



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**SİNARİT BALIĞI (*Dentex dentex*) YETİŞTİRİCİLİĞİ
YAPILAN KULUÇKALIK TANKLARINDA BAKTERİYEL
BİYOFİLM OLUŞUMU**

Emre TURGAY

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Hastalıklar Programı

Danışman

Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM

Ekim, 2015

İSTANBUL

Bu çalışma 07/10/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Hastalıklar Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Ahmet AKMİRZA
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Prof. Dr. Soner ALTUN
Uludağ Üniversitesi
Veteriner Fakültesi



Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ
Fırat Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Tülay AKAYLI
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 20950 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmamın her aşamasında verdiği destek ve yardımlardan dolayı başta çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM'a, lisansüstü eğitime kendisiyle başladığım ve her zaman manevi desteğini aldığım Sayın Prof. Dr. Akın CANDAN'a, anabilim dalımız öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Ahmet AKMİRZA, Sayın Doç. Dr. Tülay AKAYLI ve Sayın Doç. Dr. Sibel ÇOLAK'a, görüşleriyle çalışmaya yön veren Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Soner ALTUN'a, çalışma süresince bilgi ve önerilerini benden esirgemeyen değerli arkadaşım Dr. Dilek SEVER KAYA'ya, ilgi ve sabırları için çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. R. Eda YARDIMCI, Araş. Gör. Özgür ÇANAK ve Araş. Gör. Çiğdem ÜRKÜ'ye teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında bana destek olan sevgili anne ve babama, sevgili eşim Müjgan BULUT'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos, 2015

Emre TURGAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	6
2.1. DÜNYADA VE TÜRKİYE’DE AKUAKÜLTÜR.....	6
2.2. SİNARİT BALIĞI YETİŞTİRİCİLİĞİ VE HASTALIKLARI	12
2.3. BİYOFİLM TANIMI.....	16
2.4. BİYOFİLM OLUŞUMU	19
2.4.1. Tutunma Evresi	20
2.4.1.1. Geri Dönüşümlü Tutunma	20
2.4.1.2. Kalıcı Tutunma	21
2.4.2. Olgunlaşma Evresi	22
2.4.3. Dağılma (Kopma) Evresi	24
2.4.3.1. Tohumlama Tipi Dağılma	25
2.4.3.2. Kümeleşme Tipi Dağılma	25
2.4.3.3. Yüzey Tipi Dağılma	26
2.5. BİYOFİLM YAPISI VE MİMARİSİ.....	26
2.6. HÜCRE DIŞI POLİMERİK MADDE (EPS) MATRİKSİ.....	28
2.7. BİYOFİLM OLUŞUMUNU ETKİLEYEN BAZI FAKTÖRLER	31
2.8. ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA (QUORUM SENSING)	32
2.8.1. Gram Negatif Bakterilerde Çoğunluğu Algılama	33
2.8.2. Gram Pozitif Bakterilerde Çoğunluğu Algılama	36
2.9. BİYOFİLMİN BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ VE ANTİMİKROBİYAL MADDELERE DİRENCİ.....	37

2.10. BİYOFİLM VE HASTALIKLAR.....	39
2.11. KÜLTÜRDEN-BAĞIMSIZ BAKTERİYEL TEŞHİS YÖNTEMLERİ.....	44
2.11.1. DNA Dizileme ile Teşhis.....	47
2.11.2 Metagenomik Çalışmalar ve Akuakültürdeki Önemi	48
2.12. YENİ NESİL DNA DİZİLEME TEKNOLOJİSİ.....	54
2.12.1 Pirodizileme	56
2.12.2. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri Ve Kullanılan Cihazlar.....	57
3. MALZEME VE YÖNTEM	59
3.1. ÇALIŞMANIN YAPILDIĞI YER VE TARİH BİLGİLERİ.....	59
3.2. ÇALIŞMA TANKLARINDAKİ SUYUN SICAKLIK VE TUZLULUK DEĞERLERİ	59
3.3. BİYOFİLM SAPTAMA DÜZENİĞİNİN KURULUMU	59
3.4. BİYOFİLM ÖRNEKLERİNİN ALINMASI.....	61
3.5. BAKTERİYOLOJİK KÜLTÜR İLE TEŞHİS YÖNTEMİ.....	61
3.5.1. Bakteriyel Süspansiyonun Hazırlanması ve Sayımı	61
3.5.2. DNA İzolasyonu ve PCR	62
3.5.3. Dizileme	62
3.6. KÜLTÜRDEN BAĞIMSIZ TEŞHİS YÖNTEMİ.....	63
3.6.1. DNA İzolasyonu ve PCR	63
3.6.2. Pirodizileme	63
4. BULGULAR	65
4.1. BAKTERİYOLOJİK KÜLTÜR BULGULARI.....	65
4.1.1. Birinci Dönem Örneklem Bulguları.....	65
4.1.2. İkinci Dönem Örneklem Bulguları.....	67
4.1.3. Üçüncü Dönem Örneklem Bulguları	72
4.1.4. Dördüncü Dönem Örneklem Bulguları	76
4.1.5. Bakteriyolojik Kültür Bulgularının Dönemlere Göre Değişimi	80
4.2. PİRODİZİLEME BULGULARI	83
4.2.1. PCR Ürünleri Agaroz Jel Elektroforezi	83
4.2.1. Birinci Dönem Örneklem Bulguları.....	83
4.2.2. İkinci Dönem Örneklem Bulguları.....	86
4.2.3. Üçüncü Dönem Örneklem Bulguları	86
4.2.4. Dördüncü Dönem Örneklem Bulguları	88
4.2.5. Pirodizileme Bulgularının Dönemlere Göre Değişimi	92
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	95

KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ.....	130

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Yıllara göre global akuakültür üretimi miktarı.....	6
Şekil 2.2: Yıllara göre ülkemizdeki akuakültür üretimi miktarı.....	7
Şekil 2.3: Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan balık türlerinin 2009-2014 yılları arası üretim miktarı değişim grafiği.	7
Şekil 2.4: Türkiye’de üretimi yapılan yeni türler ve 2014 yılı üretim miktarları.	8
Şekil 2.5: Biyofilm oluşumunun aşamaları	19
Şekil 2.6: Olgun bir biyofilmin gelişimi ve dinamikleri.....	27
Şekil 2.7: Farklı ortamlarda oluşan biyofilmlerin form farklılıkları.....	28
Şekil 2.8: <i>Vibrio fischeri</i> ’de LuxI/LuxR çoğunluğu algılama çevrimi.....	34
Şekil 2.9: Gram pozitif bakterilerde çoğunluğu algılama çevrimi (AgrC/AgrA).....	37
Şekil 2.10: Pirodizilemenin şematik gösterimi.....	57
Şekil 3.1: Tanka sabitlenmiş çubukların görüntüsü.....	60
Şekil 4.1: Birinci dönem kültür izolatlarının profili.	67
Şekil 4.2: İkinci dönem kültür izolatlarının profili.	72
Şekil 4.3: Üçüncü dönem kültür izolatlarının profili.....	72
Şekil 4.4: Dördüncü dönem kültür izolatlarının profili.	76
Şekil 4.5: Dönemlere göre toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayısı değişimi.....	80
Şekil 4.6: <i>Pseudoalteromonas</i> cinsinin dönemlere göre değişimi.....	81
Şekil 4.7: <i>Vibrio</i> cinsinin dönemlere göre değişimi	81
Şekil 4.8: <i>Tenacibaculum</i> cinsinin dönemlere göre değişimi	81
Şekil 4.9: <i>Listonella</i> cinsinin dönemlere göre değişimi.....	81
Şekil 4.10: <i>Cobetia</i> cinsinin dönemlere göre değişimi	81
Şekil 4.11: <i>Halomonas</i> cinsinin dönemlere göre değişimi	81

Şekil 4.12: <i>Alteromonas</i> cinsinin dönemlere göre değişimi	82
Şekil 4.13: <i>Marinomonas</i> cinsinin dönemlere göre değişimi	82
Şekil 4.14: <i>Microbacterium</i> cinsinin dönemlere göre değişimi.....	82
Şekil 4.15: <i>Maribacter</i> cinsinin dönemlere göre değişimi	82
Şekil 4.16: <i>Idiomarina</i> cinsinin dönemlere göre değişimi.....	82
Şekil 4.17: <i>Colwellia</i> cinsinin dönemlere göre değişimi	82
Şekil 4.18: Kültürden bağımsız teşhis için kullanılan tüm dönemlere ait PCR ampliconlarına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	83
Şekil 4.19: Birinci dönem biyofilmi içinde dizi sayısı ≥ 10 olan cinsler.....	84
Şekil 4.20: Birinci dönemde biyofilm içinde pirodizileme ile tespit edilen tüm türler ve dizi sayıları	85
Şekil 4.21: İkinci dönem biyofilmi içinde dizi sayısı ≥ 10 olan cinsler.	86
Şekil 4.22: İkinci dönemde biyofilm içinde pirodizileme ile tespit edilen tüm türler ve dizi sayıları	85
Şekil 4.23: Üçüncü dönem biyofilmi içinde dizi sayısı ≥ 10 olan cinsler.	86
Şekil 4.24: Üçüncü dönemde biyofilm içinde pirodizileme ile tespit edilen tüm türler ve dizi sayıları	87
Şekil 4.25: Dördüncü dönem biyofilmi içinde dizi sayısı ≥ 10 olan cinsler.....	88
Şekil 4.26: Dördüncü dönemde biyofilm içinde pirodizileme ile tespit edilen tüm türler ve dizi sayıları.	91
Şekil 4.27: <i>Nannochloropsis</i> cinsinin değişim grafiği.....	92
Şekil 4.28: <i>Methylobacterium</i> cinsinin değişim grafiği.....	92
Şekil 4.29: <i>Phycisphaera</i> cinsinin değişim grafiği.....	92
Şekil 4.30: <i>Microscilla</i> cinsinin değişim grafiği	92
Şekil 4.31: <i>Tetraselmis</i> cinsinin değişim grafiği	92
Şekil 4.32: <i>Shimia</i> cinsinin değişim grafiği.....	92
Şekil 4.33: <i>Oceanicola</i> cinsinin değişim grafiği	92
Şekil 4.34: <i>Ruegeria</i> cinsinin değişim grafiği	92
Şekil 4.35: <i>Oceanobacterium</i> cinsinin değişim grafiği	93
Şekil 4.36: <i>Fluviicola</i> cinsinin değişim grafiği	93

Şekil 4.37: <i>Phaeobacter</i> cinsinin değişim grafiği	93
Şekil 4.38: <i>Donghicola</i> cinsinin değişim grafiği	93
Şekil 4.39: <i>Winogradskyella</i> cinsinin değişim grafiği	93
Şekil 4.40: <i>Roseobacter</i> cinsinin değişim grafiği	93
Şekil 4.41: <i>Sulfitobacter</i> cinsinin değişim grafiği	93
Şekil 4.42: <i>Lishizhenia</i> cinsinin değişim grafiği	93
Şekil 4.43: <i>Rhodobacter</i> cinsinin değişim grafiği	94
Şekil 4.44: <i>Parvibaculum</i> cinsinin değişim grafiği	94
Şekil 4.45: <i>Lewinella</i> cinsinin değişim grafiği	94
Şekil 4.46: <i>Marivirga</i> cinsinin değişim grafiği	94
Şekil 4.47: <i>Ochrobactrum</i> cinsinin değişim grafiği	94

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Bazı Gram negatif bakterilerde çoğunluğu algılama sinyal molekülleri ve düzenleyici proteinleri	35
Tablo 4.1: Birinci dönem biyofilm örneklerin 16S rRNA geni dizileme sonuçları.	65
Tablo 4.2: Birinci dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.....	66
Tablo 4.3: İkinci dönem biyofilm örneklerinin 16S rRNA geni dizileme sonuçları.....	68
Tablo 4.4: İkinci dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları	69
Tablo 4.5: Üçüncü dönem biyofilm örneklerinin 16S rRNA geni dizileme sonuçları.....	73
Tablo 4.6: Üçüncü dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları	74
Tablo 4.7: Dördüncü dönem biyofilm örneklerinin 16S rRNA geni dizileme sonuçları	77
Tablo 4.8: Dördüncü dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.....	78

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
16S rRNA	: 16S ribozomal RNA
2,4-DCP	: 2,4-dichlorophenol
AHL	: Açıl-homoserin lakton
AI	: Otoindükleyici
AIPs	: Otoindükleyici peptitler
APS	: Adenosine 5' phosphosulfate
ATP	: Adenozin trifosfat
CF	: Kistik fibroz
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
CLSM	: Lazer taramalı konfokal mikroskopu
EPS	: Hücre dışı polimerik madde
FISH	: Floresan <i>in situ</i> melezleme
FT-IR	: Kızılötesi spektroskopisi
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
MA	: Marine Agar 2216
O/F	: Oksidasyon/fermantasyon
PAHs	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PMNs	: Polimorfnükleer lökositler
PPI	: Pirofosfat
PTP	: PicoTiterPlate
QS	: Çoğunluğu algılama
RBC	: Dönen biyolojik disk
SEM	: Taramalı elektron mikroskopu
ssDNA	: Tek iplikli kalıp DNA
TAMB	: Toplam aerobik mezofilik bakteri
TEM	: Geçirmeli elektron mikroskopu
UV	: Morötesi

Kısaltmalar	Açıklama
bp	: Baz çifti
Gb	: Gigabaz
Mb	: Megabaz
ng	: Nanogram
Tb	: Terabaz

ÖZET

DOKTORA TEZİ

SİNARİT BALIĞI (*Dentex dentex*) YETİŞTİRİCİLİĞİ YAPILAN KULUÇKALIK TANKLARINDA BAKTERİYEL BİYOFİLM OLUŞUMU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM

Bu çalışmada, sinarit balığı (*Dentex dentex*) yetiştiriciliği yapılan kuluçkalık tanklarındaki biyofilm bakterilerinin çeşitliliği ve farklı beslenme dönemlerinde biyofilmi oluşturan bakterilerin kompozisyonundaki değişim, konvansiyonel bakteriyolojik kültür yönteminin yanı sıra pirodizilemenin kullanıldığı metagenomik bir çalışmayla tespit edilmiştir.

Konvansiyonel kültür sonrası yapılan bakteriyolojik teşhiste, *Pseudoalteromonas* sp. türlerinin tüm örnekleme dönemi boyunca biyofilm içinde baskın olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, balık patojeni olduğu bilinen ve potansiyel olarak balıklarda hastalık oluşturabilecek *Listonella anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio tapetis* ve *Tenacibaculum discolor* türleri de biyofilm içinden izole edilerek tanımlanmıştır. Bu patojen bakterilerin biyofilm içinde sadece kültür ile çoğaltıldıklarında tespit edilebilecek düzeyde düşük sayılarda bulunduğu sonucuna varılmıştır. Diğer taraftan kültürden-bağımsız metagenomik yaklaşımın cins çeşitliliğini daha fazla üye ile ortaya çıkardığı görülmüş ve *Methylobacterium*, *Phycisphaera*, *Microscilla*, *Shimia*, *Ruegeria*, *Fluviicola*, *Phaeobacter*, *Donghicola*, *Winogradskyella*, *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Lishizhenia*, *Rhodobacter*, *Parvibaculum*, *Lewinella*, *Marivirga* ve *Ochrobactrum* cinslerine ait bakteriler biyofilm içinde tespit edilmiştir. Bu önemli fark, modern kültürden-bağımsız yöntemlerin kullanımının önemini ortaya koymuş ve sonuçların sadece kültür edilebilen bakterilerden oluşmasını önleyerek kuluçkalık tanklarındaki biyofilmin gerçek kompozisyonunu çok daha nesnel bir şekilde ortaya çıkarmıştır. Akuakültür sistemlerinde biyofilm oluşumu ve kompozisyonuyla ilgili olarak daha önce yapılmış çeşitli metagenomik çalışmalar olmakla birlikte, bu çalışma mevcut literatürde sinarit balıkları yetiştiriciliğinde yapılmış ilk biyofilm çalışmasıdır. Bu nedenle bu çalışmanın biyofilmlerle ilgili mevcut bilgi ve sinarit balığı yetiştiriciliğinin erken evrelerindeki kayıpların azaltılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Ekim 2015, 141 sayfa.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, pirodizileme, sinarit, dentex

SUMMARY

Ph.D. THESIS

BACTERIAL BIOFILM FORMATION IN COMMON DENTEX (*Dentex dentex*) HATCHERY TANKS

Emre TURGAY

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Aquaculture

Supervisor : Prof. Dr. Süheyla KARATAŞ STEINUM

In this study, the diversity of biofilm bacteria in common dentex (*Dentex dentex*) hatchery tanks and the biofilm's compositional change in response to different feeding regimes, were investigated both by conventional bacteriological culturing as well as through a metagenomics approach using pyrosequencing.

According to bacterial identification after conventional culturing, the biofilm samples were dominated by *Pseudoalteromonas* species throughout the sampling period. However, some bacterial species known as fish pathogens and potentially disease-causing bacteria such as *Listonella anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio tapetis* and *Tenacibaculum discolor* were also isolated and identified. Such disease causing bacteria may be present in so low numbers that they are only identifiable through culture enrichment. On the other hand, the culture-independent metagenomics approach revealed a much wider diversity with members from many genera including *Methylobacterium*, *Phycisphaera*, *Microscilla*, *Shimia*, *Ruegeria*, *Fluviicola*, *Phaeobacter*, *Donghicola*, *Winogradskyella*, *Roseobacter*, *Sulfitobacter*, *Lishizhenia*, *Rhodobacter*, *Parvibaculum*, *Lewinella*, *Marivirga* and *Ochrobactrum*. This significant difference illustrated the importance of using additional modern culture-independent methodology to avoid bias towards culturable bacteria thus revealing a more objective picture of the hatchery tank biofilm real composition. The formation and composition of biofilm communities in aquaculture systems has previously been investigated by metagenomics, but to the best of our knowledge this is the first biofilm study related to common dentex culture. This work will therefore contribute to current biofilm knowledge and may ultimately be of help to reduce losses during the early critical stages of common dentex rearing.

October 2015, 141 pages.

Keywords: Biofilm, pyrosequencing, dentex

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar, mikrobiyoloji tarihinin büyük çoğunluğunda planktonik ve serbestçe asılı duran hücreler olarak karakterize edilmiş ve besin ögeleri açısından zengin kültür ortamlarında, üreme özellikleri temel alınarak tanımlanmışlardır. Ancak sonraki dönemlerde yapılan çalışmalarla, su ortamı da dahil olmak üzere doğadaki bakterilerin baskın olarak planktonik değil, yüzeyler üzerinde bulunduğu sonucuna varılmıştır (Henrici, 1933; Geesey ve diğ., 1977).

Yapılan çalışmalarda biyofilmlerin özellikle hidrotermal ortamlardaki fosil kayıtlarında bulunduğu dair kanıtlara rastlanmıştır. Güney Afrika'da yapılan bir çalışmada biyofilm olduğu düşünülen ve morfolojik yapılarına göre tespit edilmiş 3,3-3,4 milyar yaşında mikrokoloniler tespit edilmiştir (Westall ve diğ., 2001). Benzer şekilde Avustralya'da derin deniz hidrotermal kayalarında yapılan bir başka çalışmada da 3,2 milyar yaşında ipliksi yapıdaki biyofilmler tespit edilmiştir (Rasmussen, 2000). Benzer biyofilm yapıları günümüzün kaplıca (Reysenbach ve Cady, 2001) ve derin deniz bacaları (Taylor ve diğ., 1999) gibi modern zamanın hidrotermal ortamlarında da bulunabilmektedir. Bir başka bulgu olarak biyofilm oluşumu, yaşayan fosil olarak adlandırılabilen Archaea, Korarchaeota ve Aquificales gibi organizmalarda da karakteristiktir (Reysenbach ve diğ., 1999; Jahnke ve diğ., 2001).

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, biyofilmlerin aslında prokaryotların çok eski ve ayrılmaz bir parçası olduğu sonucu çıkmaktadır. Evrimsel süreç bağlamında düşünüldüğünde ise biyofilmlerin muhtemel olarak ilkel dünyanın aşırı uç sıcaklıkları ve pH değerleri, UV maruziyeti gibi çetin ve sürekli değişen koşullarına karşı mikroorganizmalarda homeostazı sağladıkları düşünülmektedir (Hall-Stoodley ve diğ., 2004).

Antonie van Leeuwenhoek, basit yapılı mikroskobu ile ilk olarak dış yüzeyindeki mikroorganizmaları incelemiştir, bu nedenle mikrobiyal biyofilmleri ilk keşfeden kişi olarak tanımlanmıştır (Donlan, 2002).

Heukelekian ve Heller (1940), bakteriyel üremede yüzey ve besin konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmada bakterilerin yüzeyler üzerinde ya bakteriyel yapışkan tabaka (slime layer) oluşturarak ya da koloni şeklinde ürediklerini gözlemlemişler ve yüzey üzerinde biyolojik olarak aktif bir tabaka oluşturulmasıyla birlikte bu bölgedeki biyolojik reaksiyonların da büyük ölçüde arttığı sonucuna varmışlardır.

Katı yüzeylerin bakteriyel aktivite üzerindeki etkilerini inceleyen Zobell (1943), besleyici elementlerin seyreltik bir halde bulunduğu deniz ortamındaki organik maddelerin katı yüzeyler üzerine adsorpsiyonu neticesinde yüzey üzerindeki besin maddelerinin, kendisini çevreleyen su ortamına göre çok daha konsantre hale geldiğini ve bunun da bakteriyel aktiviteyi arttırdığını tespit etmişlerdir.

Biyofilmle ilgili çalışmalarda elektron mikroskobunun kullanılmaya başlanmasıyla birlikte ışık mikroskobuna oranla elde edilen görüntülerde çok daha yüksek çözünürlük ve büyütme sağlanmış ve biyofilmle ilgili detaylı bilgiler edinilmeye başlanmıştır. Jones ve diğ. (1969), taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscope - SEM) ve geçirmeli elektron mikroskobu (transmission electron microscope - TEM) ile yapışkan tabakayı inceledikleri çalışmada, yapışkan tabakanın bakterilerin etrafında geliştiği ve bakterileri çevreleyen bir yapıda olduğunu gözlemlemiştir. Aynı çalışmada bu materyalin spesifik boyalarla boyanması sonucunda polisakkarit-benzeri bir yapıda olduğu gösterilmiştir.

Tüm bu tarihsel süreçte, biyofilmlerin sadece bir yüzeye saplanmış pasif hücre toplulukları değil yapısal ve dinamik olarak karmaşık biyolojik sistemler olduğu ve bulundukları yüzeyle çok çeşitli yönlerden ilişki içinde oldukları gösterilmiş ve biyofilm mikroorganizmalarının bir yüzeye ilk tutunmayı sağlamak, topluluk yapısı oluşturmak ve topluluktan ayrılmak için spesifik mekanizmalar geliştirdiği ortaya çıkarılmıştır (O'toole ve diğ., 2000; Donlan, 2002).

Ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde balık yetiştiriciliği çoğunlukla levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) türlerinin kültürü üzerine yoğunlaşmış olmakla birlikte, hem yetiştiricilikte gözlenen büyük miktardaki artış neticesinde üretilen balıkların pazarlanmasıyla ilgili sorunların yaşanması hem de akuakültür sektörüne yeni bir ivme kazandırabilmek amacı, ekonomik değeri yüksek yeni türlerin üretimini gündeme getirmiştir. Özel sektörde son yıllarda çipura ve levrek üretiminin yanında yeni türler

olarak; sinarit (*Dentex dentex*), fangri (*Pagrus pagrus*), granyöz (*Argyrosomus regius*), sivriburun karagöz (*Diplodus puntazzo*), kalkan (*Psetta maxima*), minekop (*Umbrina cirrosa*), eşkina (*Sciaena umbra*), orkinos (*Thunnus thynnus*) ve çizgili mercan (*Pagrus auriga*) balıkları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Ancak yeni türlerin yetiştirilmesindeki en önemli problemin, yetiştiriciliğin erken dönemlerinde fırsatçı patojenlerin neden olduğu ölümler olduğu belirtilmektedir (Shields, 2001; Kaiser ve Stead, 2002; Memis ve diğ., 2002; Harlioğlu, 2011).

Günümüzde gerek rutin kültürü yapılan türlerde gerekse alternatif türlerin deniz balıkları yetiştiriciliğinde başarı elde edilmesindeki en kritik faktörün juvenil balık temininin sağlanabilmesi olduğu anlaşılmaktadır. Bazı türlerde juvenil balık kaynağı doğadan avlama/yakalama şeklinde sağlanmakla birlikte, Avrupa’da yetiştiriciliği yapılan deniz balıkları üretiminde bu kaynak tümüyle kuluçkahanelerden sağlanmaktadır. Bu nedenle toplam balık üretim miktarını, kuluçkahanelerde üretilen larvaların hayatta kalım oranı ve gelişim performansı belirlemektedir (Planas ve Cunha, 1999).

Kültür balıkçılığında yetiştiriciliğin erken döneminde hastalıklar sonucu meydana gelen mortalite, üretim süresince oluşan ekonomik kayıpların en önemli bölümünü oluşturmaktadır. Deniz balıklarının üretiminin yapıldığı su ortamı, içerdiği besin tuzları ve organik maddeler bakımından bakterilerin gelişmesi için ideal bir besi yeri olduğundan, bakteriler su ortamında bol miktarda bulunmaktadır. Çok yoğun olarak inkübatörlerde açılmaya bırakılan balık yumurtalarının yüzeyi, döllenmeden sonraki birkaç saat içinde bakterilerle kaplanmaktadır. Bu dönemde yumurta zarının yüzeyinde bulunan bakterilerin, suda bulunan bakteri içeriğini yansıttığı bilinmektedir. Erken larval evrede, suda bulunan mikrobiyal floranın belirlenmesi, bu evrede gözlenen mikrobiyal yıkımın kontrolünü sağlayabilecek müdahalelerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Bu nedenle son yıllarda araştırmacılar gerek larvanın gerekse larvanın yaşadığı ortam olan suyun bakteriyel florası ile ilgili araştırmalar yapmaktadırlar (Planas ve Cunha, 1999; Olafsen, 2001; Nayak, 2010).

Biyofilmlerin; doğal-yapay, sıcak-soğuk, asidik-bazik, aşırı uç şartlara sahip yerler de dahil olmak üzere hemen hemen her türlü yüzeyde gelişebilen mikrobiyal topluluklar oldukları bilinmektedir. Kültür balıkçılığında da biyofilmlerin gelişebilmesi için pek çok elverişli ortam bulunmaktadır: Akuakültür sistemlerinde kullanılan biyolojik filtrelerde, tank

eperlerinde, boruların içinde, yüzer kafeslerin yüzeyinde, ağ, halat, eldiven ve benzeri ekipmanlarda, kapalı devre yetiştiricilik sistemi bileşenleri gibi pek çok yerde biyofilmler gelişebilmektedir (Braithwaite ve Mcevoy, 2004).

Bakterilerin kendi ürettikleri kimyasal sinyallerle birbirleriyle iletişim kurdukları ve mikrobiyal aktivitelerini buna göre düzenledikleri yapılan pek çok çalışmayla ortaya çıkarılmıştır. oğunluğu algılama (quorum sensing) denen bu sistemle bakteriler; biyofilmi nasıl geliştireceklerini, biyofilmin hangi mikrobiyal popülasyona sahip olacağını ve önemli bir virlans faktörü de olan mikroorganizmaların biyofilmden ne zaman ayrılacaklarını belirleyebilmektedirler (Parsek ve Greenberg, 1999).

Biyofilmlerin, kendisini oluşturan mikroorganizmalar için pek çok avantaj sağladığı da bilinmektedir. Planktonik olanlara kıyasla biyofilm içindeki mikroorganizmalar; entansif kültür balıkçılığında da profilaktif veya tedavi amaçlı olmak üzere kullanılan UV ışını, ozon gibi uygulamalara, fiziksel temizlik uygulamalarına, antimikrobiyal kimyasallara ve antibiyotiklere karşı çok daha fazla direnç göstermektedirler (Costerton ve diğ., 1999).

Tüm bu nedenlerden dolayı biyofilmler, içinde barındırma potansiyeli taşıdıkları patojenler açısından kültür balıkçılığı için risk teşkil etmektedirler. Diğer canlı gruplarında yapılan çalışmalarda biyofilm içindeki patojenlerin ciddi hastalıklara neden olduğu, hatta insan hekimliğinde yapılan çalışmalarda bazı hastalıkların sadece biyofilm kaynaklı olduğu ve bunların içindeki bir kısım hastalığın tedavisinin tam olarak başarısız olduğu veya uzun süreli tedavi gerektirdiği bilinmektedir (Adal ve Farr, 1996; Costerton ve diğ., 1999; Hall-Stoodley ve diğ., 2004; Fux ve diğ., 2006).

Biyofilmlerin akuakltrdeki bu olumsuz etkilerine karşılık, bazı çalışmalarda biyofilmlerin kültürü yapılan türler için olumlu etkiye sahip olabileceği de gösterilmiştir. *Palaemon macrodactylus* ile yapılan bir çalışmada, karides yumurtalarının üzerini kaplayan ve tek türden oluşmuş biyofilm tabakasının antibiyotik kullanımıyla baskılandığında, yumurtaların kabuklu patojeni mantarlara duyarlı hale gelerek enfeksiyon nedeniyle öldüğü tespit edilmiştir (Gil-Turnes ve diğ., 1989). Benzer durum ıstakozlarda mantar enfeksiyonuna karşı (Gil-Turnes ve Fenical, 1992) ve kabuklularda *Vibrio alginolyticus* ve *Vibrio anguillarum* bakterilerine karşı da gözlenmiştir (Riquelme ve diğ., 1997).

Günümüzde doğada bulunan bakterilerin %1 ve daha az oranda olmak üzere çok küçük bir kısmının laboratuvar şartlarında üretilbildiği, bu nedenle çeşitlilik çalışmalarında mevcut flora hakkında kültür temelli tekniklerin çeşitlilikle ilgili kısıtlı bilgi verebildiği bilinmektedir (Amann ve diğ., 1995). Biyofilm gibi karmaşık ve çoğunlukla çok sayıda farklı türden oluşan mikrobiyal toplulukların incelenmesinde, konvansiyonel bakteriyolojik kültür tabanlı yaklaşımlar, yerini kültüre ihtiyaç duymayan kültürden-bağımsız tekniklere bırakmıştır.

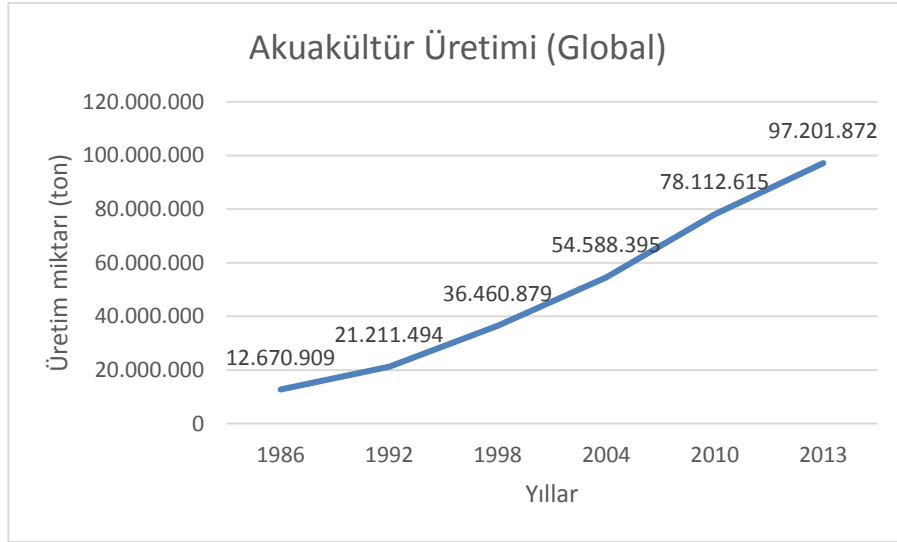
Bu çalışmanın amacı, kültür balıkçılığında yeni türlerden olan sinarit balığı (*Dentex dentex*) yetiştiriciliği yapılan kuluçkalık tanklarındaki biyofilm oluşturan bakterilerin mikrobiyal çeşitliliğini saptamak ve farklı beslenme dönemlerinde biyofilmi oluşturan bakterilerin kompozisyonundaki değişimi hem konvansiyonel bakteriyolojik kültür yöntemiyle hem de moleküler teşhis yöntemlerinden olan yeni nesil dizileme teknolojilerinden pirodizilemenin kullanıldığı metagenomik bir çalışmayla tespit etmektir.

Akuakültür sistemlerinde ve yetiştiricilik yapılan türlerde biyofilm oluşumu ve kompozisyonu ile ilgili olarak yapılmış çeşitli metagenomik çalışmalar olmakla birlikte (Van Kessel ve diğ., 2011; Auffret ve diğ., 2013; Martins ve diğ., 2013; Zarkasi ve diğ., 2014), sinarit balıkları yetiştiriciliğinde biyofilmlerle ilgili olarak ülkemizde ve yurt dışında yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın, hem sinarit balığı yetiştiriciliğinin erken evrelerindeki biyofilm oluşumu ve kompozisyonunun belirlenmesiyle sinarit balığı yetiştiriciliğine hem de mevcut bilimsel literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. DÜNYADA VE TÜRKİYE’DE AKUAKÜLTÜR

Dünya akuakültür üretiminin yıllara göre değişimi incelendiğinde 1980’li yıllardan günümüze kadar olan süreçte üretim miktarının devamlı arttığı görülmektedir. 1986 yılında global akuakültür üretimi 12.670.909 ton iken, 2013 yılında bu değer yaklaşık %762 artış ile 97.201.872 tona ulaşmıştır (FAO, 2015) (Şekil 2.1).



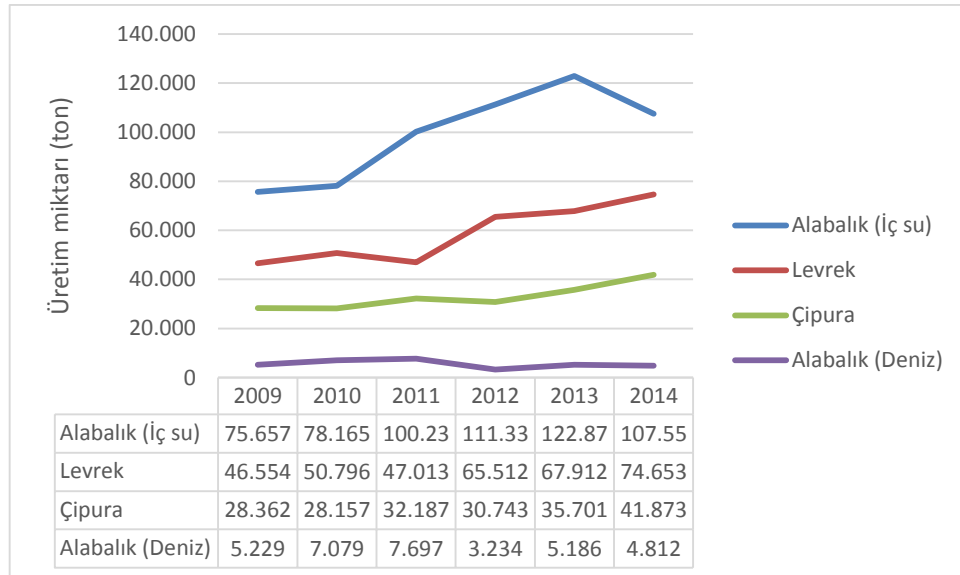
Şekil 2.1: Yıllara göre global akuakültür üretimi miktarı (FAO, 2015).

Türkiye’de akuakültür üretimine ait istatistik bilgilerine bakıldığında ise üretim miktarının, global akuakültür üretim artışına göre çok daha fazla bir oran ile arttığı görülmektedir; 1986 yılında 3.075 ton olan üretim 2014 yılında 235.133 tona yükselmiştir (TÜİK, 2015) (Şekil 2.2).

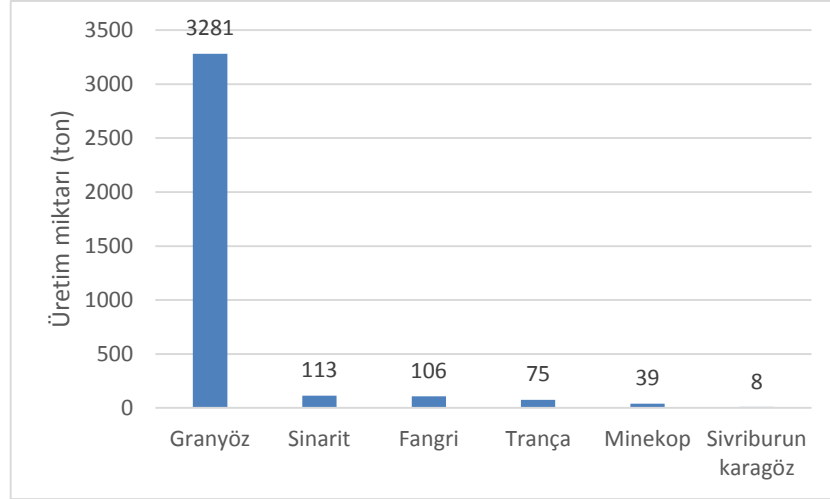


Şekil 2.2: Yıllara göre ülkemizdeki akuakültür üretimi miktarı (FAO, 2015).

Ülkemizde deniz balıkları yetiştiriciliği ağırlıklı olarak levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) türleriyle yapılmakla birlikte; son yıllarda fangri (*Pagrus pagrus*), minekop (*Umbrina cirrosa*), granyöz (sarı ağız) (*Argyrosomus regius*), sinarit (*Dentex dentex*), sivriburun karagöz (*Diplodus puntazzo*) ve trança (antenli balık) (*Dentex gibbosus*) gibi yeni türlerin üretimi de düşük üretim kapasitesine sahip bir şekilde yapılmaktadır (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). İsmi verilen yeni türlerin TÜİK tarafından istatistik verisi ilk defa 2014 yılında toplanmaya başlanmıştır.



Şekil 2.3: Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan balık türlerinin 2009-2014 yılları arası üretim miktarı değişim grafiği (TÜİK, 2015).



Şekil 2.4: Türkiye’de üretimi yapılan yeni türler ve 2014 yılı üretim miktarları (TÜİK, 2015).

Tarihsel veriler incelendiğinde dünya nüfusunun 14. yüzyıldan itibaren sürekli bir büyüme içinde olduğu görülmektedir. Birleşmiş Milletler Ekonomik ve Sosyal Konseyi (ECOSOC) tarafından yayımlanan raporda, Temmuz 2015 tarihinde dünya nüfusunun 7,3 milyar kişi olduğu hesaplanmıştır (United Nations, 2015). Aynı raporda yapılan tahminlere göre bu sayının 2030 yılında 8,5 milyar, 2050 yılında 9,7 milyar ve 2100 yılında 11,2 milyara ulaşacağı belirtilmiştir.

Dünya nüfusun devamlı artmasına karşın gıda miktarının aynı oranda artmıyor olması nedeniyle günümüzde dünyanın birçok bölgesinin yeterli besin temininden yoksun olduğu bilinmektedir. Diouf (2009) popülasyonun bu hızlı artışının yanında şehirleşmenin de yaygınlaşmasıyla birlikte hem besin öğelerince daha zengin hem de yüksek kalitede gıdalara ihtiyacın gün geçtikçe artacağını belirtmiştir.

Türlere göre değişkenlik göstermekle birlikte akuakültür üretimi olan balık ve yumuşakçaların genel olarak besin öğeleri açısından zengin olmasının yanında, balık etinin hem dengeli bir amino asit kompozisyonuna sahip olduğu hem de kolay sindirilebilir özellikte olduğu bilinmektedir (Gjedrem ve diğ., 2012). Balıklar, içerdikleri yağ asitleri ve mikro besin öğeleri açısından da sağlıklı olarak nitelendirilmektedir (Mcmanus ve Newton, 2011).

Balık ve sığır eti karşılaştırıldığında; protein ve karbonhidrat değerleri bakımından bu iki hayvansal besinin birbirine yakın değerlere sahip olmakla birlikte, yağ oranı açısından ele alındığında balık etinin çok daha az yağ içerdiği görülmektedir. Benzer şekilde balık eti,

amino asit kompozisyonu bakımından da sığır etine yakın değerler içermektedir (Friedman, 1996). Bunlara ek olarak balıklar, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve yüksek doymamış yağ asitlerini (HUFA) bol miktarda içermesiyle, gıda olarak tüketilen diğer et gruplarından ayrılmaktadırlar. Balık etinin özellikle çoklu doymamış yağ asitleri sınıfından omega-3 yağ asitlerinden eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) için zengin bir kaynak olduğu bilinmektedir (Abbas ve diğ., 2009).

Su ürünlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinden omega-3'ün çeşitli hastalıklara karşı olumlu yönde etkisinin olduğuna dair çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu olumlu etki en tutarlı olarak hem genetik hem de edinsel olmak üzere karmaşık bir etiyolojiye sahip olan kardiyovasküler hastalıklarda gözlenmiştir. Balık tüketen ve tüketmeyen insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, balık tüketicilerinde ortalama HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein) konsantrasyonunun balık tüketmeyen kesime göre yüksekken, kardiyovasküler hastalıklarda risk faktörü olarak değerlendirilen ortalama LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) değerlerinin balık tüketmeyen kesime göre düşük olduğu gözlenmiştir (Bulliyya, 2002; Dewailly ve diğ., 2003). Benzer şekilde Hu ve diğ. (2002), 84.688 kadın hemşire üzerinde 16 yıllık bir izleme programından sonra, omega-3 yağ asitlerinin yüksek miktarda tüketiminin kardiyovasküler hastalık riskini ve bu hastalıktan meydana gelen ölümleri azalttığı sonucuna varmıştır.

Kardiyovasküler hastalıklar dışında, omega-3 yağ asitlerinin çeşitli bağışıklık düzenleyici (immünomodülatör) etkisinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalardan enflamatuvar bağırsak hastalığı (Lorenz ve diğ., 1989; Aslan ve Triadafilopoulos, 1992), astım (Thien ve diğ., 2002), kistik fibroz (Oliver ve diğ., 2007) ve romatoid artrit (Cleland ve diğ., 2003) hastalıklarında yapılan çalışmalarda, kardiyovasküler hastalıklardaki kadar kuvvetli olmamakla birlikte omega-3 yağ asitleriyle hastalıkların önlenmesinde ve/veya bulguların giderilmesinde çeşitli düzeylerde olumlu yönde bir ilişki kurulmuştur.

Dünya genelinde 1 milyar kadar insan, hayvansal protein ihtiyacını birincil olarak balıktan karşılamaktadır (Sihag ve Sharma, 2012). FAO verilerine göre toplam hayvansal proteini balıktan edinme oranı; Asya kıtasında %26,2, Afrika kıtasında %17,4, Avrupa kıtasında %9,2 ve Amerika kıtasında %7,4 olarak hesaplanmıştır (FAO, 2012). Kişi başına su ürünleri tüketimi ise Kuzey Amerika'da 24,1 kg ve Avrupa'da 22 kg iken; ülkemizde kişi

başına su ürünleri tüketiminin son 10 yıllık verisi incelendiğinde, tüketim miktarının yaklaşık olarak yıllık 6,5 kg ile 8,5 kg arası değiştiği ve hayvansal proteini balıktan edinme oranının ise %5,3 olduğu görülmektedir (FAO, 2012; TÜİK, 2015).

Hem yerel hem de global düzeyde ele alındığında balıkçılık ve akuakültürün; besin sağlama, gıda güvencesi ve gelir üretimi gibi konularda çok önemli bir role sahip olduğu istatistik verilerinin incelenmesiyle anlaşılmaktadır. Günümüzde yaklaşık 43,5 milyon insanın bu sektörde doğrudan çalıştığı; işleme, pazarlama, dağıtım vb. dolaylı yollarla çalışan insanların da dahil edilmesiyle birlikte balıkçılık ve akuakültür sektörünün yaklaşık 200 milyon insan için geçim kaynağı olduğu belirtilmektedir. Hem avlama yoluyla yapılan balıkçılık hem de akuakültür sektörü, iklim değişikliğinin olumsuzluklarından farklı yönlerden etkilenmektedirler (Cochrane ve diğ., 2009).

İklim değişikliğinin insan topluluğuna ve doğal ekosisteme tehdidine yönelik ilgi, 2007 yılında Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli (IPCC) Dördüncü Değerlendirme Raporu'nun yayımlanmasıyla zirve noktasına ulaşmıştır. Balıkçılık ve akuakültür sektörü sera gazı emisyonuna düşük de olsa katkıda bulunmakla birlikte, bu etkileri azaltmaya yönelik bazı fırsatları da içinde barındırmaktadır.

Handisyde ve diğ. (2006) iklim değişikliğinin etkileyebileceği fiziksel değişiklikleri sıcaklıktaki değişiklikler, Güneş ışınlamındaki değişiklikler, deniz seviyesinin yükselmesi ve dalga ve akıntılardaki değişiklikler olarak belirtmiş ve bu değişikliklerin akuakültürde fizyolojik, ekolojik ve operasyonel işlemler üzerinde etkilerinin olacağı sonucuna varmıştır.

De Silva ve Soto (2009) yaptıkları çalışmada, akuakültürü etkileyebilecek başlıca iklim değişikliklerini; küresel ısınma, deniz seviyesinin yükselmesi, okyanuslardaki üretkenliğin ve dolaşım modellerindeki değişimler, musonlardaki değişimler ve su stresi olarak belirtmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar, insan tüketimi için yetiştirilen akuakültür canlılarının diğer çiftlik hayvanlarından farklı olarak poikiloterm canlılar olduklarını ve bulundukları ortamdaki sıcaklıktaki çok küçük değişimlerin bu canlıların metabolizmasını doğrudan etkileyeceğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde değişik tuzluluk oranına sahip sularda metabolik aktivitelerini gerçekleştiren hayvanların da bu değişimlerden doğrudan etkileneceklerini belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca iklim değişikliklerinden bir diğeri olan su stresinin akuakültür üzerinde önemli etkileri olacağını ve özellikle başlıca akuakültür

üretimi yapılan bölgeleri içeren Asya'nın merkezi, güney, doğu ve güneydoğu kesimleri ile Afrika'nın en çok etkilenecek bölgeler olacağı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada gelecekte daha yoğun bir şekilde yaşanacak olan su stresi düşünülerek, gelecekteki en uygun üretim sisteminin kapalı devre yetiştiricilik sistemleri (RAS) olacağı sonucuna varılmıştır.

Kapalı devre yetiştiricilik sistemlerinin mikrobiyolojik özelliklerinin; yem türü ve besleme rejimi, balık kaynaklı mikroflora, su parametreleri ve biyolojik filtre gibi değişkenler ile belirlendiği bilinmektedir. Kapalı devre sistemlerde balık sağlığının korunması, yetiştiricilik su parametrelerinin uygun olmasının yanında sistemde kolonize olan mikrobiyal toplulukların etkili bir şekilde yönetimine bağlı olmaktadır (Michaud ve diğ., 2009; Schreier ve diğ., 2010; Attramadal ve diğ., 2012). Kapalı devre sistemleri, entansif besleme rejimi uygulanmasından dolayı balık beslemede kullanılan yemlerden kaynaklı olarak yüksek miktarda organik madde içermektedir ve bu organik maddenin sistem içinde işlenmesinde başlıca etkinlik bakteriler tarafından sağlanmaktadır. Etkili, üretken, biyolojik olarak güvenli ve hastalıklara neden olmayan kapalı devre yetiştiricilik sistemlerinin elde edilmesi için bu tip sistemlerdeki mikrobiyal yaşamın iyi bir şekilde anlaşılması ve bu mikrobiyal toplulukların fiziksel ve biyolojik filtrasyon sistemlerine bağlılıklarının iyi bir şekilde anlaşılması gerekmektedir (Blancheton ve diğ., 2013).

Günümüzde kapalı devre yetiştiricilik sistemlerindeki mikrobiyal toplulukların belirlenmesinde kültür tabanlı yöntemler yerine, 16S rRNA veya fonksiyonel gen-spesifik proplar gibi kültürden bağımsız teknikler kullanılmaktadır (Schreier ve diğ., 2010). Bu sistemlerdeki mikrobiyal topluluklar sistem içindeki balığın türüne ve yetiştiricilik yapılan bölgeye göre değiştiği için, kapalı devre yetiştiricilik sistemlerindeki suyun ve biyolojik filtrelerin mikrobiyal kompozisyonu da sistemden sisteme büyük farklılıklar sergileyebilmektedir (Sugita ve diğ., 2005).

Biyofilmlerin, topluluğu oluşturan üyelerin fizyolojik gereksinimlerine göre biyofilm içinde farklı katmanlara yerleştiği karmaşık yapılar olduğu ve tüm akuakültür sistemlerinde ve bileşenlerinde oluşabildiği bilinmektedir. Kapalı devre sistemlerde biyofilm içinde bulunan ve hastalıklar açısından zararsız kabul edilebilecek heterotrof ve ototrof bakterilerin yanı sıra, antibiyotik kullanımının çok kısıtlı olduğu bu tür sistemlerde dezenfeksiyon işlemlerine dayanıklı patojenik bakteriler de bulunabilmektedir (Blancheton ve diğ., 2013).

King ve diğ. (2004) 9 adet kapalı devre yetiştiricilik sistemindeki fiberglas, plastik, PVC, cam, paslanmaz çelik, kauçuk, alüminyum, strafor ve beton üzerindeki biyofilm içinde bulunan patojen bakterileri standart bakteriyolojik yöntemler ve ticari kitler ile inceledikleri çalışmada, malzemeler üzerinden *Photobacterium damsela*, *Vibrio* sp. ve *Aeromonas hydrophila* bakterilerini izole ettiğini rapor etmiştir. Benzer şekilde Michaud ve diğ. (2009) deniz kapalı devre yetiştiricilik sisteminde *Vibrio* sp., *Erwinia* sp. ve *Coxiella* sp. türlerini; Martins ve diğ. (2013) ise kalkan ve dil balıkları kapalı devre sisteminde *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum discolor*, *Tenacibaculum soleae* ve *Serratia marcescens* türlerini tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

2.2. SİNARİT BALIĞI YETİŞTİRİCİLİĞİ VE HASTALIKLARI

Sinarit balıkları (*Dentex dentex*), doğal ortamlarında dibi kayalık bölgelerde yaşayan demersal, karnivor bir balıktır. Denizlerde genellikle 15-20 m derinliklerde bulunmakla birlikte bu derinliğin 150 m'ye kadar ulaşabildiği bilinmektedir. Sinarit balıkları 100 cm maksimum uzunluğa ve 12 kg ağırlığa kadar ulaşabilmekte ancak doğadan yakalanan örneklerin boyları genellikle 50 cm'nin üzerine çıkmamaktadır (Abellán, 2000). Sinarit balıkları, diğer Sparidae familyasına ait bireylerdekine benzer şekilde uzun, yüksek ve oldukça düz bir vücuda, güçlü ve yassı bir baş kısmına sahip olmaktadır. Diğer *Dentex* türlerinden, bu türlere göre oldukça küçük çapa sahip gözlere ve yan çizgi sistemindeki 60-68 pula sahip olmaları ile ayrılmaktadırlar (Rueda ve Martínez, 2001).

Doğal ortamlarında Nisan ile Haziran ayları arasında üreyen sinarit balıklarının, Akdeniz havzasının tamamında ve Atlas Okyanusu'nda Biscay Körfezi'nden Senegal'e kadar olan kesiminde dağılım gösterdikleri tespit edilmiş olmakla birlikte (Abellán, 2000) popülasyon yoğunluklarının göreceli olarak yoğun ve kararlı olduğu kesimin orta ve güney Akdeniz olduğu belirlenmiştir (Rueda ve Martínez, 2001).

Sinarit balıkları gonokoristik türler olup bazı türlerinde hermafroditizm görülebilmektedir. Bireylerin seksüel olgunluğa sahip olmaları ve ilk üremenin görülmesi, vücutlarının yaklaşık 920 g ağırlığa eriştikleri 2 ile 4 yaş arasında gözlenmektedir. Sinarit balıklarının maksimum yaşam ömürlerinin 20 yıl kadar olduğu düşünülmektedir (Riera ve diğ., 1993; Morales-Nin ve Moranta, 1997; Abellán, 2000).

Sinarit balığı yumurtalarının morfolojik olarak diğer Sparidae ailesi üyeleri ile benzer olduğu gözlenmiştir: Yumurtalar yaklaşık olarak 938–1089 µm çapında olup yağ damlası çapı ise yaklaşık olarak 217–258 µm çapında olmaktadır. Yetiştiriciliğinde döllenmeyi takiben yüzer tipteki yumurtalar toplanmakta ve inkübasyona bırakılmaktadır (Rueda ve Martínez, 2001). Çeşitli araştırmacılar tarafından farklı inkübasyon sıcaklıkları denenmiş olmakla birlikte, Saka ve diğ. (2004) yaptıkları çalışmada optimal sıcaklık aralığının 16-18 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Yetiştiricilik sistemlerinde sinarit balıkları, prelarva dönemini takiben ağız açıklığının görülmesiyle birlikte (16-18 °C sıcaklık aralığında yaklaşık 4. gün) sırasıyla rotifer (*Brachionus* sp.) (7-15 rotifer/ml), *Artemia* sp. ve toz yem ile besleme yapılmaktadır (Rueda ve Martínez, 2001; Suzer ve diğ., 2006).

Sinarit balıklarının larval evre süresince spesifik büyüme oranlarının (SGR), özellikle çipura balığı gibi diğer Sparidae üyeleriyle karşılaştırıldığında yüksek olduğu, bunun yanı sıra diğer Sparidae üyelerinin üretiminde kullanılan tekniklerin sinarit balıklarına uygulanabilmesinin ve bu uygulamalarla esaret altında üremesinin kolay oluşunun, toz yeme adaptasyonun yüksek olmasının, hem larval hem de ön büyütme evrelerindeki yüksek spesifik büyüme oranlarına sahip olmasının bir sonucu olarak rutin kültürü yapılan türlerin yanında kuvvetli bir alternatif teşkil ettiği bildirilmiştir (Abellán, 2000).

Sinarit balığı üretiminde endüstriyel boyutta üretimi olumsuz yönde etkileyen en önemli sorun, larval ve post-larval evredeki yüksek mortalite oranı olmaktadır. Üretimde görülen patolojiler ve buna bağlı olarak gözlenen mortalitenin sebepleri çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir.

Franicevic (1991) sinarit balıklarının larval ve juvenil evrelerinde oldukça agresif tavırlar sergilemelerinin bu dönemde gözlenen mortalitede etkili olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde Rueda ve Martínez (2001) büyütme tanklarında küçük bireylerin büyük bireyler tarafından çok sık bir şekilde saldırıya uğradıklarını ve bu saldırı davranışının esas nedenin türe ait bu agresif tavır olduğunu belirtmiştir. Agresif tutumla ilgili olarak yapılan bir çalışmada, yarı-yaş yemle beslenen bireylerin kuru yemle beslenen bireylere göre daha az agresif tavırlar sergiledikleri gözlenmiştir (Efthimiou ve diğ., 1994). Sinarit kültüründe ilk evrelerde görülen mortaliteye ilişkin Glamuzina ve diğ. (1989) yaptıkları çalışmada, mortalitenin canlı yem sayısının az olmasından kaynaklandığını, Pastor ve diğ. (1995) ise

genel kültür koşullarının ve yetersiz beslenmenin mortaliteye neden olan esas etken olduğunu belirtmişlerdir. Sinarit balıklarının ayrıca manipölasyon kaynaklı strese karşı da yüksek oranda hassas oldukları rapor edilmiştir (Franicevic, 1991).

Company ve diğ. (1999) aynı çiftlikten 175 adet kültür sinarit balığını bakteriyel ve paraziter ajanlar açısından incelemişler ve çeşitli biyokimyasal ve morfolojik testler ile hasta balıklardan izole edilen 81 adet bakteriyel izolatın: *Vibrio harveyi* (tüm izolatların %75,3'ü), *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. pelagius*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio* sp. ve tanımlanmayan diğer Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerden oluştuğunu bildirmişlerdir.

Sitja-Bobadilla ve Alvarez-Pellitero (2001), yetiştiriciliği yapılan çipura ve sinarit balıklarında hastalık çıkışında böbreklerinden izole ettikleri Myxosporean bir parazite *Leptotheca sparidarum* ismini önermişlerdir.

Sitja-Bobadilla ve diğ. (2007), laboratuvar ortamında büyütülen 330 adet sinarit balığı topluluğunda ilk günlerden itibaren mortalitenin başladığını ve çalışma boyunca toplam mortalite oranının %73 olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada ülserler ve ön böbrekten yapılan bakteriyolojik ekimler sonucunda çeşitli biyokimyasal ve morfolojik testler sonucunda 102 adet bakteri suşu izole edilmiş ve çalışma sonucunda hasta balıklarda en yüksek oranda *Vibrio splendidus* (%59,7), ikinci olarak *Vibrio scophthalmi* (%29,2) ve daha düşük sıklıkta *Vibrio harveyi* (%5,6) ve *Pseudoalteromonas* sp. (%6,9) türlerinin bulunduğu rapor edilmiştir.

Yiagnosis ve Athanassopoulou (2011), kültürü yapılan sinarit balıklarında görülen bir hastalık vakasından 12 adet bakteriyel suş izole edildiğini, biyokimyasal testlerin ve API kitleri ile tanımlanan suşların ise; 4 adedinin *Aeromonas* sp. ve 4 adedinin *Vibrio nereis* olduğunu ve Eylül ayında izole edilen 4 adet suşun ise *Vibrio costicola* türü olduğunu rapor etmişlerdir.

Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan sinarit balıklarını konu edinmiş ve bu balıklarda hastalıklara neden olan patojenleri tanımlamaya yönelik çalışmalar çok kısıtlıdır.

Çilli (2008), Ege Denizi'nde yetiştiriciliği yapılan sinarit balıklarında Mayıs-Kasım 2007 tarihleri arasında toplam 94 balık incelemiş ve inceleme sonucunda *Amyloodinium*

ocellatum, *Trichodina* sp., *Epistylis* sp., *Riboscyphidia* sp., *Ceratomyxa* sp., *Gyrodactylus* sp., *Microcotyle* sp. ve *Clavellotis* sp. olmak üzere 8 farklı parazit izole ettiğini bildirmiştir.

Trilles ve Öktener (2009) yaptıkları çalışmada Karaburun'da yetiştiricilik sistemlerinden elde edilen sinarit balıklarını incelemiş, çalışma sonucunda 7 adet enfeste sinarit balığının vücut yüzeyinden 14-16 mm boylarında olmak üzere 3 adet adet dişi *Anilocra physodes* (Isopoda) paraziti izole ettiğini Türkiye'de kültürü yapılan sinarit balıklarında ilk rapor olarak bildirmiştir.

Öktener (2009) Ege Denizi'nde Haziran-Ağustos 2008 tarih aralığında kültürü yapılan sinarit balıkları ile yaptığı çalışmada *Caligus mauritanicus* (Copepoda) parazitini izole ettiğini Türkiye'de kültürü yapılan sinarit balıklarında ilk rapor olarak bildirmiştir.

Akayli ve diğ. (2011), ticari bir işletmenin kafes birimlerinden 100-130 g ağırlığındaki 5 adet hasta sinarit balıklarından konvansiyonel bakteriyolojik teşhis yöntemleri ve API test kiti ile *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Akayli ve diğ. (2015) 50 adet hasta sinarit balığıyla biyokimyasal, fenotipik testler ile API tanı kitlerini kullanarak yaptıkları çalışmada yoğunluklu olarak *Vibrio* cinsi bakterilerden *V. scopthalmi*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mediterranei*, *V. splendidus* olmak üzere *Tenacibaculum maritimum* ve *Flavobacterium* sp. türlerini ve Gram pozitif türlerden *Micrococcus luteus*, *Streptococcus* sp. ve *Bacillus* sp. türlerini izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

Turgay ve diğ. (2015) sinarit balığı yetiştiriciliği yapılan ticari bir işletmede görülen hastalık çıkışında moleküler teşhis yöntemlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, hasta juvenil sinarit balıklarının deri ve solungaçlarında *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*) siliat parazitini teşhis ettiklerini literatürde ilk rapor olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada hasta balıkların iç organlarından *Vibrio* sp. türlerinin fırsatçı patojen olarak izole edildiği de belirtilmiştir.

2.3. BİYOFİLM TANIMI

Biyofilmin farklı araştırmacılar tarafından çeşitli tanımları olmakla birlikte, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin (International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC) yaptığı tanımlamaya göre: Biyofilmler, hücrelerin çoğunlukla kendi ürettikleri bir hücre dışı polimerik madde (EPS - extracellular polymeric substance) matriksi içinde gömülü olduğu, birbirilerine ve/veya bir yüzeye yapışık haldeki kümeleşmiş mikroorganizmalardır (Vert ve diğ., 2012).

Biyofilm tanımını yapan metinler çok çeşitli olmakla birlikte, hepsinde ortak olarak biyofilm yapısının 3 temel bileşenden oluştuğu görülmektedir: mikroorganizmalar, EPS ve yüzey. Bu bileşenlerin herhangi birinin eksik olduğu bir yapı, biyofilm olarak değerlendirilmemektedir (Dunne, 2002). Biyofilm matriksi içinde, oluştuğu ortama bağlı olarak; mineral kristalleri, korozyon tanecikleri, balçık ve alüvyon parçacıkları, kan bileşenleri gibi hücresel olmayan öğelerin de bulunabildiği rapor edilmiştir (Donlan, 2002).

Biyofilmler; hayvanlar, mineraller, lensler, gemilerin gövdeleri, tatlı ve tuzlu sudaki kayaların üzerinde, nükleer enerji santralleri, uzay istasyonları, hastaneler, iklimlendirme sistemleri, su dağıtım sistemleri, tüm biyomedikal implantlar ve diğer medikal cihazlar üzerinde, canlı dokularda, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin borularında, petrol nakliye sistemlerinde, deniz ve iç sular gibi doğal su sistemlerinde, yeterli neme sahip ve besin bulunduran biyotik veya abiyotik, doğal veya sentetik hemen hemen tüm yüzeylerde oluşabilmektedirler (Donlan, 2002; Dunne, 2002; Hall-Stoodley ve diğ., 2004). Bazı yüzeylerin veya bunlara uygulanan yüzey kaplamalarının mikroorganizmaların adezyonunu geciktirdiği yapılan çalışmalarda bildirilmiş olmakla birlikte (Sheng ve diğ., 2000), hiçbirinde biyofilm oluşumunun tamamen engellendiği rapor edilmemiştir.

Biyofilmler doğada baskın olarak çok sayıda türün birlikte yaşadığı ortamlar olmakla birlikte özellikle yaralarda, medikal cihaz ve implantlarda tek bir türden yapıları biyofilmlerin bulunabildiği bilinmektedir (Smilack, 1985; Adal ve Farr, 1996). Biyofilm içindeki mikrobiyal çeşitliliğe örnek olarak Palmer (2009) insan diş plağında yaptığı bir çalışmada, plak içinde 800 kadar farklı filotip saptandığını bildirmiştir.

Biyofilm oluşturma, topluluğu oluşturan mikroorganizmalara etkili bir kolonizasyon sağlamak ve biyofilm organizmaları arasındaki işbirliğinin faydalarından yararlanmak gibi

çeşitli avantajlar sağladığı gösterilmiştir (Jefferson, 2004). Birden fazla türden oluşan biyofilmlerde, bir organizmanın metabolik yan ürünü bir başka organizmanın gelişimine olumlu yönde katkı sağlayabilmektedir. Biyofilm matriksi, yapısal bir birim olması niteliğine ek olarak mikrobiyal hücrelerin oluşturduğu fonksiyonel bir topluluk olarak da işlev görmektedir. Hücreler, bireysel olarak gerçekleştirmeleri mümkün olmayan çeşitli işlevleri topluluk olarak gerçekleştirebilmektedirler. Diğer bir deyişle, matriks içindeki mikrobiyal hücreler topluluğunun özellikleri, tüm hücrelerin bireysel olarak özelliklerinin toplamından üstün hale geçmektedir (Sutherland, 2001).

Bakterilerin kümeleşerek karmaşık mikrobiyal topluluklara dönüşmesi, organizmaların bireysel olarak zarar görecekları kayma kuvvetlerine (shear forces), besin yoksunluğuna, UV ışınlarına, pH değişimlerine, metal toksisitesine, sürfaktanlara, asit maruziyetine, dehidrasyon ve tuzluluğa, antibiyotikler gibi antimikrobiyal maddelere, antikorlar ve lökositler gibi bağışıklık sistemi elemanlarına, bakteriyofajlara, aynı ortamda bulundukları amip ve benzeri düşmanlarına karşı çok daha dirençli olmalarını sağlamaktadır (Le Magrex-Debar ve diğ., 2000; Espeland ve Wetzel, 2001; Mah ve O'toole, 2001; Dunne, 2002; Leid ve diğ., 2002; Mcneill ve Hamilton, 2003; Teitzel ve Parsek, 2003; Singh ve diğ., 2006).

Biyofilmler doğada biyodegradasyon (Singh ve diğ., 2006), kanalizasyon arıtması (Wagner ve Loy, 2002) gibi çeşitli konularda yarar sağlayıcı özellikte olabilmekle birlikte borularda korozyona neden olmak (Lee ve diğ., 1995), insan ve hayvanlarda tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmak gibi çeşitli zararları da bulunmaktadır (Costerton ve diğ., 1999). Bakteriyel topluluklar doğada organik maddelerin üretiminde ve bozunmasında, birçok çevresel kirleticinin indirgenmesinde ve azot, kükürt ve birçok metalin döngüsünde anahtar bir role sahiptirler.

Biyofilm aracılı biyoremediasyon, biyofilm içindeki hücrelerin ortam şartlarına daha iyi uyum sağlama ve hayatta kalma yeteneğine sahip olmalarından ve bir matriks içinde korunmalarından dolayı, planktonik mikroorganizmaların kullanıldığı biyoremediasyona yeterli ve güvenli bir alternatif oluşturmaktadır. Biyofilm içindeki organizmalar arasındaki yakın ve karşılıklı fayda sağlayan fiziksel ve fizyolojik etkileşimlerden dolayı biyofilmler, endüstriyel fabrikalarda kirleticilerin immobilizasyonu ve degradasyonunda kullanılmaktadırlar (Singh ve diğ., 2006).

Yapılan çalışmalarda toprak ve yer altı sularındaki en yaygın kontaminantlardan birisi olarak bulunan ve aşırı düşük konsantrasyonlarda bile kanserojen etkisi olan hidrokarbonların remidasyonu için biyofilmlerden yararlanılmaktadır. Sentetik atık sulardan 2,4-dichlorophenol (DCP) bileşimini uzaklaştırmak için *Pseudomonas putida*'nın eklendiği biyoreaktörlerin kullanıldığı bir çalışmada, bileşik %100 oranında ortamdan uzaklaştırılabilmiştir (Kargi ve Eker, 2005). Benzer şekilde bir başka çalışmada, polisiklik aromatik hidrokarbonlara (PAHs) adezyon özelliğine sahip bakterilerin kullanılmasıyla, bu bileşiklerin remidasyonunda da başarı elde edilmiştir (Johnsen ve diğ., 2005).

Farmakolojik ürünler, pestisitler ve patlayıcılar gibi bazı ürünlerin sentezinde kullanılan ve içerdiği nitro grubundan dolayı biyolojik bozunmaya dayanıklı ve mikrobiyal çevriminde zararlı metabolitlerin açığa çıktığı nitroaromatik bileşiklerle biyofilm reaktörü kullanılarak yapılan bir çalışmada da yüksek bozunma oranları elde edilmiştir (Lendenmann ve diğ., 1998).

Biyofilmlerin umut veren uygulamalarından diğeri de ağır metallerin remidasyonudur. White ve Gadd (2000) sülfat indirgeyici bakterilerden oluşan biyofilm kültüründe bakır ile yaptıkları çalışmada, bakırın biyofilmde bakır sülfür formunda biriktiğini ve bileşiğin biyofilmdeki EPS içeriğinde de eş zamanlı olarak arttığını tespit etmişlerdir.

Macaskie ve diğ. (2000), polikristalin NaUO_2PO_4 'ün lipopolisakkaritlere adsorpsiyon yoluyla *Citrobacter* sp. N14'ün hücre çeperinin içinde ve etrafında biriktiğini ve dolayısıyla uranyum tuzlarının biopresipitasyonunda yardımcı olduğunu tespit etmişlerdir.

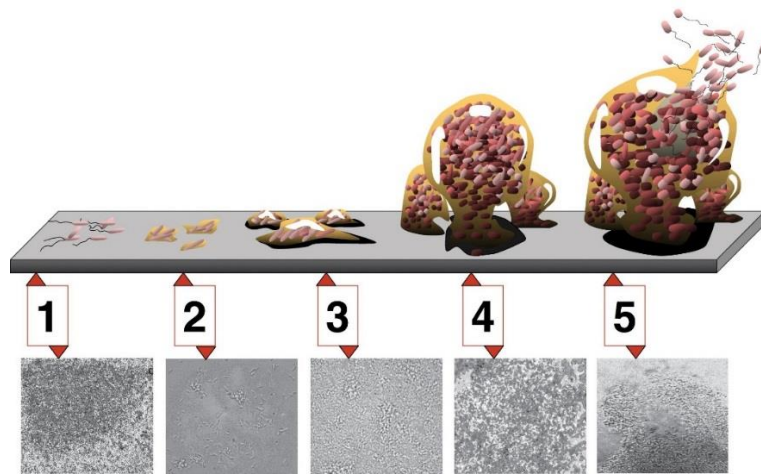
Bir başka metal presipitasyonu çalışmasında Labrenz ve diğ. (2000), sülfat indirgeyici bakterilerin oluşturduğu doğal bir biyofilmde, aerotolerant *Desulfobacteraceae* ailesi üyeleri tarafından sfalerit oluşumunu bildirmişlerdir. Bu işlemde çinko yoğunlaştırılmış ve sonra sülfat indirgeyici bakteriler tarafından çöktürülmüştür.

Costley ve Wallis (2001) kadmiyum, bakır ve çinko ile kontamine sentetik atık sularda, dönen biyolojik disk (rotating biological contactor - RBC) kullandıkları çalışmada metaller ile kontamine olmuş suların arıtılmasında biyofilm içeren sistemlerin başarıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Bu doğal işleyişlerin birçoğunun farklı metabolik kabiliyetlere sahip bakterilerin birlikte çalışmasını gerektirmesinden dolayı, bahsedilen karmaşık işlemlerin büyük çoğunluğunun biyofilm içinde bulunan bakteriler tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir (Davey ve O'toole, 2000). Biyofilmler; asit maden drenajları (Edwards ve diğ., 2000), kaplıcalar (Ward ve diğ., 1998) ve buzul gölleri (Paerl ve Priscu, 1998) gibi birçok aşırı uç şartlara sahip ortamlarda da oluşabilmektedirler. Biyofilm organizmaları ayrıca, planktonik formda bulunan (serbest haldeki) benzerlerinden fenotipik ve biyokimyasal özellikleri bakımından farklı oldukları gibi, transkript edilen genler açısından da farklılık gösterirler (Costerton ve diğ., 1999; Donlan, 2002).

2.4. BİYOFİLM OLUŞUMU

Biyofilm oluşumunun, planktonik organizmaların hareketsiz forma geçişiyle başlayan bir süreç olduğu bilinmektedir. Oluşum evreleri: dönüşümlü (reversible) ilk tutunma evresi, kalıcı (irreversible) tutunma evresi, mikrokolonilerin oluştuğu ve EPS üretiminin yapıldığı ilk olgunlaşma evresi, tüm yapılarıyla tamamen olgunlaşmış biyofilm evresi ve olgunlaşmış biyofilmden kopma ve dağılmaların meydana geldiği son evre olarak kısımlara ayrılabilir (Şekil 2.5). Biyofilm oluşumunda her bir evrenin kendine has ayırt edici özellikleri bulunmakla birlikte tüm bu evreler, çoğunluğu algılama (quorum sensing - QS) molekülleri adı verilen bazı özel sinyal molekülleri aracılığıyla düzenlenmektedir (Sauer ve diğ., 2002).



Şekil 2.5: Biyofilm oluşumunun aşamaları: 1- İlk tutunma evresi, 2- Kalıcı tutunma, 3- Olgunlaşma ve EPS üretimi, 4- Olgun biyofilm, 5- Kopma ve dağılma. (Monroe, 2007).

2.4.1. Tutunma Evresi

Bakterilerin biyotik veya abiyotik bir yüzeye tutunmasında ve bunun sonrasında biyofilm oluşumunun başlatılmasında sulu ortamın hidrodinamiği ve bu ortamın fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücre yüzeyinin çeşitli özellikleri vb. çok fazla sayıda değişken rol oynamakla birlikte (Donlan, 2002), kabaca tanımlandığında abiyotik yüzeylere ilk tutunma genellikle spesifik olmayan etkileşimlerle olmaktadır, canlı dokular gibi biyotik yüzeylere ilk tutunmada spesifik etkileşimler (lektin, ligant veya adezinler vb.) rol oynamaktadır (Dunne, 2002).

Tutunma evresi; tutunan organizmaların tekrar planktonik forma dönüş yapabildiği ve tutunma yüzeyinden uzaklaşabildiği ilk tutunma evresi ve organizmaların yüzeye geri dönüşsüz olarak tutunduğu ve biyofilm oluşumunun başladığı evre olmak üzere iki aşamalıdır (Dunne, 2002).

2.4.1.1. Geri Dönüşümlü Tutunma

Biyofilmlerle ilgili ilk çalışmalarda, mikrobiyal kolonizasyonun pürüzlü yüzeylerde hem yüzey alanının daha geniş olması hem de koparma kuvvetlerinin azalmış olması nedeniyle pürüzsüzlere oranla çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (Characklis, 1973). Bunun dışında birçok mikroorganizmanın hidrofobik, nonpolar yüzeylere (Teflon ve diğer plastikler gibi) hidrofilik malzemelere göre (cam ve metal gibi) daha fazla tutunduğu ilk çalışmalarda gözlenmiştir (Fletcher ve Loeb, 1979; Bendinger ve diğ., 1993). Ancak bakterilerin yüzey yapısının heterojen bir yapı göstermesi ve daha da önemlisi çevresel şartların değişmesiyle birlikte bu yapıların da değişik özellik kazanabilmesi, yüzeylere tutunmada yüzey yükünün dışında başka etkenlerin de önemli rol oynadığını göstermektedir (O'toole ve diğ., 2000).

Planktonik (hareketli) bakteriler, uygun bir yüzeye tutunarak biyofilm oluşturmada önce durağan forma dönüşmektedirler. Bazı durumlarda biyofilm oluşturan mikroorganizmaların ilk adezyonu, fimbriya gibi özelleşmiş organeller üzerinde bulunan adezinler aracılığıyla sağlanmaktadır (Sauer ve diğ., 2002; Lasaro ve diğ., 2009). Bazı bakterilerin bu tür özelleşmiş tutunma yapıları bulunmakla birlikte, birçok bakteri de bu yapılardan yoksundur ve bu tür bakterilerde de hücre dışı polimerik madde ile tutunma sağlanmaktadır (Donlan, 2002).

Tutunmanın, fiziksel olarak iki olayın gerçekleşmesiyle olduğu gösterilmiştir: bir yüzeye karşılaşılan bakterinin yapışmak için gerekli mesafe kadar yüzeye yaklaşması ve bakterinin dış katmanının substrata yapışması. Bakterinin potansiyel olarak yapışacakları substrat ile karşılaşma olasılığını kültür konsantrasyonu, bakteriyel hareket veya kemotaksi belirlerken; yapışmanın kendisi potansiyel substrat, bakteri yüzeyi ve polimerik yapışkan madde arasındaki fiziksel ve kimyasal etkileşime bağlı olmaktadır (Fletcher ve Loeb, 1979).

Bakteri hücresi yüzeye kritik yakınlığa eriştiğinde (genellikle 1 nm veya daha yakın) adezyonun gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, sıcaklık ve hidrodinamik kuvvetler gibi pek çok kuvvet ve değişkenin belirlediği gösterilmiştir. Bunların içinde tutunmayı olumsuz yönde etkileyen en önemli değişkenin, bakterilerin çoğunluğunun ve yüzeylerin negatif yüklü olmasından dolayı elektrostatik kuvvetler olduğu; ilk tutunmayı olumlu anlamda en belirleyici etkenin ise hidrodinamik kuvvetler olduğu gösterilmiştir (Carpentier ve Cerf, 1993).

Yapılan çalışmalar neticesinde, yüzey durumunun ilk tutunmayı belirli ölçüde etkilediği ortaya çıkmaktadır. Biyofilm oluşum sürecindeki ilk temas genellikle bir organizma ile bir yüzey arasındaki gerçekleşmektedir ki yüzeyin hidrofobikliği de yüzeyde bulunan moleküllere bağlı olarak değişmektedir. Wang ve diğ. (2007), *Staphylococcus epidermidis*'in polietilen disklerle adezyonuyla ilgili yaptıkları çalışmada, herhangi bir kaplama yapılmayan polietilen disklerle kıyasla yüzey-aktif (surface-activated) plateletlerin varlığında adezyonun artış gösterdiğini, yüzeye adsorbe olmuş plazma proteinlerinin varlığında ise azaldığını gözlemlemişlerdir. Herrmann ve diğ. (1988) ise koagülaz-negatif stafilokokların polimetilmetakrilata adezyonunun; yüzeyin fibronektinin, fibrinojen ve laminin plazma proteinleriyle kaplandığı durumda arttığını bildirmişlerdir.

Mikrobiyal hücrelerin bir yüzeye tutunması için EPS varlığının gerekli olmadığı (Allison ve Sutherland, 1987) ancak biyofilm oluşumu için mutlak gereklilik olduğu çeşitli çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır (Sutherland, 1999).

2.4.1.2. Kalıcı Tutunma

Tutunmanın ikinci evresi, sabitlenme veya kilitlenme evresi olarak da adlandırılan ve spesifik adezinlerle yüzey arasında moleküler olarak bağlanmanın gerçekleştiği evre olmaktadır (An ve diğ., 2000). Bu evreden önce yüzeye gevşekçe bağlı olan organizmalar,

yüzey malzemesiyle ve/veya piluslar veya fibriller üzerinde yerleşik reseptör-sepesifik ligantlarla kompleks oluşturan ekzopolisakkaritler üreterek tutunma işlemini sağlamlaştırmaktadırlar. İkinci tutunma evresinin sonundaki tutunma, fiziksel veya kimyasal bir müdahale olmadıkça artık geri dönüşümsüz olmakta ve organizma yüzeye sıkıca yapışmış halde bulunmaktadır (Dunne, 2002). Bazı belirli organizmalarda (örneğin *Vibrio cholerae* El Tor) yüzeye tutunmada ortama bağlı olarak değişen birkaç farklı adezinin birlikte kullanılabildiği de gösterilmiştir (Watnick ve diğ., 1999).

Tutunmanın bu evresi süresince planktonik mikroorganizmaların da ayrıca birbirlerine veya yüzeye bağlı farklı türden organizmalara yapışabildiği ve substrat üzerinde kümeler oluşturabildiği gözlenebilmektedir. İlginç bir bulgu olarak, yüzey üzerindeki bir mikroorganizma türünün varlığı, bir başka türün de aynı yüzeye yapışmasını teşvik edebilmektedir (Merritt ve An, 2000). Leung ve diğ. (1998) plastik stentlerle ve safra sıvısıyla yaptıkları çalışmada, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin bir yüzeye adezyonu ve yüzey üzerinde biyofilm oluşturmada sinerjik bir etkiye sahip oldukları sonucuna varmışlardır.

Kalıcı tutunma evresindeki bakterilerin birden fazla adezin ürettiği ve bu adezinlerden bazılarının transkripsiyonel seviyede düzenlendiği ve bu sayede farklı çevresel etkiler altında bakterilerin hareketsiz formdan planktonik forma geçişinin mümkün olabildiği bilinmektedir (Dunne, 2002).

2.4.2. Olgunlaşma Evresi

Bakterilerin kalıcı olarak yüzeye tutunmalarıyla birlikte biyofilmin olgunlaşma sürecinin de başladığı gözlenmektedir. Bu evrede, yüzeye bağlı organizmalar aktif olarak çoğalmaya ve ayrıca ölmeye başladıkça, biyofilmin toplam yoğunluğu ve karmaşıklığı da artmaktadır. Hücreler yüzeye tutundukça yüzey üzerinde yatay bir eksenle toplanırken, bu hücrelerin bölünmesiyle oluşan yavru hücreler ise (daughter cells) hücre kümeleri oluşturmak üzere tutunma eksenine göre çeşitli açılarda yukarı, aşağı veya yana doğru bölünmektedirler. Bölünen bu hücreler aynı zamanda hem çoğunluğu algılama molekülleri hem de hücre dışı polimerik madde (EPS) üretmektedirler. EPS matriksinin, mikrokoloniler halinde toplanmış hücreleri barındırmasının yanı sıra oluşturulan biyofilmin yüzeye yapışmasını da sağladığı bilinmektedir (Mckenney ve diğ., 1998; Watnick ve Kolter, 1999).

Olgunlaşma evresinde; yüzeye tutunmuş bakteriler tarafından üretilen hücre dışı bileşenler, EPS yapısını oluşturmak üzere yakın çevredeki organik ve inorganik moleküllerle etkileşime girmektedirler. Bu moleküller, mikroorganizmaların bulunduğu ortama göre çok farklı özellikte olabilmektedir. Örneğin enfekte biyomedikal implant örneklerinde bu çevresel moleküllerin, implanta tutunmuş ve konak kaynaklı yangısal yanıt proteinleri veya komplement sistemi proteinleri, fibrinojen, fibronektin ve glikozaminglikanlar olabildiği gösterilmiştir (Dunne, 2002).

Organizma sayısının artmasıyla birlikte mikrokolonilerin genişlediği bu evrede ve mikrokoloni artışına bağlı olarak üretilen EPS ve sinyal molekülleri miktarı da artmaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda biyofilm içindeki bakteriler arasında flagelluma dayalı hareket gözlenmiş olmakla birlikte; mikroorganizmaların biyofilm yapısı boyunca çoğunlukla eşit miktarda değil, daha çok mikrokoloni yığınları şeklinde dağıldığı gösterilmiştir (Mckenney ve diğ., 1998; Tolker-Nielsen ve diğ., 2000).

Olgunlaşma sürecindeki herhangi bir bakteriyel biyofilmin gelişmesi; yakın çevredeki besinlerin kullanılabilirliği, bu besinlerin biyofilm içindeki hücrelere perfüzyonu ve metabolik aktiviteler sonucu oluşan atıkların uzaklaştırılabilmesine bağlı olmaktadır. Biyofilm olgunlaşmasını belirlediği bildirilmiş diğer bazı etkenler; dahili pH değeri, oksijen perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolaritedir (Carpentier ve Cerf, 1993; O'toole ve Kolter, 1998b).

Yapılan çalışmalarda olgunlaşmanın belirli bir aşamasında biyofilmin kritik kütleye ulaştığı ve böyle bir durumda tekrar denge durumuna (equilibrium) ulaşım için dinamik olarak, biyofilmin olduğu yüzeyin en uzak bölgesinde ve en dış katmanında bulunan hücrelerin planktonik hücrelere dönüştürülmesiyle sağlandığı gösterilmiştir. Bu organizmalar serbest hale geçerek biyofilmden ayrılmakta ve böylece hem kritik kütleye ulaşmış biyofilmin denge durumuna geri dönmesini sağlamak hem de bir parçası oldukları biyofilmden ayrılan organizmaların başka bir yüzeyde kolonize olabilmelerini sağlamaktadır (Dunne, 2002).

Biyofilmlerin gelişimi, olgunlaşması ve yıkımı gibi süreçlerin, hücreler arası sinyal molekülleri tarafından kontrol edilen ve popülasyon yoğunluğuna bağlı gen anlatımı seviyeleriyle düzenlendiğine dair kanıtlar sunulmuştur (Davies ve diğ., 1998; Stickler ve diğ., 1998). Yapılan çalışmalarda, biyofilm oluşumu sırasında bazı genlerin anlatımının

(ekspresyon) arttığı buna karşılık bazı genlerin anlatımının ise baskılandığı tespit edilmiştir: Örneğin *Pseudomonas aeruginosa*'da aljinat biyosentezini sağlayan *algC* geni anlatımı genellikle artarken (Davies ve Geesey, 1995) *Escherichia coli*'de flagellin sentezini sağlayan *fliC* geni anlatımının baskılandığı gösterilmiştir (Prigent-Combaret ve diğ., 1999).

2.4.3. Dağılma (Kopma) Evresi

Olgun bir biyofilm içindeki bakterilerin biyofilmden koparak ayrılmasının, yüksek popülasyon yoğunluğunun tetiklemesiyle birlikte, programlanmış olarak ve yine biyofilmi oluşturan organizmaların kendileri tarafından salgılanan kimyasal maddeler yoluyla olduğu belirlenmiştir (O'toole ve diğ., 2000).

Biyofilmlerde dağılma-kopma olgusunun; sinyal molekülleri (Stoodley ve diğ., 2005), proteinler ve yıkım enzimleri (Boyd ve Chakrabarty, 1995), biyofilm içindeki metabolik aktivitelerin sonucu olarak üretilen oksidatif ve nitrozatif strese neden olan moleküller (Schlag ve diğ., 2007; Wood ve diğ., 2007) gibi, kimyasal maddelere bir tepki olarak meydana geldiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bunun dışında, biyofilm organizmaları tarafından üretilen aljinat liyaz isimli bir yıkım enziminin, biyofilm matriksini küçük oligosakkaritlere ayırdığı gösterilmiştir. Bu ayırma, aljinatın tutunma-bağlanma özelliğine antagonistik bir etki yapmakta ve biyofilm organizmalarının biyofilmden kopmasını sağlamaktadır (Boyd ve Chakrabarty, 1995; Barraud ve diğ., 2006).

Kopma-dağılma süreci biyofilm içinde bulunan hareketsiz organizmaların planktonik, serbest yüzer fenotipine geçmesini ve biyofilmi terk etmesini de sağlamaktadır. Biyofilmden koparak ayrılan organizmalar, biyofilm biçimlendirmesini başlatmak üzere başka bir bölgeye dağılmaktadırlar (Barraud ve diğ., 2006). Bu süreç aynı zamanda biyofilm enfeksiyonlarının konak içinde yayılmasını da sağlamakta ve hatta konağın ölümüne neden olabilecek tromboembolizm gibi patolojilere yol açabilmektedir (Wenzel, 2007). Kopma-ayrılma ihtimalinin kalın polimerik matriks içeren biyofilmlerde daha düşük olduğu ve bu özellikteki biyofilm enfeksiyonlarında enfeksiyonun yayılma hızının da daha düşük olduğu gözlenmiştir (Xavier ve Bassler, 2003).

Biyofilmden kopma, biyofilmin bulunduğu ortamdaki akışkanın kayma kuvvetinin artması gibi harici etkenlerden kaynaklanabileceği gibi (Stoodley ve diğ., 2002), enzimatik

degradasyon ya da EPS veya yüzey-bağlama proteinlerin serbest hale geçmesi gibi dahili biyofilm proseslerinden de kaynaklanabilmektedir (Boyd ve Chakrabarty, 1994; Lee ve diğ., 1996). Biyofilmden kopmanın sadece pasif değil, bazı türlerde yeni nişlere kolonizasyon sağlamak için yapıldığı düşünülen aktif bir işlem olduğu anlaşılmaktadır (Sauer ve diğ., 2002).

Günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda, biyofilmden kopmanın birbirinden ayrı özelliklere sahip 3 farklı stratejisi olduğu görülmektedir: **Oğul verme veya tohumlama tipi dağılma** (swarming/seeding) tipinde bireysel hücreler bir mikrokoloniden geniş hacimli bir sıvı içine veya çevreleyen substrat içine salınmaktadırlar, **kümeleşme tipi dağılma** (clumping dispersal) tipinde hücre yığınları kümeler halinde dağılmaktadırlar, **yüzey tipi dağılma** (surface dispersal) tipinde ise biyofilm yapıları yüzey boyunca ilerlemektedirler (Hall-Stoodley ve diğ., 2004).

2.4.3.1. Tohumlama Tipi Dağılma

Bu tip dağılma en detaylı şekilde mukoit olmayan *Pseudomonas aeruginosa* türünde tanımlanmıştır. Bu bakterilerde ilk biyofilm gelişiminin ardından mikrokoloniler, biyofilm fenotipinde olan (hareketsiz) hücrelerden oluşan bir dış duvar oluşturmak üzere farklılaşmaktadır. Aynı anda mikrokolonilerin iç kısımları ise sıvılaşmakta ve böylece planktonik fenotipteki (hareketli) hücrelerin mikrokoloniden dışarı doğru yüzebilmesi sağlanmaktadır. İç kısımların sıvılaşması, buradaki hücrelerin programlanmış bir şekilde lizise uğratılmasıyla başarılmakta ve hücrelerin bulunduğu bu bölgede içi oyuk tepecik şeklinde bir yapı meydana gelmektedir (Tolker-Nielsen ve diğ., 2000; Sauer ve diğ., 2002).

2.4.3.2. Kümeleşme Tipi Dağılma

Bu dağılım stratejisinde yığınlar halindeki hücreler devamlı bir şekilde biyofilmden kopmaktadır. Bu dağılma tipinde etrafı EPS ile çevrili biyofilm hücrelerini içeren yığınların, fizyolojik olarak planktonik hücrelerden ziyade biyofilm yapısına sahip olduğu gözlenmektedir. İnsan ve diğer pek çok hayvanda patojen olan *Staphylococcus aureus* bakteri türü bu tip bir dağılma gösterdiği belirlenmiştir. Etrafında EPS'nin de bulunmasından dolayı, koparak ayrılmış *S. aureus* bakterilerindeki antibiyotik direncinin yüzeye tutunmuş haldeki biyofilm formlarıyla çok benzeştiği tespit edilmiştir. EPS içeren kopan parçanın, bulunduğu bir bölgede tekrar biyofilm oluşturabilmesinden dolayı enfeksiyonun metastaz yapabilme oranı da yüksek olmaktadır. Bu tip kopmada kopma

yönü aktif olarak belirlenmemekle birlikte, biyofilmin sıvı akış yönünü kendi lehine kullanmasının olasılık dahilinde olduğu belirtilmektedir (Lowy, 1998; Stoodley ve diğ., 2001).

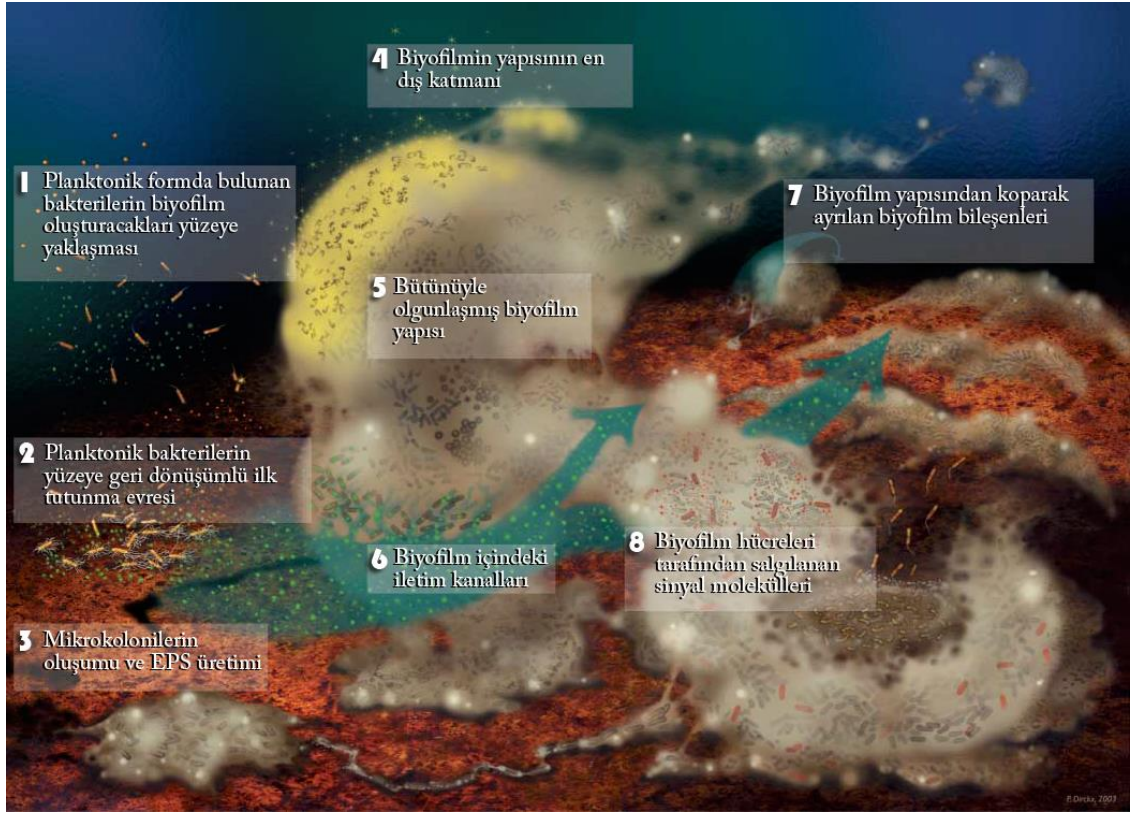
2.4.3.3. Yüzey Tipi Dağılma

Bazı hücrelerin, bireysel olarak kayma hareketi gibi aktif bir hareketle bir yüzey boyunca hareket ettiği bilinmektedir. Benzer şekilde biyofilmlerin de bir bütün halinde, kayma aracılı (shear-mediated) şekilde bir yüzey boyunca hareket edebildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Purevdorj ve diğ. (2002) *P. aeruginosa*'da ve Stoodley ve diğ. (1999b) ise karışık biyofilmlerde yaptıkları çalışmalarda, bu tip dağılmada dalgacık şeklindeki yapıların hareket hızının saatte 1 mm'ye kadar çıkabildiğini gözlemlemişlerdir. Inglis (1993) yaptıkları çalışmada, endotrakeal tüplerin içinde dalgacık şeklindeki biyofilm yapılarının bulunduğunu saptamıştır. Aynı çalışmada tüplerdeki biyofilmin aşağı yönlü hareketinin bakterilerin akciğerlere yayılmasında ve sonrasında pnömoniye sebebiyet vermesinde rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır. Yüzey tipteki dağılmaların planktonik olanlara göre hem tespitlerinin çok daha zor olması hem de antibiyotiklere planktonik olanlardan daha dirençli olmalarından dolayı bu tip dağılmaların neden olduğu enfeksiyonlarla mücadele de klinik açıdan daha zor olmaktadır (Stewart ve Costerton, 2001).

2.5. BİYOFİLM YAPISI VE MİMARİSİ

Tam olarak olgunlaşmış bir biyofilm yapısı: bakteri hücrelerinden, hücre dışı polimerik maddeden ve besinlerin ve atık maddelerin giriş-çıkışını sağlayan gözeler arası (interstitial) su kanallarından oluşmaktadır (Şekil 2.6).

Biyofilmin yapısını ve mimarisini görüntülemek için bilgisayar destekli ışık mikroskobu, faz kontrast mikroskobu, karanlık alan mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) gibi cihazlardan yararlanılmıştır (Kinner ve diğ., 1983; Robinson ve diğ., 1984; Lawrence ve diğ., 1987).

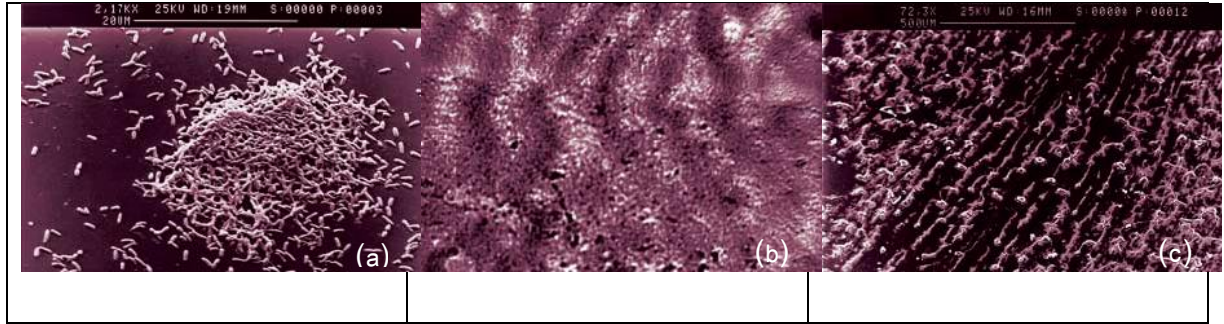


Şekil 2.6: Olgun bir biyofilmin gelişimi ve dinamikleri (Hall-Stoodley ve diğ., 2004).

Bu cihazlara alternatif olarak girişimsel herhangi bir işlem içermeyen lazer taramalı konfokal mikroskobu (CLSM), biyofilm görüntülenmesinde olgun biyofilmlerin üç boyutlu yapısının bilgisayar destekli rekonstrüksiyon ile elde edilmesini sağlamaktadır (Dunne, 2002).

Lawrence ve diğ. (1991) CLSM ile yaptıkları çalışmada *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Vibrio parahaemolyticus* biyofilmlerini kullanarak bakteriyel biyofilm mimarsinin kavramsal görüntüsünü elde etmiştir. Çalışmada, aynı koşullar altında bulunan bakteri türlerine ait biyofilmlerin yapısında da bazı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. *V. parahaemolyticus* ve *P. aeruginosa*'nın ürettikleri biyofilmin *P. fluorescens* tarafından üretilen biyofilmin yaklaşık iki katı kalınlıkta olduğu ayrıca her bir biyofilmin derinliklerinin ve biyofilmlerdeki hücresel olan ve olmayan malzeme içeriklerinin birbirinden farklı oldukları hesaplanmış, biyofilmin yüksek oranda sulu olduğu ve biyofilmin hacimsel olarak çok büyük oranın su kanalları ve EPS gibi hücresel olmayan malzemeden yapıldığı ortaya çıkarılmıştır.

Biyofilmler, temel olarak aynı yapıya sahip olmakla birlikte, bulundukları ortama göre farklı formlar oluşturabilmektedirler (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Farklı ortamlarda oluşan biyofilmlerin form farklılıkları: a) Mantar (tepecik) formu, b) Dalgacık formu, c) Şerit (flama) formu (Hall-Stoodley ve diğ., 2004).

2.6. HÜCRE DIŞI POLİMERİK MADDE (EPS) MATRİKSİ

Biyofilmler, hem doğal hem de yapay ortamlarda birbirinden çok farklı özelliklere sahip çok çeşitli ortamlarda bulunduğundan dolayı EPS (Extracellular Polymeric Substance) yapısı ve fizyolojik aktivitesi de bunlara bağlı olarak farklılıklar içerebilmektedir. EPS'nin bu yapı ve aktivitesini hem intrinsik hem de ekstrinsik faktörler belirlediği; intrinsik faktörlerin biyofilmi oluşturan mikrobiyal hücrelerin genetik profiliyle belirlenmekteyken, ekstrinsik faktörlerin biyofilm ve matriksin bulunduğu ortamın fizikokimyasal yapısı ve ortamda bulunan çözünmüş maddelerin taşınma ve difüzyon özelliklerinin oluşturduğu belirtilmiştir (Sutherland, 2001).

Bulunduğu ortama göre değişkenlik göstermekle birlikte, biyofilm matriksinin %97'sini su oluşturmaktadır. Matriksin büyük kısmını oluşturan su, mikroorganizmaların içinde bağlı halde bulunabileceği gibi, viskozite gibi fiziksel özelliklerini içinde çözünen maddelerin belirlediği bir çözücü olarak da bulunabilmektedir. Biyofilm matriksi içindeki difüzyon işleminde esas rol oynayan suyun bağlama kapasitesi ve su hareketi olduğundan dolayı, biyofilm içindeki su, iyi düzenlenmiş yapılar şeklinde organize edilmektedir (Schmitt ve Flemming, 1999).

Mikrobiyal hücreler ve su dışında, biyofilm matriksinin; salgılanmış polimerler, soğurulmuş besinler ve metabolitler, hücre yıkımından kalan artık ürünler ve hatta biyofilmi çevreleyen ortamdan anlık olarak gelen çözünmeyen katı maddeler ve organik kırıntılar (detritus) içerdiği gözlenmiştir. Bundan dolayı da ana makromoleküller olan

proteinler ve polisakkaritlerin yanı sıra DNA ve RNA, peptidoglikan, lipitler, fosfolipitler ve diğer hücre bileşenleri de matriks içinde bulunabilmektedir (Sutherland, 2001). Biyofilm içindeki hücre malzemenin miktarı çok değişken olmakla birlikte, yapılan bir çalışmada toplam organik karbon değerlerine göre incelendiğinde biyofilm yapısının %2-15'i kadarının hücre malzeme olabileceği bildirilmiş, geri kalanın ise hücre dışı malzeme olduğu hesaplanmıştır (Frølund ve diğ., 1996).

EPS moleküllerinin mikrobiyal hücrelerin içine yerleşeceği yapı iskeletini sağladığı ve matriks içindeki hücrelerin yüzey üzerinde dağınık halde ve etraflarındaki EPS ile birlikte ince bir katman oluşturabildikleri gibi, dental plaklarda olduğu gibi oral yüzeyler üzerini çevreleyen kalın ve yapışkan bir katman da oluşturabildiği bilinmektedir (Sutherland, 2001).

CLSM ile yapılan görüntüleme çalışmalarında, dental plak mimarisinde dahi kanallar ve sıvı dolu boşluklar tespit edilebilir seviyede bulunmuştur (Lawrence ve diğ., 1998). Tüm biyofilm sistemlerinde gözlenen bu kanalların; besinlerin, enzimlerin, metabolitlerin, atık ürünlerin ve diğer çözünmüş maddelerin biyofilm yapısı boyunca dolaşımını sağladığı belirlenmiştir (Sutherland, 2001).

EPS biyofilm matriksinin esas yapısal bileşeni olmakla birlikte, yapısal bütünlüğün sağlanmasında birçok farklı etkileşim bulunduğu gözlenmiştir. Polisakkarit molekülleri; multivalent katyonlarla birlikte, kendi aralarında veya heterolog moleküllerle etkileşime girerek süreç içinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Polisakkaritler ayrıca, mikrobiyal hücrelerin yüzeyine yapıştıklarında çözünmüş maddeler olarak proteinler ve glikoprotein molekülleriyle de etkileşime girmektedirler. Oral biyofilmlerde, hücreye bağlı bakteriyel lektinler ile diğer hücrelerin yüzeylerindeki uygun epitoplara arasındaki tepkimelerin, plak yapısının bakımının sağlanmasında çok önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Adams ve Mclean, 1999). EPS yapısındaki diğer etkileşimler olan protein-protein, protein-polisakkarit, ve iyonik etkileşimler hakkında detaylı ve yeterli bilgi henüz mevcut değildir (Sutherland, 2001).

Bakteri hücreleri, doğal ortamlarında kendilerini çevreleyen ortamdaki değişimlere hızlı bir şekilde cevap verebilmek zorunda oldukları bilinmekle birlikte, biyofilm matriksinin ortamdaki organik besinlerin değişimine karşı tampon vazifesi görmesinden dolayı biyofilm içinde bulunanların böyle bir zorunluluğunun da ortadan kalktığı ileri sürülmüştür

(Stoodley ve diğ., 2000). Biyofilm matriksinin kendisi de aynı zamanda karbon ve enerji rezervi olarak hareket edebilmektedir. Normalde mikrobiyal hücrelerin, bazı dental plak örneklerinde olanlar hariç olmak üzere kendi sentezledikleri EPS'yi kullanmadıkları fakat matriks içindeki heterolog türlerin EPS'yi ayrıştırıp kullanabildikleri ve bu sayede biyofilmin yapısını ve bileşimini değiştirebildikleri bilinmektedir (Sutherland, 2001).

Farklı ortamlarda bulunan biyofilmlerin farklı hidrodinamik koşullara sahip olmasından dolayı EPS matriksi de bu koşullardan önemli ölçüde etkilenmekle birlikte mikrobiyal hücrelerin, besinlerin ve atık ürünlerin taşınmasının da bu şartlara göre değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir. Bu hidrodinamik koşullardan kayma hızının (shear rate), matriksteki hücrelerin ve bölgelerin biyofilmden erozyon hızını belirlediği; biyofilmin maruz kaldığı kayma geriliminin ise (shear stress) matriksin fiziksel morfolojisini ve dinamik davranışı belirlediği gösterilmiştir (Stoodley ve diğ., 1999a; Cowan ve diğ., 2000).

Polisakkarit çözeltiler, akışkan ve elastik toparlanma özelliği sergilemektedirler. Matriksin şekli de matriksin esnek olmasından dolayı, uygulanan kuvvete verilen cevap nedeniyle değişmektedir. Burgaçlı (türbülanslı) akıntı altında, çoğunluğu polisakkaritten oluşmuş olan biyofilmler viskoz bir sıvı gibi akmaktadırlar. Burgaçlı akıntı ve artmış karbon kaynağı birlikteliğinin, kurulu haldeki bir biyofilmin hafifçe dalgalanan flama görünüşünü sıkıca paketlenmiş hücrelerden oluşan bir yığına değiştirebildiği gözlenmiştir. Daha yüksek hızdaki akıntılar altında matriksin de daha sıkı tutunduğu görülmektedir (Sutherland, 2001).

Bir biyofilim matriksi içindeki mikrobiyal hücreler birbirilerine yakın halde bulunmakta ve ortamda bulunan besinlerin eldesi için de muhtemelen yoğun bir yarış halinde bulunmaktadır. Matriks yapısındaki göreceli olarak geniş olan kanal ve gözenekler, kolonize olacak hücrelerin matrikse girmesine ve biyofilm içinde yer bulmasına izin vermektedir. Çalışmalarda hidrofobik hücrelerin hem yüzey üzerine hem de biyofilm yumağının içine tutunabildiğini, hidrofilik hücrelerin ise bunu gerçekleştiremediği bildirilmiştir. Bu nedenden dolayı matriksin mikrobiyal hücre ve makromolekül bileşimi zamanla birlikte değişmektedir (Freeman ve Lock, 1995).

2.7. BİYOFİLM OLUŞUMUNU ETKİLEYEN BAZI FAKTÖRLER

Organizmaların yüzeylere tutunma kabiliyetinin, tutunma oranıyla birlikte biyofilm oluşumunu da etkilemektedir (Shanks ve diğ., 2007; Lasaro ve diğ., 2009). Biyofilm organizmalarının tip IV piluslarıyla (fimbriya) ilişkilendirilmiş olan seğirme hareketi (twitching motility) yapışma hızını belirlemekte ve dolaylı olarak da biyofilm oluşumunu etkilemektedir (O'toole ve Kolter, 1998a). Kamçı (flagella) ve pilus (fimbriya), yapışma için gerekli olduklarından dolayı biyofilm oluşumunun ilk evresinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (O'toole ve Kolter, 1998a). Biyofilm oluşumunun ayrıca besinlerin bulunabilirliğine (kullanılabilirliğine) de bağlı olduğu ve türler arasında farklılık gösterdiği bilinmektedir (Mcdougald ve diğ., 2006). Besin miktarının artmasıyla birlikte biyofilm oluşumu ve gelişimi için gerekli olan çoğunluğu algılama moleküllerinin, enzimlerin ve diğer temel (esansiyel) amino asitlerin üretiminin arttığı gösterilmiştir (Heydorn ve diğ., 2002; Rice ve diğ., 2005). Bir başka faktör olarak bazı Gram negatif organizmalar tarafından salgılanan indolün, biyofilm oluşumunu etkileyen maddelerden birisi olduğu gösterilmiştir. İndolün, *Escherichia coli* gibi indol sentezleyen bazı organizmalarda biyofilm oluşumunu azaltırken *P. aeruginosa* gibi sentezlemeyen diğer bazı organizmalarda biyofilm oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir (Lee ve diğ., 2007). Biyofilm kültüründe belirli maddelerin varlığının biyofilm oluşumu ve sürdürülmesi üzerinde önemli etkileri olabilmektedir; örneğin düşük konsantrasyondaki demir biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilerken, yüksek konsantrasyonlarda hücrelerdeki DNA salınım hızını (oranını) azaltmaktadır dolayısıyla biyofilm oluşum hızını da düşürmektedir (Banin ve diğ., 2005; Banin ve diğ., 2006; Yang ve diğ., 2007). Gözyaşı, hava yolu salgıları ve süt gibi insan salgılarında bulunan laktoferrinin, ayrıca demiri şelatlayarak organizmaların seğirme hareketine başlamasına neden olduğu ve böylece hareket kazanan organizmaların biyofilm oluşturmak üzere yüzeylere tutunmasını engellemek suretiyle biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Singh ve diğ., 2002). Bununla birlikte, biyofilm bir kez oluşturulduktan sonra laktoferrine dirençli hale gelmektedir (Singh ve diğ., 2002). Yapılan bir çalışmada biyofilmlere elektrik akımı uygulanmasının zaman içinde biyofilmde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Van Der Borden ve diğ., 2004). Elektrik akımının antimikrobiyal maddelerle birlikte kullanılması, özellikle antimikrobiyallere duyarlı olan planktonik formdaki biyofilm hücreleri üzerinde sinerjik öldürücü etki sağlamaktadır (Jass ve Lappin-Scott, 1996).

2.8. ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA (QUORUM SENSING)

Bireysel hücreler yerine bir grup hücre olarak ortaklaşa hareket etmenin mikroorganizmalara daha uygun veya besince daha zengin bir ortama göç etmek, biyofilm oluşturmak gibi yeni gelişim modellerini hayata geçirmek, zararlı çevresel şartlardan ve düşmanlardan korunmak vb. çok çeşitli kazanımlar sağladığı bilinmektedir. Bakterilerin karmaşık etkinliklerini çok hücreli organizmalarda olduğu gibi eş güdümlü (koordine) olarak yürütebilmeleri için birbirleriyle iletişim kurabilme yeteneğine sahip oldukları ve bu eş güdümlü hareketin biyofilmi oluşturan organizmaların her biri tarafından üretilen ve hücreden hücreye iletişimi sağlayan otoindükleyiciler (autoinducers) olarak adlandırılan sinyal molekülleri ile başarıldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Parsek ve Greenberg, 2000; Rice ve diğ., 2005; Wang ve diğ., 2007).

Çoğunluğu algılama, organizmaların bir ortamda bulunan diğer organizmaların varlığını sinyal molekülleri yoluyla izlediği ve aynı yolla tepki (karşılık) verdiği bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Biyofilm içinde metabolik aktivitelerin ve popülasyon yoğunluğunun düzenlenmesinin, ortamdaki sinyal moleküllerinin birikmesinin bir sonucu olarak hücre yoğunluğuna bağlı gen anlatımı tarafından kontrol edildiği ve otoindükleyicilerin kullanımı yoluyla bakterilerin davranışlarını popülasyon yoğunluklarına göre düzenleyebildikleri ortaya çıkarılmıştır (De Kievit ve Iglewski, 2000).

Mikroorganizmaların bireysel olarak ürettiği otoindükleyici moleküller, hücrelerden dağılarak hücrelerin bulunduğu ortamda birikmektedirler. Yeterli sayıda bakteri ortamda bulunduğunda ortamdaki otoindükleyici konsantrasyonu bakterilerin kritik hücre kütlesine (critical cell mass) ulaşıldığını algılayabileceği eşik düzeye ulaşılmış olmakta ve eşik değere ulaşıldığında ise ortamdaki mikroorganizmaların oluşturduğu tüm popülasyon, transkripsiyonel düzenleyici proteinlerini (transcriptional regulator protein) aktive etmektedirler. Aktive olmuş düzenleyiciler hedef DNA dizisiyle etkileşime girmekte ve bu sayede hedef genleri aktive edilmesi veya tam tersi şekilde baskılanması mümkün olmaktadır. Bunun sonucu olarak da popülasyonu oluşturan tüm bakterilerde belirli bir fenotip, senkronize bir şekilde belirmiş olmaktadır (De Kievit ve diğ., 2001; Sauer ve diğ., 2002).

Çoğunluğu algılama genel olarak; biyofilm mimarisinin düzenlenmesi, organizmaların biyofilmden kopması ve virülans faktörlerinin üretilmesi, toksin üretimi vb. simbiyotik ve

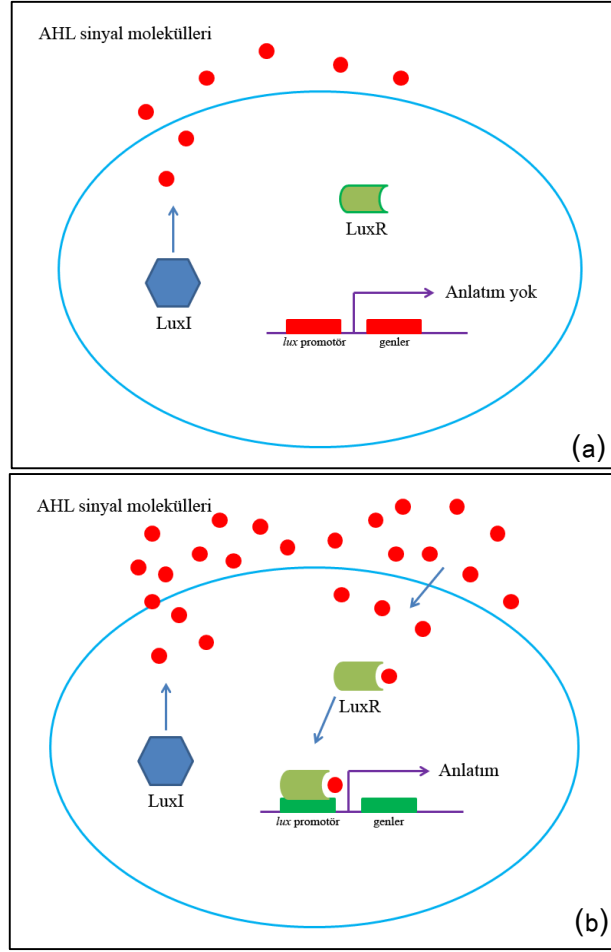
patolojik bir ilişkinin başarılı bir şekilde kurulmasında anahtar bir rol oynamaktadır (Rumbaugh ve diğ., 1999; Fuqua ve diğ., 2001; Schuster ve diğ., 2003; Rice ve diğ., 2005; Liu ve diğ., 2007).

Çoğunluğu algılama ilk olarak, deniz ortamında bulunan ve birçok ökaryotik canlıda simbiyotik olarak yaşayan ve biyoluminesans özelliğine sahip *Vibrio fischeri* ile *Vibrio harveyi* bakterilerinde Nealson ve Hastings (1979) tarafından tanımlanmıştır. Çalışmada her iki bakteride de ışık üretiminin sadece bakterilerin çok yüksek popülasyon değerlerine ulaştığı zaman gerçekleştiği gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çoğunluğu algılama moleküllerinin sadece prokaryotlar arasında değil, prokaryotlarla ökaryot organizmalar arasında da iletişimin sağlanmasında kullanıldığı gösterilmiştir (Joint ve diğ., 2002).

2.8.1. Gram Negatif Bakterilerde Çoğunluğu Algılama

Günümüzde onlarca Gram negatif bakterinin çoğunluğu algılama çevrimleri tanımlanmıştır ve bu bakterilerdeki çoğunluğu algılama çevrimleri, en azından *V. fischeri*'de saptanan düzenleyici proteinler olan LuxI (otoindükleyici sentaz enzimi) ve LuxR isimli proteinlerin homologlarını içermektedirler.

LuxI benzeri proteinler, otoindükleyiciler olarak bilinen spesifik bir açıl-homoserin lakton (acylated homoserine lactone) (AHL) sinyal molekülünün biyosentezinden sorumludurlar. LuxR proteini ise hem otoindükleyiciye bağlanma hem de LuxI transkripsiyonunu aktive etme işlevi görmektedir (Miller ve Bassler, 2001). *Vibrio fischeri*'de LuxI/LuxR çoğunluğu algılama çevrimi Şekil 2.8'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.8: *Vibrio fischeri*'de LuxI/LuxR çoğunluğu algılama çevrimi. a) Ortamdaki sinyal seviyesinin düşük olduğu durum, b) Sinyal seviyesinin anlatım için yeterli olduğu durum (Openwetware, 2015).

Gram negatif bakterilerde iki tip otoindükleyici (autoinducer - AI) molekül tanımlanmıştır: AI-1 ve AI-2. AI-1 moleküllerinin, Gram negatif bakterilerde majör otoindükleyici grup olduğu ve N-açıl-homoserin laktonları (N-acyl-homoserine lactones) (AHL) içerdiği tespit edilmiştir. Bu moleküller yeterli derecede yüksek konsantrasyona ulaştığında bir transkripsiyonel aktivatöre (R proteini) bağlanarak aktive edebilmekte ve hedef genlerin ekspresyonunu indükleyebilmektedirler. Açıl-homoserin laktonların (AHL) otoindükleyici sinyal olarak işlev gördüğü *Agrobacterium* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., *Brucella* sp. ve *Vibrio* sp. gibi birçok Gram negatif bakteri tanımlanmıştır (González ve Keshavan, 2006). Bazı Gram negatif bakterilerin sinyal molekülleri ve düzenleyici proteinleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

AHL düzenleyici sistemi iki yapısal genden oluştuğu belirlenmiştir; AI-1 sentaz (AI-1 synthase) kodlayan LuxI ve AI-1 cevap düzenleyicisi (AI-1 response regulator) kodlayan

LuxR. Bu iki genin homologları birçok Gram negatif bakterilerde bulunmaktadır ve toksinler, enzimler, biyofilm oluşumu ve antibiyotik direnci gibi virülans faktörlerinin üretimini de içeren birkaç gen işlemini de kontrol etmektedirler (Passador ve diğ., 1993; Xu ve diğ., 2000; Patel, 2005; Xu ve diğ., 2006).

AI-2 molekülleri, türler arası iletişim için global bir sinyal molekülü olarak tanımlanmaktadır ve bu moleküller hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde üretilmektedir. AI-2 üretiminden sorumlu genin (LuxS) birçok türde yüksek derecede korunmuş olduğu gözlenmiş ve ayrıca diğer bakteri türlerinde gen anlatımını düzenleme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiş ve birkaç organizmanın da patojenitesiyle ilişkilendirilmiştir. AI-2, sensör proteini olarak LuxP'ye bağlanmaktadır ve furanosyl borate diester olarak tanımlanmıştır (De Kievit ve Iglewski, 2000).

Biyofilm oluşumu da dahil olmak üzere virülans faktörlerinin düzenlenmesinde oynadığı rolünden dolayı, patojenik organizmalarda çoğunluğu algılamanın bloke edilmesi, özellikle biyofilm enfeksiyonlarının kontrolünde yeni bir tedavi stratejisi olarak önerilmektedir (Bjarnsholt ve Givskov, 2007).

Tablo 2.1: Bazı Gram negatif bakterilerde çoğunluğu algılama sinyal molekülleri ve düzenleyici proteinleri (De Kievit ve Iglewski, 2000; Miller ve Bassler, 2001).

Organizma	Düzenleyici proteinler	Sinyal molekülü
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AhyI/AhyR	C4-HSL
<i>Aeromonas salmonicida</i>	AsaI/AsaR	C4-HSL
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraI/TraR	3-Oxo-C8-HSL
<i>Burkholderia cepacia</i>	CepI/R	C8-HSL
<i>Chromobacterium violaceum</i>	CviI/CviR	C6-HSL
<i>Enterobacter agglomerans</i>	EagI/EagR	3-Oxo-C6-HSL
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	ExpI/ExpR CarI/CarR	3-Oxo-C6-HSL
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	ExpI/ExpR	3-Oxo-C6-HSL C6-HSL

Tablo 2.1 (devam):

<i>Erwinia stewartii</i>	EsaI/EsaR	3-Oxo-C6-HSL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasI/LasR RhlI/RhlR	3-Oxo-C12-HSL C4-HSL
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	PhzI/PhzR	C6-HSL
<i>Ralstonia solanacearum</i>	SolI/SolR	C8-HSL
<i>Rhizobium etli</i>	RaiI/RaiR	Çoklu/Onaylanmamış
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	RhiI/RhiR	C6-HSL C8-HSL 3-Hydroxy-7-cis-C14-HSL
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	CerI/CerR	7-cis-C14-HSL
<i>Salmonella typhimurium</i>	?/SdiA	N-octanoyl-HSL
<i>Serratia liquifaciens</i>	SwrI/SwrR	C4-HSL
<i>Vibrio anguillarum</i>	VanI/VanR	3-Oxo-C10-HSL
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxI/LuxR	3-Oxo-C6-HSL
<i>Vibrio harveyi</i>	LuxLM/LuxN	3-Hydroxy-C4-HSL
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YenI/YenR	C6-HSL
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	YesI/YesR YtbI/YtbR	C8-HSL

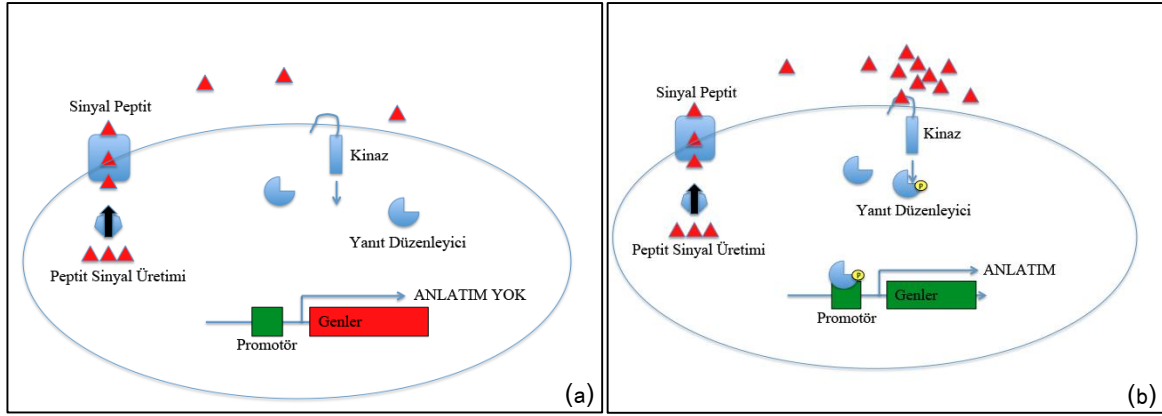
2.8.2. Gram Pozitif Bakterilerde Çoğunluğu Algılama

Gram pozitif bakterilerin de artan hücre popülasyonu yoğunluğuna yanıt olarak çeşitli prosesleri düzenledikleri belirlenmiştir ancak bu bakterilerdeki sinyal moleküllerinin yapısı, Gram negatif bakterilerde olduğundan farklılık göstermektedir (Miller ve Bassler, 2001).

Gram pozitif bakterilerde bugüne kadar Gram negatiflerde görülen AHL üretimi tespit edilmemiştir. Bunun yerine çoğunluğu algılamak için Gram pozitif bakterilerde otoindükleyici olarak çeşitli peptitler (autoinducing peptides - AIPs) salgılanmaktadır. Bu peptitler genellikle, özelleşmiş ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcısı ile

salgılanmaktadır. Gram pozitif bakterilerde otoindükleyici peptitlerin algılanmasının, iki bileşenli düzenleyici sistem (two-component regulatory system) aracılığıyla gerçekleştirildiği tespit edilmiştir (Şekil 2.9). Bu sistem, membrana bağlı histidin kinaz reseptörü ve hücre içi yanıt düzenleyiciden oluşmaktadır (Miller ve Bassler, 2001).

Bu sistemde, hücre popülasyonundaki yoğunluğun artmasıyla birlikte, salgılanan otoindükleyici peptitlerin yoğunluğu da artmaktadır. İki bileşenli sensör kinazlar, salgılanan peptit sinyalleri için algılayıcı vazifesi görmekte ve sinyallerin eşik düzeyine ulaşmasıyla birlikte gen anlatımındaki gerekli değişikliğin yapılmasını başlatmaktadır (Suntharalingam ve Cvitkovitch, 2005).



Şekil 2.9: Gram pozitif bakterilerde yoğunluğu algılama çevrimi (AgrC/AgrA). a) Sinyal seviyesinin düşük olduğu durum, b) Sinyal seviyesinin anlatım için yeterli olduğu durum (Openwetware, 2015).

2.9. BİYOFİLMİN BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ VE ANTİMİKROBİYAL MADDELERE DİRENCİ

Antimikrobiyal maddelere karşı olgun bir biyofilm içindeki mikroorganizmalar, planktonik emsallerine göre oldukça farklı davranışlar sergilemektedir. Biyofilm organizmalarının vücut bağışıklık mekanizmalarına ve antimikrobiyallere karşı doğal olarak bulunan direncinden dolayı, daimi enfeksiyonlara neden oldukları bilinmektedir (Gilbert ve diğ., 1997; Costerton ve diğ., 1999; Chandra ve diğ., 2001; Leid ve diğ., 2005). Biyofilm organizmalarının antimikrobiyal maddelere karşı dirençleri, tutunma evresinde başlamakta ve biyofilmin gelişmesiyle birlikte artmaktadır (Patel, 2005).

Biyofilm içindeki organizmaların, biyofilm mimarisi ve bileşiminden kaynaklanan çeşitli mekanizmalarla antimikrobiyallere karşı direnç gösterme yeteneğinde oldukları gösterilmiştir. Direnç mekanizması hem biyofilm mimarisi ve fizyolojisinden kaynaklanan doğal hem de dirençli genlerin genetik edinimiyle olabilmektedir (Fux ve diğ., 2005; Anderson ve O'toole, 2008). Hücre dışı matriks ve içeriği bariyer görevi yaparak antimikrobiyal maddelerin biyofilm içine difüzyonunu kısıtlamakta ve böylece organizmaları antimikrobiyal maddelerin etkilerinden korumaktadır (Farber ve diğ., 1990; Anwar ve diğ., 1992).

Biyofilm içindeki besin ve oksijence fakirleşmenin sonucu olarak organizmaların yavaş bir hızda üremesi, üremeye bağlı antimikrobiyal öldürücü etkiye karşı organizmaların daha az duyarlı hale gelmesini sağlamaktadır (Borriello ve diğ., 2004). Bunu görüşü destekler nitelikte Bendinger ve diğ. (1993) Gram negatif ve Gram pozitif bazı klinik olarak izole edilmiş suşlarla yaptıkları çalışmada, besin kısıtlaması ile üreme hızını kontrol ettiği bakterilerde metabolik aktivitenin düşük olduğu gruplarda test edilen antibiyotiklerin önemli ölçüde etkisinin azaldığını göstermiştir.

Antimikrobiyal maddelerin etkisini azaltan mekanizmalardan bir diğerinin biyofilmin oluşturduğu mikrohabitat olduğu düşünülmektedir. Biyofilm içindeki pH, oksijen miktarı ve diğer kimyasal maddelerin biyofilm içinde ayrışıklık (heterojenlik) göstermesinin antimikrobiyallerin aktivitesini düşürdüğü gösterilmiştir. Bu nedenle antimikrobiyallerin biyofilm içindeki etkisi, biyofilm içinde bulunduğu bölgeye bağlı olarak farklılık göstermektedir (Borriello ve diğ., 2004).

Biyofilmlerin antimikrobiyal maddelere direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda bazı çok uç değerler de elde edilmiştir: Ceri ve diğ. (1999) bakteriyel biyofilmlerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi konusunda yaptıkları çalışmada; belirli bazı antibiyotiklerde, aynı organizmaya ait ancak biyofilm içinde bulunan bakteriler için elde edilen bakterisidal değerlerin, planktonik emsallerine göre 100 ile 1000 kat daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Biyofilm organizmalarının hızlı bir şekilde mutasyona uğramasının antimikrobiyallere direnç hızını da etkilediği gösterilmiştir (Driffeld ve diğ., 2008). Çoğunluk algılama molekülleriyle genlerin düzenlenmesi, antimikrobiyal direnç genlerini de içermektedir. *P.*

aeruginosa'nın enfeksiyonlara neden olan çoğunluk algılamadan yoksun suşlarının antimikrobiyallere direncinin azaldığı gösterilmiştir (Karatuna ve Yagci, 2010).

Biyofilmlerin yaşının da biyofilmin antimikrobiyallere direncini etkilediği, daha yaşlı biyofilmlerin daha dirençli olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Donlan, 2001).

Biyofilm yapısı ve mimarisi, biyofilm içindeki organizmaların vücut bağışıklık mekanizmalarına ve antimikrobiyallere karşı direncine yardımcı olmaktadır. Biyofilmin hücre dışı polisakkarit (EPS) bileşenleri çoğunlukla biyofilm organizmalarının fagosite edilmelerini engellediği gösterilmiştir (Jesaitis ve diğ., 2003; Leid ve diğ., 2005). Yapılan bir başka çalışmada, daha yaşlı olan biyofilmlerin genç olanlara göre polimorfnükleer lökositlerin (PMNs) fagositik aktivitesine karşı daha dirençlidirler (Günther ve diğ., 2009).

2.10. BİYOFİLM VE HASTALIKLAR

İnsan toplulukları yakın geçmişe kadar genellikle planktonik hücrelerin neden olduğu (*Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis* gibi) ve belirli bir hastalığa neden olan akut epidemik enfeksiyöz hastalıklarla karşı karşıya gelmişlerdir. Günümüzde bu türdeki akut enfeksiyonlar, etkenin antibiyotik dirençli olduğu durumlar haricinde etkili bir şekilde tedavi edilebilmektedir. Ancak medikal açıdan risk taşıyan bireyleri hafif şiddette etkileyen enfeksiyon hastalıklarının yarısından daha fazlasına, insan vücuduyla kommensal olarak yaşayan veya insanlarla birlikte aynı ortamda bulunan bakteri türleri neden olmaktadır (Costerton ve diğ., 1999). Örnek olarak insan derisinin normal florasında bulunan *Staphylococcus epidermidis* ve su ortamında yaygın olarak bulunan *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türlerinin, medikal risk taşıyan insanlarda ağır hasarlı enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir (Costerton ve diğ., 1995).

Hastanelerde cihaz kaynaklı olduğu düşünülen enfeksiyonlarda, enfeksiyona neden olduğu düşünülen medikal cihazların incelendiği elektron mikroskopisi çalışmalarında, cihazların üzerinde etrafı yapışkan tabakayla çevrili çok sayıda bakteri hücresi tespit edilmiştir (Khoury ve diğ., 1992). Benzer şekilde, cihaz kaynaklı olmayan kronik enfeksiyonlardan alınan doku örneklerinde de etrafı EPS matriksi ile çevrili biyofilm bakterilerinin saptandığı çalışmalar vardır (Costerton ve diğ., 1999).

Biyofilmlerin insanlarda görülen kronik enfeksiyonların %60-80 kadarından sorumlu oldukları ve benzer şekilde nozokomiyal enfeksiyonların da %65'inin yine biyofilm kaynaklı olduğu hesaplanmıştır (Costerton ve diğ., 1995)

Biyofilm enfeksiyonlarına neden olan bakterilerin klinik özellikleri genellikle birbirine benzemektedir: Enfeksiyon kaynağı olan bakteriler hareketsiz yüzeylerde ve sıklıkla medikal cihazların ve ölü doku parçalarının üzerinde biyofilm oluşturmaktadırlar. Bunların yanı sıra endokarditte olduğu gibi enfeksiyona neden olan biyofilmler canlı dokularda da gelişebilmektedirler (Lambe ve diğ., 1991).

Konak bağışıklık sistemi açısından düşünüldüğünde, biyofilm içindeki hareketsiz bakteri hücreleri antijen salarak antikor üretimini tetiklemektedirler ancak antikorlar biyofilm içindeki bakterileri öldürmekte yetersiz kalmakta ve hatta bazı durumlarda bağışıklık sistemi hücrelerinin çevre dokulara hasar vermesine neden olabilmektedir (Cochrane, 1988; Leid ve diğ., 2002). Sadece medikal açıdan tehlikelere açık bireylerde değil, bağışıklık sistemi değerleri normal bireyler için bile biyofilm enfeksiyonları konak savunma sistemiyle nadiren ortadan kaldırılabilmektedir (Khoury ve diğ., 1992).

Biyofilm enfeksiyonlarında antibiyotik tedavisi, biyofilme ait planktonik bakteriler üzerinde etkili olduğundan dolayı enfeksiyon belirtilerini ortadan kaldırabilmekte ancak biyofilmin kendisini yok edememektedir ve bu nedenle de biyofilm enfeksiyonları tipik olarak tekrarlayan belirtilerin gözlenmesiyle karakterize bir enfeksiyon olarak izlenmektedir. Bu tipteki enfeksiyonlarda biyofilmin hareketsiz olan kısmı konaktan uzaklaştırılmadığı sürece tam bir tedavi sağlanamamaktadır (Marrie ve diğ., 1982; Costerton ve diğ., 1995).

Doğal ve endüstriyel çevrelerde oluşan biyofilmlerin; bakteriyofajlara, amiplere ve endüstriyel işlemlerde biyolojik kirlenme (biofouling) ile mücadelede kullanılan çeşitli kimyasal biyositlere karşı dirençli oldukları belirlenmiştir. Biyofilmlerin antimikrobiyal maddelere karşı dirençlerinde rol oynayan mekanizmalardan birisinin, antimikrobiyal ajanın biyofilm içine tamamen nüfuz edememesi olduğu belirtilmektedir. Benzer şekilde biyofilm yapısında bulunan EPS bileşeninin de antibiyotiklerin veya diğer kimyasalların hücrelere ulaşmasını geciktirdiği gösterilmiştir (Cheema ve diğ., 1986; Shih ve Huang, 2002). Biyofilm içindeki organizmaların hava ve besinlerin kademeli olarak dağılmasından kaynaklanan yavaş hızda üremesinin, buradaki organizmalarının antimikrobiallere

direncini daha da arttırarak kronik enfeksiyonlara yol açmasına neden olduğu ifade edilmektedir. Pek çok antibiyotik ve antimikrobiyal madde, çok yavaş üreyen bakterilere karşı tam bir etki gösterememektedir (Borriello ve diğ., 2004).

Biyofilm içindeki organizmaların akrabalığı, karışık organizmalardan oluşmuş biyofilmler arasında antimikrobiyal direncini, toksin ve enzim üretimi gibi virülans genlerin transferini ve edinimini arttırmaktadır (Molin ve Tolker-Nielsen, 2003; Burmølle ve diğ., 2006; Weigel ve diğ., 2007). Biyofilm organizmaları tarafından uygulanan direnç stratejilerinin kümülatif faktörleri, antimikrobiyallere karşı planktonik emsallerinden 10 ile 100 kat arası daha fazla olmak üzere muazzam bir direnç olarak sonuçlanmaktadır (Lewis, 2001).

Biyofilm hücrelerinin, bir konak içindeki kan dolaşımında ve iç organların da dahil olduğu diğer başka bir bölgede enfeksiyonu başlatmak için biyofilmden kopabildikleri gözlenmiştir (Rice ve diğ., 2005). Bazı durumlarda biyofilmden ayrılan-kopan parça damarlar aracılığıyla taşındığı ve hayati tehlike oluşturan embolizme neden olabildiği ifade edilmiştir (Wenzel, 2007).

Yapılan çalışmalarda biyofilmlerin kalp kapakçığı kateterleri, eklem protezleri vb. medikal cihaz ve donatılarda kolonize olabildikleri gösterilmiştir. Bu bölgeler, organizmalar için rezervuar işlevi görmekte ve özellikle bağışıklık yetmezliği olan hastalarda hastane enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Donlan, 2001; Fux ve diğ., 2006).

Biyofilmler; idrar yolu enfeksiyonları (Jacobsen ve diğ., 2008), kateter enfeksiyonları (Stickler ve diğ., 1998), ortakulak iltihabı (otitis media), dental enfeksiyonlar (Thomas ve Nakaishi, 2006), endokardit (Nallapareddy ve diğ., 2006), kistik fibroz (Hassett ve diğ., 2009), beyin-omurilik sıvı şant sisteminde enfeksiyonlar (Fux ve diğ., 2006) ve yaralardaki enfeksiyonlar (James ve diğ., 2008) gibi çok çeşitli mikrobiyal enfeksiyonlarla ilişkilendirilmişlerdir.

Protez dışı hastalıklar arasında biyofilmlerin önemli bir paya sahip olduğu düşünülen hastalıklardan biri, kistik fibrozlu (CF) hastalarda *Pseudomonas aeruginosa*'nın neden olduğu akciğer enfeksiyonlarıdır. Bu kalıtsal genetik hastalığa sahip olan bireylerin, nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonuna karşı duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Enfeksiyonun sonucu olarak akciğerlerde meydana gelen enflamasyon ile birlikte akciğer fonksiyonu yitirilmekte ve enfeksiyon hastanın ölümüne

yol açmaktadır (Collins, 1992; Pier, 1998). *P. aeruginosa* biyofilminin hastalıkta rol oynaması ihtimalini kuvvetlendiren iki bulgu saptanmıştır: bunlardan ilki, CF hastalarının akciğerlerinde bakteri mikrokolonilerinin gözlenmesi ve ikincisi de bu hastaların akciğerlerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının aljinat adı verilen ve biyofilm yapısının oluşumunda anahtar role sahip EPS'nin yapısında bulunan polisakkaritin aşırı üretiminden dolayı mukoit yapıda olmasıdır (Govan ve Deretic, 1996; Davey ve O'toole, 2000).

Kronik kulak enfeksiyonu (otitis media) biyofilmlerin neden olduğu düşünülen hastalıklardan bir diğeridir. Bu enfeksiyona genellikle biyofilm bakterileri neden olmaktadır (Dingman ve diğ., 1998) ve kronik otitis media hastalarından yapılan rutin kültür yöntemlerinde enfeksiyon etkenine rastlanılamamasının muhtemel nedeni de biyofilm bakterilerinin rutin kültür yöntemleriyle izolasyonunun zor olmasından kaynaklandığı ifade edilmektedir (Costerton ve diğ., 1995).

Biyofilm kaynaklı hastalıklardan bir diğeri, diş etini destekleyen dokuların kronik inflamasyonu ile karakterize edilen ve dişin kaybına yol açan periodontittir. Hastalıkla ilişkilendirilen temel bakteri *Porphyromonas gingivalis* adı verilen ve ağız boşluğu, çeşitli mukozal yüzeyler ve dişler üzerinde doğrudan kolonize olabilen bir bakteri olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak, yapılan çalışmalarda birincil kolonize olan *Streptococcus gordonii* ve *Streptococcus sanguis* gibi bakterilerle etkileşime girerek de kolonize olabildiği bilinmektedir (Lamont ve Jenkinson, 1998).

Protez enfeksiyonlarında biyofilmlerin rolü birçok sistemde gösterilmişse de protez dışı hastalıklarda biyofilmin rolü henüz tüm hatlarıyla tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan çalışmalar yüzeylere tutunmuş bakterilerin hastalıkların patogeneziindeki muhtemel rollerine ait bazı bilgiler sağlamaktadır ancak biyofilm gelişimi için gerekli olan fonksiyonlarla konakta hastalık oluşumu için gerekli faktörler arasında doğrudan bir bağlantı kurulabilmesi için ek çalışmalar yapılması gerekmektedir (Davey ve O'toole, 2000).

Biyofilm içindeki bakteriler, fiziksel ve kimyasal dezenfeksiyon işlemlerine ve antimikrobiyal maddelere karşı dayanıklı olduklarından dolayı akuakültür sistemlerinde de birçok patojenin biyofilmler içinde kalıcı olarak bulunması olası gözükmektedir. Hem primer hem de fırsatçı patojen bakteriler balık yetiştiriciliği yapılan işletmelerde bulunan biyolojik filtrelerin içinde, tankların çeperlerinde ve boruların içinde kolonize olma

potansiyeli taşımaktadır. Benzer şekilde kapalı devre yetiştiricilik sistemlerinde de su kolonunda ve balıklarda bulunanlar dışında, biyofilmler içinde mevcut olan patojen bakteriler; artan substrat konsantrasyonu, yüksek balık yoğunluğu vb. etkenler nedeniyle birikme yaparak hastalık çıkışı riskini artırabilirler (Sharrer ve Summerfelt, 2007; Kent ve diğ., 2009).

Hayvan konakları dışında çevrede bulunan bazı patojenler; iç sular, denizler, acı sular ve su dağıtım şebekeleri gibi akuatik sistemlerin doğal sakinleridirler. Biyofilmlerin bütünüyle bir virölans faktör olması gerekliliği olmamakla birlikte, bunların içindeki belirli bazı patojenler hayvan konaklarına bulundukları biyofilm ortamından bulaşmaktadır (Hall-Stoodley ve diğ., 2004).

Akuatik çevrede kültür balıklarının sağlığını etkileyen birçok mikroorganizma bulunmakla birlikte bunların birçoğu fırsatçı patojendir, ortamda serbest olarak yaşarlar ve sadece immünitesi zayıflamış balıklarda veya çevre şartlarının uygun olmadığı durumlarda hastalıklara neden olurlar (Woo ve diğ., 2011).

Diğer taraftan bazı belirli şartlar altında planktonik bakteriyel hücrelerin biyofilm içinden koparak ayrıldıkları bilinmektedir. Yapılan çalışmalar bu durumun, vücuda yerleştirilen medikal implantlar üzerinde oluşan biyofilmlerin kendi başlarına bir tehdit oluşturmaya bile biyofilmden ayrılıp kopan planktonik bakteri hücrelerinin ciddi bir sağlık tehdidi oluşturabildiğini göstermiştir (Wenzel, 2007). Benzer şekilde akuakültür sistemlerinde de biyofilmden koparak serbest hale geçen planktonik patojenler özellikle bağışıklığı azalmış veya stres altındaki balıklarda hastalıklara neden olabilme potansiyeline sahiptir. Bunun yanı sıra, obligat patojenler genellikle dış ortamda uzun süre canlı kalamadıkları bilinmesine rağmen, bu patojenlerin ne kadarının biyofilmler içinde hayatta kalabildiği bilinmemektedir.

Biyofilm kümeleri; bir yüzeye bağlanabilmesinin yanında, bir sıvı içinde yumaklar halinde süspanse olabilirler veya sıvı-hava arayüzlerinde pelikül şeklinde bulunabilirler. Biyofilmler yüksek sayıda organizmayı küçük bir hacimde bir araya getirirler ve bu sayede bir yüzey üzerindeki patojen hücre yoğunluğu 10^7 hücre/cm²'ye ulaşabilmektedir. Bu özellik, çevreden patojen geçişi açısından oldukça önemlidir. Biyofilm gelişimi; üreme, kopma ve kümelenmeden oluşan dinamik bir süreçtir ve yoğun enfeksiyöz dozun solunması veya yutulmasına neden olabilmektedir (Hall-Stoodley ve Lappin-Scott, 1998).

Yapılan çalışmalarda çoğunluğu algılama moleküllerinin virölans faktörlerinin düzenlenmesindeki artış üzerine etkisiyle birlikte biyofilm içindeki organizmaların çok daha virulent hale geçebildiği (Sauer ve diğ., 2002; Schembri ve diğ., 2003; Goldsworthy, 2008) ve biyofilm içindeki çok sayıdaki organizma tarafından bu virölans faktörleri anlatımının kümülatif etkisiyle enfeksiyonun hasar verici özelliğinin arttığı gözlenmiştir (Asad ve Opal, 2008).

Biyofilm içinde bulunan patojenlerin planktonik olanlara göre daha fazla hastalık yapabilmesini sağlayan çeşitli muhtemel mekanizmalar düşünülmektedir. Bunlardan ilki ve en kuvvetlisi, biyofilm içinde üreyen yüksek sayıda patojen hücrenin çevreye saçılması ve enfeksiyonu başlatmasıdır (Stoodley ve diğ., 2001). İkinci mekanizma olarak biyofilm içindeki patojenlerin fenotipik olarak heterojen olması ve bunlardan virulent fenotipin hayatta kalıp biyofilm içinde sayıca artmasıdır (Hall-Stoodley ve Stoodley, 2005).

2.11. KÜLTÜRDEN-BAĞIMSIZ BAKTERİYEL TEŞHİS YÖNTEMLERİ

Günümüzde, yapılan tahminlere göre doğal bir ortamdaki mikroorganizmaların sadece %1’lik veya daha az kısmının laboratuvar kültürü yapılabilmektedir ve hatta iç sularda bu oran %0,25 gibi çok daha düşük seviyelerde seyretmektedir (Amann ve diğ., 1995; Hansen ve Olafsen, 1999). Ayrıca günümüzdeki bu mevcut durumun, bakteriyolojik kültürde yeni teknolojiler geliştirilmediği sürece değişmeyeceği öngörülmektedir (Streit ve Schmitz, 2004). Kültür tabanlı tekniklerin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.2’de verilmiştir.

Günümüzde özellikle çevresel örneklerde karşılaşılan bu sorunların üstesinden gelebilmek ve doğadaki mikroorganizma çeşitliliğini çok daha iyi belirleyebilmek ve bu çeşitlilik içindeki genleri ve bu genlerin fonksiyonlarını tespit edebilmek için çalışmalarda kullanılmak üzere çeşitli kültürden-bağımsız yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.3’te verilmiştir.

Tablo 2.2: Kùltür tabanlı tekniklerin avantaj ve dezavantajları (Fraher ve diğ., 2012).

Avantajları	Dezavantajları
• Düşük maliyet • Yarı-kantitatif • Yaygın olarak kullanılmakta • Biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalara uygun • Diğer tekniklerle birlikte kullanılabilir	• Zahmetli • Kùltür edilebilen mikroorganizma sayısı çok düşük • Örneğin derhal işleme alınması gerekmekte • Sadece kùltür edilebilen bakterilerle çalışılabilir • Yapılan çalışmalar seçilen besiyerine göre farklı sonuçlar vermekte • Teşhiste uzmanlaşma ve deneyim gerektirmekte

Floresan *in situ* melezleme (FISH), DNA veya RNA molekülünün çevre ve insan sağlığına zararlı olan radyoaktif proplar yerine floresan proplar ile işaretlenmesi ve epifloresan mikroskop ile gözlenmesi temeline dayanan bir tekniktir. Bakteriyel çeşitlilik çalışmalarında kullanılan proplar genellikle 16S rRNA'yı hedef almaktadırlar. Birden fazla tür içeren karışık örneklerde kullanılmaktadır (Franks ve diğ., 1998). Farklı proplar kullanılarak pek çok bakterinin teşhisi yapılabilmekle birlikte, daha önce bilinmeyen türler ve/veya suşlar bu teknikle tespit edilememektedir (Fraher ve diğ., 2012). Akış sitometrisi (flow cytometry), süspansiyon halindeki hücre ya da partiküllerin kapiler bir tüpten geçişi sırasında lazer ışığı ile aydınlatılmaları ve bu sırada verdikleri sinyallerin toplanarak analiz edilmesi prensibine dayalı bir tekniktir. Hücreleri-partikülleri kantitatif ve kalitatif olarak analiz edebilmektedir (Nicoletti ve diğ., 1991). Kantitatif dot-blot tekniğinde, tespit edilecek biyomolekül karışımı doğrudan bir membran üzerine uygulanmakta ve DNA probları veya antikorlar ile biyomoleküller tespit edilmektedir. Herhangi bir elektroforez veya jel işlemi gerektirmedikinden çok hızlı bir teknik olmasına karşın, tespit edilen biyomoleküllerin boyutu hakkında bilgi vermemektedir (Heinicke ve diğ., 1992). DGGE/TGGE, aynı uzunluktaki DNA dizilerinin farklı denatürasyon konsantrasyonu veya sıcaklık değerlerinde denatüre olması prensibine dayanan bir tekniktir. Karışık PCR amplikonlarının ayrımı ve teşhisinde kullanılmaktadır (Muyzer ve diğ., 1993). qPCR, kompleks bakteriyel toplulukların kantitatif bir yaklaşımla çalışılmasında kullanılmaktadır. Hızlı ve etkili bir teknik olmakla birlikte daha önceden bilinmeyen türler için kullanılamamaktadır (Higuchi ve diğ., 1993). T-RFLP, restriksiyon enzimleri yardımıyla benzer uzunluktaki DNA'nın farklı parçalara ayrılarak incelenmesi prensibine dayanan bir tekniktir. Mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında, farklı bakteriyel toplulukların birbirleriyle karşılaştırılmasında kullanılmaktadır (Marsh, 1999). DNA microarray teknolojisi, DNA ve

RNA'nın (genellikle cDNA olarak) tespit edilmesinde kullanılmaktadır. DNA microarray ile çok sayıda genin anlatım düzeyi belirlenebilmekte veya bir genomun birden fazla bölgesinin genotiplendirmesi yapılabilmektedir (Schena ve diğ., 1995).

Tablo 2.3: Kültürden-bağımsız yöntemlerin avantaj ve dezavantajları (Fraher ve diğ., 2012).

Yöntem	Avantajları	Dezavantajları
FISH	- Filogenetik teşhis yapılabilir - Yarı kantitatif - Özgüllüğü yüksek <i>In situ</i> teşhis	Bilinmeyen türler tespit edilemez
qPCR	- Filogenetik teşhis yapılabilir - Kantitatif - Özgüllüğü yüksek - İşlem süresi hızlı	- PCR ile ilgili sorunlar - Bireysel hedef seçilmekte - Bilinmeyen türler tespit edilemez
Akış sitometrisi	- Kantitatif ve kalitatif - Morfolojik, yoğunluk ve metabolik analizler yapılabilen - Hücrelerin yüksek hacimde paralel analizi mümkün - DNA izolasyonu ve amplifikasyon gerekmekte	- Karmaşık veri analizi gerekmekte - Hücre boyutları sorun oluşturabilmekte
Kantitatif dot-blot	- Metabolik aktiviteyi temsil edebilmekte - Grupların kıyaslanması mümkün	Uygulamada ve sonuçların okunmasında sorunlar oluşabilmekte
T-RFLP	- Yöntem hızı yüksek - Yarı kantitatif - Ucuz	- Filogenetik teşhis yapılamamakta - PCR sorunları - Düşük çözünürlük
DNA microarray	- Filogenetik teşhis mümkün - Uygulama hızı yüksek - Yarı kantitatif	- Çapraz melezleme - PCR sorunları - Düşük sayıda bulunan türlerin tespit edilmesi zor
DGGE/TGGE	- Uygulama hızı yüksek - Yarı kantitatif - Örnekler başka testler için tekrar kullanılabilir	- Filogenetik teşhis yapılamamakta - PCR sorunları
DNA dizileme	- Filogenetik teşhis mümkün - Kantitatif - Hızlı - Bilinmeyen bakteriler teşhis edilebilir	- PCR sorunları - Maliyeti yüksek

2.11.1. DNA Dizileme ile Teşhis

Canlıların sınıflandırılması ve sistematikteki yerleri geçmişte fenotipik benzerliklerine veya farklılıklarına göre yapılmakla birlikte; yıllar içinde bilimsel araştırma yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte, aynı türden olan canlılarda bile çok çeşitli fenotipik varyasyonların olduğunun saptanmasıyla, fenotipik temelli bir sınıflandırmanın yeterli olmadığı anlaşılmıştır. Otuz yılı aşkın bir süre önce yapılan moleküler biyoloji temelli ilk filogenetik çalışmalarla başlayan (Fox ve diğ., 1977; Fox ve diğ., 1980) ve sonraki yıllarda geliştirilen PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ve otomasyonlu DNA dizileme teknolojisindeki gelişmelerin de katkısıyla, fenotipik temelli sınıflandırma yerini tamamı ile moleküler yaklaşımlı sınıflandırmaya bırakmıştır (Woese ve diğ., 1990; Woo ve diğ., 2008).

Bakteriyel teşhis için günümüzde en fazla kullanılan ve dizilenen gen bölgesi 16S ribozomal RNA (16S rRNA) bölgesidir. 16s rRNA geninin bazı özellikleri, bu bölgenin önemli bir filogenetik araç halini almasını sağlamış ve dolayısıyla klinik tanı ve mikrobiyal çeşitliliğin belirlenmesi çalışmalarında da yoğun bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır.

Bu bölgenin çalışmalarda seçilmesini sağlayan en önemli özelliği, genin tüm bakterilerde bulunuyor olmasıdır ve bu nedenle bakteriyel tanı için uygun bir hedef oluşturmaktadır. İkinci olarak bu bölgenin bakterilerde evrimsel süreçte çok iyi korunmuş olması, bölgenin evrim çalışmalarında çok önemli bir yeri olmasını sağlamıştır. 16S rRNA geninin bir başka çok önemli özelliği de türler arasında bazı dizilim farklılıkları içermesidir. Son olarak, gen bölgesi uzunluğu (yaklaşık 1500 bp) istatistiksel olarak anlamlı veriler verebilecek kadar yeterli uzunluktadır (Patel, 2001; Woo ve diğ., 2008).

Tüm bu üstün özelliklerine rağmen, bazı bakteri gruplarında sadece 16S rRNA bölgesinin kısmi dizilenmesiyle türlerin ayrımı yapılamamaktadır. Bu tipteki teşhisi zor bakteriler için ilk defa 1998 yılında önerilen Multi-Locus Sequence Typing (MLST) isimli ve birden fazla gen bölgesi dizilerinin belirlenmesi yoluyla teşhisin yapıldığı teknikler geliştirilmiştir (Maiden ve diğ., 1998). Günümüzde 16S dışında, evrensel veya şube-aile-cins spesifik olabilen 23S, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB*, *toxR*, *fusA*, *nifD* ve benzeri başka gen bölgeleri de dizilenerek analiz edilmekte ve böylece teşhis yapılabilmektedir (Holmes ve diğ., 2004; Pascual ve diğ., 2010). MLST tekniği; laktik asit bakterilerinde, *Borrelia* türlerinde (Margos ve diğ., 2009), *Enterococcus* türlerinde (Naser ve diğ., 2005), *Mycobacterium* türlerinde (Stinear ve diğ., 2000), *Pseudomonas* bakterilerinde, bazı *Chlamydia* türlerinde

(Pannekoek ve diğ., 2008), Geobacteraceae familyasında (Holmes ve diğ., 2004) ve Vibrionaceae familyası üyelerinde (Pascual ve diğ., 2010), *Tenacibaculum* cinsi üyelerinde (Habib ve diğ., 2014) gibi çok çeşitli bakteri türlerinde kullanılmaktadır.

2.11.2 Metagenomik Çalışmalar ve Akuakültürdeki Önemi

Metagenomik, toprak ve su gibi çevresel örneklerde, bitkilerde, hayvanlarda, kısacası mikroorganizmaların yaşamlarını sürdürebildikleri bütün ortamlarda bulunan karışık mikrobiyal toplulukların, kültürden-bağımsız genomik analizi olarak tanımlanmaktadır. Metagenomik çalışmalar özellikle çevresel örneklerde, kültürü yapılamayan prokaryotlar üzerinde yaygın bir şekilde yapılmaktadır (Schloss ve Handelsman, 2003).

Çok uzak bir geçmişi olmayan metagenomik çalışmaların sayısının günümüzde hızla artmasında iki temel etken rol oynamaktadır. Bunların ilki, yeni nesil DNA dizileme teknolojilerindeki büyük gelişimdir. Günümüzde, metagenomik çalışmalarda elde edilen çok büyük miktardaki veriler geçmişte yapılamayacak kadar kısa bir süre ve maliyetle, yeni nesil dizileme teknolojileriyle işlenebilmekte ve analiz edilebilmektedir. Metagenomik çalışmaların sayısındaki artışın ikinci temel etkeni ise kompleks mikrobiyal toplulukların memeli biyolojisinde ve insan sağlığı ve hastalıklarında önemine karşı artan ilgi olmuştur (Schloss ve Handelsman, 2003; Ansorge, 2009).

Bu duruma bir başka örnek olarak, insan kalın bağırsağı mikrobiyotasının, yapılan metagenomik bir çalışmada, mikrobiyotadaki tür sayısının daha önce yapılmış olan hesaplamalarla tespit edilenden çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalarda ayrıca, insan bağırsağında saptanan bakterilerin %62'sinin daha önce bilinmeyen türlerden oluştuğu ve ayrıca metagenomik olarak teşhis edilen bakterilerin de %80'inin kültür edilemeyen bakterilerden oluştuğu belirtilmiştir (Eckburg ve diğ., 2005).

Su ekosisteminde yaşayan mikroorganizmalar, ekosistemin ana bileşenlerinden birisidir ve sedimentte, su kolonunda, ekosistemde yaşayan diğer canlıların üzerinde ve iç organlarında yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Doğal sistemlerde mikroorganizmalar birincil üretici olmalarının yanı sıra ekosistem içindeki pek çok canlı için de besin kaynağı olarak işlev görmektedirler (Martínez-Córdova ve diğ., 2014). Deniz ortamındaki birincil üretim aktivitesinin %98'inin deniz suyundaki mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirildiği hesaplanmıştır (Kennedy ve diğ., 2010).

Mikroorganizmalar akuakültürde biyolojik filtrelerde, atık suların biyoremediasyonunda, ortam parametrelerinin değerlendirilmesinde ve probiyotik olarak yaygın bir şekilde kullanılmakla birlikte; mikroorganizmaların, su kolonunda veya sedimentte bulunan toksik metabolitleri uzaklaştırmak (Mulder ve diğ., 1995; Isaka ve diğ., 2007), tüketilmeyen besinlerin ve ölü organizmalardan kaynaklanan organik maddenin degradasyonunu sağlamak (Burford ve diğ., 1998), kültüre edilen canlılarda enzimatik sindirim performansın geliştirmek (Becerra-Dorame ve diğ., 2012) gibi doğrudan veya dolaylı olarak pek çok olumlu etkisi bulunmaktadır (Caruso, 2013).

Akuakültürde mikroorganizmaların bu olumlu etkilerinin yanında negatif etkileri de bulunmaktadır. Bunların başında hastalık problemleri, toksin üretiminden kaynaklı sorunlar ve bazı durumlarda da aşırı oksijen tüketimi gelmektedir (Moriarty, 1997; Aguirre-Guzmán ve diğ., 2004).

Mikroorganizmaların olumlu yönde potansiyel kullanım alanları keşfedilip uygulamaya konulması, hem balık yetiştiriciliğine yaptığı olumlu katkılardan dolayı ekonomik getiri sağlayacak hem de balık çiftliklerinin bulundukları ortama olumsuz etki yapabilecek kirlilik etkenlerini en az düzeye indirgeyebilecektir (Martínez-Córdova ve diğ., 2014).

Metagenomik çalışmalar, bir mikrobiyal nişteki kompleks yapıdaki canlıları analiz etmede ve mikrobiyal çeşitliliğin saptanmasında, organizmaları kültür etme temelli tüm konvansiyonel tekniklerden daha detaylı sonuçlar vermektedir (Martínez-Porchas ve Vargas-Albores, 2015).

Metagenomik çalışmalar, bir ekosistemde bulunan tüm canlıların bütün genlerinin saptanmasına yönelik çalışmalar şeklinde de tasarlanabilmekle birlikte, binlerce canlının tüm genomunu çalışmak günümüz teknolojisiyle pratik olarak çok uygulanabilir değildir. Bu nedenle ekosistem hedefli metagenomik çalışmalarda topluluk içindeki organizmaların belirli genlerinin hedef alındığı çalışmalar tercih edilmektedir (Gilbert ve Dupont, 2011).

Çalışmaların büyük çoğunluğunun tıp ve ekoloji gibi disiplinlerde yapıldığı metagenomik çalışmalar, akuakültür alanında henüz çok fazla yoğun değildir. Bunda en büyük etken, metagenomik tekniklerle çalışmanın geçmişteki maliyet değerinin çok yüksek olmasıdır. Bu derece yüksek maliyetler, başlangıçta ancak insan sağlığı veya insan sağlığına doğrudan etki eden ekolojik problemlerle ilgili araştırmalar için ayrılan fonlarla

karşılanabilmekteyken, son yıllarda geliştirilen cihazlar ve dizileme teknolojileri ile metagenomik çalışma maliyetlerini geçmişe oranla çok daha düşürmüş ve akuakültür gibi sektörlerde de uygulanabilir hale getirmiştir (Steele ve Streit, 2005).

Metagenomik çalışmalarda sadece niteliksel değil aynı zamanda niceliksel veriler de elde edilmektedir (Kennedy ve diğ., 2010). Bu sayede yetiştiricilik yapılan suyun, balık yeminin ve balığın mikroflorası ve mikrofloranın içeriği veya bu organizmaların tek bir geni veya birkaç geni ile ilgili işlevsel ve sayısal bilgiler de elde edilebilmektedir.

Deniz suyunda yapılan çalışmalarda, örnek alınan bölgeye göre büyük farklılıklar içermekle birlikte genel olarak hücre yoğunluğu 10^6 hücre/ml olarak hesaplanmıştır (Whitman ve diğ., 1998). Tür çeşitliliği açısından farklı ortalamalar olmakla birlikte, deniz ortamında kültür edilebilen bakteri türleri binlerle ifade edilmekteyken buna karşılık kültürden bağımsız yöntemlerle yapılan incelemelerde on binlere çıkmaktadır (Amaral-Zettler ve diğ., 2010). Akuakültür ortamı da içerdiği organik madde miktarının yoğun olmasından dolayı mikroorganizmaların gelişmesi için çok uygun bir ortam özelliği sergilemektedir ve bu kadar çok türle ilgili çalışmalar için metagenomik uygulamalara başvurmak kaçınılmaz olmaktadır.

Örneğin büyük çoğunluğu doku kültürü gibi özel kültür ortamlarına ihtiyaç duyduğu için, hücre içi zorunlu patojenik bakterilerin hasta balıklardan izole edilmesi ve dolayısıyla teşhis edilmesi zordur. Kültürden bağımsız metagenomik teknikler ve biyoenformatik uygulamalarıyla bu gibi patojenlerin teşhisi kolaylıkla yapılabilmektedir (Fryer ve Mauel, 1997; Corsaro ve Greub, 2006).

Organizmaların 16S rRNA ve 18S rRNA genlerinin V1'den V9'a kadar isimlendirilmiş bölgelerinin çok değişkenli (hypervariable) kısımlarının dizilenmesiyle yapılmış filogenetik analiz çalışmaları uzunca bir süredir yapılmaktadır (Lane ve diğ., 1985). Günümüzde de mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında genomik DNA üzerindeki prokaryotlar için 16S rRNA ve ökaryotlar için 18 rRNA gen bölgelerinin çok değişkenli (hypervariable) kısımlarının analiziyle topluluk içindeki bireyler, kültürden bağımsız olarak metagenomik tespit edilebilmektedir (Hugenholtz ve diğ., 1998).

Mikrobiyal çeşitliliğin akuakültür alanında incelendiği çalışmalar balıklarda (Xing ve diğ., 2013), istiridyelerde (Chauhan ve diğ., 2014), karideslerde (Tang ve diğ., 2014), yeşil su

yetiştiricilik sistemlerinde (Krishnani ve diğ., 2010), akuakültürde kullanılabilecek yeni probiyotik organizmaların belirlenmesinde (Navarrete ve Tovar-Ramírez, 2014) vb. pek çok konuda yapılmakta ve yapılmaya da devam etmektedir.

Akuakültür işletmelerinin mikroorganizma çeşitliliğiyle ilgili bilgiler günümüzde tamamen açığa kavuşmuş bir durumda değildir. Bunda en büyük etken, kültür edilemeyen mikroorganizmaların varlığı ve yapılan çalışmaların çoğunluğunun da bu yetersiz kültür ortamlarını kullanmasından ileri gelmektedir. Bu nedenle akuakültür işletmelerinin mikrobiyal profilini ortaya çıkarmak ancak metagenomik çalışmaların sayısındaki artış ile mümkün olacaktır.

Gen tespit edici algoritmalar tek bir türe ait genomlarda başarıyla çalışmakla birlikte, metagenomik uygulamalardaki birden fazla farklı türe ait ve bütün olmayan, parçalı DNA moleküllerinin olduğu kompleks bir ortamda bu tespit edici algoritmaları kullanarak genleri tespit etmek çok daha zor olmaktadır. Ancak son yapılan çalışmalarda önerilen yöntemlerle, yeni gen tahmin etmeye dayalı yaklaşımlarda düşük kompleksliğe sahip metagenomiklerde yüksek, karmaşık metagenomik örneklerde ise daha düşük olmak üzere tatminkar kesinlik oranları yakalanabilmektedir (Mavromatis ve diğ., 2007; Hoff ve diğ., 2008; Yooseph ve diğ., 2008; Wooley ve diğ., 2010).

Akuakültür sistemlerinde bulunan mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen metabolik reaksiyonların ve bunların gerçekleştirmesinde kullanılan genlerin tespit edilmesi; besinlerin biyokimyasal döngülerini, bakteriyel toplulukların üretim lehine yapılandırılmasını ve mikroorganizmaların hastalıklara neden olan proseslerinin öğrenilerek hastalıkların önlenmesini sağlayabilecektir (Martínez-Porchas ve Vargas-Albores, 2015).

Hastalıklar açısından metagenomiğin bir başka potansiyel kullanım sahası da virüslerdir. Virüsler, deniz ve tatlı su ekosistemlerinde olduğu gibi akuakültür ortamının da doğal bileşenlerindendir. Bir ortamdaki virüs sayısının, aynı ortamda bulunan bakteri sayısının en az 10 katı olduğu hesaplanmıştır. (Amaral-Zettler ve diğ., 2010). Tüm ekosistemlerde olduğu gibi, akuakültür yapılan bölgelerde bulunan virüslerin sayısı, aynı ortamda bulunan prokaryotların sayısı ile orantılı olmaktadır (Suttle, 2007; Alavandi ve Poornima, 2012). Bakterilerde olduğu gibi, yeni virüs türlerinin tanımlanmasında da mevcut teşhis yöntemleri kısıtlı güce sahiptirler. Viral saflaştırma ve sonrasında ‘shotgun’ dizilemeyi

içeren viral metagenomik çalışmaları, viral çeşitliliği belirlemek ve yeni viral hastalıkları tespit etmek için etkinliği kanıtlanmış tekniklerdir ve hem insan hem de veteriner hekimlikte yeni virüslerin keşfi için çok önemli bir araç niteliği vardır (Alavandi ve Poornima, 2012).

Antibiyotiklerin yanlış kullanımı veya fazla kullanımı sonucu patojenlerin bu maddelere direnç geliştirmesine neden olan direnç genlerinin genlerin özellikle kültür edilemeyen bakterilerdeki dağılımı, çeşitliliği ve bu genlerin nereden köken aldıkları hakkındaki bilgiler fazla değildir (Alderman ve Hastings, 1998; Cabello, 2006). Yeni direnç belirleyicilerinin tespitiyle ilgili olarak fonksiyonel ve dizilim tabanlı metagenomik çalışmalar doğal çevrelerde yapılmış olmakla birlikte (Port ve diğ., 2014) bunların akuakültürle ilişkilendirilmesine yönelik çalışmalar çok kısıtlıdır (Martínez, 2012; Port ve diğ., 2012).

Konvansiyonel yöntemlerle antibiyotik direncinin belirlenmesinde, genellikle kültür edilmiş bakterilerin belirli antibiyotik etken maddelerine karşı direnç düzeyini ölçen disk difüzyon ve bu maddelerin minimum inhibe edici konsantrasyonlarının bulunmasına yönelik MIC gibi testlerle belirlenmektedir (Andrews, 2001). Ancak sadece birkaç izole edilmiş bakteri için elde edilmiş bu veriler, akuakültür ortamında bulunan diğer milyonlarca bakteriyle ilgili hiçbir bilgi verememektedir. Real-time PCR (Espy ve diğ., 2006) ve DNA microarray (Heller, 2002) gibi yeni tekniklerin uygulanması da antibiyotik direncini anlamaya yönelik yeterli bilgi verememektedir çünkü bu tekniklerin kullanıldığı genler daha önce tanımı yapılmış ve üzerinde çalışılmış genler olmaktadır. Buna karşın metagenomik yaklaşım, kültürü yapılamayan bakterilerde olanlar da dahil olmak üzere antibiyotik direnç genlerinin varlığı, yokluğu veya değişime uğrayıp uğramadıkları hakkında bilgi verebilmekte ve dirençle ilgili yeni genlerin bulunma hızını arttırmaktadır (Riesenfeld ve diğ., 2004; Diaz-Torres ve diğ., 2006).

Akuakültürde kullanılan yemler, probiyotikler, antibiyotikler vb. birçok madde sedimentte birikme eğilimindedirler. Doğal ortamdan çok farklı yapıda olan ve bu nedenle ‘nadir bölgeler’ olarak isimlendirilen bu tip yerlerde bulunan mikrobiyal toplulukların bu bölgelere adaptasyonuna ilişkin genetik farklılaşmaların tespit edilmesiyle, aynı zamanda antibiyotik direncine neden olan gen farklılaşmalarının de saptanması olasıdır (Martínez-Porchas ve Vargas-Albores, 2015).

Metagenomik çalışmalar sadece yetiştiricilik sistemlerindeki ürünlerle ilgili olumlu iyileştirmeler için değil, aynı zamanda bu sistemlerin çevresinde bulunan ortamla ilgili olarak da iyileştirmeler yapabilecek uygulamaların geliştirilmesine de öncülük edebilecektir. Akuakültürde her yıl milyonlarca ton atık üretilmekte ve bu atıkların önemli bir bölümü de azotlu, sülfürlü, fosforlu ve karbonlu bileşiklerden oluşmakta ve bazı çevresel değişkenlere de bağlı olarak bazı ortamlarda toksik etki gösterebilmektedir. Metagenomik çalışmalarla tanımlanacak genlerle mikroorganizmalar tarafından belirli metabolitlerin algılanması, hücreler içine alınması ve mikroorganizmalarca kullanılmasını sağlayabilecek genlerin ve proteinlerin saptanması ve böylece bu atıkların zararsız formlara dönüştürülmesi sağlanabilecektir. Benzer şekilde bu genlerin tespitiyle birlikte resirkülasyon sistemlerinin çalışmasını sağlayan metabolik çevrimlerin de manipüle edilmesine imkan vererek ve bu türdeki sistemlerin daha performanslı şekilde çalışmasını sağlayabilecektir.

Hem insan hem de veteriner hekimlikte patojenlerin tespiti, daha önceden bilinen bir etkene özel bazı klinik belirtiler göstermesi üzerine yapılmaktadır. Bununla birlikte, klinik olarak belirti gösteren bazı vakalarda etkenin teşhisine yönelik konvansiyonel yöntemlerinin uygulanmasına rağmen teşhisin yapılamadığı veya yanlış yapıldığı örneklerle rastlanmaktadır (Miller ve diğ., 2013). Bununla ilgili insan hekimliğinde yapılan çalışmalarda, hastalık etkeninin teşhis edilememe oranı gastroenteritte yaklaşık olarak %40 (Finkbeiner ve diğ., 2008), ensefalit olgularında ise %60 olarak hesaplanmıştır (Ambrose ve diğ., 2011).

Bakterilerde olduğu gibi birçok virüs de laboratuvarıda üretilmemektedir. Bu özelliklerinden ötürü konvansiyonel yöntemlerle farklı virüslerin teşhisi yapılamamakta ve yeni virüslerin keşfedilmesi mümkün olamamaktadır. Virüslerin teşhisi geleneksel olarak virüse özgü antikorlar veya virüs nükleik materyalindeki bilinen bir bölgenin moleküler yöntemlerle çoğaltılması veya kültür ortamında üretilerek sitopatik etkilerin görülmesiyle yapılmaktadır (Storch, 2000). Bu yöntemlerde virüse özgü antikor kullanımı ancak böyle bir antikorun daha önceden bilinen bir virüse karşı üretilmiş olmasıyla kullanılabilir ve yeni virüslerin teşhisi için bir değer taşımamaktadır. Benzer şekilde virüs nükleik materyalindeki bir bölgenin PCR gibi moleküler yöntemlerle çoğaltılabilmesi için de virüs genomu hakkında ön bilgi sahibi olmak gereklidir.

Metagenomik tekniklerden olan shotgun dizileme genellikle genomik çeşitlilik çalışmalarında kullanılmakla birlikte, viral patojenlerin teşhisinde (Rosario ve Breitbart, 2011) ve çevresel örneklerde virüs tespitinde de kullanılabilir (Venter ve diğ., 2004).

Maliyeti gittikçe düşen yeni nesil dizileme tekniklerinin de yardımıyla birlikte metagenomik çalışmaların; yeni türlerin ve suşların bulunmasında (Xu ve diğ., 2011; Wan ve diğ., 2013), hastalık çıkışlarında (Greninger ve diğ., 2010; Loman ve diğ., 2013) ve kompleks hastalıklarda (Cho ve Blaser, 2012; Qin ve diğ., 2012) kullanım etkinliği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Tüm bu nedenlerden dolayı, enfeksiyon hastalıkları ve patojenlerle ilgili olarak son yıllarda gösterilen metagenomik yaklaşım büyük olasılıkla artan bir şekilde önümüzdeki yıllarda da hızla devam edecektir.

Yaşayabilir formda ve yeterli miktardaki tanımlanmış mikroorganizmalardan oluşan ve konaktaki bir bölgede kolonizasyon veya implantasyon yoluyla mikroflorayı değiştiren ve konak sağlığına faydalı etki gösteren preparat veya ürün olarak tanımlanan (Schrezenmeir ve De Vrese, 2001) probiyotikler, diğer canlı gruplarında olduğu gibi akuakültürde de kullanılmaktadır. Bugüne kadar pek çok bakteri ve maya türü akuakültürde probiyotik olarak farklı türdeki balıklarda denenmiş, immünolojik açıdan sağladıkları faydalar, balık patojenlerine karşı antagonistik etkileri, sindirime yaptıkları katkılar, gelişim üzerine etkileri vb. birçok açıdan incelenmiştir (Mohapatra ve diğ., 2013).

Probiyotiklerin kullanıldığı akuakültür sistemlerindeki mikrobiyal toplulukları izlemek için metagenomik teknikler oldukça etkili ve kullanışlıdır. Hem kültürü yapılan canlının sindirim kanalındaki hem de kültür ortamındaki mikroorganizmalar, metagenomik çalışmalara dahil edilebilmektedir. Metagenomik tekniklerle probiyotiklerin kullanıldığı canlı veya sistemlerdeki sinerjik veya antagonistik mikrobiyal etkileşimler kültürden bağımsız olarak gözlemlenebilmektedir (Mohapatra ve diğ., 2013; Martínez-Porchas ve Vargas-Albores, 2015).

2.12. YENİ NESİL DNA DİZİLEME TEKNOLOJİSİ

İlk kez Sanger ve diğ. (1977) tarafından tanımlanmış olan ve başlangıçta çok küçük ölçekli olan DNA dizileme; günümüzde robot teknolojisi altyapısına, biyoenformatiğe, bilgisayar

veri tabanlarına ve özelleşmiş cihazlara gereksinim duyan bir sanayi haline gelmiştir. Özellikle 2000’li yılların başlarında başlayan ve insan genomunun dizilenmesi ihtiyacı için yapılan çalışmaların da katkısıyla DNA dizileme teknolojisinde büyük gelişmeler kaydedilmiştir (Mardis, 2008).

Günümüzdeki Sanger dizileme teknolojisi ile teknik olarak 600-1000 baz uzunluğundaki 384 adet diziye paralel olarak dizilemek mümkün olabilmekle birlikte 384 kapiler sistemi çok nadir bulunmaktadır. Bugünün standardı olan 96 kuyucuklular ile günde en fazla 6 Mb DNA dizisi elde edilebilmektedir (Shibata ve diğ., 2000; Emrich ve diğ., 2002).

Yüksek hacimli Sanger DNA dizileme günümüzde bazı dizileme merkezlerinde gelişmiş cihazlarla zaten gerçekleştiriliyor olmakla birlikte, ‘yeni nesil’ (next generation) olarak adlandırılan ve hem yüksek ölçekte hem de hızı ve güvenilirliği devamlı artan cihazlar da DNA dizileme alanında yaygın bir şekilde kullanılmakta ve kullanıcı sayısı da devamlı artmaktadır (Mardis, 2008). Yeni nesil dizilemenin kapiler tabanlı dizilemeden en büyük farkı ve aynı zamanda üstünlüğü, tek seferde 96 kez yerine milyonlarca dizi okumasını paralel olarak işleyebilme kabiliyetidir. Yeni nesil dizilemede bu çok yüksek iş hacmi için sadece bir veya iki cihazın çalıştırılması yeterli olabilmektedir (Cowan ve diğ., 2000; Mardis, 2008). İnsan genomu gibi büyük projelerin Sanger tekniği kullanılarak yıllarca süren analizleri, yeni nesil dizileme sistemleri sayesinde haftalar ve hatta günlerle ifade edilebilecek zaman dilimleri içinde başarılabilmektedir (Ansorge, 2009).

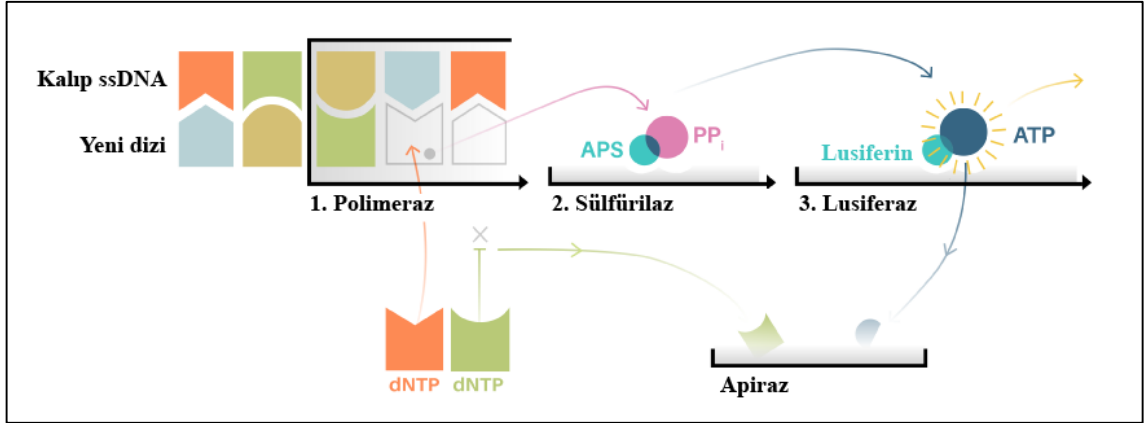
Yeni nesil dizi okumaları, ‘parça kütüphanelerinden’ (fragment library) okunmaktadır; bir başka deyişle konvansiyonel vektör tabanlı klonlama ve kapiler dizilemede kullanılan *Escherichia coli* tabanlı amplifikasyon evrelerine ihtiyaç duyulmamaktadır. Yeni nesil dizilemede DNA örneklerinin parçalanması sonucu elde edilen her bir parçaya, platforma özgü spesifik adaptör oligolar, ligasyon yoluyla eklenir. Bu sistemde kütüphane oluşturmak için göreceli olarak az miktarda DNA örneği (en çok birkaç mikrogram) gerekmektedir. Bu platformlar ayrıca DNA parçasını her iki yönden de dizileyebilme yeteneğine sahiptirler. Bazı yeni nesil dizileme çalışmalarında RNA moleküllerinden RT-PCR ile oluşturulan cDNA parça kütüphaneleri havuzundan okuma yapılmaktayken, bazılarında PCR ampikonlarının oluşturduğu havuzdan okuma yapılmaktadır (Mahmod, 2014). Yeni nesil dizileme cihazları, kapiler sistemlerle karşılaştırıldığında, platforma bağlı

olarak değişmekle birlikte göreceli olarak kısa okuma uzunlukları üretmektedirler (Mardis, 2008). Bu platformların karşılaştırması Tablo 2.4'te verilmiştir.

2.12.1 Pirodizileme

Pirodizileme, Ronaghi (2001) tarafından geliştirilmiş olan ve basitçe, DNA polimeraz enzimi aracılığıyla gerçekleşen nükleotit birleşiminde açığa çıkan pirofosfat moleküllerinin kemoluminesans bir enzim yardımıyla saptanmasına dayalı bir yöntemdir.

Pirodizilemede dizilenecek tek iplikli kalıp DNA (ssDNA), dizileme primerleriyle hibridize edilip sabit bir halde; DNA polimeraz, ATP sülfürilaz, lusiferaz ve apiraz enzimleriyle birlikte adenosine 5' phosphosulfate (APS) ve lüsiferin substratlarıyla inkübe edilir. Daha sonra A, C, G ve T nükleotitleri sıralı olarak reaksiyona eklenir ve çıkarılır. Nükleotit solüsyonu, kalıbın ilk eşleşmemiş bazıyla birleştğinde pirofosfat (PPi) açığa çıkar. ATP sülfürilaz açığa çıkan pirofosfat (PPi) molekülünü adenosine 5' phosphosulfate (APS) varlığında ATP'ye (adenozin trifosfat) çevirir. Bu ATP molekülü, lusiferaz enzimi için substrat vazifesi görerek lusiferinin oksilüsiferine dönüşmesini sağlar ve bu reaksiyon da görünür bir ışık üretir. Işığın miktarı, ortamdaki ATP'nin miktarıyla orantılı olarak değişmektedir. Lusiferaz enziminin katalizlemesiyle açığa çıkan ışık bir kamera ile tespit edilir ve ham veriler analiz edilerek kalıp DNA'nın dizisi belirlenir. Reaksiyonda bağlanmayan nükleotitler ve ATP, apiraz enzimiyle parçalanır ve reaksiyon diğer bir nükleotitle tekrar başlatılır (Ronaghi, 2001). Pirodizileme aşamaları Şekil 2.10'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.10: Pirodizilemenin şematik gösterimi.

2.12.2. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri Ve Kullanılan Cihazlar

Roche (454) GS FLX Sequencer: İlk kez 2004 yılında kullanıma sunulmuştur ve ticari olarak geliştirilen ilk yeni nesil dizileme sistemidir. Bu dizileme cihazı, sentez yoluyla dizileme prensibine dayalı pirodizileme yöntemini kullanmaktadır. Bu sistemde DNA ipliklerinden oluşan kalıplar, birbirinden ayrı tüplerde veya kuyucuklu plaklar içinde dizileme yerine, emülsiyon PCR ile yüzbinlerce agaroz boncuğun üzerinde çoğaltılmaktadır. Çoğaltım sonunda, her biri sadece tek bir çoğaltılmış DNA parçası içeren yüzbinlerce boncuk, cihazın PicoTiterPlate isimli (PTP) ve her birinde 1,6-3,2 milyon kuyucuk içeren plakların yüzeyine eklenmektedir. Cihaza yerleştirilen plaklarla pirodizileme temelli analiz yapılmakta ve DNA dizileri belirlenmektedir.

Çift-sonlu okuma yapabilen cihazın ortalama okuma uzunlukları modele göre değişmektedir: Günümüzde üretimde olan modellere göre GS Junior Plus System yaklaşık 700 bp, GS FLX Titanium XLR70 modeli 450 bp ve GS FLX Titanium XL+ modeli 700 bp ortalama okuma uzunluklarına sahiptir. En gelişmiş modeli 700 Mb veri çıkış hacmi sağlamaktadır.

Illumina Genome Analyzer: İlk kez ticari olarak 2006 yılında kullanıma sunulmuştur, eski adıyla Solexa olarak bilinmektedir. Her biri farklı bir floresan boya ile etiketlenmiş dört baz için geri dönüşümlü sonlandırma nükleotitleri ve bunlara bağlanabilen özel bir DNA polimeraz enziminden oluşan sentez yoluyla dizileme prensibine dayalı dizileme yapan bir cihazdır.

Çift-sonlu okuma yapabilen cihazın okuma uzunlukları cihazın modeline göre 25-300 bp arasında değişmektedir. En gelişmiş modeli 1,6-1,8 Tb gibi yüksek veri çıkış hacmine sahiptir.

Applied Biosystems (ABi) SOLiD sequencer: Ticari olarak 2007 yılında kullanıma sunulmuştur. İşleyiş açısından DNA ligaz ile katalizleme prensibine göre çalışır. Son geliştirilen modellerde 320 Gb veri çıkış hacmine sahiptir.

Genomik DNA'nın dizilenmesindeki yöntemlerin gelecekte daha da geliştirilmesiyle birlikte medikal sistemlerde hastalıkların tanısı, yeni ilaçların ve yeni tanı tekniklerinin geliştirilmesi olası gözükmemektedir. Yeni nesil dizileme teknikleri ayrıca aynı ortamda yaşayan mikroorganizmaların genetik boyutlarını araştıran mikrobiyal ekoloji çalışma sahasında da günümüzde olduğu gibi gelecekte de kullanılacak bir teknoloji olacaktır. Birçok mikrobiyal dizileme projesi hem tamamlanmış ve sonuçları alınmış olarak hem de yeni projeler olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsan vücudu içinde ve üzerinde yaşayan mikrobiyal çeşitliliği ortaya çıkarmak için 2007 yılında başlatılmış olan 'Human Microbiome Project' isimli projenin, insan sağlığı ve hastalıklarını anlamada büyük katkı sağlayacağı tahmin edilmektedir (Turnbaugh ve diğ., 2007; Hugenholtz ve Tyson, 2008; Ansorge, 2009).

Tablo 2.4: NGS platformlarının karşılaştırması (Fraher ve diğ., 2012).

Üretici - Cihaz	Avantajları	Dezavantajları
Roche – 454 FLX	- Okuma uzunluğu fazla - Yüksek hacimli veri - Hassas - Aynı anda birden fazla örnek çalışılabilir - Klonlama sorunları yok	- Yüksek kimyasal maliyeti - Homopolimerlerde yüksek hata oranı - Düşük dizi okumaları - Yoğun biyoenformatik gerekli
Illumina - HiSeq	- Çok yüksek hacimli veri - Gün geçtikçe geliştirilen okuma uzunluğu - Minimum pratik yapma süresi	- Uzun çalışma süresi - Kısa okuma uzunluğu
Life Technologies – Ion Torrent	- Kısa çalışma süresi - Çip kimyasallarında esneklik	Gelişme aşamasında
Life Technologies - SOLiD	- Düşük hata oranı - Çok yüksek veri hacmi	- Çok kısa okumalar - Uzun çalışma süresi
Pacific Bioscience - PacBio RS	- Örneklerin kolay hazırlanması - Kimyasal maliyeti düşük - Okuma uzunluğu fazla	- Hata oranları yüksek - Yüksek maliyetli sistem

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMANIN YAPILDIĞI YER VE TARİH BİLGİLERİ

Bu çalışma Ege Bölgesi'nde, Muğla ili Milas ilçesinde bulunan deniz balıkları yetiştiriciliği alanında faaliyet göstermekte olan ticari bir kuluçkahane işletmesinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışma için gerekli örneklemeler, toplamda 4 dönem olmak üzere ilgili kuluçkahanede Aralık (2012) ile Ocak (2013) tarihleri arasında yapılmıştır. Örneklemeye dönemleri balığın kuluçkahanedeki beslenme dönemleri dikkate alınarak: Dışarıdan beslenmenin olmadığı prelarva dönemi (I. Dönem), rotifer ile beslenme dönemi (II. Dönem), rotifer ve *Artemia* ile birlikte beslenme dönemi (III. Dönem) ve *Artemia* ile beslenme dönemi (IV. Dönem) olmak üzere toplam 4 dönemde yapılmıştır. Çubuklar, birinci dönem için ilk kez 08.12.2012 tarihinde yerleştirilmiş ve izleyen her dönem için dönem başlangıcında tüm çubuklar yenileriyle değiştirilmiştir.

3.2. ÇALIŞMA TANKLARINDAKİ SUYUN SICAKLIK VE TUZLULUK DEĞERLERİ

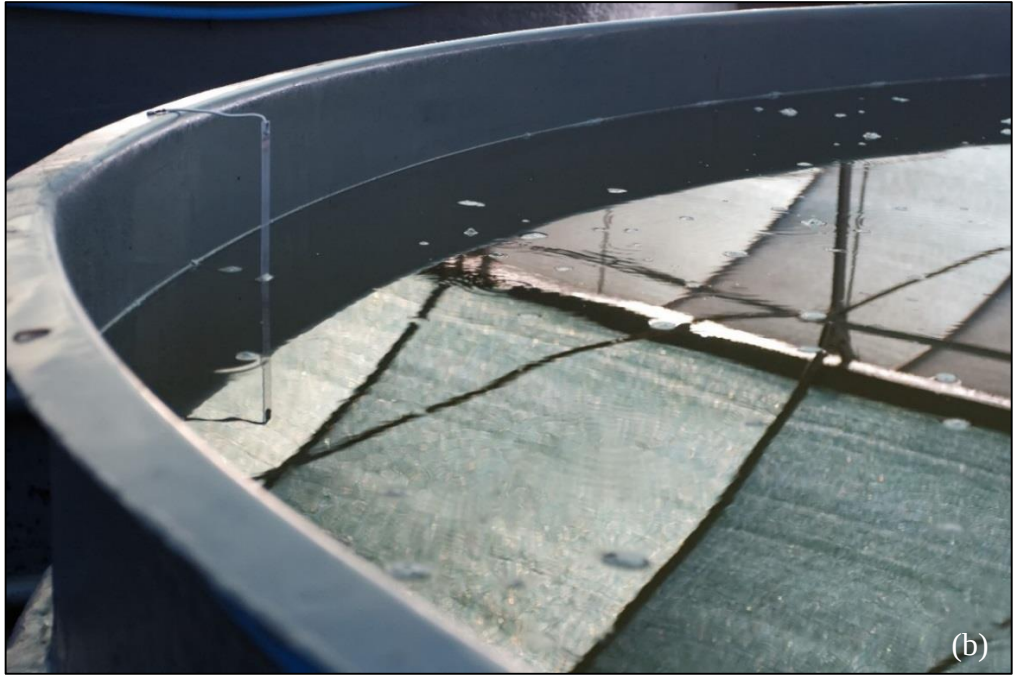
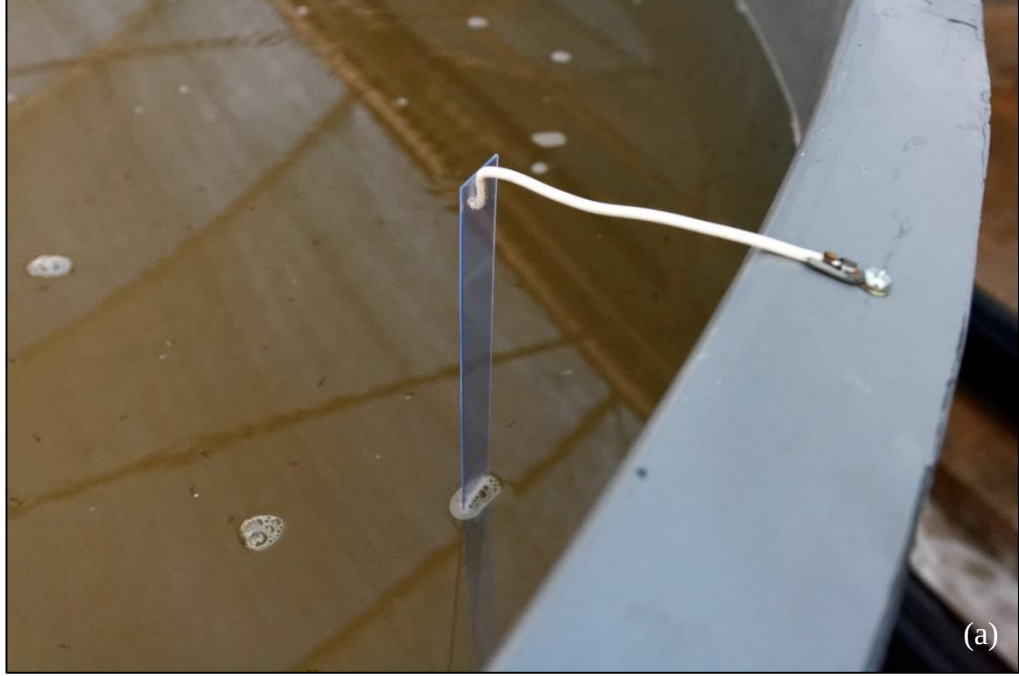
İlk dönem örneklemede tank suyunun tuzluluğu 4 gün boyunca kademeli olarak ‰40 tuzluluktan ‰29 tuzluluğa düşürülmüştür. Diğer tüm dönemlere ait örneklemelerde tank suyunun tuzluluk oranı ‰25 olarak ölçülmüştür.

Tüm çalışma boyunca tanklardaki su sıcaklığı $18 \pm 0,5$ °C olarak ölçülmüştür.

3.3. BİYOFİLM SAPTAMA DÜZENİĞİNİN KURULUMU

Biyofilmin sinarit balığı yetiştiriciliğinde kullanılan tanklardan izole edilmesinde 490x200x1 mm ölçülerinde PVC çubuklardan yararlanılmıştır. PVC çubuklar, tankların kenarlarına açılan deliklere kablolar kullanılarak tutturulmuştur (Şekil 3.1). Çubuklar, her bir örneklemeye dönemi için iki ayrı tanka yerleştirilmiş ve her bir tankta 4 adedi

bakteriyolojik kültür yöntemi ve 4 adedi de kültürden bağımsız yöntem için kullanılmak üzere 8 adet çubuk suya dik bir şekilde konumlandırılmıştır.



Şekil 3.1: Tanka sabitlenmiş çubukların görüntüsü. (a) Detay görüntüsü, (b) Tanktaki konumu.

Her bir PVC çubuk tank suyuna yerleştirilmeden önce iyice yıkanmış, kurutulmuş ve kullanımdan hemen önce %70'lik etanol (v/v) ile tüm yüzeyi dezenfekte edilmiş ve tank üzerine açılan deliklere bağlanan esnek tellerle sabitlenmiştir (Yu ve diğ., 2010).

3.4. BİYOFİLM ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Çalışma süresince alınan örneklerden: I. Dönem örnekleri 12.12.2012, II. Dönem örnekleri 15.12.2012, III. Dönem örnekleri 21.12.2012 ve IV. Dönem örnekleri 03.01.2013 tarihlerinde alınmıştır.

Aseptik bir şekilde tanktan çıkarılan çubuklara, Leonard ve diğ. (2000) belirttiği yöntemin modifiye edilmiş haliyle muamele edilmiştir. Çubukların yüzeyi kazınmadan önce planktonik organizmaların uzaklaşması için steril %0,9 Sodyum Klorür çözeltisiyle (Normal Saline) iyice yıkanmıştır. Yıkama sonunda biyofilm örnekleri, yetiştiricilik yapılan suya batırılan çubukların su yüzeyinden itibaren 30 cm derinlikte başlayan 9 cm uzunluğundaki kısmından, steril hücre kazıyıcıları (UltraCruz® Cell Scrapers) kullanılarak kazınmıştır. Çubuk üzerinden kazıntı alınan alan 18 cm²'dir.

Kazıntı materyalleri her biri ayrı tüpte olmak üzere hem steril fosfat tamponlu tuz çözeltisine (PBS) (5 ml) hem de RNALater çözeltisi (Ambion) (5 ml) içeren 50 ml hacmindeki steril santrifüj tüplerine (Isolab) alınmıştır.

PBS çözeltisi içindeki örnekler bakteriyolojik kültür için derhal işleme alınmış, RNALater çözeltisi içindeki örnekler ise üretici firmanın talimatları doğrultusunda önce gece boyunca +4 °C'de bekletilmiş, daha sonra -20 °C sıcaklıkta kültürden bağımsız teşhis yöntemi prosedürü başlatılana kadar saklanmıştır.

3.5. BAKTERİYOLOJİK KÜLTÜR İLE TEŞHİS YÖNTEMİ

3.5.1. Bakteriyel Süspansiyonun Hazırlanması ve Sayımı

PBS çözeltisi içine alınmış olan kazıntı materyalleri vortekslendikten sonra, bu karışımdan 1 ml örnek alınarak steril PBS çözeltisiyle 10 katlı seri dilüsyonlar yapılmıştır. Her bir dilüsyondan alınan 100 µl örnek, 3 tekrarlı olmak üzere steril drigalski ile Marine Agar 2216 (MA) (Difco) besiyerine yayma ekim yapılmıştır (Whitman, 2004).

Ekim yapılan besiyerleri Maturin ve Peeler (2009) bildirdiği şekilde 22 °C sıcaklıkta 24-72 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda üzerinde 25 ile 250 arası koloni bulunduran besiyerleri seçilerek koloniler sayılmış ve her bir dönem içindeki çubuklardan elde edilen koloni sayılarının ortalaması alınarak dönemsel toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB)

sayısı hesaplanmıştır. Üremenin görüldüğü petri kutularında morfolojik olarak birbirinden farklı koloniler seçilerek saf kültür elde edilene kadar MA besiyerine tekrar ekilmiştir. Saf olarak elde edilen izolatlar ayrıca Gram boyama, hareket, sitokrom oksidaz, katalaz ve O/F testleri yapılarak sonuçlar kaydedilmiştir (Whitman, 2004).

3.5.2. DNA İzolasyonu ve PCR

Saf olarak elde edilmiş izolatlar Marine Borth 2216 (Difco) besiyerine ekilmiş ve 22 °C sıcaklıkta 24-72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerden alınan örnekler PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) üretici firma yönergeleri doğrultusunda kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'lar PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmıştır (Innis ve diğ., 2012).

Evrensel bakteri primer setleri S-D-Bact-0008-a-S-20 (5'- GWA TTA CCG CGG CKG CTG -3') ve S*-Univ-0536-a-A-18 (5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') kullanılarak 16S rRNA geninin yaklaşık 540 bp uzunluğundaki bölgesi çoğaltılmıştır (Suau ve diğ., 1999).

PCR karışımı (50 µl); yaklaşık 50 ng kalıp DNA, her bir primerden 0,4 µM, PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) ve nükleaz içermeyen su (Thermo Scientific) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon, termal döngü cihazında (Biometra, TPersonal); ilk denatürasyon 95 °C 3 dk., 25 döngü olarak 95 °C 30 sn., 56 °C 1 dk., 72 °C 1 dk. ve son uzama adımı 72 °C 4 dk. olacak şekilde programlanarak gerçekleştirilmiştir (Innis ve diğ., 2012).

3.5.3. Dizileme

PCR ürünleri, amplifikasyon sonunda TAE (Tris/Asetik Asit/EDTA) ile hazırlanmış ve 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren %1,5'lik (w/v) agaroz jelde 40 dakika 90 V altında elektroforeze tabi tutulmuştur. PCR ürünleri UV transillüminatör cihazında görüntülenmiş ve GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) ile bantların yaklaşık uzunlukları hesaplanmıştır (Innis ve diğ., 2012).

PCR ürünleri BM Labosis (Ankara) firması tarafından saflaştırılmış ve çift yönlü olarak dizilenmiştir. Elde edilen diziler Bioedit v7.0.0 (Hall, 1999) yazılımı ile ClustalX 2.1

(Larkin ve diğ., 2007) ve BLASTN 2.2.20 (Zhang ve diğ., 2000) algoritması kullanılarak analiz edilmiştir.

3.6. KÜLTÜRDEN BAĞIMSIZ TEŞHİS YÖNTEMİ

3.6.1. DNA İzolasyonu ve PCR

RNA Later solüsyonu içinde -20 °C sıcaklıkta depolanmış ürünlerin sıcaklığı önce oda sıcaklığına getirilmiş ve sonrasında DNA izolasyon protokolü uygulanmıştır. RNA Later solüsyonu içinde bulunan örneklerden PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) üretici firma yönergeleri doğrultusunda kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'lar PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmıştır.

PCR karışımı (50 µl); yaklaşık 50 ng kalıp DNA, her bir primerden 0,4 µM, PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) ve nükleaz içermeyen su (Thermo Scientific) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyon, termal döngü cihazında (Biometra, TPersonal): İlk denatürasyon 95 °C 3 dk., 25 döngü olarak 95 °C 30 sn., 56 °C 1 dk., 72 °C 1 dk. ve son uzama adımı 72 °C 4 dk. olacak şekilde programlanarak gerçekleştirilmiştir (Innis ve diğ., 2012).

3.6.2. Pirodizileme

Priodizileme, Dowd ve diğ. (2008) tarafından tanımlanan bTEFAP pirodizileme (Bacterial Tag—Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing) yöntemine göre Molecular Research LP (ABD) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Amplikon eldesi için 16S evrensel primerler 27FMod (5'-AGR GTT TGA TC MTGG CTCAG -3') ve 519Rmodbio (5'-GWA TTAC CGCGG CKGCTG -3') kullanılmıştır. PCR reaksiyonu HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen) kullanılarak: 94 °C 3 dk., 28 döngü olarak 94 °C 30 sn., 53 °C 40 saniye ve 72 °C 1 dk. ve son uzama adımı 72 °C 5 dk. olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Dowd ve diğ., 2008).

PCR sonrasında tüm örnekler Agencourt AMPure (Agencourt Bioscience Corporation, ABD) kullanılarak saflaştırılmıştır ve GS FLX Titanium (Roche) cihazında, üretici firmanın reaktifleri ve yönergeleri doğrultusunda kullanılarak dizilenmiştir. Elde edilen

dizilerden türetilen OTU (Operational Taxonomic Unit) bilgileri, BLASTN 2.2.20 (Zhang et al., 2000) algoritması kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. BAKTERİYOLOJİK KÜLTÜR BULGULARI

4.1.1. Birinci Dönem Örnekleme Bulguları

Birinci dönem biyofilm örneklerinin bakteriyolojik kültürü sonucunda toplam 15 adet saf kültür elde edilmiştir. Bu dönemdeki örneklerinin 16S rRNA geni dizileme sonuçlarına göre: 7 adet izolat *Pseudoalteromonas* sp., 4 adet izolat *Cobetia marina*, 2 adet izolat *Halomonas* sp., 1 adet izolat *Vibrio tapetis* ve 1 adet izolat *Amphritea atlantica* olarak teşhis edilmiştir (Tablo 4.1). Birinci dönem biyofilm içeriğinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı $6,6 \times 10^4$ CFU/ml olarak belirlenmiştir. Birinci dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.

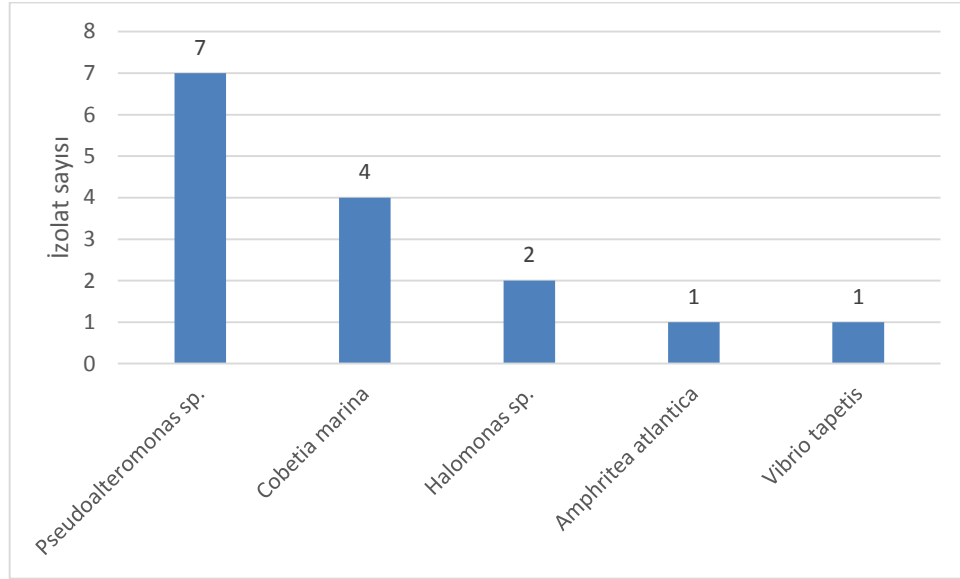
Tablo 4.1: Birinci dönem biyofilm örneklerin 16S rRNA geni dizileme sonuçları.

İzolat no.	Tür	Benzerlik	Erişim no.
PA1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	99%	DQ173046
PA2	<i>Cobetia marina</i>	100%	AY628694
PA3	<i>Cobetia marina</i>	100%	AY628694
PA4	<i>Cobetia marina</i>	100%	AY628694
PA5	<i>Halomonas</i> sp.	100%	JF416844
PA6	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173046
PA7	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173046
PA8	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173046
PA9	<i>Halomonas</i> sp.	100%	JF416844
PA10	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173046
PA11	<i>Cobetia marina</i>	100%	AY628694
PA12	<i>Vibrio tapetis</i>	99%	JQ406679
PA13	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173046
PA14	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173046
PA15	<i>Amphritea atlantica</i>	100%	NR_042455

Tablo 4.2: Birinci dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.

İzolat no.	Gram boyama	Hareket	Sitokrom oksidaz	Katalaz	O/F	O/129	Hücre morfolojisi	Koloni morfolojisi
PA1	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PA2	-	-	-	+	O	R	Basil	Yuvarlak, grimsi beyaz
PA3	-	-	-	+	O	R	Basil	Yuvarlak, grimsi beyaz
PA4	-	-	-	+	O	R	Basil	Yuvarlak, grimsi beyaz
PA5	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, krem
PA6	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PA7	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PA8	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PA9	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, krem
PA10	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PA11	-	-	-	+	O	R	Basil	Yuvarlak, grimsi beyaz
PA12	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, yarı saydam
PA13	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PA14	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PA15	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, bejimsi-beyaz renkli

İzolatların cins bazında dağılımı ise: 7 adet *Pseudoalteromonas*, 3 adet *Cobetia*, 3 adet *Halomonas*, 1 adet *Vibrio* ve 1 adet *Amphritea* olarak bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Birinci dönem kültür izolatlarının profili.

4.1.2. İkinci Dönem Örneklem Bulguları

İkinci dönem biyofilm örneklerinin bakteriyolojik kültürü sonucunda toplam 34 adet saf kültür elde edilmiştir. Bu dönemdeki örneklerinin 16S rRNA geni dizileme sonuçlarına göre: 8 adet izolat *Pseudoalteromonas* sp., 6 adet izolat *Listonella anguillarum*, 5 adet izolat *Vibrio tubiashii*, 3 adet izolat *Pseudoalteromonas marina*, 3 adet izolat *Vibrio* sp., 2 adet izolat *Alteromonas macleodii*, 2 adet izolat *Marinomonas* sp., 2 adet izolat *Microbacterium oxydans*, 1 adet izolat *Agarivorans* sp., 1 adet izolat *Bacillus* sp. ve 1 adet izolat *Tenacibaculum* sp. olarak teşhis edilmiştir (Tablo 4.3).

İkinci dönem biyofilm içeriğinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı $1,5 \times 10^4$ CFU/ml olarak belirlenmiştir. İkinci dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir.

İzolatların cins bazında dağılımı ise: 11 adet *Pseudoalteromonas*, 6 adet *Listonella*, 8 adet *Vibrio*, 2 adet *Alteromonas*, 2 adet *Marinomonas*, 2 adet *Microbacterium*, 1 adet *Agarivorans*, 1 adet *Bacillus* ve 1 adet *Tenacibaculum* olarak bulunmuştur (Şekil 4.2).

Tablo 4.3: İkinci dönem biyofilm örneklerinin 16S rRNA geni dizileme sonuçları.

İzolasyon no.	Tür	Benzerlik	Erişim no.	İzolasyon no.	Tür	Benzerlik	Erişim no.
PB1	<i>Agarivorans</i> sp.	100%	FJ593496	PB18	<i>Vibrio tubiashii</i>	99%	CP009354
PB2	<i>Listonella anguillarum</i>	100%	AY662305	PB19	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	KF994031
PB3	<i>Bacillus</i> sp.	99%	DQ079008	PB20	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	KC160912
PB4	<i>Alteromonas macleodii</i>	100%	KM037734	PB21	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	GQ495024
PB5	<i>Vibrio tubiashii</i>	99%	CP009354	PB22	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173046
PB6	<i>Listonella anguillarum</i>	98%	AY662305	PB23	<i>Alteromonas macleodii</i>	100%	KM037734
PB7	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	FJ015037	PB24	<i>Tenacibaculum</i> sp.	99%	JN676161
PB8	<i>Listonella anguillarum</i>	98%	AY662305	PB25	<i>Vibrio tubiashii</i>	99%	CP009354
PB9	<i>Listonella anguillarum</i>	100%	AY662305	PB26	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	GU198498
PB10	<i>Vibrio</i> sp.	99%	AJ560649	PB27	<i>Listonella anguillarum</i>	100%	AY662305
PB11	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	FR750937	PB28	<i>Marinomonas</i> sp.	100%	AJ843078
PB12	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	99%	FJ169963	PB29	<i>Vibrio</i> sp.	100%	FJ457313
PB13	<i>Vibrio tubiashii</i>	100%	CP009354	PB30	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	99%	DQ173041
PB14	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	98%	KC160912	PB31	<i>Vibrio</i> sp.	100%	KF488567
PB15	<i>Marinomonas</i> sp.	99%	AJ843079	PB32	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173046
PB16	<i>Microbacterium oxydans</i>	99%	KF055008	PB33	<i>Microbacterium oxydans</i>	99%	AJ717356
PB17	<i>Listonella anguillarum</i>	100%	AY662305	PB34	<i>Vibrio tubiashii</i>	99%	CP009354

Tablo 4.4: İkinci dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.

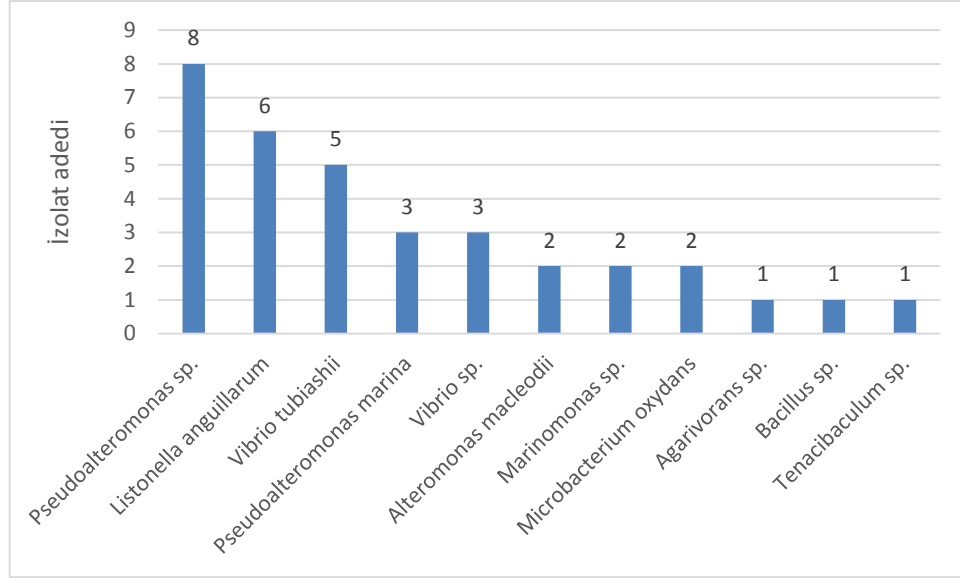
İzolat no.	Gram boyama	Hareket	Sitokrom oksidaz	Katalaz	O/F	O/129	Hücre morfolojisi	Koloni morfolojisi
PB1	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, yumuşak, sarımsı beyaz
PB2	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PB3	+	-	+	+	O	R	Basil (zincir oluşturmuş)	Düz, ondüleli, beyaz
PB4	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, yumuşak, yarı saydam
PB5	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem, mukoit
PB6	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PB7	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PB8	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PB9	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PB10	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PB11	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı
PB12	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PB13	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem, mukoit
PB14	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli

Tablo 4.4 (devam):

İzolat no.	Gram boyama	Hareket	Sitokrom oksidaz	Katalaz	O/F	O/129	Hücre morfolojisi	Koloni morfolojisi
PB15	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, yarı saydam
PB16	+	+	-	+	O	R	Basil	sarı
PB17	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PB18	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem, mukoit
PB19	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı
PB20	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PB21	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PB22	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PB23	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, yumuşak, yarı saydam
PB24	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düzensiz kenarlı, sarı
PB25	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem, mukoit
PB26	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı
PB27	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PB28	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, yarı saydam

Tablo 4.4 (devam):

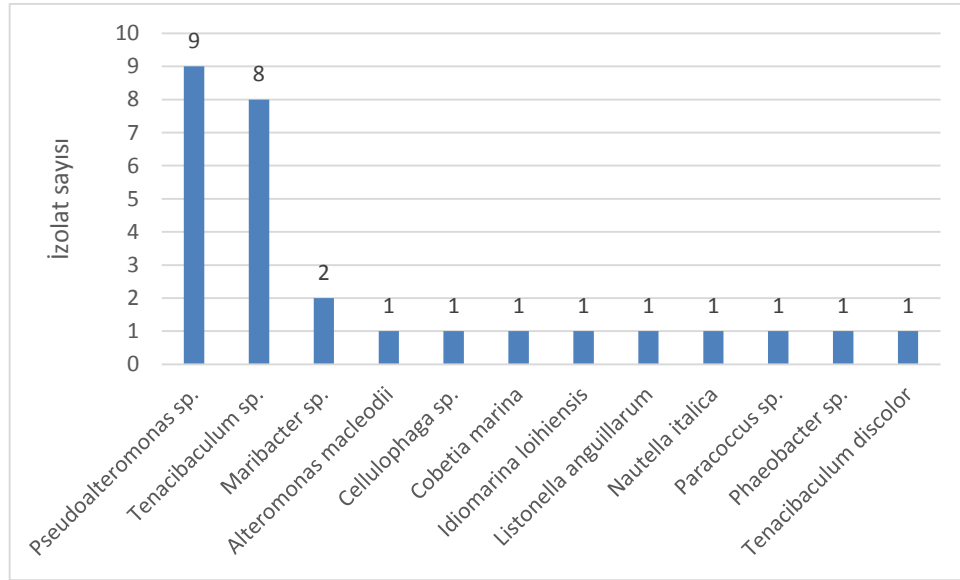
İzolat no.	Gram boyama	Hareket	Sitokrom oksidaz	Katalaz	O/F	O/129	Hücre morfolojisi	Koloni morfolojisi
PB29	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PB30	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PB31	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PB32	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PB33	+	+	-	+	O	R	Basil	Yuvarlak, sarı renkli
PB34	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem, mukoit



Şekil 4.2: İkinci dönem kültür izolatlarının profili.

4.1.3. Üçüncü Dönem Örneklem Bulguları

Üçüncü dönem biyofilm örneklerinin bakteriyolojik kültürü sonucunda toplam 28 adet saf kültür elde edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Üçüncü dönem kültür izolatlarının profili.

Bu dönemdeki örneklerinin 16S rRNA geni dizileme sonuçlarına göre: 9 adet izolat *Pseudoalteromonas sp.*, 8 adet izolat *Tenacibaculum sp.*, 2 adet izolat *Maribacter sp.*, 1 adet izolat *Alteromonas macleodii*, 1 adet izolat *Cellulophaga sp.*, 1 adet izolat *Cobetia marina*, 1 adet izolat *Idiomarina loihiensis*, 1 adet izolat *Listonella anguillarum*, 1 adet

izolat *Nautella italica*, 1 adet izolat *Paracoccus* sp., 1 adet izolat *Phaeobacter* sp. ve 1 adet izolat *Tenacibaculum discolor* olarak teşhis edilmiştir (Tablo 4.5).

Üçüncü dönem biyofilm içeriğinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı $4,75 \times 10^5$ CFU/ml olarak belirlenmiştir. Üçüncü dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.5: Üçüncü dönem biyofilm örneklerinin 16S rRNA geni dizileme sonuçları.

İzolat no.	Tür	Benzerlik	Erişim no.	İzolat no.	Tür	Benzerlik	Erişim no.
PC1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ978982	PC15	<i>Maribacter</i> sp.	99%	GU936121
PC2	<i>Tenacibaculum discolor</i>	100%	JN676161	PC16	<i>Nautella italica</i>	100%	AM944522
PC3	<i>Tenacibaculum</i> sp.	100%	FN554616	PC17	<i>Cellulophaga</i> sp.	99%	AF539757
PC4	<i>Phaeobacter</i> sp.	99%	NR_074144	PC18	<i>Idiomarina loihiensis</i>	100%	AY505529
PC5	<i>Tenacibaculum</i> sp.	100%	FN554616	PC19	<i>Cobetia marina</i>	100%	AY628694
PC6	<i>Tenacibaculum</i> sp.	100%	FN554616	PC20	<i>Tenacibaculum</i> sp.	100%	FN554616
PC7	<i>Alteromonas macleodii</i>	100%	KM037734	PC21	<i>Tenacibaculum</i> sp.	100%	KF792464
PC8	<i>Tenacibaculum</i> sp.	100%	FN554616	PC22	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ978982
PC9	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173043	PC23	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173046
PC10	<i>Paracoccus</i> sp.	100%	GQ452865	PC24	<i>Listonella anguillarum</i>	99%	AY662305
PC11	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	KM277582	PC25	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	FJ876419
PC12	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	FJ876419	PC26	<i>Tenacibaculum</i> sp.	99%	FN554616
PC13	<i>Maribacter</i> sp.	99%	GU936121	PC27	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ923439
PC14	<i>Tenacibaculum</i> sp.	100%	FN554616	PC28	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	FJ170037

Tablo 4.6: Üçüncü dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.

İzolat no.	Gram boyama	Hareket	Sitokrom oksidaz	Katalaz	O/F	O/129	Hücre morfolojisi	Koloni morfolojisi
PC1	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PC2	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düz, Düzensiz kenarlı, sarı
PC3	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düz, Düzensiz kenarlı, sarı
PC4	-	+	+	+	O	R	Kokobasil	Konveks, yumuşak, sarımsı beyaz
PC5	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düz, Düzensiz kenarlı, sarı
PC6	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düz, Düzensiz kenarlı, sarı
PC7	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, yumuşak, yarı saydam
PC8	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düz, Düzensiz kenarlı, sarı
PC9	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PC10	-	-	+	+	O	R	Kok	Konveks, yumuşak, kahverengi
PC11	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PC12	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PC13	-	-	+	+	O	R	Basil	Konveks, sarı, parlak, rizoit
PC14	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düz, düzensiz kenarlı, sarı

Tablo 4.6 (devam):

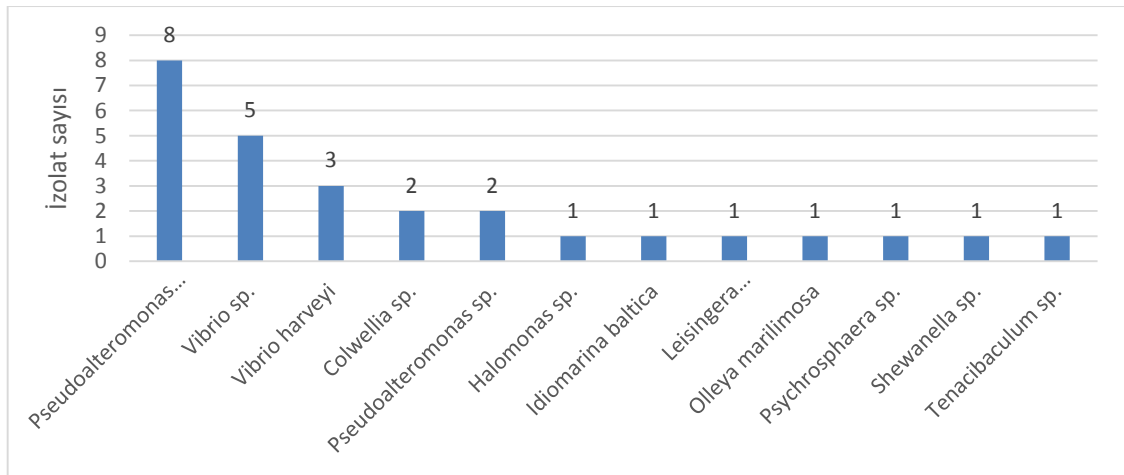
İzolât no.	Gram boyama	Hareket	Sitokrom oksidaz	Katalaz	O/F	O/129	Hücre morfolojisi	Koloni morfolojisi
PC15	-	-	+	+	O	R	Basil	Konveks, sarı, parlak, rizoit
PC16	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, bej
PC17	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, sarı, parlak
PC18	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, yarı saydam
PC19	-	-	-	+	O	R	Basil	Yuvarlak, grimsi beyaz
PC20	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düz, Düzensiz kenarlı, sarı
PC21	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düz, Düzensiz kenarlı, sarı
PC22	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PC23	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PC24	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PC25	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PC26	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düz, Düzensiz kenarlı, sarı
PC27	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PC28	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli

4.1.4. Dördüncü Dönem Örneklem Bulguları

Dördüncü dönem biyofilm örneklerinin bakteriyolojik kültürü sonucunda toplam 27 adet saf kültür elde edilmiştir (Şekil 4.4).

Bu dönemdeki örneklerinin 16S rRNA geni dizileme sonuçlarına göre: 8 adet izolat *Pseudoalteromonas marina*, 5 adet izolat *Vibrio* sp., 3 adet izolat *Vibrio harveyi*, 2 adet izolat *Colwellia* sp., 2 adet izolat *Pseudoalteromonas* sp., 1 adet izolat *Halomonas* sp., 1 adet izolat *Idiomarina baltica*, 1 adet izolat *Leisingera methylohalidivorans*, 1 adet izolat *Olleya marlimosa*, 1 adet izolat *Psychrosphaera* sp., 1 adet izolat *Shewanella* sp., 1 adet izolat *Tenacibaculum* sp. olarak teşhis edilmiştir (Tablo 4.7).

Dördüncü dönem biyofilm içeriğinde toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı $3,85 \times 10^5$ CFU/ml olarak belirlenmiştir. Dördüncü dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları Tablo 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.4: Dördüncü dönem kültür izolatlarının profili.

Tablo 4.7: Dördüncü dönem biyofilm örneklerinin 16S rRNA geni dizileme sonuçları.

İzolot no.	Tür	Benzerlik	Erişim no.	İzolot no.	Tür	Benzerlik	Erişim no.
PD1	<i>Psychrosphaera</i> sp.	100%	KF146527.1	PD15	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	GU198498.1
PD2	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ923439.1	PD16	<i>Shewanella</i> sp.	100%	AB910534.1
PD3	<i>Vibrio harveyi</i>	100%	KJ158254.2	PD17	<i>Tenacibaculum</i> sp.	99%	KF188477.1
PD4	<i>Vibrio</i> sp.	100%	JF719280.1	PD18	<i>Vibrio</i> sp.	100%	DQ314530.1
PD5	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	GU198498.1	PD19	<i>Leisingera methylohalidivorans</i>	99%	NR_121711.1
PD6	<i>Vibrio harveyi</i>	100%	KJ158254.2	PD20	<i>Olleya marilimosa</i>	100%	FJ015035.1
PD7	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	GU198498.1	PD21	<i>Vibrio</i> sp.	100%	DQ314530.1
PD8	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	FR750937.1	PD22	<i>Halomonas</i> sp.	100%	JF416844.1
PD9	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	FR750937.1	PD23	<i>Idiomarina baltica</i>	100%	EU624441.1
PD10	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	FR750937.1	PD24	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100%	DQ173041.1
PD11	<i>Vibrio</i> sp.	100%	DQ314530.1	PD25	<i>Vibrio harveyi</i>	100%	KJ158254.2
PD12	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	GU198498.1	PD26	<i>Colwellia</i> sp.	100%	JF825438.1
PD13	<i>Vibrio</i> sp.	100%	DQ328946.1	PD27	<i>Colwellia</i> sp.	100%	JF825438.1
PD14	<i>Pseudoalteromonas marina</i>	100%	GU198498.1				

Tablo 4.8: Dördüncü dönem izolatlarının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları.

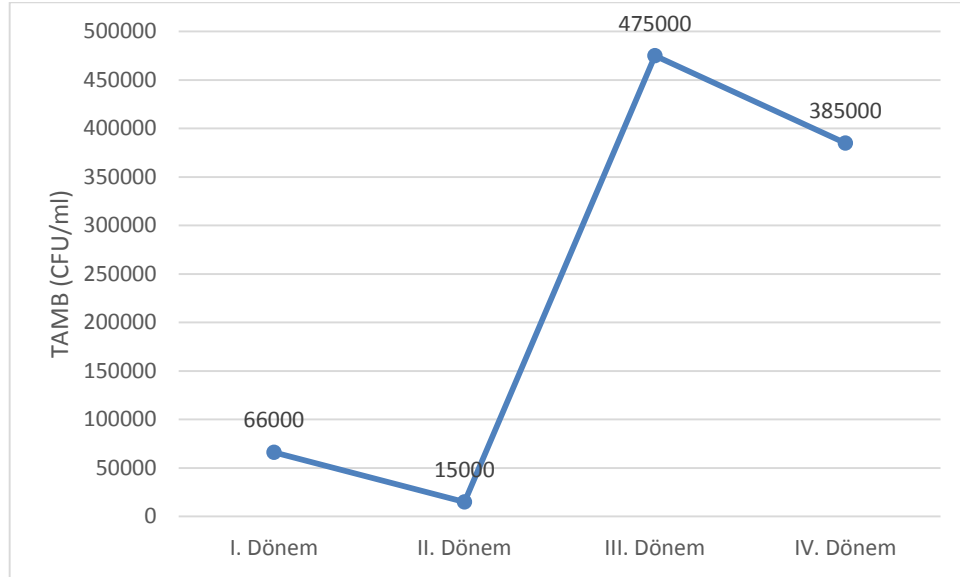
İzolat no.	Gram boyama	Hareket	Sitokrom oksidaz	Katalaz	O/F	O/129	Hücre morfolojisi	Koloni morfolojisi
PD1	-	+	+	-	O	R	Kokobasil	Yuvarlak, yarı saydam
PD2	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PD3	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, parlak, beyazımsı
PD4	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PD5	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı
PD6	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, parlak, beyazımsı
PD7	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı
PD8	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı
PD9	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı
PD10	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı
PD11	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PD12	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı
PD13	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PD14	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı

Tablo 4.8 (devam):

İzolat no.	Gram boyama	Hareket	Sitokrom oksidaz	Katalaz	O/F	O/129	Hücre morfolojisi	Koloni morfolojisi
PD15	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, yumuşak, soluk sarı
PD16	-	+	+	+	F	R	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, mat, soluk kahverengi
PD17	-	+	+	+	O	R	Basil (uzun)	Düz, düzensiz kenarlı, sarı
PD18	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PD19	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, yumuşak, yarı saydam
PD20	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit sarımsı-turuncu
PD21	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, soluk krem
PD22	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, krem
PD23	-	+	+	+	O	R	Basil	Yuvarlak, yarı saydam
PD24	-	+	+	+	O	R	Basil	Konveks, mukoit, krem renkli
PD25	-	+	+	+	F	S	Basil (kıvrık)	Yuvarlak, parlak, beyazımsı
PD26	-	+	+	+	F	R	Basil	Konveks, mukoit, grimsi-beyaz
PD27	-	+	+	+	F	R	Basil	Konveks, mukoit, grimsi-beyaz

4.1.5. Bakteriyolojik Kültür Bulgularının Dönemlere Göre Değişimi

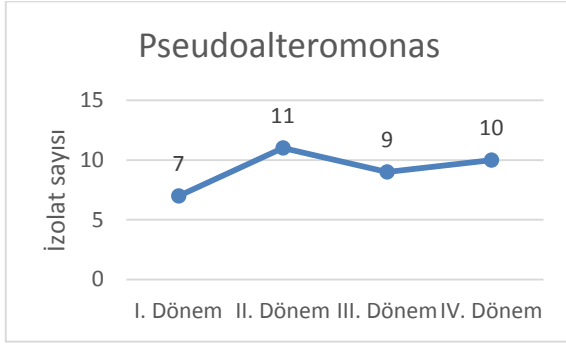
Bakteriyolojik kültür bulgularına göre toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı; birinci dönemde $6,6 \times 10^4$ CFU/ml, ikinci dönemde $1,5 \times 10^4$ CFU/ml, üçüncü dönemde $4,75 \times 10^5$ CFU/ml, dördüncü dönemde ise $3,85 \times 10^5$ CFU/ml olarak değişim göstermiştir (Şekil 4.5).



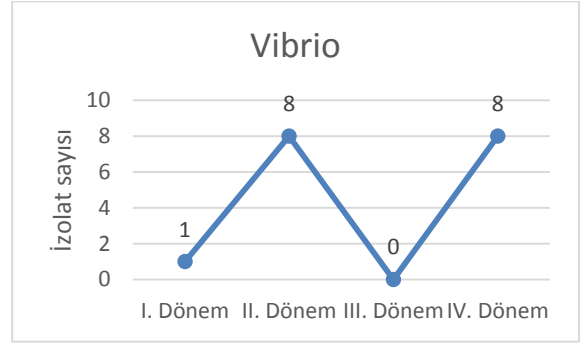
Şekil 4.5: Dönemlere göre toplam aerobik mezofilik bakteri (TAMB) sayısı değişimi.

Tüm dönemler incelendiğinde: *Pseudoalteromonas* cinsine ait türlere ait izolat sayısı tüm dönemlerde birbirine yakın sayılarda, *Vibrio* cinsine ait türlere ait izolat sayısı en çok ikinci ve dördüncü dönemlerde, *Tenacibaculum* cinsine ait türlere ait izolat sayısı en çok üçüncü dönemde, *Listonella* cinsine ait türlere ait izolat sayısı en çok ikinci dönemde ve *Cobetia* cinsine ait türlere ait izolat sayısı ise en çok birinci dönemde elde edilmiştir.

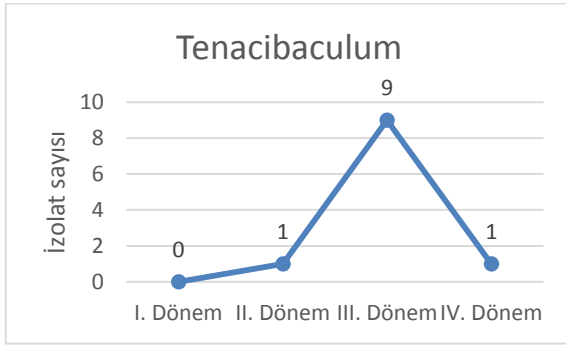
Tüm örnekleme dönemi boyunca biyofilm içeriğinde toplam izolat sayısı >1 olan tüm cinslerin dönemler arasındaki izolat sayısı değişim grafikleri Şekil 4.6 ile 4.17 arası verilmiştir.



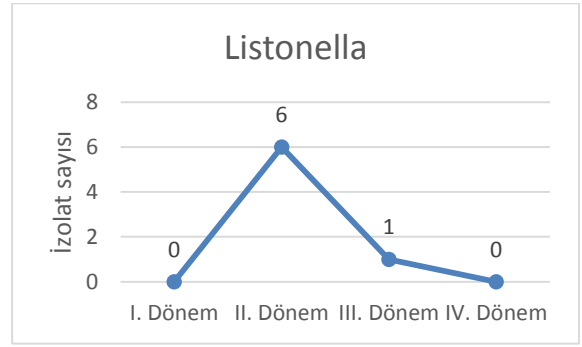
Şekil 4.6: *Pseudoalteromonas* cinsinin dönemlere göre değişimi.



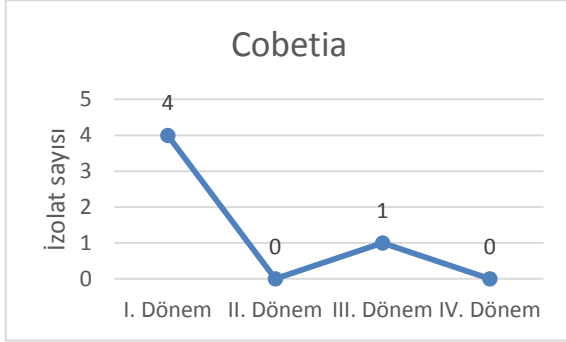
Şekil 4.7: *Vibrio* cinsinin dönemlere göre değişimi.



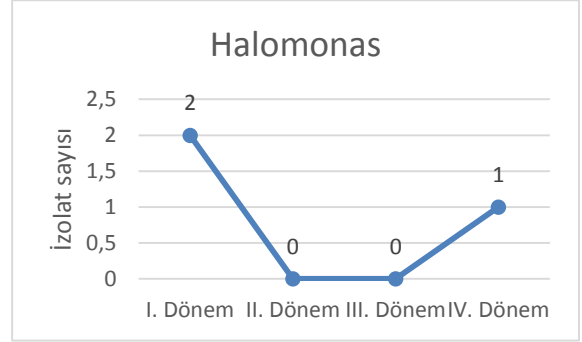
Şekil 4.8: *Tenacibaculum* cinsinin dönemlere göre değişimi.



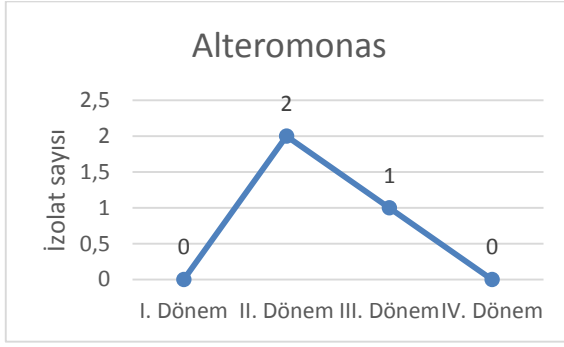
Şekil 4.9: *Listonella* cinsinin dönemlere göre değişimi.



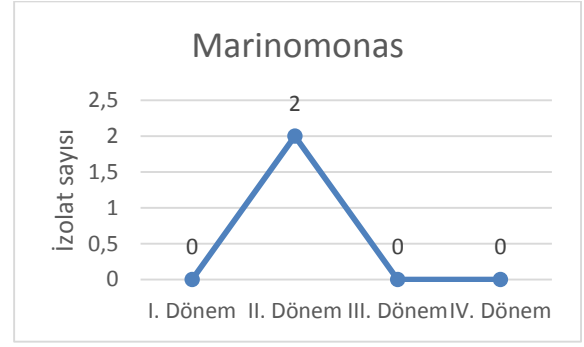
Şekil 4.10: *Cobetia* cinsinin dönemlere göre değişimi.



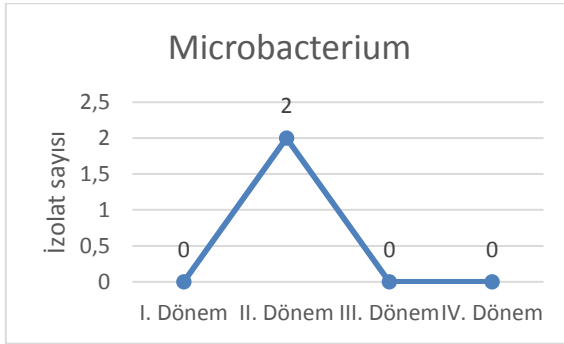
Şekil 4.11: *Halomonas* cinsinin dönemlere göre değişimi.



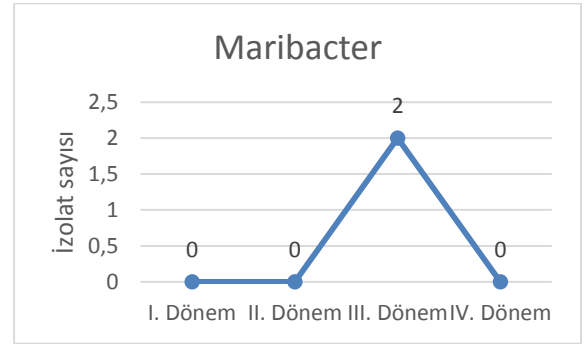
Şekil 4.12: *Alteromonas* cinsinin dönemlere göre değişimi.



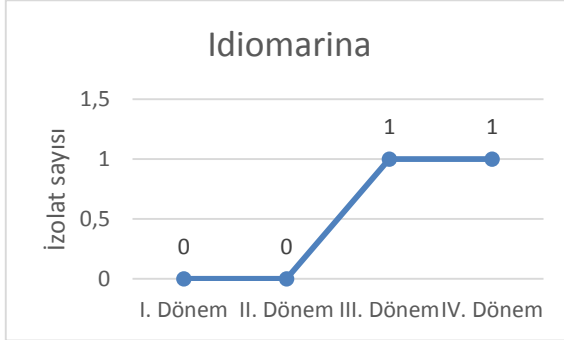
Şekil 4.13: *Marinomonas* cinsinin dönemlere göre değişimi.



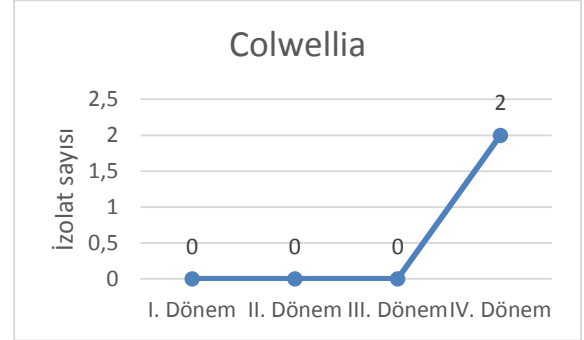
Şekil 4.14: *Microbacterium* cinsinin dönemlere göre değişimi.



Şekil 4.15: *Maribacter* cinsinin dönemlere göre değişimi.



Şekil 4.16: *Idiomarina* cinsinin dönemlere göre değişimi.

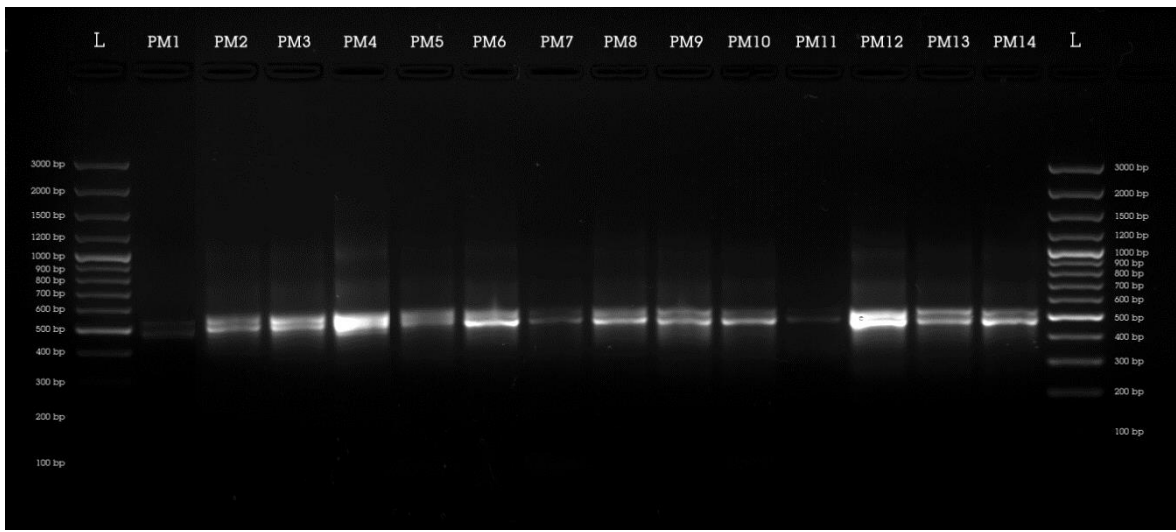


Şekil 4.17: *Colwellia* cinsinin dönemlere göre değişimi.

4.2. PİRODİZİLEME BULGULARI

4.2.1. PCR Ürünleri Agaroz Jel Elektroforezi

Tüm dönemlere ait örneklerin toplam DNA izolasyonunu takiben 16S rRNA gen bölgelerinin yaklaşık 500 bp uzunluğundaki kısımları çoğaltılmış ve PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve bunun sonucunda tüm örneklerin PCR amplifikasyonunun başarıyla gerçekleştirildiği görülmüştür. Tüm örneklerle ait agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.18: Kültürden bağımsız teşhis için kullanılan tüm dönemlere ait PCR ampliconlarına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. **L:** Ladder, **PM1-PM14:** Tüm dönemlere ait PCR ampliconları.

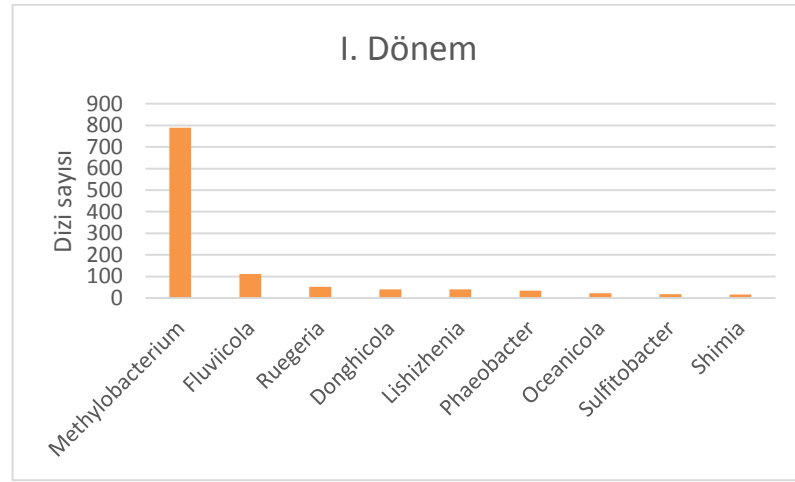
4.2.1. Birinci Dönem Örnekleme Bulguları

Birinci dönem çubuklarından yapılan örneklemeden pirodizileme ile ortalama 1166 adet dizi sayısı elde edilmiştir. Bu dizilerin analizi neticesinde, birinci dönemde oluşan biyofilm içeriğinde 23 ayrı cinse ait 27 farklı OTU tespit edilmiştir (Şekil 4.20).

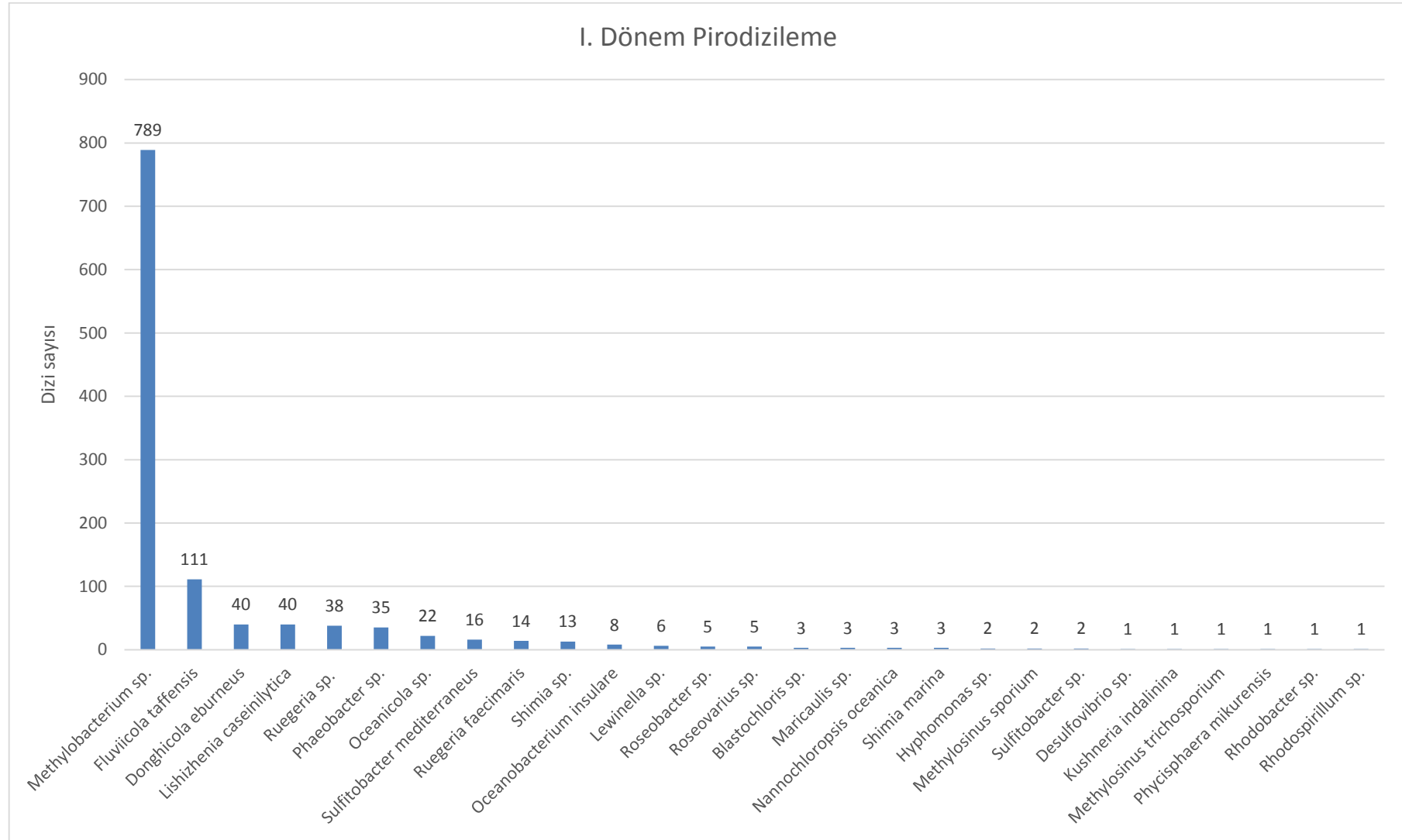
Bu OTU’lerin incelenmesi sonucunda biyofilm içeriğinde: 789 adet *Methylobacterium* sp., 111 adet *Fluviicola taffensis*, 40 adet *Donghicola eburneus*, 40 adet *Lishizhenia caseinilytica*, 38 adet *Ruegeria* sp., 35 adet *Phaeobacter* sp., 22 adet *Oceanicola* sp., 16 adet *Sulfitobacter mediterraneus*, 14 adet *Ruegeria faecimaris*, 13 adet *Shimia* sp., 8 adet *Oceanobacterium insulare*, 6 adet *Lewinella* sp., 5 adet *Roseobacter* sp., 5 adet *Roseovarius* sp., 3 adet *Blastochloris* sp., 3 adet *Maricaulis* sp., 3 adet *Nannochloropsis*

oceanica, 3 adet *Shimia marina*, 2 adet *Hyphomonas* sp., 2 adet *Methylosinus sporium*, 2 adet *Sulfitobacter* sp., 1 adet *Desulfovibrio* sp., 1 adet *Kushneria indalinina*, 1 adet *Methylosinus trichosporium*, 1 adet *Phycisphaera mikurensis*, 1 adet *Rhodobacter* sp. ve 1 adet *Rhodospirillum* sp. türü teşhis edilmiştir.

Birinci dönem biyofilmi içinde: *Methylobacterium*, *Fluviicola*, *Ruegeria*, *Donghicola*, *Lishizhenia*, *Phaeobacter*, *Oceanicola*, *Sulfitobacter* ve *Shimia* cinslerinin biyofilm içinde 10 kopya ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: Birinci dönem biyofilmi içinde dizi sayısı ≥ 10 olan cinsler.



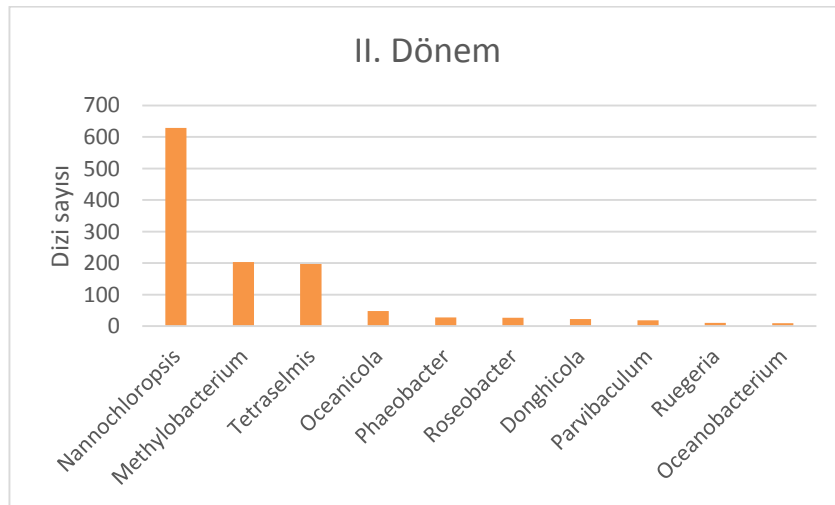
Şekil 4.20: Birinci dönemde biyofilm içinde pirodizileme ile tespit edilen tüm türler ve dizi sayıları.

4.2.2. İkinci Dönem Örneklem Bulguları

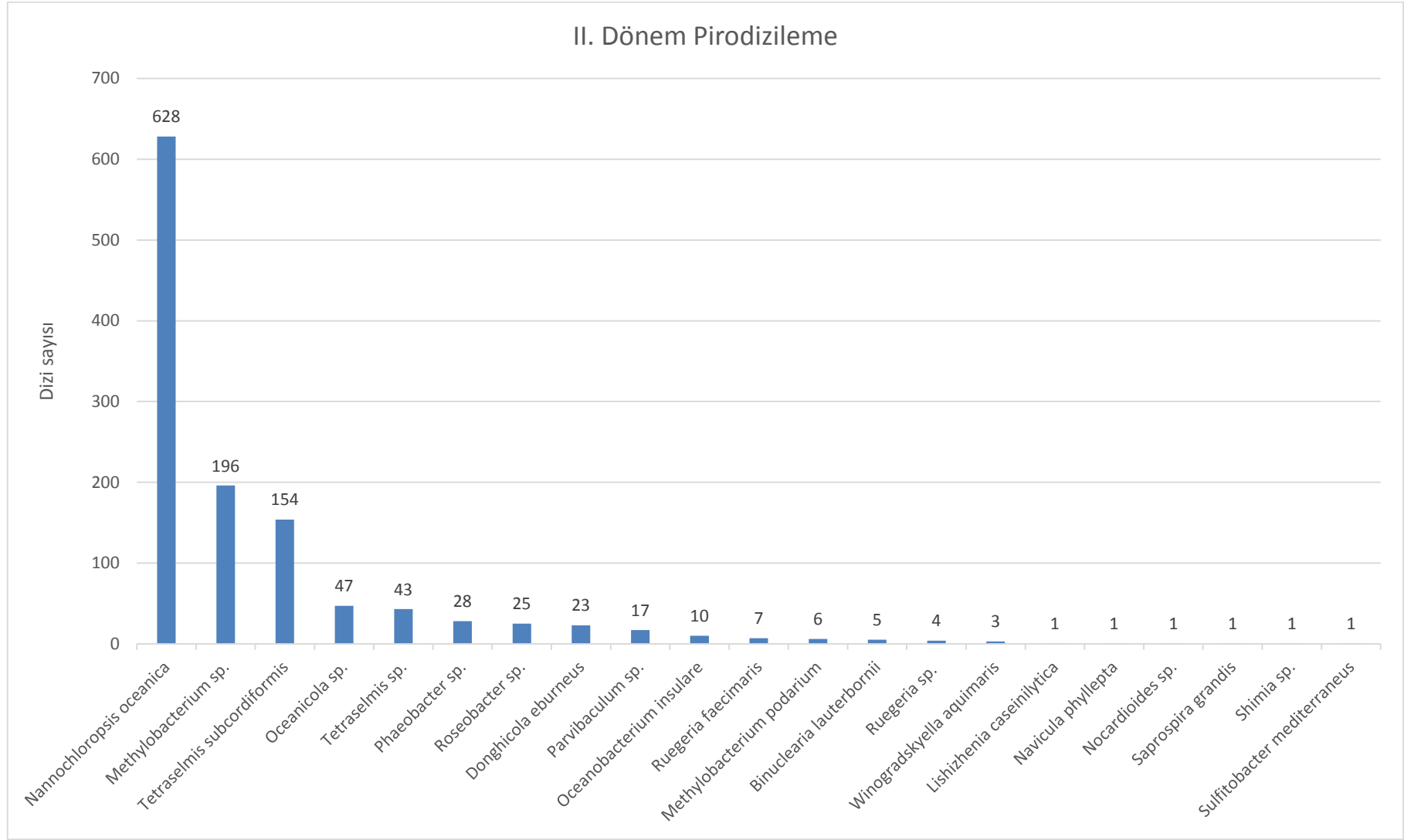
İkinci dönem çubuklarından yapılan örneklemeden pirodizileme ile ortalama 1202 adet dizi sayısı elde edilmiştir. Bu dizilerin analizi neticesinde, ikinci dönemde oluşan biyofilm içeriğinde 18 ayrı cinse ait 21 farklı OTU tespit edilmiştir (Şekil 4.22).

Bu OTU'lerin incelenmesi sonucunda biyofilm içeriğinde: 628 adet *Nannochloropsis oceanica*, 196 adet *Methylobacterium* sp., 154 adet *Tetraselmis subcordiformis*, 47 adet *Oceanicola* sp., 43 adet *Tetraselmis* sp., 28 adet *Phaeobacter* sp., 25 adet *Roseobacter* sp., 23 adet *Donghicola eburneus*, 17 adet *Parvibaculum* sp., 10 adet *Oceanobacterium insulare*, 7 adet *Ruegeria faecimaris*, 6 adet *Methylobacterium podarium*, 5 adet *Binuclearia lauterbornii*, 4 adet *Ruegeria* sp., 3 adet *Winogradskyella aquimaris*, 1 adet *Lishizhenia caseinilytica*, 1 adet *Navicula phyllepta*, 1 adet *Nocardioides* sp., 1 adet *Saprospira grandis*, 1 adet *Shimia* sp. ve 1 adet *Sulfitobacter mediterraneus* türü tespit edilmiştir.

İkinci dönem biyofilmi içinde: *Nannochloropsis*, *Methylobacterium*, *Tetraselmis*, *Oceanicola*, *Phaeobacter*, *Roseobacter*, *Donghicola*, *Parvibaculum*, *Ruegeria* ve *Oceanobacterium* cinslerinin biyofilm içinde 10 kopya ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: İkinci dönem biyofilmi içinde dizi sayısı ≥ 10 olan cinsler.



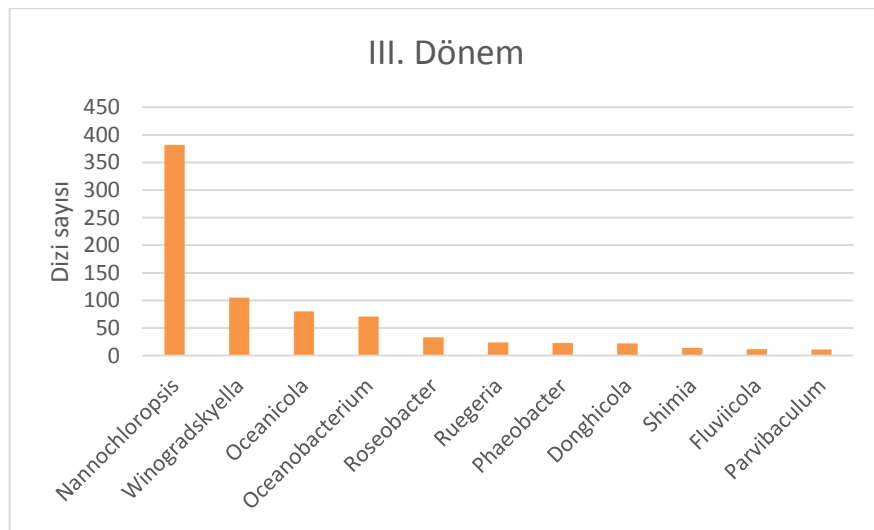
Şekil 4.22: İkinci dönemde biyofilm içinde pirodizileme ile tespit edilen tüm türler ve dizi sayıları.

4.2.3. Üçüncü Dönem Örneklem Bulguları

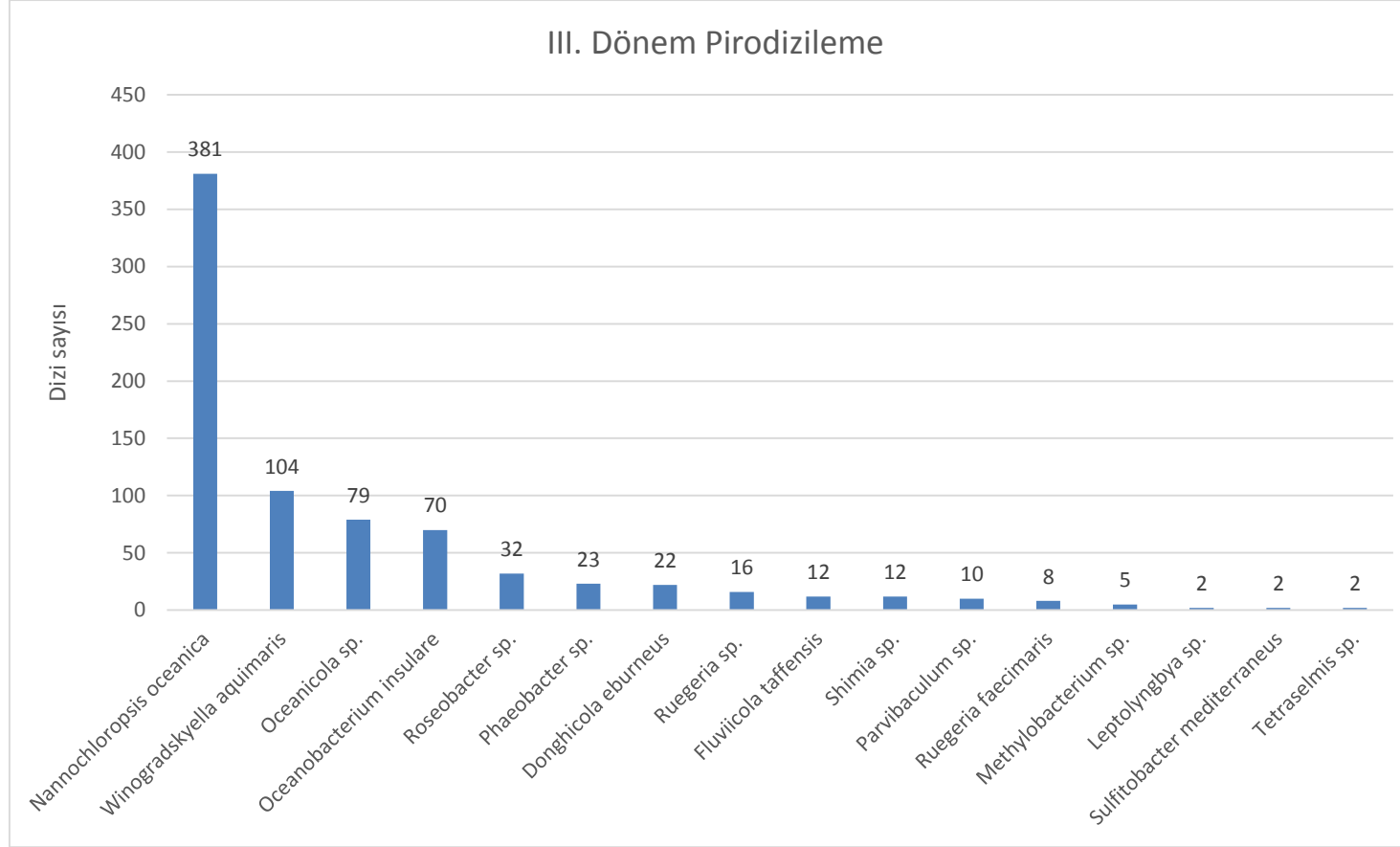
Üçüncü dönem çubuklarından yapılan örneklemeden pirodizileme ile ortalama 780 adet dizi sayısı elde edilmiştir. Bu dizilerin analizi neticesinde, ikinci dönemde oluşan biyofilm içeriğinde 16 ayrı cinse ait 16 farklı OTU tespit edilmiştir (Şekil 4.24).

Bu OTU'lerin incelenmesi sonucunda biyofilm içeriğinde: 381 adet *Nannochloropsis oceanica*, 104 adet *Winogradskyella aquimaris*, 79 adet *Oceanicola* sp., 70 adet *Oceanobacterium insulare*, 32 adet *Roseobacter* sp., 23 adet *Phaeobacter* sp., 22 adet *Donghicola eburneus*, 16 adet *Ruegeria* sp., 12 adet *Fluviicola taffensis*, 12 adet *Shimia* sp., 10 adet *Parvibaculum* sp., 8 adet *Ruegeria faecimaris*, 5 adet *Methylobacterium* sp., 2 adet *Leptolynghya* sp., 2 adet *Sulfitobacter mediterraneus*, 2 adet *Tetraselmis* sp. türü tespit edilmiştir.

Üçüncü dönem biyofilm içinde: *Nannochloropsis*, *Winogradskyella*, *Oceanicola*, *Oceanobacterium*, *Roseobacter*, *Ruegeria*, *Phaeobacter*, *Donghicola*, *Shimia*, *Fluviicola* ve *Parvibaculum* cinslerinin biyofilm içinde 10 kopya ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: Üçüncü dönem biyofilmi içinde dizi sayısı ≥ 10 olan cinsler.



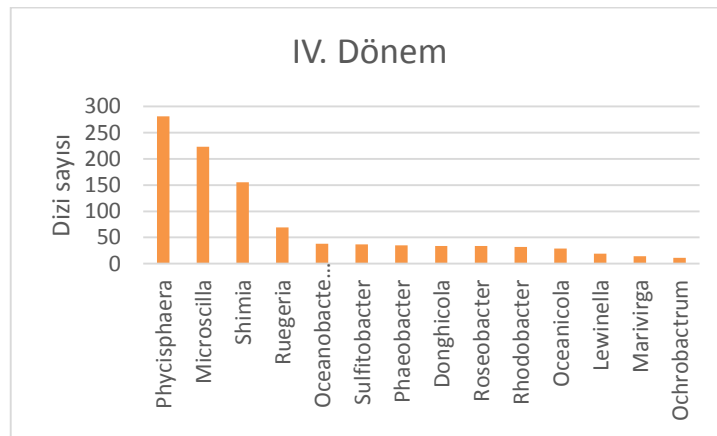
Şekil 4.24: Üçüncü dönemde biyofilm içinde pirodizileme ile tespit edilen tüm türler ve dizi sayıları.

4.2.4. Dördüncü Dönem Örneklem Bulguları

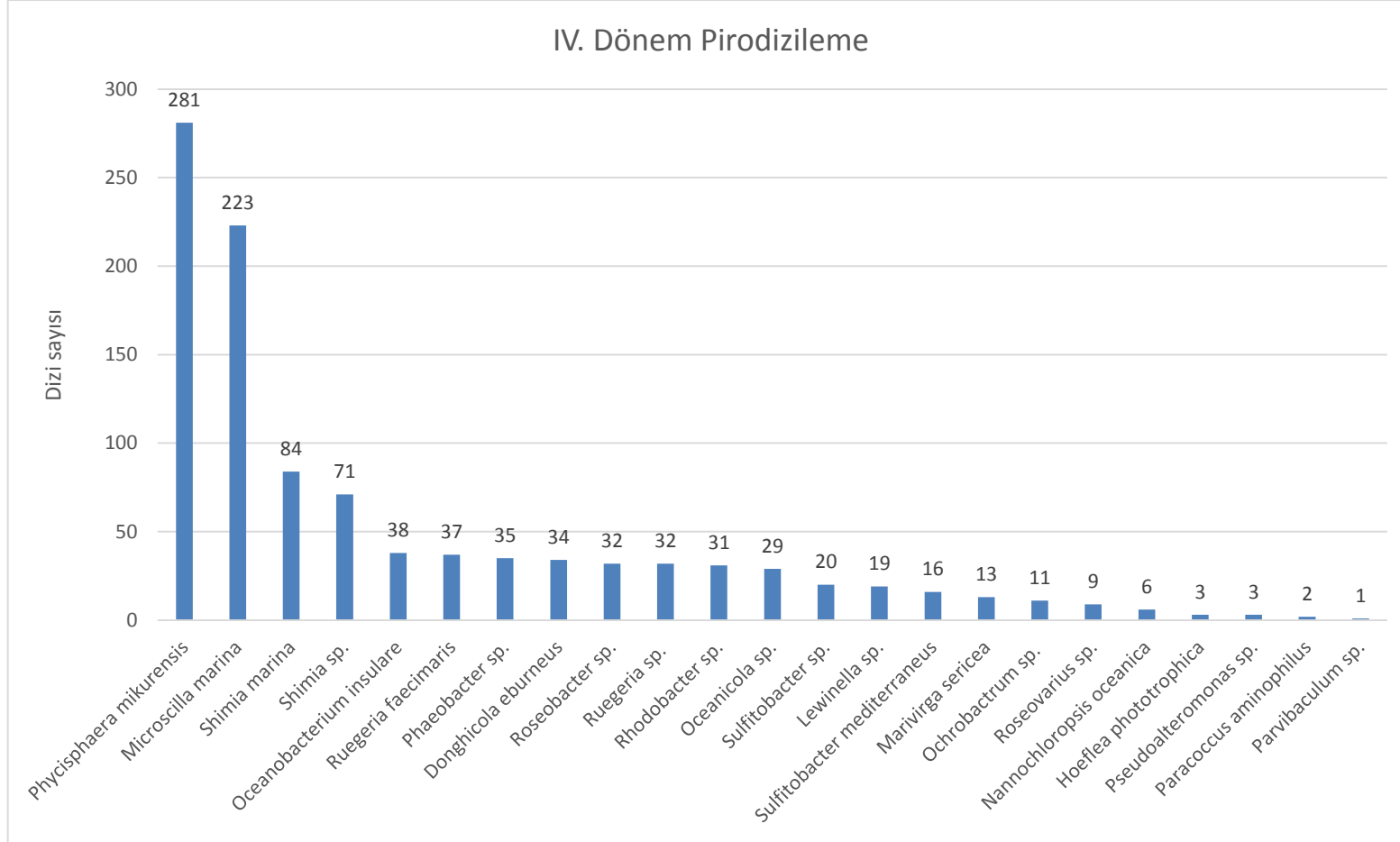
Dördüncü dönem çubuklarından yapılan örneklemeden pirodizileme ile ortalama 1030 adet dizi sayısı elde edilmiştir. Bu dizilerin analizi neticesinde, ikinci dönemde oluşan biyofilm içeriğinde 20 ayrı cinse ait 23 farklı OTU tespit edilmiştir (Şekil 4.26).

Bu OTU'lerin incelenmesi sonucunda biyofilm içeriğinde: 281 adet *Phycisphaera mikurensis*, 223 adet *Microscilla marina*, 84 adet *Shimia marina*, 71 adet *Shimia* sp., 38 adet *Oceanobacterium insulare*, 37 adet *Ruegeria faecimaris*, 35 adet *Phaeobacter* sp., 34 adet *Donghicola eburneus*, 32 adet *Roseobacter* sp., 32 adet *Ruegeria* sp., 31 adet *Rhodobacter* sp., 29 adet *Oceanicola* sp., 20 adet *Sulfitobacter* sp., 19 adet *Lewinella* sp., 16 adet *Sulfitobacter mediterraneus*, 13 adet *Marivirga sericea*, 11 adet *Ochrobactrum* sp., 9 adet *Roseovarius* sp., 6 adet *Nannochloropsis oceanica*, 3 adet *Hoeflea phototrophica*, 3 adet *Pseudoalteromonas* sp., 2 adet *Paracoccus aminophilus* ve 1 adet *Parvibaculum* sp. türü tespit edilmiştir.

Dördüncü dönem biyofilm içinde: *Phycisphaera*, *Microscilla*, *Shimia*, *Ruegeria*, *Oceanobacterium*, *Sulfitobacter*, *Phaeobacter*, *Donghicola*, *Roseobacter*, *Rhodobacter*, *Oceanicola*, *Lewinella*, *Marivirga* ve *Ochrobactrum* cinslerinin biyofilm içinde 10 kopya ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25).



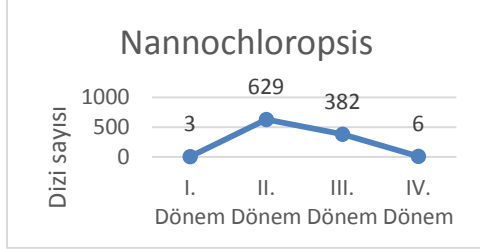
Şekil 4.25: Dördüncü dönem biyofilmi içinde dizi sayısı ≥ 10 olan cinsler.



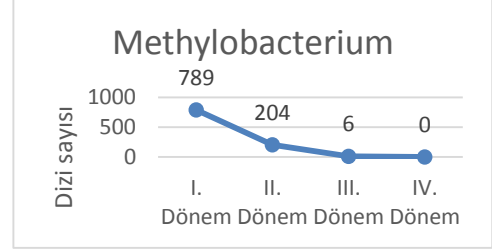
Şekil 4.26: Dördüncü dönemde biyofilm içinde pirodizileme ile tespit edilen tüm türler ve dizi sayıları.

4.2.5. Pirodizileme Bulgularının Dönemlere Göre Değişimi

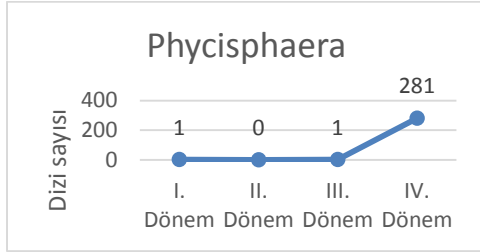
Örnekleme dönemlerinin herhangi birinde dizi sayısı ≥ 10 olan tüm cinslerin, dönemler arasındaki dizi sayısı değişim grafikleri Şekil 4.27 ile 4.47 arası verilmiştir.



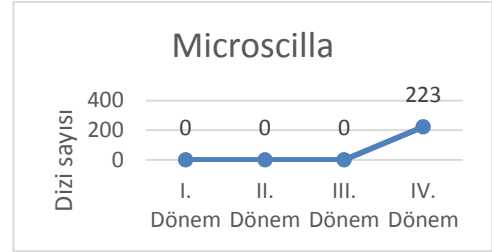
Şekil 4.27: *Nannochloropsis* cinsinin değişim grafiği.



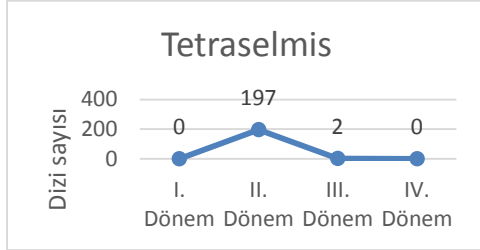
Şekil 4.28: *Methylobacterium* cinsinin değişim grafiği.



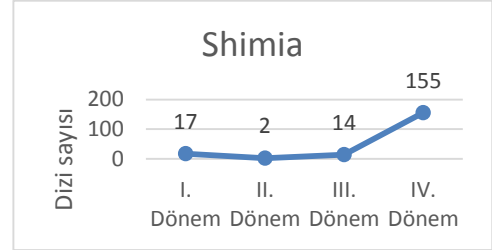
Şekil 4.29: *Phycisphaera* cinsinin değişim grafiği.



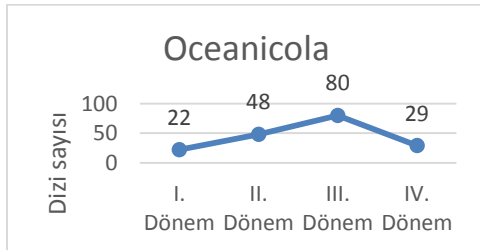
Şekil 4.30: *Microscilla* cinsinin değişim grafiği.



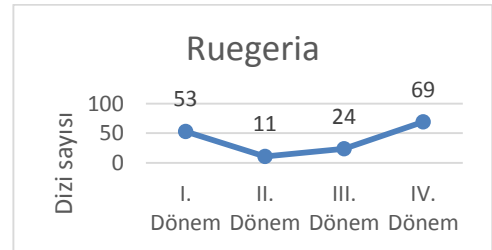
Şekil 4.31: *Tetraselmis* cinsinin değişim grafiği.



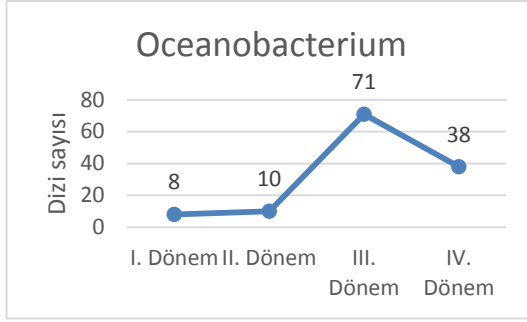
Şekil 4.32: *Shimia* cinsinin değişim grafiği.



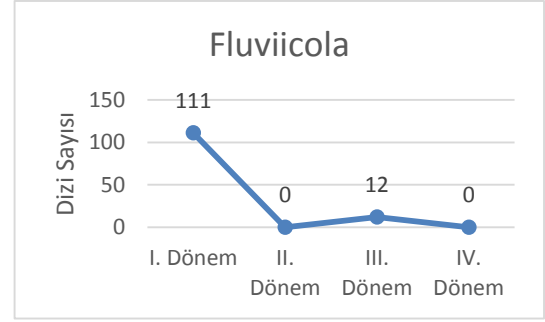
Şekil 4.33: *Oceanicola* cinsinin değişim grafiği.



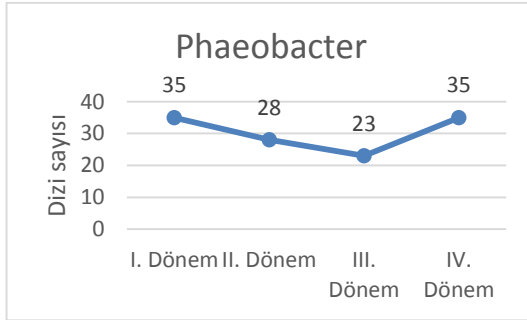
Şekil 4.34: *Ruegeria* cinsinin değişim grafiği.



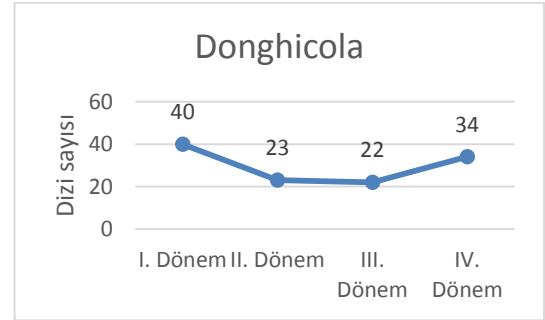
Şekil 4.35: *Oceanobacterium* cinsinin değişim grafiği.



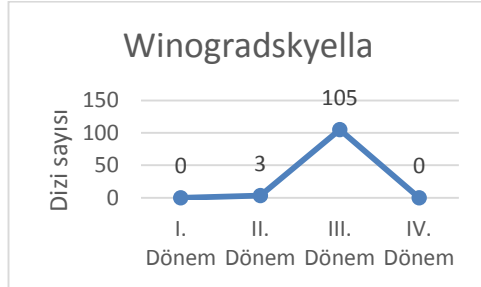
Şekil 4.36: *Fluviicola* cinsinin değişim grafiği.



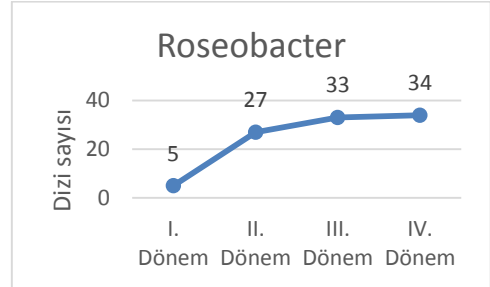
Şekil 4.37: *Phaeobacter* cinsinin değişim grafiği.



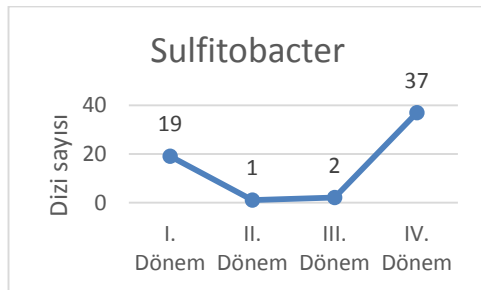
Şekil 4.38: *Donghicola* cinsinin değişim grafiği.



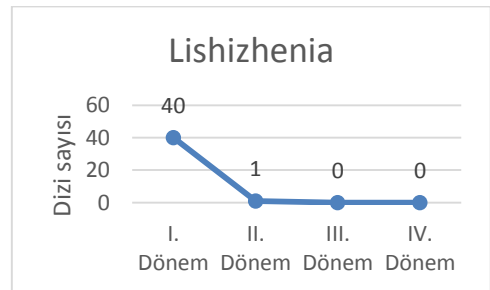
Şekil 4.39: *Winogradskyella* cinsinin değişim grafiği.



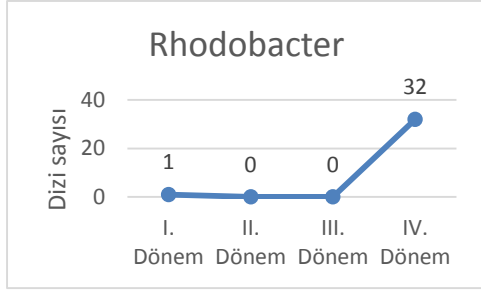
Şekil 4.40: *Roseobacter* cinsinin değişim grafiği.



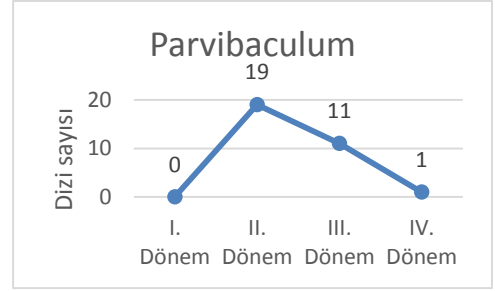
Şekil 4.41: *Sulfitobacter* cinsinin değişim grafiği.



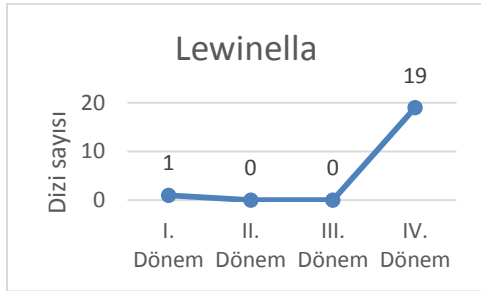
Şekil 4.42: *Lishizhenia* cinsinin değişim grafiği.



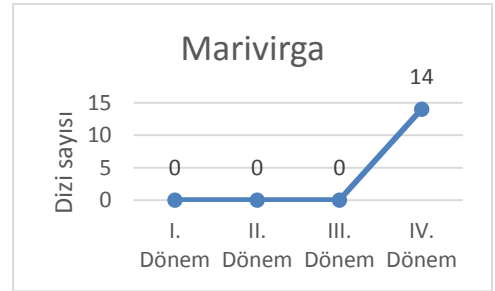
Şekil 4.43: *Rhodobacter* cinsinin değişim grafiği.



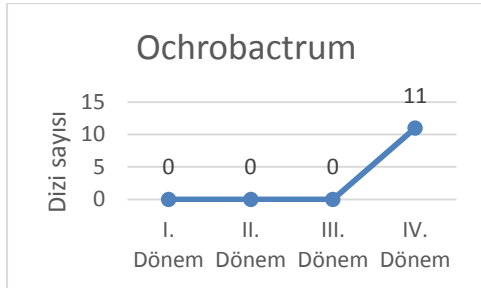
Şekil 4.44: *Parvibaculum* cinsinin değişim grafiği.



Şekil 4.45: *Lewinella* cinsinin değişim grafiği.



Şekil 4.46: *Marivirga* cinsinin değişim grafiği.



Şekil 4.47: *Ochrobactrum* cinsinin değişim grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, kültür balıkçılığında gerek yurt dışı gerekse ülkemiz akuakültür sektörü için yeni türlerden olan sinarit balığı (*Dentex dentex*) yetiştiriciliğinin yapıldığı kuluçkalık tanklarındaki biyofilm oluşturan bakterilerin mikrobiyal çeşitliliği hem konvansiyonel bakteriyolojik kültür yöntemiyle hem de kültürden bağımsız moleküler teşhis yöntemlerinden biri olan yeni nesil dizileme teknolojilerinden pirodizilemenin kullanıldığı metagenomik bir çalışma ile saptanmıştır.

Çalışmanın bakteriyolojik kültür kısmında, biyofilm örnekleri içinde tüm dönemler için geçerli olmak üzere ağırlıklı olarak *Pseudoalteromonas* sp. türlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. *Pseudoalteromonas* cinsi üyelerinin aerobik metabolizmaya sahip, polar ve lateral flagellumlarıyla hareketli, 4-40 °C sıcaklık aralıklarında yaşayabilen türler olduğu bilinmektedir (Ivanova ve Mikhailov, 2001). Günümüzde 41 adet türü tanımlanmış olan *Pseudoalteromonas* cinsi üyelerinin; deniz ortamındaki kaya ve alglerin yüzeyi, deniz süngerleri, midyeler, hidrotermal bacalar, deniz suyu, sediment, buzullar, balık mucus içeriği ve hasta balıklar gibi çok çeşitli kaynaklardan izole edildiği bildirilmiştir (Euzéby, 1997). Yapılan çalışmalarda *Pseudoalteromonas* cinsine ait birçok türün, cinse özgü bir özellik olarak çok çeşitli organizmaları hedef alan biyolojik olarak aktif metabolitler ürettiği ve cins üyeleri tarafından üretilen agaraz, toksinler, bakteriyolitik maddeler ve diğer bazı enzimler gibi hücre dışı metabolitlerin, ortamda bulunan diğer mikroorganizmalara karşı hem besin eldesinde hem de biyotik ve abiyotik yüzeyler üzerinde kolonizasyon mücadelesinde cins üyelerine üstünlük sağladığı gösterilmiştir (Gauthier, 1976; Gauthier ve Flatau, 1976; Holmström ve Kjelleberg, 1999; Holmström ve diğ., 2002; Kanagasabhpathy ve diğ., 2006). Bu maddelerden, katı yüzeylere tutunma (Fletcher ve Floodgate, 1973) ve yüzey kolonizasyonunda (Gauthier ve Flatau, 1976) *Pseudoalteromonas* türlerine üstünlük sağlayan maddenin, hücreye bağlı olarak bulunan polianyonik karbonhidratların sağladığı tespit edilmiştir. *Pseudoalteromonas* türleri içinde biyofilm yapısının temel bileşenlerinden olan EPS üreten suşların yaygın bir şekilde bulunduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (Wrangstadh ve diğ., 1986; Wrangstadh ve diğ., 1990; Szewzyk ve diğ., 1991; Vincent ve diğ., 1994). Akuakültür alanında

Pseudoalteromonas türlerinin balık yumurtalarının doğal mikroflorasında bulunduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bunun yanı sıra Iijima ve diğ. (2009), balık çiftliklerinde yaptıkları çalışmada yetiştiricilik yapılan tank tabanından alınan örneklerden 15 adet bakteri suşu izole ettiğini ve bu izolatların içinde *Pseudoalteromonas* cinsine ait bakterilerin biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Tüm bu bilgileri destekler nitelikte, bu çalışmada da biyofilm örneklerinin bakteriyolojik kültür ile elde edilen izolat kompozisyonunda prelarval dönem olan birinci dönemde %46,6, ikinci dönem biyofilm örneklerinde %23,5, üçüncü dönemde %32,1 ve dördüncü dönemde %29,6 olmak üzere *Pseudoalteromonas* türlerinin tüm dönemlerde en çok izole edilen tür olduğu görülmüştür.

Prelarval dönemde izole edilen ve %26,6 ile ikinci baskın tür *Cobetia marina* olarak tespit edilmiştir. *Cobetia marina*'nın, biyofilm yapısının temelini oluşturan EPS'yi yüksek miktarda sentezlediği Shea ve diğ. (1991) tarafından gösterilmiştir. Bu tür, deniz ortamındaki biyofilm araştırmalarında da model organizma olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Salta ve diğ., 2013). Bununla birlikte bu çalışmada, prelarval dönemde ikinci baskın tür olan *Cobetia marina* suşlarının, canlı yemin tank suyunda bulunduğu diğer dönemlerde - üçüncü dönemdeki 1 izolat haricinde - gözlenmediği kaydedilmiştir.

Prelarval dönemi temsil eden birinci dönem sonrasında, tank suyuna canlı yemlerin girmesiyle birlikte bakteri yükünün de ani bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Canlı yem organizmalarının yoğun mikrobiyal yük taşıdığı McIntosh ve diğ. (2008) tarafından daha önce rapor edilmiştir; yapılan bu tez çalışmasında da benzer şekilde canlı yem organizmalarının biyofilm içindeki tür sayısı ve kompozisyonunu etkilediği tespit edilmiştir. Çalışmada birinci dönem bakteriyolojik kültür ortamından 5 türden oluşan toplam 15 izolat elde edilmişken, ikinci dönemde %126 artışla 11 türden oluşan toplam 34 izolat elde edilmiştir.

Birçok deniz balığı ve karides kültürü yapılan kuluçkahanede, larval beslenmenin başlangıcında canlı yem organizmaları olarak rotiferler ve *Artemia* türleri çok yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Dhert ve diğ., 2001). Diğer taraftan, bu organizmaların kültürü yapılan canlılarla ilgili pek çok patojeni de mikroflorasında barındırdığı bilinmektedir (Skjermo ve Vadstein, 1993). Bu çalışmanın bakteriyolojik kültür sonuçlarında da prelarval dönemde sadece bir izolatla temsil edilen *Vibrio* cinsine ait bakterilerin, prelarval

dönemin bitmesi ve tank suyuna rotifer verilmesiyle birlikte biyofilm içindeki bakterilerin %41,7'sini oluşturacak oranda bulunduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde prelarval dönemde gözlenmeyen *Listonella anguillarum* suşlarının da tank suyuna ilk kez rotifer girişinin yapıldığı ikinci dönemde biyofilm bakterileri içinde en yoğun ikinci tür olduğu tespit edilmiştir. Bu sonucu destekler nitelikte, Verdonck ve diğ. (1997) deniz balığı yetiştiriciliği yapılan kuluçkahanelerden yaptıkları rotifer örneklemelerinde, *Listonella anguillarum*'un rotifer mikroflorasında baskın olduğunu rapor etmişlerdir.

Mcintosh ve diğ. (2008) morina balıkları (*Gadus morhua*) yetiştiriciliği yapılan bir kuluçkahanede gerçekleştirdikleri iki yıllık bir çalışmada canlı yem, balık yumurta ve larvası mikroflorasını kültürden-bağımsız moleküler yöntemlerden DGGE ile incelemişler; rotifer örneklerinden *Marinosulfonomonas methylophaga*, *Arcobacter* sp., *Dyadobacter* sp., *Marinomonas* sp., *Roseobacter* sp., *Algicola bacteriolytica*, *Morganella morganii*, *Vibrio harveyi*, *Alteromonas macleodii* ve *Vibrio pacinii* türlerini izole ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında da benzer şekilde, ikinci dönem olan rotifer ile besleme döneminde bakteriyolojik kültür ile *Marinomonas* sp. ve pirodizileme ile *Roseobacter* sp. türleri biyofilm içinde tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar *Artemia* örneklerinden *Vibrio pacinii*, *Leucothrix mucor*, *Roseobacter* sp., *Alteromonas* sp., *Vibrio shilonii* ve *Vibrio campbelli* türlerini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde tank suyuna *Artemia* girişinin olduğu dönemlerde biyofilm içinde bakteriyolojik kültür ile *Alteromonas macleodii*, *Vibrio* sp. ve pirodizileme ile *Roseobacter* sp. türleri tespit edilmiştir.

Çalışmanın ikinci dönem biyofilm örneklerinde daha az sayıda izole edilen diğer türlerden olan *Alteromonas macleodii*'nin yapılan bir başka çalışmada kuluçkalık sistemlerindeki mikro ve makroalglerden (Schulze ve diğ., 2006), morina balığı yetiştiriciliği yapılan bir kuluçkahanedeki rotifer kültüründen (Mcintosh ve diğ., 2008) izole edildiği; ikinci dönem biyofilm örneklerinde düşük miktarda izole edilen bir başka tür olan *Marinomonas* sp. türlerinin ise deniz balıkları yetiştiriciliği yapılan bir kuluçkahanede larval kültürden (Griffiths ve diğ., 2001) izole edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada, ikinci dönem biyofilm örneklerinden izole edilen *Listonella anguillarum* ve *Vibrio tubiashii* türlerinin hem balık hem de canlı yem organizmaları için yüksek derecede patojen olduğu bilinmektedir (Austin ve diğ., 2005).

Üçüncü dönem bakteriyolojik kültür örneklerinde; birinci dönemde tespit edilmeyen, ikinci ve dördüncü dönemlerdeyse sadece 1 izolat elde edilmiş *Tenacibaculum* cinsi bakterilerde göreceli olarak artış tespit edilmiştir. Üçüncü dönem izolatlarının %50'sinin *Tenacibaculum* cinsine ait bakterilerden oluştuğu teşhis edilmiştir. Bu dönem içinde, bir önceki dönem olan ikinci dönem biyofilm örneklerinde 6 izolat ile ikinci baskın tür olan *Listonella anguillarum* izolat sayısının büyük bir düşüşle 1 izolata indiği ve yine ikinci dönemdeki üçüncü baskın cins olan *Vibrio* cinsi üyelerinin ise biyofilm içinde hiç bulunmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada üçüncü dönem biyofilm örnekleri içinde balık patojeni olarak pek çok balık türünde hastalık yaptığı bilinen *Listonella anguillarum* (Austin ve diğ., 2005) 1 izolat olarak ve daha önce hasta dil balıklarında (*Solea senegalensis*) Piñeiro-Vidal ve diğ. (2008) tarafından rapor edilmiş olan *Tenacibaculum discolor* da yine 1 izolat olarak tespit edilmiştir.

Üçüncü dönem biyofilm örneklerinden az sayıda tespit edilmiş olan *Paracoccus* sp. ve *Phaeobacter* sp. türlerinin akuakültür sistemlerinde biyofilm oluşturdıkları Schulze ve diğ. (2006) ve Martins ve diğ. (2013) tarafından bildirilmiştir. Üçüncü dönemde biyofilm içinde yine az sayıda izolatla tespit edilmiş olan *Pseudoalteromonas marina* türünün, daha önce yapılan çalışmalarda deniz suyu ve kumundan (Nam ve diğ., 2007; Sugita ve diğ., 2012) ve kuluçkalık sistemlerindeki hasta yumuşakça ve balık örneklerinden izole edildiği bildirilmiştir (Schulze ve diğ., 2006).

Dördüncü dönemde, bir önceki dönem olan üçüncü dönemde az sayıda izolatla tespit edilmiş olan *Pseudoalteromonas marina* türünün 8 izolat ile baskın hale geçtiği görülmüştür. Ayrıca bu dönem içinde, bir önceki dönemde hiç tespit edilmemiş olan *Vibrio* cinsi bakterilerde de yüksek bir artış gözlenmiştir, bu dönemde toplam izolatların %29,6'sını *Vibro* cinsi bakteriler oluşturmuştur.

Dördüncü dönem bakteriyolojik kültür örneklerinde; tür düzeyinde tanımlanmamış olmakla birlikte içlerinde balık patojeni türler içeren *Vibrio*, *Shewanella* ve *Tenacibaculum* cinsi üyeleri tespit edilmiştir. Dördüncü dönem biyofilm örneği içinden 3 izolat olarak elde edilmiş olan *Vibrio harveyi* suşlarının, kuluçkahaneden kafes sistemlerine nakil edilen sinarit balıklarında meydana gelen hastalık çıkışı neticesinde etken bakteri olarak izole

edilmiş olan *Vibrio harveyi* suşları ile (KJ158254.2) %100 16S rRNA benzerliğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında tüm dönemler ele alındığında biyofilm içinde pirodizileme ile tespit edilmiş en fazla sayıda diziye sahip türün ökaryotik bir organizma olan *Nannochloropsis* sp. olduğu görülmüştür. Deniz balıkları yetiştiriciliğinde larval kültürde yoğun olarak kullanılan bir mikroalg türü olan *Nannochloropsis* sp., örnekleme yapılan işletmede de sinarit balıkları larval kültüründe kullanılmıştır. Çalışmada *Nannochloropsis* cinsi üyeleri prelarval dönemi temsil eden birinci dönemde biyofilm içinde ihmal edilebilir sayıda (≤ 10) düşük dizi içermektedirken (3 adet), rotifer ile beslenmenin başladığı ikinci dönemde en yüksek sayıya ulaşarak (629 adet) biyofilm içinde baskın hale gelmiş, rotifer ve *Artemia* ile beslenme dönemi olan üçüncü dönemde azalma göstermiş (382 adet) ve *Artemia* ile beslenmenin yapıldığı dördüncü dönemde tekrar ihmal edilebilecek seviyeye (6 adet) düşmüştür. İşletmenin kullandığı ikinci alg türü olan *Tetraselmis* sp., yine aynı nedenden dolayı bu çalışmadaki biyofilm örnekleri içinde sadece rotifer ile beslemenin yapıldığı ikinci dönemde gözlenmiş (197 adet), diğer dönemlerde cins üyelerine biyofilm içinde rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada pirodizileme ile biyofilm örnekleri içinde en fazla sayıda diziye sahip ikinci tür *Methylobacterium* sp. olarak tespit edilmiştir. Dönemler ele alınarak incelendiğinde, *Methylobacterium* cinsi üyelerinin prelarval dönemde biyofilm içinde dominant tür olarak bulunduğu (789 adet) ve ikinci ve üçüncü dönemlerde azaldığı ve dördüncü dönemde ise biyofilm örneği içinde bulunmadığı tespit edilmiştir.

Lee ve diğ. (2008) deniz ortamına yerleştirdikleri yapay yüzeyler üzerindeki biyofilm oluşumuyla ilgili yaptıkları çalışmada ilk 9 saat içinde Gammaproteobacteria sınıfı üyelerinin baskın olduğunu, ancak biyofilm oluşumundan sonraki 24-36 saat sonunda Alphaproteobacteria sınıfı üyelerinden *Loktanella*, *Methylobacterium* ve *Pelagibacter* cinsi üyelerinin baskın hale geçtiğini bildirmişlerdir. Yano ve diğ. (2013), banyolarda oluşmuş biyofilmlerle yaptıkları çalışmada, *Methylobacterium* cinsi bakterilerinin incelenen tüm yüzeylerde baskın olduğunu ve temizlik malzemelerine ve kurumaya karşı yüksek toleransa sahip olduklarını bildirmişlerdir. Ishino ve diğ. (2012) rotiferler (*Brachionus plicatilis*) ve üretildikleri kültür suyu ile hem kültür hem de kültürden-bağımsız yöntemle yaptıkları çalışmada; rotifer kültür suyunun konvansiyonel kültür yöntemiyle

incelenmesinde *Pseudoalteromonas* cinsine ait bakterilerin baskın olmasına karşın kültürden bağımsız yöntemde rotifer kültür suyunda tespit ettikleri 46 türün 12 adedinin *Methylobacterium* cinsi üyeleri olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, kültür suyunun UV ve klor ile dezenfekte edildiğini ve bu tip uygulamalar yapılan ortamlarda *Methylobacterium* gibi UV'ye ve klor ile dezenfeksiyon işlemlerine dayanıklı bakterilerin dominant hale gelebileceği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada da *Methylobacterium* türlerinin sinarit larvalarının beslenmesinde rotiferlerin kullanıldığı dönemde baskın olarak bulunmasına karşın, ilgili çalışmadan farklı olarak *Methylobacterium* türlerinin prelarval dönemde de baskın tür olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, elde edilen dizi sayısı bakımından biyofilm içinde daha az sayıda yer aldığı tespit edilen bakteri cinslerinin sırasıyla *Phycisphaera*, *Microscilla* ve *Shimia* cinsi üyeleri olduğu belirlenmiştir. Bunlardan *Phycisphaera* ve *Microscilla* cinsleri ilk üç dönemde biyofilm içinde tespit edilmemiş, *Shimia* türlerinin ise bu dönemlerde çok az sayıda bulunduğu tespit edilmiştir. Choi ve Cho (2006) bu cinsler içinde *Shimia* cinsine ait türleri kıyı balıkçılığı yapan bir balık çiftliğinde 1 ay süreyle yüzey sularına batırılmış lamalar üzerinde oluşan biyofilm tabakasından izole ettiklerini bildirmişler ve aynı çalışmada *Shimia* cins adını tanımlamışlardır.

Biyofilmler hemen hemen her tür yüzeyde olduğu gibi akuakültür sistemlerinde de yaygın bir şekilde oluşabilmektedirler. Biyofilmler, kültür sistemlerinde kullanılan ağ ve kafeslerin üzerinde birikebilmekte, biyolojik filtrelerin ve boruların içinde, akuakültür ekipmanlarında, kapalı devre yetiştiricilik sistemi gibi pek çok yerde gelişebilmektedirler. Kültür balıkçılığında biyofilmlerin, içlerinde barındırma potansiyeli taşıdıkları patojenlerle ilgili olarak yapılmış araştırmaların sayısı yetersizdir. Bu çalışmada, biyofilm içinde balıklarda hastalıklara neden olduğu pek çok çalışmada gösterilmiş olan *Listonella anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio tubiashii* ve *Tenacibaculum discolor* gibi tür düzeyinde tanımlanmış bakteriler ile birlikte potansiyel olarak patojenik türleri içerebilecek *Shewanella*, *Tenacibaculum* ve *Vibrio* cinslerine ait bakteriler de tespit edilmiştir.

Biyofilm içindeki mikroorganizmaların karmaşık etkinliklerini yürütebilmeleri için çoğunluğu algılama adı verilen bir sistemle birbirileriyle iletişim kurabilme yeteneğine sahip oldukları ve bu eş güdümlü hareketin biyofilmi oluşturan organizmaların her biri

tarafından üretilen sinyal molekülleri ile başarıldığı yapılan çalışmalarda ortaya çıkarılmıştır. Diğer taraftan bu hücreler arası iletişimin aynı zamanda virülans faktörlerinin üretilmesinde, diğer canlılarla patolojik bir ilişkinin başarılı bir şekilde kurulmasında da anahtar bir rol oynadığı bilinmektedir. Günümüzde balık patojenlerinin çoğunluk algılama sistemleriyle ilgili bilgiler oldukça yetersizdir ve özellikle insan hekimliğinde yeni bir tedavi stratejisi olarak kullanılması önerilen çoğunluk algılama sistemlerinin bloke edilerek hastalıklarla mücadele etme stratejisinin balık hastalıklarında uygulanabilmesi için bu alanda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Tüm bunların başarılabilmesi için akuakültür sistemlerindeki biyofilmlerin yapısal olarak incelenmesi, mikrobiyal çeşitliliğinin saptanması ve biyofilm üreten patojen mikroorganizmaların sinyal moleküllerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Günümüzde doğadaki bakterilerin çok küçük bir kısmının laboratuvarında üretilebildiği, buna karşın büyük çoğunluğunun üretilmesinin mümkün olmadığı bilinmektedir. Bu nedenden dolayı günümüzde mikrobiyal ekoloji çalışmalarında mevcut flora hakkında kısıtlı bilgi sağlayan kültür temelli teknikler yerine kültürden bağımsız olan metagenomik teknikler kullanılmaktadır. Yine aynı sebepten dolayı biyofilm gibi karmaşık mikrobiyal toplulukların incelenmesinde, konvansiyonel bakteriyolojik kültür tabanlı yaklaşımlar yerine; doğadaki mikroorganizma çeşitliliğini çok daha iyi belirleyebilmek ve bu çeşitlilik içindeki genleri ve bu genlerin fonksiyonlarını tespit edebilmek için kültüre ihtiyaç duymayan kültürden-bağımsız teknikler kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında da pirodizileme ile elde edilen bulgular incelendiğinde, bakteriyolojik kültür ile elde edilene kıyasla çok daha fazla cins ve tür sayısı elde edilmiştir. Tüm dönemlerde bakteriyolojik kültür yöntemi ile 23 ayrı cinse ait 29 farklı tür tespit edilmesine karşın, kültürden-bağımsız yöntem ile 37 ayrı cinse ait 89 farklı tür tespit edilmiştir.

Akuakültür sistemlerindeki mikrobiyal çeşitlilikle ilgili mevcut bilgiler ise, bu sistemlerde yapılan çalışmaların çoğunun çeşitliliği ortaya çıkarmada yetersiz olan kültür temelli çalışmalardan oluşmasından dolayı günümüzde eksiktir. Bu nedenle akuakültür işletmelerinin mikrobiyal profillerinin belirlenebilmesi için metagenomik tekniklerin uygulanmasının yaygınlaşmasına ihtiyaç vardır. Benzer şekilde kullanılan canlı yem ve alglerin mikroflorasıyla ilgili bilgiler de yetersizdir. Akuakültür sistemlerinde bulunan mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen metabolik reaksiyonların ve bunların gerçekleştirmesinde kullanılan genlerin tespit edilmesiyle; besinlerin biyokimyasal

döngülerinde rol alan bakteriyel toplulukların yetiştiricilik lehine yapılandırılması ve mikroorganizmaların hastalıklara neden olan proseslerinin öğrenilerek hastalıkların önlenmesi sağlanabilecektir.

Ülkemizde mevcut kültürü yapılan türlere kuvvetli bir alternatif teşkil eden sinarit balıklarının konu edinmiş ve bu balıklarda hastalıklara neden olan patojenleri tanımlamaya ve hem canlının hem de bulunduğu ortamın florasının tespitine yönelik çalışmalar çok kısıtlıdır. Günümüzde bazı balıklarda yapılmış olan metagenomik çalışmalar olmakla birlikte, sinarit balıkları yetiştiriciliğinde biyofilmlerle ilgili olarak ülkemizde ve yurt dışında yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın, hem sinarit balığı yetiştiriciliğinin erken evrelerinde yetiştiricilik ortamındaki biyofilm oluşumu ve kompozisyonunun belirlenmesiyle birlikte sinarit balığı yetiştiriciliğine hem de mevcut bilimsel literatüre katkı sağlayacağı ve ülkemiz akuakültür alanında yapılacak olan gelecekteki metagenomik çalışmalar için de öncü bir çalışma olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbas, K.A., Mohamed, A., Jamilah, B., 2009, Fatty acids in fish and beef and their nutritional values: A review, *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7, 37-42.
- Abellán, E., 2000, Culture of common dentex (*Dentex dentex* L.): present knowledge, problems and perspectives, *Cahiers Options Méditerranéennes*, 47, 157-168.
- Adal, K.A., Farr, B.M., 1996, Central venous catheter-related infections: a review, *Nutrition*, 12, 208-213.
- Adams, J.L., Mclean, R.J., 1999, Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4285-4287.
- Aguirre-Guzmán, G., Mejia Ruiz, H., Ascencio, F., 2004, A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp, *Aquaculture Research*, 35, 1395-1404.
- Akayli, T., Çiğdem, Ü., Başaran, B., 2011, Kültür balıklarında *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* enfeksiyonu, *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 26, 1-12.
- Akayli, T., Erkan, M., Yardimci, R.E., Canak, O., Urku, C., 2015, Interaction of gut flora and bacterial pathogens of cultured common dentex (*Dentex dentex*), *Israeli Journal Of Aquaculture-Bamidgeh*, 67.
- Alavandi, S., Poornima, M., 2012, Viral metagenomics: a tool for virus discovery and diversity in aquaculture, *Indian Journal of Virology*, 23, 88-98.
- Alderman, D., Hastings, T., 1998, Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance–potential for consumer health risks*, *International Journal of Food Science & Technology*, 33, 139-155.
- Allison, D.G., Sutherland, I.W., 1987, The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria, *Journal of General Microbiology*, 133, 1319-1327.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1995, Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Reviews*, 59, 143-169.
- Amaral-Zettler, L., Artigas, L.F., Baross, J., Bharathi, L., Boetius, A., Chandramohan, D., Herndl, G., Kogure, K., Neal, P., Pedrós-Alió, C., 2010, A global census of marine microbes, *Life in the World's Oceans: Diversity, Distribution and Abundance*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 223-245.

- Ambrose, H., Granerod, J., Clewley, J., Davies, N., Keir, G., Cunningham, R., Zuckerman, M., Mutton, K., Ward, K., Ijaz, S., 2011, Diagnostic strategy used to establish etiologies of encephalitis in a prospective cohort of patients in England, *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 3576-3583.
- An, Y.H., Dickinson, R.B., Doyle, R.J., 2000, Mechanisms of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections, *Handbook of Bacterial Adhesion*, Springer, 1617371920.
- Anderson, G., O'toole, G., 2008, Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms, *Bacterial Biofilms*, Springer, 3540754172.
- Andrews, J.M., 2001, Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16.
- Ansorge, W.J., 2009, Next-generation DNA sequencing techniques, *New Biotechnology*, 25, 195-203.
- Anwar, H., Strap, J., Costerton, J., 1992, Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 1347.
- Asad, S., Opal, S.M., 2008, Bench-to-bedside review: quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection, *Critical Care*, 12, 236.
- Aslan, A., Triadafilopoulos, G., 1992, Fish oil fatty acid supplementation in active ulcerative colitis: a double-blind, placebo-controlled, crossover study, *The American Journal of Gastroenterology*, 87, 432-437.
- Attramadal, K.J., Salvesen, I., Xue, R., Øie, G., Størseth, T.R., Vadstein, O., Olsen, Y., 2012, Recirculation as a possible microbial control strategy in the production of marine larvae, *Aquacultural Engineering*, 46, 27-39.
- Auffret, M., Yergeau, É., Pilote, A., Proulx, É., Proulx, D., Greer, C.W., Vandenberg, G., Villemur, R., 2013, Impact of water quality on the bacterial populations and off-flavours in recirculating aquaculture systems, *FEMS Microbiology Ecology*, 84, 235-247.
- Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F., Swings, J., 2005, Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*, *Environmental Microbiology*, 7, 1488-1495.
- Banin, E., Brady, K.M., Greenberg, E.P., 2006, Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2064-2069.
- Banin, E., Vasil, M.L., Greenberg, E.P., 2005, Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 11076-11081.

- Barraud, N., Hassett, D.J., Hwang, S.-H., Rice, S.A., Kjelleberg, S., Webb, J.S., 2006, Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology*, 188, 7344-7353.
- Becerra-Dorame, M.J., Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L.R., Rivas-Vega, M.E., Lopez-Elias, J.A., Porchas-Cornejo, M.A., 2012, Production response and digestive enzymatic activity of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) intensively pregrown in microbial heterotrophic and autotrophic-based systems, *The Scientific World Journal*, 2012.
- Bendinger, B., Rijnaarts, H.H., Altendorf, K., Zehnder, A.J., 1993, Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3973-3977.
- Bjarnsholt, T., Givskov, M., 2007, Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362, 1213-1222.
- Blancheton, J., Attramadal, K., Michaud, L., D'orbcastel, E.R., Vadstein, O., 2013, Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication, *Aquacultural Engineering*, 53, 30-39.
- Borriello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A.M., Ehrlich, G.D., Stewart, P.S., 2004, Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 2659-2664.
- Boyd, A., Chakrabarty, A., 1995, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide, *Journal of Industrial Microbiology*, 15, 162-168.
- Boyd, A., Chakrabarty, A.A., 1994, Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2355-2359.
- Braithwaite, R., Mcevoy, L., 2004, Marine biofouling on fish farms and its remediation, *Advances in Marine Biology*, 47, 215-252.
- Bulliyya, G., 2002, Influence of fish consumption on the distribution of serum cholesterol in lipoprotein fractions: comparative study among fish-consuming and non-fish-consuming populations, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 11, 104-111.
- Burford, M., Peterson, E., Baiano, J., Preston, N., 1998, Bacteria in shrimp pond sediments: their role in mineralizing nutrients and some suggested sampling strategies, *Aquaculture Research*, 29, 843-849.
- Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Kjelleberg, S., 2006, Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3916-3923.

- Cabello, F.C., 2006, Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment, *Environmental Microbiology*, 8, 1137-1144.
- Carpentier, B., Cerf, O., 1993, Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry, *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 499-511.
- Caruso, G., 2013, Microbes and their use as Indicators of Pollution, *Journal of Pollution Effects & Control*, 1, e102.
- Ceri, H., Olson, M., Stremick, C., Read, R., Morck, D., Buret, A., 1999, The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms, *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1771-1776.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A., 2001, Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance, *Journal of Bacteriology*, 183, 5385-5394.
- Characklis, W.G., 1973, Attached microbial growths—II. Frictional resistance due to microbial slimes, *Water Research*, 7, 1249-1258.
- Chauhan, A., Wafula, D., Lewis, D.E., Pathak, A., 2014, Metagenomic assessment of the Eastern oyster-associated microbiota, *Genome Announcements*, 2, e01083-14.
- Cheema, M., Rassing, J., Marriott, C., 1986, The diffusion characteristics of antibiotics in mucus glycoprotein gels, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 38, 53P-53P.
- Cho, I., Blaser, M.J., 2012, The human microbiome: at the interface of health and disease, *Nature Reviews Genetics*, 13, 260-270.
- Choi, D.H., Cho, B.C., 2006, *Shimia marina* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium of the Roseobacter clade isolated from biofilm in a coastal fish farm, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1869-1873.
- Cleland, L.G., James, M.J., Proudman, S.M., 2003, The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis, *Drugs*, 63, 845-853.
- Cochrane, D.M.G., 1988, Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection, *Journal of Medical Microbiology*, 27, 255.
- Cochrane, K., De Young, C., Soto, D., Bahri, T., 2009, Climate change implications for fisheries and aquaculture, *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 530, 212.
- Collins, F.S., 1992, Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications, *Science*, 256, 774-779.

- Company, R., Sitj, A., Pujalte, M., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., 1999, Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L, *Journal of Fish Diseases*, 22, 299-309.
- Corsaro, D., Greub, G., 2006, Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria, *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 283-297.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995, Microbial biofilms, *Annual Reviews in Microbiology*, 49, 711-745.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E., 1999, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284, 1318-1322.
- Costley, S., Wallis, F., 2001, Bioremediation of heavy metals in a synthetic wastewater using a rotating biological contactor, *Water Research*, 35, 3715-3723.
- Cowan, S.E., Gilbert, E., Liepmann, D., Keasling, J., 2000, Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4481-4485.
- Davey, M.E., O'toole, G.A., 2000, Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847-867.
- Davies, D., Geesey, G., 1995, Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 860-867.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J., Greenberg, E., 1998, The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm, *Science*, 280, 295-298.
- De Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., Iglewski, B.H., 2001, Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1865-1873.
- De Kievit, T.R., Iglewski, B.H., 2000, Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships, *Infection and Immunity*, 68, 4839-4849.
- De Silva, S.S., Soto, D., 2009, Climate change and aquaculture: potential impacts, adaptation and mitigation, *Climate change implications for fisheries and aquaculture: overview of current scientific knowledge. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 151-212.
- Dewailly, É., Blanchet, C., Gingras, S., Lemieux, S., Holub, B.J., 2003, Fish consumption and blood lipids in three ethnic groups of Québec (canada), *Lipids*, 38, 359-365.
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., Sorgeloos, P., 2001, Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe, *Aquaculture*, 200, 129-146.

- Diaz-Torres, M.L., Villedieu, A., Hunt, N., McNab, R., Spratt, D.A., Allan, E., Mullany, P., Wilson, M., 2006, Determining the antibiotic resistance potential of the indigenous oral microbiota of humans using a metagenomic approach, *FEMS Microbiology Letters*, 258, 257-262.
- Dingman, J.R., Rayner, M.G., Mishra, S., Zhang, Y., Ehrlich, M.D., Post, J.C., Ehrlich, G.D., 1998, Correlation between presence of viable bacteria and presence of endotoxin in middle-ear effusions, *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 3417-3419.
- Diouf, J. 2009. How to feed the world in 2050. FAO's Director-General's Statements.
- Donlan, R.M., 2001, Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process, *Clinical Infectious Diseases*, 33, 1387-1392.
- Donlan, R.M., 2002, Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerging Infectious Diseases*, 8.
- Dowd, S.E., Sun, Y., Wolcott, R.D., Domingo, A., Carroll, J.A., 2008, Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs, *Foodborne Pathogens and Disease*, 5, 459-472.
- Driffield, K., Miller, K., Bostock, J., O'Neill, A., Chopra, I., 2008, Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 1053-1056.
- Dunne, W.M., 2002, Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 155-166.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005, Diversity of the human intestinal microbial flora, *Science*, 308, 1635-1638.
- Edwards, K.J., Bond, P.L., Gihring, T.M., Banfield, J.F., 2000, An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage, *Science*, 287, 1796-1799.
- Efthimiou, S., Divanach, P., Rosenthal, H., 1994, Growth, food conversion and agonistic behaviour in common dentex (*Dentex dentex*) juveniles fed on pelleted moist and dry diets, *Aquatic Living Resources*, 7, 267-275.
- Emrich, C.A., Tian, H., Medintz, I.L., Mathies, R.A., 2002, Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis, *Analytical Chemistry*, 74, 5076-5083.
- Espeland, E., Wetzel, R., 2001, Complexation, stabilization, and UV photolysis of extracellular and surface-bound glucosidase and alkaline phosphatase: implications for biofilm microbiota, *Microbial Ecology*, 42, 572-585.
- Espy, M., Uhl, J., Sloan, L., Buckwalter, S., Jones, M., Vetter, E., Yao, J., Wengenack, N., Rosenblatt, J., Cockerill, F., 2006, Real-time PCR in clinical microbiology:

- applications for routine laboratory testing, *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 165-256.
- Euzéby, J.P., 1997, List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 590-592.
- FAO, 2012, FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics, *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome*, 219.
- FAO. 2015. *Fisheries & Aquaculture - Fisheries statistics and information. Topics Fact Sheets* [Online]. FAO. Available: <http://www.fao.org/fishery/topic/2017/en> [Ziyaret Tarihi: 01.06.2015 2015].
- Farber, B.F., Kaplan, M.H., Clogston, A.G., 1990, Staphylococcus epidermidis extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics, *Journal of Infectious Diseases*, 161, 37-40.
- Finkbeiner, S.R., Allred, A.F., Tarr, P.I., Klein, E.J., Kirkwood, C.D., Wang, D., 2008, Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery, *PLoS Pathogens*, 4, e1000011.
- Fletcher, M., Floodgate, G., 1973, An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces, *Journal of General Microbiology*, 74, 325-334.
- Fletcher, M., Loeb, G., 1979, Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces, *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 67-72.
- Fox, G.C.-A., Stackebrandt, E., Hespell, R., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T., Wolfe, R., Balch, W., Tanner, R., Magrum, L., 1980, The phylogeny of prokaryotes, *Science (New York, NY)*, 209, 457.
- Fox, G.E., Magrum, L.J., Balch, W.E., Wolfe, R.S., Woese, C.R., 1977, Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 4537-4541.
- Fraher, M.H., O'toole, P.W., Quigley, E.M., 2012, Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9, 312-322.
- Franicevic, V., 1991, Preliminary results on the larval rearing of common dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758), *EAS Spec. Publ*, 106-107.
- Franks, A.H., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Schut, F., Welling, G.W., 1998, Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3336-3345.

- Freeman, C., Lock, M.A., 1995, The biofilm polysaccharide matrix: a buffer against changing organic substrate supply?, *Limnology and Oceanography*, 40, 273-278.
- Friedman, M., 1996, Nutritional value of proteins from different food sources. A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 6-29.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996, Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin, *Water Research*, 30, 1749-1758.
- Fryer, J.L., Mauel, M.J., 1997, The rickettsia: an emerging group of pathogens in fish, *Emerging Infectious Diseases*, 3, 137.
- Fuqua, C., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2001, Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing, *Annual Review of Genetics*, 35, 439-468.
- Fux, C., Costerton, J., Stewart, P., Stoodley, P., 2005, Survival strategies of infectious biofilms, *Trends in Microbiology*, 13, 34-40.
- Fux, C., Quigley, M., Worel, A., Post, C., Zimmerli, S., Ehrlich, G., Veeh, R., 2006, Biofilm-related infections of cerebrospinal fluid shunts, *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 331-337.
- Gauthier, M., 1976, *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26, 459-466.
- Gauthier, M., Flatau, G., 1976, Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds, *Canadian Journal of Microbiology*, 22, 1612-1619.
- Geesey, G., Richardson, W., Yeomans, H., Irvin, R., Costerton, J., 1977, Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream, *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 1733-1736.
- Gil-Turnes, M.S., Fenical, W., 1992, Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria, *The Biological Bulletin*, 182, 105-108.
- Gil-Turnes, M.S., Hay, M.E., Fenical, W., 1989, Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus, *Science*, 246, 116-118.
- Gilbert, J.A., Dupont, C.L., 2011, Microbial metagenomics: beyond the genome, *Annual Review of Marine Science*, 3, 347-371.
- Gilbert, P., Das, J., Foley, I., 1997, Biofilm susceptibility to antimicrobials, *Advances in Dental Research*, 11, 160-167.
- Gjedrem, T., Robinson, N., Rye, M., 2012, The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: a review, *Aquaculture*, 350, 117-129.

- Glamuzina, B., Jug-Dujaković, J., Katavić, I., 1989, Preliminary studies on reproduction and larval rearing of common dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus 1758), *Aquaculture*, 77, 75-84.
- Goldsworthy, M.J.H., 2008, Gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* and MRSA within a catheter-associated urinary tract infection biofilm model, *Bioscience Horizons*, 1, 28-37.
- González, J.E., Keshavan, N.D., 2006, Messing with bacterial quorum sensing, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 859-875.
- Govan, J.R., Deretic, V., 1996, Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*, *Microbiological Reviews*, 60, 539-574.
- Greninger, A.L., Chen, E.C., Sittler, T., Scheinerman, A., Roubinian, N., Yu, G., Kim, E., Pillai, D.R., Guyard, C., Mazzulli, T., 2010, A metagenomic analysis of pandemic influenza A (2009 H1N1) infection in patients from North America, *PloS One*, 5, e13381.
- Griffiths, S., Melville, K., Cook, M., Vincent, S., Pierre, M., Lanteigne, C., 2001, Profiling of bacterial species associated with haddock larviculture by PCR amplification of 16S rDNA and denaturing gradient gel electrophoresis, *Journal of Aquatic Animal Health*, 13, 355-363.
- Günther, F., Wabnitz, G.H., Stroh, P., Prior, B., Obst, U., Samstag, Y., Wagner, C., Hänsch, G.M., 2009, Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN), *Molecular Immunology*, 46, 1805-1813.
- Habib, C., Houel, A., Lunazzi, A., Bernardet, J.-F., Olsen, A.B., Nilsen, H., Toranzo, A.E., Castro, N., Nicolas, P., Duchaud, E., 2014, Multilocus Sequence Analysis of the Marine Bacterial Genus *Tenacibaculum* Suggests Parallel Evolution of Fish Pathogenicity and Endemic Colonization of Aquaculture Systems, *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 5503-5514.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004, Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases, *Nature Reviews Microbiology*, 2, 95-108.
- Hall-Stoodley, L., Lappin-Scott, H., 1998, Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*, *FEMS Microbiology Letters*, 168, 77-84.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., 2005, Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens, *Trends in Microbiology*, 13, 7-10.
- Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999. 95-98.

- Handisyde, N., Ross, L., Badjeck, M., Allison, E., 2006, *The effects of climate change on world aquaculture: a global perspective*, Department for International Development
- Hansen, G., Olafsen, J., 1999, Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish, *Microbial Ecology*, 38, 1-26.
- Harlioğlu, A.G., 2011, Present status of fisheries in Turkey, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21, 667-680.
- Hassett, D.J., Sutton, M.D., Schurr, M.J., Herr, A.B., Caldwell, C.C., Matu, J.O., 2009, *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways, *Trends in Microbiology*, 17, 130-138.
- Heinicke, E., Kumar, U., Munoz, D., 1992, Quantitative dot-blot assay for proteins using enhanced chemiluminescence, *Journal of Immunological Methods*, 152, 227-236.
- Heller, M.J., 2002, DNA microarray technology: devices, systems, and applications, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4, 129-153.
- Henrici, A.T., 1933, Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique, *Journal of Bacteriology*, 25, 277.
- Herrmann, M., Vaudaux, P.E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P.D., Perdreau, F.S., Peters, G., Waldvogel, F.A., 1988, Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material, *Journal of Infectious Diseases*, 158, 693-701.
- Heukelekian, H., Heller, A., 1940, Relation between food concentration and surface for bacterial growth, *Journal of Bacteriology*, 40, 547.
- Heydorn, A., Ersbøll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S., 2002, Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2008-2017.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology*, 11, 1026-1030.
- Hoff, K.J., Tech, M., Lingner, T., Daniel, R., Morgenstern, B., Meinicke, P., 2008, Gene prediction in metagenomic fragments: a large scale machine learning approach, *BMC Bioinformatics*, 9, 217.
- Holmes, D.E., Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2004, Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1591-1599.

- Holmström, C., Egan, S., Franks, A., Mccloy, S., Kjelleberg, S., 2002, Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species, *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 47-58.
- Holmström, C., Kjelleberg, S., 1999, Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents, *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 285-293.
- Hu, F.B., Bronner, L., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rexrode, K.M., Albert, C.M., Hunter, D., Manson, J.E., 2002, Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women, *Jama*, 287, 1815-1821.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998, Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity, *Journal of Bacteriology*, 180, 4765-4774.
- Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2008, Microbiology: metagenomics, *Nature*, 455, 481-483.
- Iijima, S., Washio, K., Okahara, R., Morikawa, M., 2009, Biofilm formation and proteolytic activities of *Pseudoalteromonas* bacteria that were isolated from fish farm sediments, *Microbial Biotechnology*, 2, 361-369.
- Inglis, T., 1993, Evidence for dynamic phenomena in residual tracheal tube biofilm, *British Journal of Anaesthesia*, 70, 22-24.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., 2012, *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Academic Press, ISBN: 008088671X.
- Isaka, K., Date, Y., Sumino, T., Tsuneda, S., 2007, Ammonium removal performance of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria immobilized in polyethylene glycol gel carrier, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1457-1465.
- Ishino, R., Iehata, S., Nakano, M., Tanaka, R., Yoshimatsu, T., Maeda, H., 2012, Bacterial diversity associated with the rotifer *Brachionus plicatilis* sp. complex determined by culture-dependent and-independent methods, *Biocontrol Science*, 17, 51-56.
- Ivanova, E., Mikhailov, V., 2001, A new family, Alteromonadaceae fam. nov., including marine proteobacteria of the genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina*, and *Colwellia*, *Microbiology*, 70, 10-17.
- Jacobsen, S., Stickler, D., Mobley, H., Shirtliff, M., 2008, Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 26-59.
- Jahnke, L.L., Eder, W., Huber, R., Hope, J.M., Hinrichs, K.-U., Hayes, J.M., Des Marais, D.J., Cady, S.L., Summons, R.E., 2001, Signature Lipids and Stable Carbon Isotope Analyses of Octopus Spring Hyperthermophilic Communities Compared with Those of Aquificales Representatives, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5179-5189.

- James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W., Stewart, P.S., 2008, Biofilms in chronic wounds, *Wound Repair and Regeneration*, 16, 37-44.
- Jass, J., Lappin-Scott, H.M., 1996, The efficacy of antibiotics enhanced by electrical currents against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38, 987-1000.
- Jefferson, K.K., 2004, What drives bacteria to produce a biofilm?, *FEMS Microbiology Letters*, 236, 163-173.
- Jesaitis, A.J., Franklin, M.J., Berglund, D., Sasaki, M., Lord, C.I., Bleazard, J.B., Duffy, J.E., Beyenal, H., Lewandowski, Z., 2003, Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions, *The Journal of Immunology*, 171, 4329-4339.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005, Principles of microbial PAH-degradation in soil, *Environmental Pollution*, 133, 71-84.
- Joint, I., Tait, K., Callow, M.E., Callow, J.A., Milton, D., Williams, P., Cámara, M., 2002, Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary, *Science*, 298, 1207-1207.
- Jones, H., Roth, I., Sanders, W., 1969, Electron microscopic study of a slime layer, *Journal of Bacteriology*, 99, 316-325.
- Kaiser, M., Stead, S.M., 2002, Uncertainties and values in European aquaculture: communication, management and policy issues in times of “changing public perceptions”, *Aquaculture International*, 10, 469-490.
- Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Haldar, S., Yamasaki, S., Nagata, S., 2006, Antibacterial activities of marine epibiotic bacteria isolated from brown algae of Japan, *Annals of Microbiology*, 56, 167-173.
- Karatuna, O., Yagci, A., 2010, Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates, *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 1770-1775.
- Kargi, F., Eker, S., 2005, Removal of 2, 4-dichlorophenol and toxicity from synthetic wastewater in a rotating perforated tube biofilm reactor, *Process Biochemistry*, 40, 2105-2111.
- Kennedy, J., Flemer, B., Jackson, S.A., Lejon, D.P., Morrissey, J.P., O’gara, F., Dobson, A.D., 2010, Marine metagenomics: new tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism, *Marine Drugs*, 8, 608-628.
- Kent, M.L., Feist, S.W., Harper, C., Hoogstraten-Miller, S., Mac Law, J., Sanchez-Morgado, J.M., Tanguay, R.L., Sanders, G.E., Spitsbergen, J.M., Whipps, C.M., 2009, Recommendations for control of pathogens and infectious diseases in fish

- research facilities, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149, 240-248.
- Khoury, A.E., Lam, K., Ellis, B., Costerton, J.W., 1992, Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices, *ASAIO Journal*, 38, M174-M178.
- King, R.K., Flick Jr, G.J., Pierson, D., Smith, S.A., Boardman, G.D., Coale Jr, C.W., 2004, Identification of bacterial pathogens in biofilms of recirculating aquaculture systems, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13, 125-133.
- Kinner, N.E., Balkwill, D.L., Bishop, P.L., 1983, Light and electron microscopic studies of microorganisms growing in rotating biological contactor biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 1659-1669.
- Krishnani, K.K., Kathiravan, V., Natarajan, M., Kailasam, M., Pillai, S., 2010, Diversity of sulfur-oxidizing bacteria in greenwater system of coastal aquaculture, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 1225-1237.
- Labrenz, M., Druschel, G.K., Thomsen-Ebert, T., Gilbert, B., Welch, S.A., Kemner, K.M., Logan, G.A., Summons, R.E., De Stasio, G., Bond, P.L., 2000, Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria, *Science*, 290, 1744-1747.
- Lambe, D., Ferguson, K., Mayberry-Carson, K., Tober-Meyer, B., Costerton, J., 1991, Foreign-body-associated experimental osteomyelitis induced with *Bacteroides fragilis* and *Staphylococcus epidermidis* in rabbits, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 266, 285-294.
- Lamont, R.J., Jenkinson, H.F., 1998, Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1244-1263.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1985, Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 6955-6959.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., Mcgettigan, P.A., Mcwilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., 2007, Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Lasaro, M.A., Salinger, N., Zhang, J., Wang, Y., Zhong, Z., Goulian, M., Zhu, J., 2009, F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 246-251.
- Lawrence, J., Korber, D., Hoyle, B., Costerton, J., Caldwell, D., 1991, Optical sectioning of microbial biofilms, *Journal of Bacteriology*, 173, 6558-6567.
- Lawrence, J., Neu, T., Swerhome, G., 1998, Multiple parameter imaging, and microbial biofilms. Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal,

- bacterial and exopolymer components of microbial biofilms, *Journal of Microbiological Methods*, 32, 253-261.
- Lawrence, J.R., Delaquis, P.J., Korber, D.R., Caldwell, D.E., 1987, Behavior of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments, *Microbial Ecology*, 14, 1-14.
- Le Magrex-Debar, E., Lemoine, J., Gellé, M.-P., Jacquelin, L.-F., Choisy, C., 2000, Evaluation of biohazards in dehydrated biofilms on foodstuff packaging, *International Journal of Food Microbiology*, 55, 239-243.
- Lee, J.-W., Nam, J.-H., Kim, Y.-H., Lee, K.-H., Lee, D.-H., 2008, Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces, *The Journal of Microbiology*, 46, 174-182.
- Lee, J., Jayaraman, A., Wood, T.K., 2007, Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA, *BMC Microbiology*, 7, 42.
- Lee, S.F., Li, Y.H., Bowden, G.H., 1996, Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity, *Infection and Immunity*, 64, 1035-1038.
- Lee, W., Lewandowski, Z., Nielsen, P.H., Hamilton, W.A., 1995, Role of sulfate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: A review, *Biofouling*, 8, 165-194.
- Leid, J.G., Shirtliff, M.E., Costerton, J., Stoodley, P., 2002, Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms, *Infection and Immunity*, 70, 6339-6345.
- Leid, J.G., Willson, C.J., Shirtliff, M.E., Hassett, D.J., Parsek, M.R., Jeffers, A.K., 2005, The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing, *The Journal of Immunology*, 175, 7512-7518.
- Lendenmann, U., Spain, J.C., Smets, B.F., 1998, Simultaneous biodegradation of 2, 4-dinitrotoluene and 2, 6-dinitrotoluene in an aerobic fluidized-bed biofilm reactor, *Environmental Science & Technology*, 32, 82-87.
- Leonard, N., Blancheton, J., Guiraud, J., 2000, Populations of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system, *Aquacultural Engineering*, 22, 109-120.
- Leung, J.W., Liu, Y.L., Desta, T., Libby, E., Inciardi, J.F., Lam, K., 1998, Is there a synergistic effect between mixed bacterial infection in biofilm formation on biliary stents?, *Gastrointestinal Endoscopy*, 48, 250-257.
- Lewis, K., 2001, Riddle of biofilm resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 999-1007.
- Liu, Z., Stirling, F.R., Zhu, J., 2007, Temporal quorum-sensing induction regulates *Vibrio cholerae* biofilm architecture, *Infection and Immunity*, 75, 122-126.

- Loman, N.J., Constantinidou, C., Christner, M., Rohde, H., Chan, J.Z.-M., Quick, J., Weir, J.C., Quince, C., Smith, G.P., Betley, J.R., 2013, A culture-independent sequence-based metagenomics approach to the investigation of an outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O104: H4, *Jama*, 309, 1502-1510.
- Lorenz, R., Weber, P., Szimnau, P., Heldwein, W., Strasser, T., Loeschke, K., 1989, Supplementation with n-3 fatty acids from fish oil in chronic inflammatory bowel disease—a randomized, placebo-controlled, double-blind cross-over trial, *Journal of Internal Medicine*, 225, 225-232.
- Lowy, F.D., 1998, *Staphylococcus aureus* infections, *New England Journal of Medicine*, 339, 520-532.
- Macaskie, L.E., Bonthron, K.M., Yong, P., Goddard, D.T., 2000, Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation, *Microbiology*, 146, 1855-1867.
- Mah, T.-F.C., O'toole, G.A., 2001, Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends in Microbiology*, 9, 34-39.
- Mahmod, F., 2014, *Novel methods to study intestinal microbiota*, Master Thesis, Norwegian University of Life Sciences.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., 1998, Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 3140-3145.
- Mardis, E.R., 2008, The impact of next-generation sequencing technology on genetics, *Trends in Genetics*, 24, 133-141.
- Margos, G., Vollmer, S.A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Collares-Pereira, M., Drancourt, M., 2009, A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes, *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5410-5416.
- Marrie, T.J., Nelligan, J., Costerton, J., 1982, A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead, *Circulation*, 66, 1339-1341.
- Marsh, T.L., 1999, Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products, *Current opinion in Microbiology*, 2, 323-327.
- Martínez-Córdova, L.R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., 2014, Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review, *Reviews in Aquaculture*.
- Martínez-Porchas, M., Vargas-Albores, F., 2015, Microbial metagenomics in aquaculture: a potential tool for a deeper insight into the activity, *Reviews in Aquaculture*.

- Martínez, J.L., 2012, Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials, *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Martins, P., Cleary, D.F., Pires, A.C., Rodrigues, A.M., Quintino, V., Calado, R., Gomes, N.C., 2013, Molecular analysis of bacterial communities and detection of potential pathogens in a recirculating aquaculture system for *Scophthalmus maximus* and *Solea senegalensis*, *PLoS One*, 8(11): e80847.
- Maturin, L., Peeler, J. 2009. Bacteriological Analytical Manual (BAM) BAM. Chapter 3. Aerobic Plate Count. Edition 8, Revision A, 1998. Chapter 3.
- Mavromatis, K., Ivanova, N., Barry, K., Shapiro, H., Goltsman, E., Mchardy, A.C., Rigoutsos, I., Salamov, A., Korzeniewski, F., Land, M., 2007, Use of simulated data sets to evaluate the fidelity of metagenomic processing methods, *Nature Methods*, 4, 495-500.
- Mcdougald, D., Lin, W., Rice, S., Kjelleberg, S., 2006, The role of quorum sensing and the effect of environmental conditions on biofilm formation by strains of *Vibrio vulnificus*, *Biofouling*, 22, 161-172.
- Mcintosh, D., Ji, B., Forward, B.S., Puvanendran, V., Boyce, D., Ritchie, R., 2008, Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua* L.) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis, *Aquaculture*, 275, 42-50.
- Mckenney, D., Hübner, J., Muller, E., Wang, Y., Goldmann, D.A., Pier, G.B., 1998, The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin, *Infection and Immunity*, 66, 4711-4720.
- Mcmanus, A., Newton, W., 2011, Seafood, nutrition and human health: A synopsis of the nutritional benefits of consuming seafood.
- Mcneill, K., Hamilton, I., 2003, Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*, *FEMS Microbiology Letters*, 221, 25-30.
- Memis, D., Demir, N., Eroldogan, O.T., Kucuk, S., 2002, Aquaculture in Turkey. The *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 54(1), 34-40.
- Merritt, K., An, Y.H., 2000, Factors influencing bacterial adhesion, *Handbook of Bacterial Adhesion*, Springer, ISBN:1617371920.
- Michaud, L., Lo Giudice, A., Troussellier, M., Smedile, F., Bruni, V., Blancheton, J.-P., 2009, Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system, *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1935-1946.
- Miller, M.B., Bassler, B.L., 2001, Quorum sensing in bacteria, *Annual Reviews in Microbiology*, 55, 165-199.

- Miller, R.R., Montoya, V., Gardy, J.L., Patrick, D.M., Tang, P., 2013, Metagenomics for pathogen detection in public health, *Genome Medicine*, 5, 81.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Kumar, V., Deboeck, G., Mohanta, K., 2013, Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97, 405-430.
- Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003, Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure, *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 255-261.
- Monroe, D., 2007, Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms, *PLoS Biology*, 5, e307.
- Morales-Nin, B., Moranta, J., 1997, Life history and fishery of the common dentex (*Dentex dentex*) in Mallorca (Balearic Islands, western Mediterranean), *Fisheries Research*, 30, 67-76.
- Moriarty, D.J., 1997, The role of microorganisms in aquaculture ponds, *Aquaculture*, 151, 333-349.
- Mulder, A., Van De Graaf, A.A., Robertson, L., Kuenen, J., 1995, Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized-bed reactor, *FEMS Microbiology Ecology* 16 (3), 177-183.(1995).
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Sillanpää, J., Garsin, D.A., Höök, M., Erlandsen, S.L., Murray, B.E., 2006, Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*, *Journal of Clinical Investigation*, 116, 2799.
- Nam, Y.-D., Chang, H.-W., Park, J.R., Kwon, H.-Y., Quan, Z.-X., Park, Y.-H., Lee, J.-S., Yoon, J.-H., Bae, J.-W., 2007, *Pseudoalteromonas marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 12-18.
- Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., Swings, J., 2005, Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes, *Microbiology*, 151, 2141-2150.
- Navarrete, P., Tovar-Ramírez, D., 2014, Use of yeasts as probiotics in fish aquaculture, *Sustainable Aquaculture Techniques. INTECH Open Science*, 135-172.
- Nayak, S.K., 2010, Role of gastrointestinal microbiota in fish, *Aquaculture Research*, 41, 1553-1573.

- Nealson, K., Hastings, J.W., 1979, Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance, *Microbiological Reviews*, 43, 496.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M., Grignani, F., Riccardi, C., 1991, A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *Journal of Immunological Methods*, 139, 271-279.
- O'toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000, Biofilm formation as microbial development, *Annual Reviews in Microbiology*, 54, 49-79.
- O'toole, G.A., Kolter, R., 1998a, Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Molecular Microbiology*, 30, 295-304.
- O'toole, G.A., Kolter, R., 1998b, Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis, *Molecular Microbiology*, 28, 449-461.
- Olafsen, J.A., 2001, Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture, *Aquaculture*, 200, 223-247.
- Oliver, C., Everard, M., N'diaye, T., 2007, Omega-3 fatty acids (from fish oils) for cystic fibrosis, *The Cochrane Library*.
- Openwetware. 2015. *CH391L/S12/Quorum Sensing* [Online]. Available: http://openwetware.org/index.php?title=CH391L/S12/Quorum_Sensing&oldid=760913 [Ziyaret Tarihi: 21 Ağustos 2015 2015].
- Paerl, H., Priscu, J., 1998, Microbial phototrophic, heterotrophic, and diazotrophic activities associated with aggregates in the permanent ice cover of Lake Bonney, Antarctica, *Microbial Ecology*, 36, 221-230.
- Palmer, R.J., 2009, Oral bacterial biofilms—history in progress, *Microbiology*, 155, 2113-2114.
- Pannekoek, Y., Morelli, G., Kusecek, B., Morré, S.A., Ossewaarde, J.M., Langerak, A.A., Van Der Ende, A., 2008, Multi locus sequence typing of Chlamydiales: clonal groupings within the obligate intracellular bacteria *Chlamydia trachomatis*, *BMC Microbiology*, 8, 42.
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 1999, Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Methods in Enzymology*, 310, 43-55.
- Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2000, Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 8789-8793.
- Pascual, J., Macián, M.C., Arahál, D.R., Garay, E., Pujalte, M.J., 2010, Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 154-165.

- 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.
- Pastor, E., Reira, F., Pou, S., Grau, A., Grau, A. Summary of investigations on reproduction and larval rearing of common dentex (*Dentex dentex* (L.)). *ICES Marine Science Symposia*, 1995. Copenhagen, Denmark: International Council for the Exploration of the Sea, 1991-, 148-152.
- Patel, J.B., 2001, 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory, *Molecular Diagnosis*, 6, 313-321.
- Patel, R., 2005, Biofilms and antimicrobial resistance, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 437, 41-47.
- Pier, G.B., 1998, *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis, *ASM News-American Society for Microbiology*, 64, 339-347.
- Piñeiro-Vidal, M., Riaza, A., Santos, Y., 2008, *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 21-25.
- Planas, M., Cunha, I., 1999, Larviculture of marine fish: problems and perspectives, *Aquaculture*, 177, 171-190.
- Port, J.A., Cullen, A.C., Wallace, J.C., Smith, M.N., Faustman, E.M., 2014, Metagenomic frameworks for monitoring antibiotic resistance in aquatic environments, *Environmental Health Perspectives*, 122, 222.
- Port, J.A., Wallace, J.C., Griffith, W.C., Faustman, E.M., 2012, Metagenomic profiling of microbial composition and antibiotic resistance determinants in Puget Sound. *PLoS ONE*, 7(10): e48000.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P., 1999, Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 181, 5993-6002.
- Purevdorj, B., Costerton, J., Stoodley, P., 2002, Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4457-4464.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., 2012, A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes, *Nature*, 490, 55-60.
- Rasmussen, B., 2000, Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit, *Nature*, 405, 676-679.
- Reysenbach, A.-L., Cady, S.L., 2001, Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems, *Trends in Microbiology*, 9, 79-86.

- Reysenbach, A., Ehringer, M., Hershberger, K., 1999, Microbial diversity at 83 (degree) C in Calcite Springs, Yellowstone National Park: another environment where the Aquificales and Korarchaeota coexist, *Extremophiles*, 4, 61.
- Rice, S., Koh, K., Queck, S., Labbate, M., Lam, K., Kjelleberg, S., 2005, Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues, *Journal of Bacteriology*, 187, 3477-3485.
- Riera, F., Pastor, E., Grau, A., Pou, S., Grau, A., Massuti, E. Experiencias en el cultivo del dentón, *Dentex dentex* (L.). *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*, 1993. 21-24.
- Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M., Handelsman, J., 2004, Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes, *Environmental Microbiology*, 6, 981-989.
- Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., 1997, Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios, *Oceanographic Literature Review*, 2, 144.
- Robinson, R.W., Akin, D.E., Nordstedt, R.A., Thomas, M.V., Aldrich, H.C., 1984, Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors, *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 127-136.
- Ronaghi, M., 2001, Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing, *Genome Research*, 11, 3-11.
- Rosario, K., Breitbart, M., 2011, Exploring the viral world through metagenomics, *Current Opinion in Virology*, 1, 289-297.
- Rueda, F., Martínez, F., 2001, A review on the biology and potential aquaculture of *Dentex dentex*, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 11, 57-70.
- Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Iglewski, B.H., Hamood, A.N., 1999, Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections, *Infection and Immunity*, 67, 5854-5862.
- Saka, Ş., Firat, K., Coban, D., 2004, Development of the common dentex (*Dentex dentex*) eggs in relation to temperature, *Aquaculture Research*, 35, 224-231.
- Salta, M., Wharton, J.A., Blache, Y., Stokes, K.R., Briand, J.F., 2013, Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics, *Environmental Microbiology*, 15, 2879-2893.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-5467.
- 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, *Journal of Bacteriology*, 184, 1140-1154.

- Schembri, M.A., Kjærsgaard, K., Klemm, P., 2003, Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms, *Molecular Microbiology*, 48, 253-267.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., 1995, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, 270, 467-470.
- Schlag, S., Nerz, C., Birkenstock, T.A., Altenberend, F., Götz, F., 2007, Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite, *Journal of Bacteriology*, 189, 7911-7919.
- Schloss, P.D., Handelsman, J., 2003, Biotechnological prospects from metagenomics, *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 303-310.
- Schmitt, J., Flemming, H.-C., 1999, Water binding in biofilms, *Water Science and Technology*, 39, 77-82.
- Schreier, H.J., Mirzoyan, N., Saito, K., 2010, Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems, *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 318-325.
- Schrezenmeir, J., De Vrese, M., 2001, Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 361s-364s.
- Schulze, A.D., Alabi, A.O., Tattersall-Sheldrake, A.R., Miller, K.M., 2006, Bacterial diversity in a marine hatchery: balance between pathogenic and potentially probiotic bacterial strains, *Aquaculture*, 256, 50-73.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E., 2003, Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis, *Journal of Bacteriology*, 185, 2066-2079.
- Shanks, R.M., Stella, N.A., Kalivoda, E.J., Doe, M.R., O'dee, D.M., Lathrop, K.L., Guo, F.L., Nau, G.J., 2007, A *Serratia marcescens* OxyR homolog mediates surface attachment and biofilm formation, *Journal of Bacteriology*, 189, 7262-7272.
- Sharrer, M.J., Summerfelt, S.T., 2007, Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculating system, *Aquacultural Engineering*, 37, 180-191.
- Shea, C., Nunley, J., Williamson, J., Smith-Somerville, H., 1991, Comparison of the adhesion properties of *Deleya marina* and the exopolysaccharide-defective mutant strain DMR, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3107-3113.
- Sheng, W.-H., Ko, W.-J., Wang, J.-T., Chang, S.-C., Hsueh, P.-R., Luh, K.-T., 2000, Evaluation of antiseptic-impregnated central venous catheters for prevention of catheter-related infection in intensive care unit patients, *Diagnostic Microbiology and infectious disease*, 38, 1-5.
- Shibata, K., Itoh, M., Aizawa, K., Nagaoka, S., Sasaki, N., Carninci, P., Konno, H., Akiyama, J., Nishi, K., Kitsunai, T., 2000, RIKEN integrated sequence analysis (RISA) system—384-format sequencing pipeline with 384 multicapillary sequencer, *Genome Research*, 10, 1757-1771.

- Shields, R., 2001, Larviculture of marine finfish in Europe, *Aquaculture*, 200, 55-88.
- Shih, P.-C., Huang, C.-T., 2002, Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 309-314.
- Sihag, R.C., Sharma, P., 2012, Probiotics: the new ecofriendly alternative measures of disease control for sustainable aquaculture, *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7, 72-103.
- Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., Welsh, M.J., 2002, A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development, *Nature*, 417, 552-555.
- Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006, Biofilms: implications in bioremediation, *Trends in Microbiology*, 14, 389-397.
- Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., 2001, *Leptotheca sparidarum* n. sp. (Myxosporaea: Bivalvulida), a parasite from cultured common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) (Teleostei: Sparidae), *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48, 627-639.
- Sitjà-Bobadilla, A., Pujalte, M.J., Bermejo, A., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 2007, Bacteria associated with winter mortalities in laboratory-reared common dentex (*Dentex dentex* L.), *Aquaculture Research*, 38, 733-739.
- Skjermo, J., Vadstein, O. Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. *Rotifer Symposium VI*, 1993. Springer, 185-191.
- Smilack, J.D., 1985, Infections Associated With Prosthetic Devices, *JAMA*, 253, 2443-2443.
- Steele, H.L., Streit, W.R., 2005, Metagenomics: advances in ecology and biotechnology, *FEMS Microbiology Letters*, 247, 105-111.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *The Lancet*, 358, 135-138.
- Stickler, D.J., Morris, N.S., Mclean, R.J., Fuqua, C., 1998, Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules *in situ* and *in vitro*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3486-3490.
- Stinear, T.P., Jenkin, G.A., Johnson, P.D., Davies, J.K., 2000, Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence, *Journal of Bacteriology*, 182, 6322-6330.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C., Wilson, S., Klapper, I., 2002, Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29, 361-367.
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J., Lappin-Scott, H., 1999a, Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure, *Journal of Applied Microbiology*, 85, 19S-28S.

- Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Jorgensen, F., Lappin-Scott, H.M. Environmental and genetic factors influencing biofilm structure. *Symposia-society for General Microbiology*, 2000. Cambridge; Cambridge University Press; 1999, 53-64.
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., 1999b, The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow, *Environmental Microbiology*, 1, 447-455.
- Stoodley, P., Purevdorj-Gage, B., Costerton, J., 2005, Clinical significance of seeding dispersal in biofilms: a response, *Microbiology*, 151, 3453-3453.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., Costerton, J., 2001, Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5608-5613.
- Storch, G.A., 2000, Diagnostic virology, *Clinical infectious diseases*, 31, 739-751.
- Streit, W.R., Schmitz, R.A., 2004, Metagenomics—the key to the uncultured microbes, *Current Opinion in Microbiology*, 7, 492-498.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.-J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Doré, J., 1999, Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4799-4807.
- Sugita, H., Mizuki, H., Itoi, S., 2012, Diversity of siderophore-producing bacteria isolated from the intestinal tracts of fish along the Japanese coast, *Aquaculture Research*, 43, 481-488.
- Sugita, H., Nakamura, H., Shimada, T., 2005, Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish, *Aquaculture*, 243, 403-409.
- Suntharalingam, P., Cvitkovitch, D.G., 2005, Quorum sensing in streptococcal biofilm formation, *Trends in Microbiology*, 13, 3-6.
- Sutherland, I.W., 1999, Biofilm exopolysaccharides, *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Springer, 3642642772.
- Sutherland, I.W., 2001, The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment, *Trends in Microbiology*, 9, 222-227.
- Suttle, C.A., 2007, Marine viruses—major players in the global ecosystem, *Nature Reviews Microbiology*, 5, 801-812.
- Suzer, C., Çoban, D., Kamacı, H.O., Saka, Ş., Fırat, K., 2006, Sinagrit (*Dentex dentex* (L., 1758)) Larva Yetiştiriciliğinde Kullanılan Üretim Teknikleri, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23, 31-35.

- Szewzyk, U., Holmström, C., Wrangstadh, M., Samuelsson, M.-O., Maki, J., Kjelleberg, S., 1991, Relevance of the exopolysaccharide of marine *Pseudomonas* sp. strain S 9 for the attachment of *Ciona intestinalis* larvae, *Marine Ecology Progress Series*, Oldendorf, 75, 259-265.
- Tang, Y., Tao, P., Tan, J., Mu, H., Peng, L., Yang, D., Tong, S., Chen, L., 2014, Identification of Bacterial Community Composition in Freshwater Aquaculture System Farming of *Litopenaeus vannamei* Reveals Distinct Temperature-Driven Patterns, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 13663-13680.
- Taylor, C.D., Wirsén, C.O., Gaill, F., 1999, Rapid microbial production of filamentous sulfur mats at hydrothermal vents, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2253-2255.
- Teitzel, G.M., Parsek, M.R., 2003, Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2313-2320.
- Thien, F.C., De Luca, S., Woods, R.K., Abramson, M.J., 2002, Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma in adults and children, *The Cochrane Library*.
- Thomas, J.G., Nakaishi, L.A., 2006, Managing the complexity of a dynamic biofilm, *The Journal of the American Dental Association*, 137, S10-S15.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S., Molin, S., 2000, Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms, *Journal of Bacteriology*, 182, 6482-6489.
- Turgay, E., Steinum, T., Gul, A., Karatas, S., 2015, An outbreak of scuticociliatosis in cultured common dentex (*Dentex dentex*) in Turkey, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 35, 104-111.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C., Knight, R., Gordon, J.I., 2007, The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world, *Nature*, 449, 804.
- TÜİK. 2015. *Su Ürünleri İstatistikleri* [Online]. Available: http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005 [Ziyaret Tarihi: 01.06.2015 2015].
- United Nations, D.O.E.a.S.A., Population Division, 2015, *World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables*, United Nations, New York,
- Van Der Borden, A.J., Van Der Werf, H., Van Der Mei, H.C., Busscher, H.J., 2004, Electric current-induced detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms from surgical stainless steel, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6871-6874.
- Van Kessel, M., Dutilh, B.E., Neveling, K., Kwint, M.P., Veltman, J.A., Flik, G., Jetten, M.S., Klaren, P.H., Den Camp, H.J.O., 2011, Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio* L.), *AMB Express*, 1, 41.

- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., 2004, Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, *Science*, 304, 66-74.
- Verdonck, L., Grisez, L., Sweetman, E., Minkoff, G., Sorgeloos, P., Ollevier, F., Swings, J., 1997, Vibrios associated with routine productions of *Brachionus plicatilis*, *Aquaculture*, 149, 203-214.
- Vert, M., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., Schué, F., 2012, Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012), *Pure and Applied Chemistry*, 84, 377-410.
- Vincent, P., Pignet, P., Talmont, F., Bozzi, L., Fournet, B., Guezennec, J., Jeanthon, C., Prieur, D., 1994, Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4134-4141.
- Wagner, M., Loy, A., 2002, Bacterial community composition and function in sewage treatment systems, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 218-227.
- Wan, X.-F., Barnett, J.L., Cunningham, F., Chen, S., Yang, G., Nash, S., Long, L.-P., Ford, L., Blackmon, S., Zhang, Y., 2013, Detection of African swine fever virus-like sequences in ponds in the Mississippi Delta through metagenomic sequencing, *Virus Genes*, 46, 441-446.
- Wang, Y., Dai, Y., Zhang, Y., Hu, Y., Yang, B., Chen, S., 2007, Effects of quorum sensing autoinducer degradation gene on virulence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Science in China Series C: Life Sciences*, 50, 385-391.
- Ward, D.M., Ferris, M.J., Nold, S.C., Bateson, M.M., 1998, A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1353-1370.
- Watnick, P.I., Fullner, K.J., Kolter, R., 1999, A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor, *Journal of Bacteriology*, 181, 3606-3609.
- Watnick, P.I., Kolter, R., 1999, Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm, *Molecular Microbiology*, 34, 586-595.
- Weigel, L.M., Donlan, R.M., Shin, D.H., Jensen, B., Clark, N.C., McDougal, L.K., Zhu, W., Musser, K.A., Thompson, J., Kohlerschmidt, D., 2007, High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 231-238.
- Wenzel, R.P., 2007, Health Care–Associated Infections: Major Issues in the Early Years of the 21st Century, *Clinical Infectious Diseases*, 45, S85-S88.
- Westall, F., De Wit, M.J., Dann, J., Van Der Gaast, S., De Ronde, C.E., Gerneke, D., 2001, Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments

- from the Barberton greenstone belt, South Africa, *Precambrian Research*, 106, 93-116.
- White, C., Gadd, G., 2000, Copper accumulation by sulfate-reducing bacterial biofilms, *FEMS Microbiology Letters*, 183, 313-318.
- Whitman, K.A., 2004, *Finfish and shellfish bacteriology manual: techniques and procedures*, Iowa state press, ISBN: 0813819520.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998, Prokaryotes: the unseen majority, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 6578-6583.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990, Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4576-4579.
- Woo, P., Lau, S., Teng, J., Tse, H., Yuen, K.Y., 2008, Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories, *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 908-934.
- Woo, P.T., Leatherland, J.F., Bruno, D.W., 2011, *Fish Diseases and Disorders*, CABI, ISBN: 1845935543.
- Wood, S.R., Firoved, A.M., Ornatowski, W., Mai, T., Deretic, V., Timmins, G.S., 2007, Nitrosative stress inhibits production of the virulence factor alginate in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, *Free Radical Research*, 41, 208-215.
- Wooley, J.C., Godzik, A., Friedberg, I., 2010, A primer on metagenomics, *PLoS Computational Biology*, 6, e1000667.
- Wrangstadh, M., Conway, P.L., Kjelleberg, S., 1986, The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion, *Archives of Microbiology*, 145, 220-227.
- Wrangstadh, M., Szewzyk, U., Ostling, J., Kjelleberg, S., 1990, Starvation-specific formation of a peripheral exopolysaccharide by a marine *Pseudomonas* sp., strain S9, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 2065-2072.
- Xavier, K.B., Bassler, B.L., 2003, LuxS quorum sensing: more than just a numbers game, *Current Opinion in Microbiology*, 6, 191-197.
- Xing, M., Hou, Z., Yuan, J., Liu, Y., Qu, Y., Liu, B., 2013, Taxonomic and functional metagenomic profiling of gastrointestinal tract microbiome of the farmed adult turbot (*Scophthalmus maximus*), *FEMS Microbiology Ecology*, 86, 432-443.
- Xu, B., Liu, L., Huang, X., Ma, H., Zhang, Y., Du, Y., Wang, P., Tang, X., Wang, H., Kang, K., 2011, Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan Province, China: discovery of a new bunyavirus, *PLoS Pathogens*, 7, e1002369.

- Xu, K.D., Mcfeters, G.A., Stewart, P.S., 2000, Biofilm resistance to antimicrobial agents, *Microbiology*, 146, 547-549.
- Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y., Otto, M., Gao, Q., 2006, Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*, *Infection and Immunity*, 74, 488-496.
- Yang, L., Barken, K.B., Skindersoe, M.E., Christensen, A.B., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2007, Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, 153, 1318-1328.
- Yano, T., Kubota, H., Hanai, J., Hitomi, J., Tokuda, H., 2013, Stress tolerance of *Methylobacterium* biofilms in bathrooms, *Microbes and Environments*, 28, 87.
- Yiagnisis, M., Athanassopoulou, F., 2011, *Bacteria isolated from diseased wild and farmed marine fish in Greece*, INTECH Open Access Publisher, ISBN: 953307759X.
- Yooseph, S., Li, W., Sutton, G., 2008, Gene identification and protein classification in microbial metagenomic sequence data via incremental clustering, *BMC Bioinformatics*, 9, 182.
- Yu, J., Kim, D., Lee, T., 2010, Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials, *Water Science & Technology*, 61.1: 163.
- Zarkasi, K.Z., Abell, G.C., Taylor, R.S., Neuman, C., Hatje, E., Tamplin, M.L., Katouli, M., Bowman, J.P., 2014, Pyrosequencing-based characterization of gastrointestinal bacteria of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) within a commercial mariculture system, *Journal of Applied Microbiology*, 117, 18-27.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000, A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *Journal of Computational Biology*, 7, 203-214.
- Zobell, C.E., 1943, The effect of solid surfaces upon bacterial activity, *Journal of Bacteriology*, 46, 39.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Emre TURGAY
Uyruğu	T.C.
E-mail	eturgay@istanbul.edu.tr

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Doktora	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü / Hastalıklar Programı	2015
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü / Hastalıklar Programı	2009
Lisans	İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi	2006
Lise	Üsküdar Fen Lisesi / Bilfen Lisesi	1997