

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI GRAM-NEGATİF BAKTERİYEL BALIK
PATOJENLERİNDE ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİNİN
İNCELENMESİ

Nurdan NURCAN

Danışman: Doç. Dr. Ayşegül KUBİLAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA-2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Bakteriyel Patojenlerde Virülens Faktörleri.....	4
2.2. Hastalık Mekanizmaları.....	4
2.2.1. Adhezyon.....	4
2.2.2. Kolonizasyon.....	5
2.2.3. İstila.....	5
2.2.4. İmmün tepki inhibitörleri.....	5
2.2.5. Toksinler.....	5
2.3. Virülens Faktörleri ve Karakterizasyonu.....	5
2.3.1. Biyofilm.....	6
2.3.2. Pigment.....	9
2.3.3. Ramnolipid.....	9
2.3.4. Elastaz.....	10
2.3.5. Proteaz.....	10
2.3.6. Amilaz.....	10
2.3.7. Hemoliz.....	11
2.4.Gram Negatif Bakterilerde Çevreyi Algılama Sistemi.....	11
2.4.1. Çevreyi algılama sistemini kullanan organizma grupları	15

2.4.1.1. <i>Chromobacterium violaceum</i> (CV026)'da virölens faktörleri ve çevreyi algılama.....	15
2.4.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (NT1)'de virölens faktörleri ve çevreyi algılama.....	16
2.4.1.3. <i>Vibrio anguillarum</i> 'da, virölens faktörleri ve çevreyi algılama.....	17
2.4.1.4. <i>Vibrio alginolyticus</i> 'da, virölens faktörleri ve çevreyi algılama	19
2.4.1.5. <i>Pseudomonas fluorescens</i> 'de, virölens faktörleri ve çevreyi	19
2.4.1.6. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'da, virölens faktörleri ve çevreyi.....	19
2.4.1.7. <i>Yersinia ruckeri</i> 'de virölens faktörleri ve çevreyi algılama.....	20
2.4.1.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1)'da çevreyi algılama sistemi ve virölens faktörleri.....	20
2.5. Çevreyi Algılama Sisteminin Moleküler Mekanizması.....	21
2.6.Çevreyi Algılama Mekanizmasının Düzenlediği Fenotipler.....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Bakteriyel suşlar.....	26
3.1.1.1. <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> suşlarının üretim ve depolanması.....	26
3.1.1.2. <i>C. violaceum</i> CV026, <i>A. tumefaciens</i> NT1 ve <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşlarının üretim ve depolanması.....	28
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	28
3.1.3. Besiyerleri ve çözeltiler.....	28
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. AHL moleküllerinin tespiti.....	30
3.2.1.1. <i>C. violaceum</i> CV026 İndikatör Suşu Kullanılarak <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> 'de AHL sinyal moleküllerinin üretiminin araştırılması.....	30
3.2.1.2. <i>A. tumefaciens</i> NT1 İndikatör Suşu Kullanılarak <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> 'de AHL sinyal moleküllerinin üretiminin araştırılması.....	31
3.2.1.3. AHL moleküllerinin tespiti için çapraz doğrulama testi.....	31
3.2.2. Biyofilm testi.....	31

3.2.3. Pigment testi.....	32
2.3.4. Ramnolipid üretimi testi.....	32
2.3.5. Elastaz testi.....	33
3.2.6. Proteaz testi.....	33
3.2.7. Amilaz testi.....	34
3.2.8. Hemoliz testi.....	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	36
4.1. İndikatör Suşlar (<i>C. violaceum</i> CV026 ve <i>A. tumefaciens</i> NT1), Pozitif Kontrol Suşu <i>P. aeruginosa</i> PAO1, Gram Negatif Balık Patojenleri <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> 'nin Koloni Yapıları.....	36
4.2. İndikatör Suşlar Aracılığıyla <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> 'de <i>N</i> -acyl Homoserine Lakton (AHL) Sinyal Moleküllerinin Tespiti.....	40
4.3. BHL ve OddHL Sinyal Molekülüne Bağımlı Virülens Faktörlerinin Üretimi...42	
4.3.1. <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> ve <i>P. fluorescens</i> 'de biyofilm testi ve bulgular.....	42
4.3.2. <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> 'de pigment testi ve bulgular.....	44
4.3.3. <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> 'de ramnolipid üretim testi ve bulgular.....	49
4.3.4. <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> 'de elastaz testi ve bulgular.....	52
4.3.5. <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> 'de proteaz testi, zon çapları ve bulguları.....	53
4.3.6. <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> 'de amilaz testi ve bulgular.....	55
4.3.7. <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> 'de hemoliz testi, zon çapları ve bulguları.....	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	61
6. KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	76

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI GRAM-NEGATİF BAKTERİYEL BALIK PATOJENLERİNDE ÇEVREYİ ALGILAMA SİSTEMİNİN İNCELENMESİ

Nurdan NURCAN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Araştırmada bakteriyel balık patojenlerinden *Vibrio anguillarum* (5 suş), *Vibrio alginolyticus* (3 suş), *Pseudomonas fluorescens* (3 suş), *Aeromonas hydrophila* (2 suş) ve *Yersinia ruckeri* (12 suş) izolatları kullanılmıştır. İzolatlarda öncelikle *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (BHL) ve *N*-(3-okzododekanoyl)-L-homoserin lakton (OdDHL) sinyal moleküllerinin üretimi, *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 indikatör suşları kullanılarak test edilmiştir. *C. violaceum* CV026 suşu kullanılarak yapılan testlerde *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşlarının BHL sinyal molekülünü ürettiğinin tespit edilirken *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* ve *P. fluorescens* suşlarının ise üretmediği tespit edilmiştir. BHL sinyal molekülünü üretmeyen suşlar ve üreten suşların tamamının *A. tumefaciens* NT1 suşu kullanılarak yapılan testte ise OdDHL sinyal molekülünü üretebildiklerini göstermiştir. Araştırmanın sonucunda çalışılan tüm Gram negatif bakteriyel balık patojenlerinin OdDHL sinyal molekülünü üretebildikleri tespit edilmiştir. Üretmiş oldukları sinyal molekülleri aracılığıyla birbirleri ile iletişim kurmakta ve istedikleri çoğunluğa ulaştıkları anda balık için kritik gen ekspresyonlarını tetiklemektedir. Gram negatif bakteriyel balık patojenleri BHL ve OdDHL sinyal moleküllerinin tespitiyle bu moleküllere bağımlı olan biyofilm, pigment, ramnolipid, elastaz, proteaz, amilaz, hemoliz üretimi gibi çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen virülens faktörlerinin varlığı bakımından fenotipik olarak test edilmiştir.

Çalışılan Gram negatif balık patojenlerinin birbirleriyle aynı ya da farklı olarak araştırılan virülens faktörlerini üretebildikleri tespit edilmiştir. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens* suşlarının tamamının biyofilm ve pigment ürettikleri belirlenmiştir. Pigment için yapılan ikinci test olan tirozin saydamlaştırmada ise sadece *P. fluorescens*'in bir suşunda belirlenmiştir. *P. fluorescens*, *A. hydrophila* suşlarının ramnolipid ürettikleri belirlenmiştir. PAO1 kontrol suşuna göre daha az elastaz aktivitesine sahip olan suşlar *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* suşlarıdır. PAO1 kontrol suşuna göre daha yüksek elastaz aktivitesine sahip olan *V. alginolyticus* suşlarıdır. *V. anguillarum*, *A. hydrophila* suşları ve *P. fluorescens* suşlarından ikisinin proteaz aktivitesi pozitifken *Y. ruckeri* ve *V. alginolyticus* suşlarında negatiftir. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* suşlarının amilaz testi pozitifken *Y. ruckeri* suşları negatiftir.

V. anguillarum, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* suşlarının hemoliz testi pozitif olarak *Y. ruckeri* ve *V. alginolyticus* suşları negatif olarak tespit edilmiştir.

Bu klinik Gram negatif bakteriyel balık patojen izolatları çevreyi algılama sistemiyle organize olmakta, aynı anda etki göstermekte ve virülens faktörleriyle balıklarda çeşitli şekillerde enfeksiyonlara sebep olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çevreyi algılama sistemi, biyofilm, pigment, *N*-acyl homoserin lakton, bakteriyel balık patojenleri

2010, 76 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF QUORUM SENSING SYSTEM IN SOME GRAM-NEGATIVE FISH PATHOGENIC BACTERIA

Nurdan NURCAN

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Some Gram Negative fish pathogen bacteria in *Vibrio anguillarum* (5 strains), *Vibrio alginolyticus* (3 strains), *Pseudomonas fluorescens* (3 strains), *Aeromonas hydrophila* (2 strains) and *Yersinia ruckeri* (12 strains) isolates were used in this investigation. Before all else these isolates were tested for the production of *N*-butanoyl-L-homoserine lacton (BHL) and *N*-(3-okzododekanoyl)- L-homoserine lacton (OdDHL) signal molecules using indicator strains the *Chromobacterium violaceum* strain CV026 and the *Agrobacterium tumefaciens* strain NT1. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* and *P. fluorescens* strains had no BHL activity while *A. hydrophila* and *Y. ruckeri* strains had BHL activity by using bioassay strain *C. violaceum* CV026. Strains produce had no BHL activity and strains produce had BHL activity all *A. tumefaciens* NT1 strain showed using tested the produce of OdDHL signal molecules. All working in Gram Negative fish pathogen bacteria identified the produce of OdDHL signal molecules was investigated. The signal molecules of the produce via communication with each other and majority of desirable access at the same time when triggers critical gene expression for fish. Gram Negative fish pathogen bacteria identified of BHL and OdDHL signal molecules this molecules dependent which the produce of biofilm, pigment, rhamnolipid, elastase, protease, amilase and hemolysis as phenotype tested as virulence factors entity controlled of quorum sensing system.

Working in Gram negative fish pathogen bacteria with each other identified alike or different virulence factors can produce has been invested. Biofilm and pigment product determined of all *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens* strains. Only one strain of *P. fluorescens* identified if doing secondary test which make sth transparent of thyrosine tested for pigment. *P. fluorescens*, *A. hydrophila* strains identified rhamnolipid product. According *P. aeruginosa* PAO1 control strain *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* strains had less elastase activity. According *P. aeruginosa* PAO1 control strain *V. alginolyticus* strains had higher elastase activity. *V. anguillarum*, *A. hydrophila* strains and two of *P. fluorescens* strains are protease activity positive while *Y. ruckeri* ve *V. alginolyticus* strains were activity negative. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* strains were amilase activity positive while *Y. ruckeri* strains were activity negative. *V. anguillarum*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* strains

were hemolysis activity positive while *Y. ruckeri* and *V. alginolyticus* strains were hemolysis activity negative.

This clinic Gram negative fish pathogen bacteria isolate to have one's ducks in a row with quorum sensing system and adduced alike at the same time show effect and with virulence factors at fish induced cause different shape of infections.

Key Words: Quorum sensing system, biofilm, pigment, *N*-acyl homoserine lactones, fish pathogens bacteria

2010, 76 pages

TEŞEKKÜR

Öngörüsüne, yerinde tespitlerine, tecrübelerine ve değerli görüşlerine her zaman saygı duyduğum, bakterilerde çevreyi algılama sistemi kavramı ile tanışmama sebep olan ve bu çalışmamda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, Sayın tez danışmanım Doç. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımda Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin tüm imkânlarını kullanmam konusunda desteklerini esirgemeyen, gerekli tespitleriyle, değerli bilgileriyle yönlendirmeleri yapan, tecrübeleriyle destek olan Sayın Müdürümüz Doç. Dr. Gülgün TINAZ'a ve bilgilerini esirgemeyen Sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Seyhan ULUSOY'a ve yardımlarıyla destek olan laboratuvar personeline teşekkür ederim.

Karşılaştığım problemlerin çözümünde tecrübeleriyle ve değerli bilgileriyle destek olan Sayın hocam Prof. Dr. Öznur DİLER'e, Sayın Arş. Gör. Seçil EKİCİ'ye ve öğrenimimde katkısı bulunan diğer tüm hocalarıma teşekkür ederim.

1973-YL-09 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında ve hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Nurdan NURCAN
ISPARTA, 2010

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyofilm gelişiminin beş aşaması. <i>P. aeruginosa</i> 'da biyofilm gelişiminin fotomikrografi ile şekilde eşli numaralarla gelişmenin her bir aşamasının görüntülenerek bütün fotomikrografilerde bu büyümenin eşit olarak derecelendiğinin gösterilmesi.....	7
Şekil 2.2. Biyofilmin 3 boyutlu görünümü (Çizim: Bryan Christie).....	8
Şekil 2.3. <i>N</i> -acyl homoserine lakton (AHL) molekülü, Gram negatif bakterilerde tipik çevreyi algılama molekülü.....	12
Şekil 2.4. <i>E. coli</i> populasyonundaki her bir bakteri diğer bakterilerle birlikte hareket edebilme ve moleküler saat gibi davranarak oluşturdıkları mekanizma.....	15
Şekil 2.5. <i>V. anguillarum</i> çevreyi algılama sistemlerinin modeli. Yalnızca türler arasında farklılığı belirlemek için yüksek hücre populasyon yoğunluğunda model gösterilmesi.....	18
Şekil 2.6. Bilinen üç çevreyi algılama kimyasal reaksiyon sinyallerinin şematik gösterimi. A, Gram negatif; B. Gram pozitif; C. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde.....	22
Şekil 2.7. Bazı çevreyi algılama ligandlarının (mesaj molekülü) kimyasal yapıları. A-E, <i>N</i> -acyl-homoserin lakton, R türe özgü olan alifatik zincir. F, AIP otoindüksiyon. G, AI-2. Standart tek harf kısaltmalarıyla onların aminoasitlerinin ifadesi.....	23
Şekil 4.1. <i>Choromacterium violaceum</i> 12472 orijinal suş (sol tarafta) ve mutant suş <i>Choromacterium violaceum</i> CV026 (sağ tarafta).....	36
Şekil 4.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1.....	37
Şekil 4.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	37
Şekil 4.4. <i>Vibrio anguillarum</i>	38
Şekil 4.5. <i>Vibrio alginolyticus</i>	38
Şekil 4.6. <i>Aeromonas hydrophila</i>	39
Şekil 4.7. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	39
Şekil 4.8. <i>Yersinia ruckeri</i>	40
Şekil 4.9. <i>C. violaceum</i> CV026 indikatör suşu kullanılarak <i>A. hydrophila</i> , <i>Y. ruckeri</i> ve pozitif kontrol <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunda BHL sinyal moleküllerinin üretimi.....	41

Şekil 4.10. <i>A. tumefaciens</i> NT1 indikatör suşu kullanılarak <i>P. fluorescens</i> , <i>Y. ruckeri</i> ve pozitif kontrol <i>P. aeruginosa</i> PAO1 suşunda OdDHL sinyal moleküllerinin üretimi.....	41
Şekil 4.11. <i>A. tumefaciens</i> NT1 indikatör suşu kullanılarak <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> ve <i>A. hydrophila</i> 'da, OdDHL sinyal moleküllerinin üretimi.....	42
Şekil 4.12. Kristal viole ile boyanmış pleytlerde biyofilm oluşumu.....	43
Şekil 4.13. Kristal viole ile boyandıktan sonra pleytlere etanol ve saf su ilave edilen pleytlerde biyofilm oluşumunun görünümü.....	43
Şekil 4.14. LBB (- kontrol) ve <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (+ kontrol), <i>V. anguillarum</i> (A4, A6, ATCC, Mersu, İstanbul Levrek), <i>V. alginolyticus</i> (V5, ATCC, V6), <i>P. fluorescens</i> (NCIMB 1953, Ç1, F1) suşlarında biyofilm üretiminin grafik gösterimi.....	44
Şekil 4.15. <i>C. violaceum</i> 12472 (+ kontrol), LBB (- kontrol), <i>V. anguillarum</i> A4, A6, ATCC, Mersu, İstanbul levrek suşlarında tirozinli ve tirozinsiz LBB ortamında pigment üretiminin gösterimi.....	45
Şekil 4.16. <i>C. violaceum</i> 12472 (+ kontrol), LBB (- kontrol), <i>V. alginolyticus</i> (V5, ATCC, V6), <i>P. fluorescens</i> (NCIMB 1953, Ç1,F1) suşlarında tirozinli ve tirozinsiz LBB ortamında pigment üretiminin gösterimi.....	45
Şekil 4.17. <i>P. fluorescens</i> F1 suşunda tirozin saydamlaştırma testinde pozitif sonuç.....	47
Şekil 4.18. Pozitif kontrol <i>P. aeruginosa</i> (PAO1) suşunda tirozin saydamlaştırma testinde pozitif sonuç.....	47
Şekil 4.19. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>P. aeruginosa</i> (PAO1) suşunun M9- glutamat minimal medium agar üzerindeki sarı renk ve zon oluşumuyla ramnolipid üretimi ve negatif kontrol steril LBB.....	49
Şekil 4.20. <i>P. fluorescens</i> F1 ve <i>A. hydrophila</i> ATCC 700183 suşlarında M9- glutamat minimal medium agar üzerindeki sarı renkli zon oluşumuyla ramnolipid üretimi	50
Şekil 4.21. <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (+kontrol), <i>V. anguillarum</i> (Mersu), <i>V. alginolyticus</i> (V6) <i>P. fluorescens</i> (NCIMB 1953, Ç1, F1), <i>A. hydrophila</i> (ATCC 700183), <i>Y. ruckeri</i> (18/1) suşlarında elastaz üretiminin grafik gösterimi.....	52
Şekil 4. 22. <i>V. anguillarum</i> Mersu suşunda proteaz zonu.....	54
Şekil 4. 23. <i>P. fluorescens</i> (Ç1 ve NCIMB 1953) suşlarında lugol solüsyonu damlatılmadan önce amilaz aktivitesi.....	56
Şekil 4. 24. Lugol solüsyonu damlatılmış <i>A. hydrophila</i> (ATCC 700183 ve İ1) suşlarında net amilaz zonu oluşumu.....	56

Şekil 4.25. <i>A. hydrophila</i> 'da, çizgi ekiminde hemoliz zonu.....	58
Şekil 4.26. <i>A. hydrophila</i> (İ1 ve ATCC 700183) suşlarında, well difüzyon testinde hemoliz zonu.....	59
Şekil 4.27. <i>V. anguillarum</i> (A6) suşunda, well difüzyon testinde hemoliz.....	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mikrobiyolojik monitör sistemleriyle (<i>A. tumefaciens</i> NT1 [pZLR4] ya da <i>C. violaceum</i> CV026) bakteriyel balık patojenlerinde AHL'lerin belirlenmesi.....	13
Çizelge 2.2. Çevreyi algılama sistemine bağımlı AHL'nin kontrolündeki bazı fenotipler.....	24
Çizelge 3.1. Araştırma sırasında kullanılan suşlar.....	27
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler.....	29
Çizelge 4.1. <i>C. violaceum</i> 12472 (+ kontrol), LBB (- kontrol), <i>V. alginolyticus</i> (V5, ATCC, V6), <i>P. fluorescens</i> (NCIMB 1953, Ç1,F1) suşlarının tirozinli LBB ortamında pigment artışı.....	46
Çizelge 4.2. Pigment tespiti için agarda tirozin saydamlaştırma sonuçları.....	48
Çizelge 4.3. Ramnolipid üretimi için test sonuçları.....	51
Çizelge 4.4. Elastaz üretimi için test sonuçları.....	53
Çizelge 4.5. Proteaz aktivitesi için well diffusion agar testi sonuçları.....	54
Çizelge 4.6. Amilaz aktivitesi için test sonuçları.....	57
Çizelge 4.7. Hemoliz aktivitesi için well diffusion agar testi sonuçları.....	60

SİMGELER DİZİNİ

AHL	<i>N</i> -butanoyl-L-homoserin lakton
C4-HSL	<i>N</i> -butanoyl-L-homoserin lakton
CTAB	Cetyltrimetylammonium bromide
ECR	Elasin Kongo Red
HHL	<i>N</i> -hekzanoyl-L-homoserin lakton
HPLCs	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS	Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi
LBA	Luria Bertani Agar
LBB	Luria Bertani Broth
mg	Miligram
Mm	Milimolar
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
OdDHL	<i>N</i> -(3-okzododekanoyl)-L-homoserin lakton
QS	Quorum Sensing
Tris	Tris (hidroksimetil) amino metan
X-gal	5-Bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid
3-oxo-C12-HSL	<i>N</i> -(3-okzododekanoyl)-L-homoserin lakton

1.GİRİŞ

"Bakteriyel direnç ve direncin geliştiği zeminler, insanlık için ortak tehdittir..." (Baskın, 2005).

Yirmi birinci yüzyılın başında, dünya çapında antibiyotiklere dirençli, hatta çoklu dirençli, patojenik bakterilerde bir artış ile karşılaşmaktayız. Bu nedenle, "infeksiyon hastalıkları" hala dünyada en önde gelen ölüm nedenlerinden biridir (Baskın, 2005).

Bakterilerin birbirleri ile iletişim kurduklarının gösterilmesi, mikroorganizmaların oluşturduğu dünya hakkındaki düşüncelerimizi değiştirmiştir. Bu iletişimde kullanılan dil, mikroorganizmaların çevreye saldıkları sinyal moleküllerinden oluşmaktadır. Bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, böylece çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmektedir. Son zamanlarda kullanılmaya başlanan çevreyi algılama "Quorum Sensing" (QS) terimi de bu özellikten hareketle "Quorum: salt çoğunluk" ve "sense: hissetme" kelimelerinden oluşturulmuştur (Saraçlı, 2006).

Çevreyi algılama sinyalleri sayesinde bir odakta toplanan mikroorganizmalar biyofilmin temelini oluşturur. Doğal ortamda mikroorganizmalar çevresel uyarılara bağlı olarak planktonik veya bir yüzeye tutunmuş durağan fazda bulunur. Durağan faza geçiş genellikle besin kaynaklarındaki bir yetersizliğe bağlı olarak gelişir ve hücreler kendilerini biyofilm içinde korumaya alır (Altun ve Şener, 2008).

Çevreyi algılama sisteminin bakteriye getirdiği pek çok avantaj vardır. Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek, besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir. Aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir. En önemlisi, infeksiyon sırasında virülens faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün yanıtı kaçabilir. Çevreyi algılama sistemi içinde en önemli rolü sinyal molekülleri üstlenir. Bu moleküllere aynı zamanda "autoinducer" da denilmektedir. Bakterilerdeki sinyal molekülleri Gram negatif bakterilerde acyl homoserine lakton (AHL), Gram pozitif bakterilerde küçük peptidler, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde "autoinducer-2" dir (Altun ve Şener, 2008).

Çevreyi algılamaya ilişkin ilk gözlemler 1970'li yıllarda *Vibrio harveyi* ve *Vibrio fischeri* isimli iki deniz bakterisinde yapılmıştır. Bu iki bakteri türünün bazı balık ve mürekkep balıklarının ışık üreten (biyoluminesan) organlarında yüksek yoğunlukta bulunduklarında lüsiferaz enzim sentezi aracılığıyla ışık ürettikleri gözlenmiştir. Bu

bakteriler deniz suyunda 10^2 bakteri/ml yoğunluğunda saptanırken, balıkların ışık organlarında 10^{10} - 10^{11} /ml yoğunlukta bulunmaktadır ve ancak yüksek yoğunlukta bulunduklarında ışık yaymaktadırlar. Adı geçen bakteriler etraflarındaki bakteri yoğunluğunu ortamdaki besin maddelerinin azalmasını saptayarak değil, aksine ortamdaki bir molekülün yüksek yoğunlukta bulunması aracılığıyla fark etmektedirler. Her *Vibrio* kendine özgü *N*-acyl homoserin lakton (AHL) molekülünü sentezlemekte, bu molekül de tür yoğunluğuna işaret eden bir indikatör rolü oynamaktadır (Akova, 2005).

Çevreyi algılama sistemi ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunu insan ve bitki patojeni bakterilerin virülens mekanizmaları oluşturmaktadır. Bununla birlikte bakteriyel balık patojenlerinde çevreyi algılama sistemi *A. hydrophila* (Swift et al., 1997), *Vibrio vulnificus* (Valiente et al., 2009), *V. harveyi* (Henke and Bassler, 2004) ve *V. anguillarum*'da (Defoirdt et al., 2005) çalışılmıştır. Bruhn et al. (2005)'de yaptıkları çalışmada *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*, *V. salmonicida* ve *V. vulnificus*'da çevreyi algılama sisteminde sinyal moleküllerini araştırmışlardır. Bu moleküller ilk olarak, ışık üretimini çevreyi algılama sistemi kullanarak düzenleyen deniz bakterisi olan *V. fischeri*'de tanımlanmıştır (Nealson et al., 1970).

Bakteriler konağı enfekte etmek ve hastalık oluşturmak için, patojeniteye katkıda bulunan bir seri virülens faktörü üretirler (Bruhn et al., 2005). Virülens bir dizi Gram negatif bakteride çevreyi algılama sisteminin kontrolü altındadır (Jones et al., 1993). Birçok farklı Gram pozitif ve Gram negatif patojenin, virülens faktörlerinin üretimini koordine etmek için küçük, difüze olabilen *N*-acyl homoserin laktone (AHL) türevi sinyal molekülleri üretmek suretiyle birbiriyle haberleştikleri bilinmektedir. Çevreyi algılama sistemi birçok bitki ve hayvan patojeni tarafından virülensi düzenlemek için kullanıldığı için bu sinyal sistemini bozmaya yönelik geliştirilen stratejilerin muhtemelen birçok potansiyel uygulama alanı olacaktır. Günümüzde biyoteknolojik çalışmalar, AHL antagonistlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Tıpta bu tip moleküllerin kullanımı, hücreler arası haberleşmenin bloke edilerek virülensin azaltması ve dolayısıyla infeksiyonların kontrolüne fırsat verecek yeni bir tedavi yaklaşımı olarak düşünülmektedir. Günümüzde, Gram negatif bakterilerde çevreyi algılama sistemini bloke ettiği bilinen tek bileşik, kırmızı bir deniz algi olan *Delisea pulchura*'dan (Givskov et al., 1996) izole edilen halojenlenmiş furanonlardır (Bruhn

et al., 2005; Göze 2009). Bu bileşikler bakteriyel hastalıkların kontrolü için yeni tedavi yöntemi olarak önerilmektedir. Son yapılan çalışmalarda furanon C30 *V. anguillarum* ile deneysel olarak infekte edilen alabalık yetiştiricilik suyuna ilave edildiğinde kontrol grubuna göre mortalitede belirgin bir azalmanın olduğu belirtilmektedir. Furanon C30 kullanılan konsantrasyonunun *V. anguillarum*'un büyümesi üzerine etkisi olmadığını belirtmişlerdir (Rasch et al. 2004; Bruhn et al., 2005).

Balık patojenlerinde çevreyi algılama sistemi sinyal moleküllerinin üretimiyle başlar. AHL molekülleri *Aeromonas salmonicidae* ve *A. hydrophila*'nın birkaç suşunda tespit edilmiştir. Aynı zamanda *V. harveyi*'nin AHL moleküllerini üretebildiği gösterilmiştir (Cao and Meighen, 1989). *V. vulnificus*, *V. splendidus* ve *V. salmonicidae* balık patojenlerinden steril filtrelerden geçirilmiş süpernatantlarda *V. harveyi* ve *V. fischeri*'de biyoluminesense sebep olur. *Enterobacteriaceae*, kapsayan balık patojenlerinin çoğunda AHL molekülü üretildiği görülmüştür (Bruhn et al., 2005).

Bu çalışmada, Gram negatif bakteriyel balık patojenlerinden *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'de çevreyi algılama sisteminin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda; *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* balık patojenlerinde *N*-acyl homoserine lakton AHL sinyal moleküllerinin tespiti ve çevreyi algılama sisteminin etkisi altında olan virülens faktörlerinden biofilm, pigment, ramnolipid, elastaz, proteaz, amilaz ve hemoliz üretimi incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Bakteriyel Patojenlerde Virülens Faktörleri

Virülans, bir mikrobun patojenliği, yani onun hastalığa neden olma yeteneğidir. Patojenlik terimi mutlak anlamda hastalığa neden olma yeteneği için kullanılırken virülans ise bir patojenin ne derecede hatalık yapabileceğinin göstergesi olarak kullanılmaktadır (Wikipedia, 2010).

Virülant bakteriler; bakterilerin hastalığa yol açma yeteneğini belirleyen faktörler, infeksiyon yapan bakteri sayısı, vücuda giriş yolu, konak organizmanın savunma mekanizmalarının etkisi ve virülans denen, bakterinin kendine has özelliklerdir (Wikipedia, 2010).

Virülans, bir mikroorganizma grubu veya türü içerisinde hastalık oluşturma yeteneğinin (patojenitenin) derecesini tanımlamaktadır. Genel olarak iki özelliği kapsamaktadır: Mikroorganizmanın hastalık başlatabilme yeteneği (infektivite) ve ortaya çıkan hastalığın şiddeti (derecesi). Bu özellikler göz önüne alındığında patojen bir tür içerisinde az, orta ve çok virulan suşlar bulunabilmektedir. Virülans kantitatif olarak değerlendirilebilir. Örneğin, deney hayvanlarının yarısını öldürmek için gerekli mikroorganizma sayısı letal doz (LD)₅₀; deney hayvanlarının yarısında infeksiyon oluşturmak için gerekli mikroorganizma sayısı ise infeksiyöz doz (ID)₅₀ olarak adlandırılır. Bu değerler mikroorganizmalar arasında önemli ölçüde değişkenlik gösterir. Bu değişkenliğin temel nedeni mikroorganizmanın içerdiği virülans faktörleridir (Gülay, 2010).

2.2. Hastalık Mekanizmaları

Patojen organizmalar çeşitli mekanizmalarla infeksiyonlara yol açabilirler.

2.2.1. Adhezyon

Kolonizasyon için mikroorganizmanın öncelikle mukozaya tutunması ve mukus, siliyer hareket, sıvı akımı ile sürüklenmeye direnebilecek ölçüde sıkı olarak bağlanması gereklidir. Bu sıkı tutunma (adezyon) süreci, adezin olarak adlandırılan bakteri yüzey yapılarının konak hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanmasını içermektedir (Salysers and Whitt, 1994; Gülay, 2010).

2.2.2. Kolonizasyon

Bazı virülant bakteriler özel proteinler salgılayarak konağın vücudunun belli bölgelerini işgal edebilirler. Örneğin yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır (Altun ve Şener, 2008).

2.2.3. İstila

Bazı virülen bakteriler konak hücre zarını bozar veya bakterinin konak hücre içine endositoz ile alınmasına neden olur. Bu virülans faktörleri bakterinin konak hücrelerin içine girmesini sağlar, böylece vücudun yüzeyindeki epitel doku yoluyla bakterinin vücudun içine girmesi mümkün olur (Wikipedia, 2010).

2.2.4. İmmün tepki inhibitörleri

Çoğu bakteri, konak organizmanın bağışıklık sisteminin işleyişini bozan virülans faktörleri üretir. Örneğin, yaygın bir bakteriyel strateji, konak organizmanın antikorlarına bağlanan proteinler salgılamaktır. *Streptococcus pneumoniae*'in polisakkarit kapsülü, bakterinin konak immün hücreleri tarafından fagositoz olmasını engeller (Wikipedia, 2010). Biyofilm oluşturan bakterilere karşı makrofaj fagositik aktivitesinin veya yapılan opsonik antikorların yetersiz olduğu gösterilmiştir (Meluleni et.al., 1995; Sakarya, 2005).

2.2.5. Toksinler

Çoğu virülans faktörü, konak hücreleri zehirleyip doku zararına neden olan proteinlerdir. Örneğin, insan gıdalarına bulaşan bakteriler tarafından salgılanan çeşitli gıda zehirlenmesi toksinleri vardır. Bunların bazıları bozulmuş gıdaları pişirildikten sonra imha olmazlar ve gıdanın yenmesiyle hastalığa yol açarlar (Wikipedia, 2010).

2.3. Virülens Faktörleri ve Karakterizasyonu

Mukozal yüzeylerin kolonizasyonu, penetrasyonu ve infeksiyon gelişimi için mikroorganizmaların bu aşamaları kolaylaştıran bazı özelliklere sahip olması

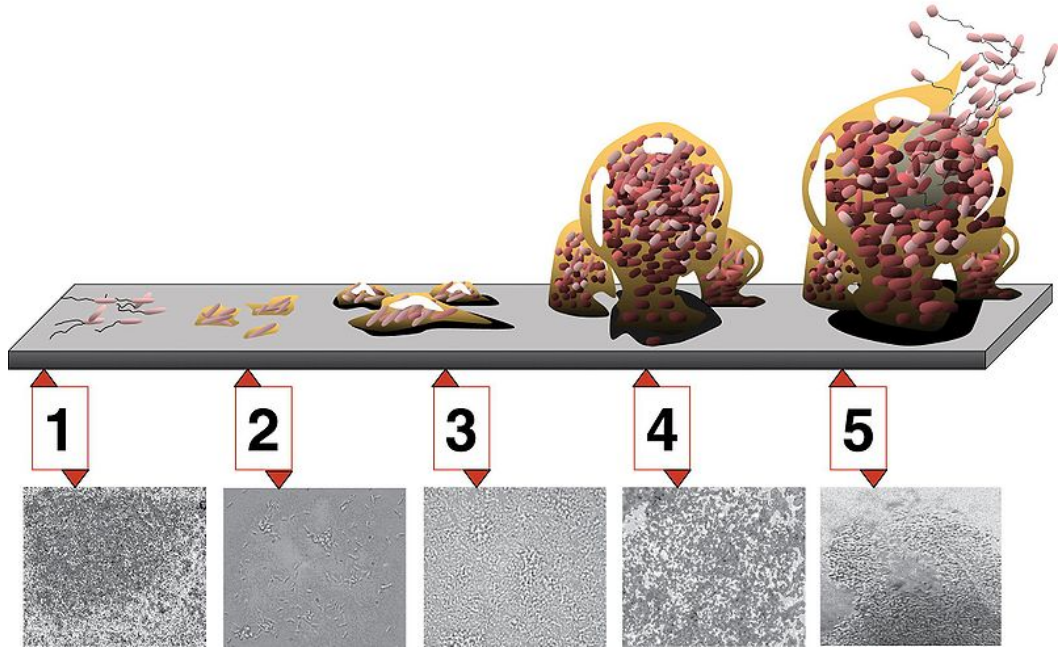
gereklidir. Patojen mikroorganizmaların hastalık yapabilmelerini kolaylaştıran bu özelliklerine virölans faktörleri adı verilmektedir. Tüm patojen mikroorganizmalar infeksiyon sürecinin çeşitli basamaklarında etkili virölans özellikleri taşımalarına rağmen, bunlar en iyi bakterilerde karakterize edilmiştir (Gülay, 2010).

2.3.1. Biyofilm

Fosil kayıtlarından edinilen bilgiler prokaryotların 3 milyar yıldan daha uzun bir süreden beri biyofilmler içerisinde yaşadıklarını ortaya çıkarmıştır (Çiftçi, 2005).

Mikroorganizmalar bir süre öncesine kadar, hızlı çoğalan ve tek başlarına hareket ederek serbestçe dolaşan canlılar olarak görülmekteydi. Araştırmacılar bu yüzden bu güne kadar, planktonik olarak da adlandırılan ve diğer bakterilerden bağımsız olarak, tek başlarına dolaşan mikrobiyal hücrelerin davranışlarını incelemiş ve araştırmalarını bu yönde geliştirmişlerdir. Bununla beraber, bakterilerin planktonik formdan çok, bir yüzeye tutunarak ve biyofilm adı verilen bir yapı oluşturarak hayatlarını devam ettirdiğine dair kanıtların ortaya konduğu birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Çiftçi, 2005). Bu duruma örnek olarak *Pseudomonas aeruginosa*'da biyofilm gelişimi Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.

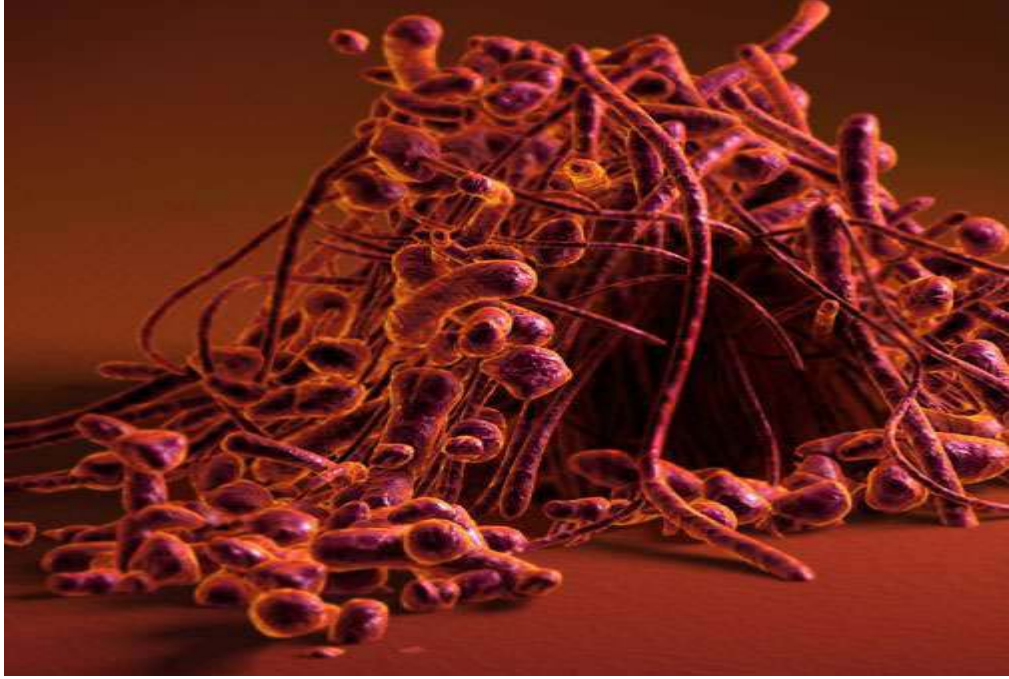
Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur. Bakteriler ekstraselüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarid, nükleik asit ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (Çiftçi, 2005).



Şekil 2.1. Biyofilm gelişiminin beş aşaması. *P. aeruginosa*'da biyofilm gelişiminin fotomikrografi ile şekilde eşli numaralarla gelişmenin her bir aşamasının görüntülenerek bütün fotomikrografilerde bu büyümenin eşit olarak derecelendiğinin gösterilmesi (Wikipedia, 2010)

Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan 'su kanallarına' sahip, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler. Tam hidrate ve canlı biyofilm volümlerinin %15 hücre, % 85 matriks materyali tarafından oluşturulduğu ve hücrelerin matrikslerinin çevrelediği farklı yüksekliklerdeki 'kuleler' veya 'mantarlar' içerisinde bulundukları anlaşılmıştır (Çiftçi, 2005).

Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaridler biyofilmin ana ekstraselüler komponentini oluşturur (Şekil 2.2). İçerisinde yaşayan organizmaya bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler taşıyabilir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik biofilmler oluşturduğu ve Gram pozitif bakterilerin katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir (Çiftçi, 2005).



Şekil 2.2. Biyofilmin 3 boyutlu görünümü (Çizim: Bryan Christie) (Çiftçi, 2005)

Donlan ve Costerton biyofilm tanımını biraz daha geliştirmiş ve biyofilmleri aşağıdaki özelliklere sahip mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamışlardır:

- 1) Hücreler düzensiz olarak bir substrata, ara yüze veya birbirlerine tutunmuşlardır.
- 2) Hücreler kendi ürettikleri ekstarsellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülüdürler.
- 3) Büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıklar vardır (Çiftçi, 2005).

Biyofilm içerisinde büyüyen bakteriler, planktonik olarak büyüyenlere göre antibiyotiklere çok daha fazla dirençlidir. Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) seviyesi eski biyofilm içerisindeki bakterilerde yeni oluşmuş biyofilm içerisindeki bakterilere göre 100-1000 oranında daha fazladır (Hoiby, 2002).

Biyofilmlerin ayırt edici bir özelliği, hücrelerin etrafını çevreleyen ve tamamen kaplayan hücre dışı polimerik maddelerin (çoğunlukla polisakkaritler) varlığıdır. Taramalı elektron mikroskopuyla görüntülenen bu polisakkaritler, yüzey üzerinde amorf materyal yaprakları halinde ya da hücreleri yüzeye ya da birbirlerine bağlayan ince lifler halinde bulunur. Biyofilm hacminin büyük kısmı hücrelerden değil, bu

hücre dışı polimerik maddeden oluşur. Bu durum, rutenyum kırmızısı ile boyama yöntemiyle ve transmisyon elektron mikroskopuyla doğrulanmıştır (Donlan, 2002). Biyofilm oluşumu bakteriyel patojenitede ve ısrarcı infeksiyonlarda önemli rol oynar (Costerton et al., 1999; Middleton et al., 2002; Singh et al., 2002).

2.3.2. Pigment

Pigment, tüm nesnelerin renklerini oluşturan moleküllerdir. Pigment moleküllerinin harekete geçmesi için belirli bir enerji gereklidir. Renklerin oluşmasındaki diğer tüm aşamalarda olduğu gibi, pigmentlerle ışık arasında da ilişki vardır. Zira dünyaya ulaşan güneş ışığı, canlılarda renk molekülü olarak bilinen söz konusu pigment molekülleri için önemli rol oynar (Wikipedia, 2010).

Bir çok patojen bakteride biyofilm gibi etkili bir virülensin infeksiyon kapasitesi kadar proteaz ve pigment üretiminde konak üzerinde infeksiyon etkisi vardır (Croxatto et al., 2002).

Tirozin, fosfopenolpiruvat'tan sentezlenen hidroksifenilpiruvat'ın aminlenmiş bir derivasyondur. Aromatik bir aminoasittir. Bilhassa *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* ve eugonic *Mycobacteria*'lar bu aminoasitten melanin oluşturabilir. Siyah koloni oluşumu yanında, koloni çevresinde ve altında (agar içerisinde) saydamlaşma görülmesi beklenir (Aydın, 2004). Örneğin; *hpdA* *V. anguillarum*'u pigment üretimini açısından hem tetiklemekte hem de pigmenti meydana getirmektedir (Croxatto et al., 2002).

2.3.3. Ramnolipid

Hemolitik etkisi olan hemolizindir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosürfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sürfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosiliyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (Salyers and Whitt, 1994; Karatuna ve Yağcı, 2008).

2.3.4. Elastaz

Elastin akciğerlerin genişleyip, daralmasına olanak sağlayan bir proteindir ve akciğerlerde bulunan proteinin yaklaşık %30'u elastindir. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur. Enzimler sinerjistik etki göstererek elastini parçalar. LasA bir serin metalloproteinazdır ve *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarında bulunan pentaglisinpeptidoglikan köprülerini yıkar. LasA proteaz, elastini yıkamaz ancak LasB elastazın elastolitik aktivitesini artırır. LasB 33 kDa ağırlığında bir çinko metalloproteinazdır, LasA proteazın yıprattığı elastini parçalar. LasB elastazın proteolitik gücü oldukça fazladır (*P. aeruginosa* alkali proteazının yaklaşık 10 katı). Hücre dışına tip 2 salgı sistemi ile salgılanan elastaz enfeksiyonun başlangıç fazında akciğerde hasara yol açarak, kompleman bileşenlerini ve serum α 1-proteinaz inhibitörünü parçalayarak patogeneizde önemli rol oynar (Salyers and Whitt, 1994; Karatuna ve Yağcı, 2008).

2.3.5. Proteaz

Proteinlerin parçalanmasından sorumlu enzim grubudur. Hücrede protein sentezi ve yıkımı hücresel bileşenlerin ihtiyaç duyduğu homeostasisi sağlar. Proteazlar veya peptidazlar peptid bağlarının yıkımını katalizler. Katalitik mekanizmalarına göre 5 ana sınıfa ayrılırlar; serin, treonin, sistein, aspartat ve metallo proteazlar. Proteolitik reaksiyonlar basit veya karmaşık biyolojik proseslerdir ve iyi şekilde düzenlenmeleri gerekir (Wikipedia, 2010).

2.3.6. Amilaz

Nişasta soğuk suda çözünmeyen granüller formunda olup, organizmalar için depo materyali olarak bitki hücrelerinde depolanan önemli bir karbonhidrattır. Mısır, patates, pirinç ve buğday gibi birçok hububatın ana bileşenidir (Polaina and MacCabe, 2007; Demirkan 2009).

Nişasta; α -, β -amilaz, isoamilaz ve pullulanaz gibi enzimlerle glikoz, maltoz ve oligosakkaritlere hidrolize edilmektedir. Nişastayı hidrolize eden amilazlar endüstriyel açıdan en önemli enzimlerdendir. Bakteriler, funguslar ve mayaları kapsayan birçok organizma nişastayı parçalayan enzimler üretmektedir (Hamilton et al., 1999; Yamamoto et al., 2000; Gawande and Patkar, 2001; Demirkan 2009).

2.3.7. Hemoliz

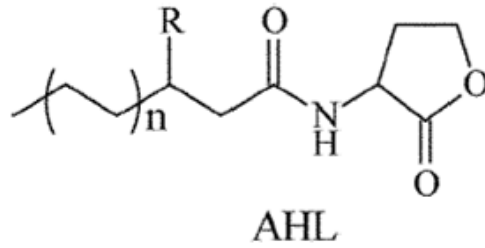
Bazı bakteriler sahip oldukları çeşitli tipteki hemolizin enzimleri ile kandaki hemoglobini farklı derecelerde hemoliz etme yani parçalama yeteneğine sahiptirler. Bakterilerin hemoliz yeteneği kanlı agar besiyeri kullanılarak test edilebilmektedir. Hemoliz testi, daha çok streptokok ve stafilokokları kendi içlerinde ayırmak için kullanılmaktadır. Streptokoklar Kanlı Agar besiyerinde α -, β - ve γ -hemolitik reaksiyon verirler. α -hemolitik streptokokların kanlı agar besiyerinde oluşturdukları kolonilerin etrafında, kenarları keskin hatlı olmayan, bulanık ve yeşilimsi bir zon oluşur. β -hemolitik streptokoklar, aynı besiyerinde tam hemoliz yaparak, kolonilerin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu oluşturur. γ -hemolitik streptokoklar ise hemolizin enzimine sahip olmayan, kanlı agar besiyerinde hemoliz oluşturmayan streptokoklardır (Mikrobiyoloji, 2010). Ekzoenzim serin proteaz, ekzotoksin α -hemolizin ve hücre dışı protein olan siderefor gibi virülens faktörleri yüksek bakteri yoğunluğuna bağlı olarak çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki genlerin ekspresyonu ile ortaya çıkar (Jangid et al., 2007).

2.4. Gram Negatif Bakterilerde Çevreyi Algılama Sistemi

Erwin F. Smith, 1905, Çok sayıdaki bakterinin bir kaç bakteriden güçlü olduğunu, ancak bu bir kaç bakterinin de birlik olarak engelleri aşabildiğini söylemiştir (Baskın, 2005). İşte bu sözlerden yıllar sonra, yapılan çalışmalar ile tek hücreli bakterilerin birbirileri ile iletişim kurabildiği ve değişen bir ortama yanıt verebildikleri gösterilmiştir (Baskın, 2005).

Bakterilerin izole varlıklar olarak yaşamadıkları, değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası haberleşme sistemleri kullanan topluluklar halinde bulundukları giderek artan bir yaygınlıkla kabul edilmektedir. Bu tip hücreler arası haberleşmenin iyi karakterize edilmiş bir örneği, çevreyi algılamadır. Çevreyi algılama, bir bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izlemesine olanak veren autoinducer veya feromon olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin üretimine bağımlıdır. Değişik bakteri türlerinde, çeşitli fizyolojik işlemler, çevreyi algılama ile regüle edilir. Bu işlemlere örnek olarak, biyoluminesens, antibiyotik biyosentezi, biyofilm oluşumu, konjugasyon ve hayvan, bitki ve balık patojenleri tarafından oluşturulan virülens etkenlerinin üretimi

verilebilir (Hardman et al., 1998; Boşgelmez-Tınaz, 2003). Gram negatif bakterilerin çoğunda virülens çevreyi algılama olarak isimlendirilen çevreyi algılama sisteminin kontrolü altındadır (Bruhn et al., 2005). Gram negatif bakterilerde en yaygın olarak bulunan sinyal molekülleri *N*-acyl homoserin lakton türevleridir (acyl HSLs) (Boşgelmez-Tınaz, 2003). Mikrobiyolojik monitör sistemleriyle (*A. tumefaciens* NT1 [pZLR4] ya da *C. violaceum* CV026) bakteriyel balık patojenlerinin iletişimde kullandıkları AHL'lerin belirlenmesi Çizelge 2.1.'de verilmiştir. Gram negatif bakterilerde bakteriyel iletişimde kullanılan tipik çevreyi algılama molekülü acyl HSLs Şekil 2.3.'de verilmiştir.



Şekil 2.3. *N*-acyl homoserin lakton (AHL) molekülü, Gram negatif bakterilerde tipik çevreyi algılama molekülü (OpenWetWare, 2010)

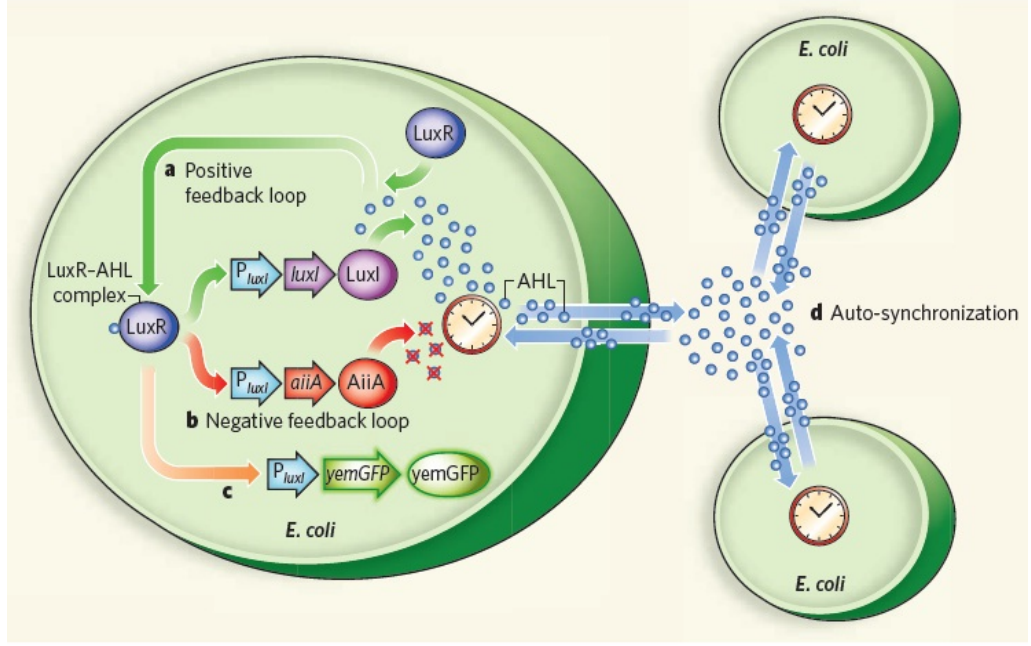
Çizelge 2.1. Mikrobiyolojik monitör sistemleriyle (*A. tumefaciens* NT1 [pZLR4] ya da *C. violaceum* CV026) bakteriyel balık patojenlerinde AHL'lerin belirlenmesi (Bruhn et al., 2005)

Balık patojeni	Suş	AHL-indüksiyon zon (mm)	
		NT1(PZLR4)	CV026
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	25	<15
	92-9-210	19	16
	96-3-35	30	20
	90-8-184	19	16
	NCIMB 1102	<15	<15
<i>Aeromonas salmonicida</i>	02-9-1	18	35
	02-9-37	18	35
	93-8-294	19	35
	94-6-87	19	35
	219	16	50
	234	—	<15
	ssp. <i>smithia</i> NCIMB 13210	—	—
	ssp. <i>masoucida</i> ATCC 27013	—	—
<i>Aeromonas salmonicida</i>	ssp. <i>pectinolytica</i> DSM 12609	31	50
	spp. <i>achromogenes</i> ATCC 19261	—	—
	NCIMB 1110	15	32
	209	—	—
	204	—	—
	183	—	—
	93	—	—
	51	—	—
	NCIMB 1947	—	—
	950106-1/1	—	—
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	900406-1/3	—	—
	030514-1/A1A	—	—
	030522-1/2	—	—
	F288/95	—	—
<i>Moritella viscosa</i>	F195/94	—	—
	F288/95	—	—
	NB10 (pos. control)	20	—
<i>Vibrio anguillarum</i>	DM27 (neg. control)	—	—
	ATCC 33539	—	—
	940801-1/1	—	—
<i>Photobacterium damsela</i>	950810-3/5	—	—
	94-11-229	—	—
	96-2-25/1	—	—
	NCIMB 2262	40	25
	VS81	36	15
<i>Vibrio salmonicida</i>	VS201	40	20
	VS224	38	16
	VS288	41	25
	VS289	45	25
	VS297	38	18
	VS399	42	24
	DMC-1	16	—
	LMS-1	—	—
<i>Vibrio splendidus</i>	LTS-3	—	—
	LTH-3	—	—
	DTC-5	20	—
	DTY-1	—	—
	NCIMB 1	—	—
	NCIMB 2251	—	—
	NCIMB 2136	<15	—
	ATCC 27562	<15	—
<i>Vibrio vulnificus</i>	94-8-108	<15	—
	98-2-32	<15	—
	NCIMB 1316	>60	<15
	88-6-32	>60	20
	88-6-44	>60	24
<i>Yersinia ruckeri</i>	89-4-77	>60	19
	89-5-11	>60	24

Gram negatif bakterilerde çevreyi algılama sisteminin temel işleyişinde; vibriolarda tanımlanan sistemde de olduğu gibi *luxI* ve *luxR* adı verilen iki temel gen söz konusudur. *LuxI*'nin kodladığı enzim bir otoindükleyici AHL sentezler. Sentezlenen AHL *Vibrio* hücresinin içine ve dışına diffüze olarak *luxR* geni tarafından sentezlenen LuxR proteinine bağlanır. Otoindükleyici ile bağlanan LuxR proteini bir yandan ışık üretimini sağlayan genlerin, öte yandan da daha fazla AHL sentezlenmesini sağlayacak LuxI proteini üretimini sağlayan genlerin eksprese olmasına neden olur. Bu iki parçalı gen sistemi temel olarak diğer bakteri türlerinde de farklı isim ve moleküllerle benzer şekilde çalışır (Donabedian, 2003; Akova, 2005).

Bu mekanizmanın temel mantığı, bir bakteri hücresinde her hangi bir metabolik değişimin ancak o tür bakteriler ortamda yeterli yoğunlukta olduklarında bakteriye yarar sağlaması esasına dayanmaktadır. Örneğin *Streptococcus pneumoniae* diğer pnömokoklardan DNA alımını ancak belli bakteri yoğunluklarında sağlayabilmekte, bu sayede örneğin penisiline direnç genlerini elde edebilmektedir. Dolayısıyla bakteri hücresi belli bir işlem için enerjisini, ancak bu işlemde elde edeceği sonuç kendine bir avantaj sağlayacaksa harcamaktadır (Donabedian, 2003; Akova, 2005).

Bakteriyel iletişimin bir diğer örneği; *Escherichia coli* popülasyonundaki her bir bakteri diğer bakterilerle tıpkı meslektaş gibi aynı anda çalışma prensibine göre hızlı bir şekilde çaprazlama olarak birlikte hareket edebilmekte ve ayarlanmış moleküler saat gibi davranarak proteinleri ve genlerinden bir network (şebeke, ağ) kurgulamaktadır (Fussenegger, 2010). *E. coli* popülasyonundaki haberleşme Şekil 2.4.'de verilmiştir.



Şekil 2.4. *E. coli* populasyonundaki her bir bakteri diğer bakterilerle birlikte hareket edebilme ve moleküler saat gibi davranarak oluşturdukları mekanizma (Fussenegger, 2010)

2.4.1. Çevreyi algılama sistemini kullanan organizma grupları

2.4.1.1. *Chromobacterium violaceum* (CV026)'da virülens faktörleri ve çevreyi algılama

C. violaceum bir Gram negatif bakteridir ve çoğunlukla toprakta ve suda bulunur ve mor pigment violacein özelliğini üretir. Daha önce yazarlar bir violacein-negatif, pigment üretiminin süpernatant ile inkübasyon ile iade edilebildiği *C. violaceum* (CV026)'nın mini-Tn5 mutant'ı olarak tanımlamışlardır. Bu mutantı AHL için genel bir biyosensör geliştirmek için, doğal *C. violaceum* AHL molekülü öncelikle kimyasal olarak karakterize edilir. Solvent ekstraksiyonunu kullanarak, HPLC ve kütle spektrometri, bir tek AHL, *N*-hexanoyl-L-homoserin lakton (HHL) doğal suş *C. violaceum* kültür süpernatantları içinde tanımlanmış, bunlarda CV026'de bulunmamaktadır. Violacein üretimi AHL tespiti için basit bir analiz oluştursa da, CV026'nın bir sentetik AHL serisine ve *N*-acyl homocysteine thiolakton (AHT) analogları cevap verebilme kabiliyeti olduğunu keşfetmişlerdir. CV026'da violacein bütün AHL ve AHT bileşikleri tarafından C₄ ve C₈'nin *N*-acyl yan zincirleri uzunluk olarak duyarlılık bakımından çeşitlilik göstererek değerlendirilir. C₁₀'den C₁₄'e

N-acyl yan zincirleri AHL bileşikleri violacein üretimi yapamamasına rağmen, eğer aktive edici AHL (e.g.HHL) agar içinde birleştirilmemiş ise, bu uzun zincirli AHL'ler, violacein üretimini inhibe etme kabiliyetleri ile tespit edilmektedir. Kültür ve ince tabakalı kromotografi ile ayrılmış süpernatantlarında çıkartılan AHL karışımlarının tespitinin kolaylaştırılması ispatlanmıştır. CV026 AHL sinyal moleküllerinin geniş bir spektrumunu tespit etme kabiliyetini artırmaktadır (McClean et al., 1997). *C. violaceum*'da HHL, kısmi olarak antibiyotik üretimini, virülens faktörlerini, kitinolitik aktiviteyi ve mor pigment üretimini bu sinyal moleküllerine dayanan çevreyi algılama mekanizmasını kullanarak düzenler. Yine bu bakterinin sinyal molekülü üretemeyen mutanlığı, diğer bakterilerin acyl homoserin lakton molekülü üretimlerini test etmek için kullanılmaktadır (Sharma et al., 2003).

2.4.1.2. *Agrobacterium tumefaciens* (NT1)'de virülens faktörleri ve çevreyi algılama

A. tumefaciens, onkojenik DNA'nın kendi çekirdeğine transferi tarafından taç tümörüne neden olan ve bitkilerde görülen bir patojendir. *A. tumefaciens* tarafından kullanılan tümörler opinler salgılamaktadır. *A. tumefaciens*'in asıl virülensi büyük bir plazmid olan Ti plazmididir. Nutrient kaynağı veya kimyasal sinyal olarak *A. tumefaciens*, Ti plasmidi'nin tümör içinde *Agrobacterium* hücrelerinden Ti plasmidi'ni olmayana konjugal transferini salgılar. Oktopine-tipi Ti plasmidlerinin transferi, oktopine tarafından, agrokinopine tarafından nopaline-tipi Ti plasmidleri transferi olurken salgılanmaktadır. Opine-salgılamanın esası, konjugasyon için gerekli olup *A. tumefaciens* içinde uygun opine'nin katabolizmasının salgılanmasıdır (Farrand, 1998; Zhu et al., 2000; Whitehead et al., 2001).

Plazmit, 195 protein kodlayan 196 gene sahiptir. Ti plazmid yapısal RNA bulundurmaz ve 206,479 nükleotid uzunluktadır. GC içeriği %56'dır genetik ve materyalin %81'i gen kodlar, pseudogen bulundurmaz (Wikipedia, 2010).

Ti plazmid üzerinde bulunan tra genleri LuxI ve LuxR homologu olan TraI ve TraR proteinleri ve sinyal molekülü olan *N*-3(okzokitonol)-L-homoserin lakton aracılığıyla aktive edilirler (Boşgelmez-Tınaz, 2003).

2.4.1.3. *Vibrio anguillarum*'da, virölens faktörleri ve çevreyi algılama

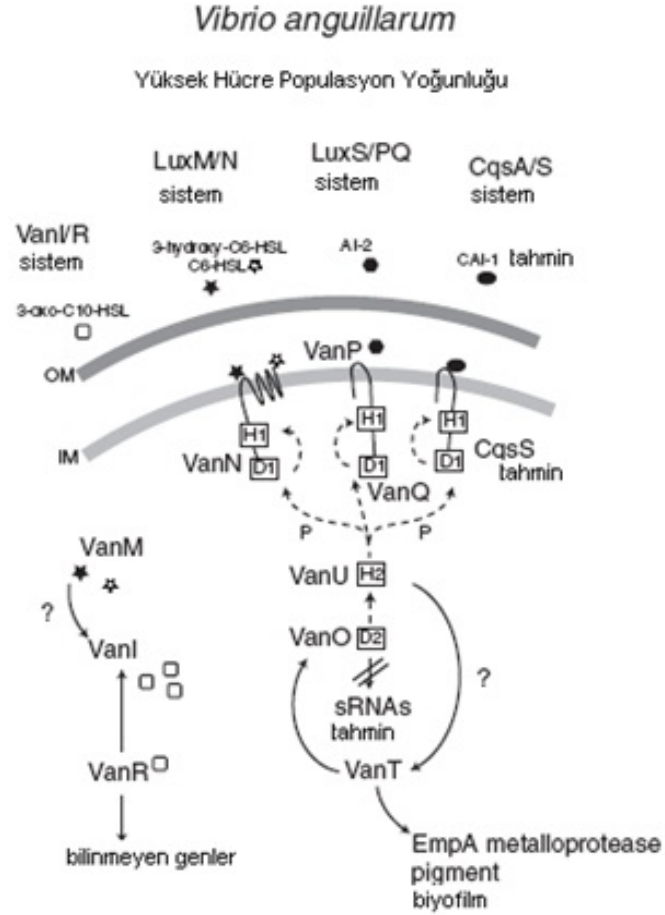
V. anguillarum, virölens faktörleri ve çeşitli toksinler üreterek balığın savunma mekanizmasını etkilemektedir. *V. anguillarum*'un ürettiği toksinler hemolizin, proteaz, metalloproteaz, sitotoksin, dermatoksin, hemagglutinin, amilaz, kazeinaz, jelatinaz, elastaz, lipaz, lösin arilamidaz, valin arilamidaz, tripsin ve ekstrasellüler gibi toksinlerdir. Virölens faktörleri ise hareketi sağlayan flagella, hücre tutunmasını sağlayan faktörler, yüzey antijeni, pJM1 plazmidi, siderofor ve demiri tutan hücre zarı reseptörüdür (Austin and Austin, 1999; Rodkhuma et al., 2005; Ekici, 2010).

V. anguillarum hibrit sistemini kullanarak virölens faktörlerinden biri olan proteaz aktivitesini oluşturmaktadır (Henke and Bassler, 2004).

V. anguillarum; çevreyi algılama sistemi sinyal moleküllerinden 3-Okzo-C10-HSL molekülünü salgılayarak regülatör proteinleri VanI/VanR sayesinde fenotipik etkilerini gösterir (Ulusoy, 2007). Çevreyi algılama incelemelerinde türler arasındaki farklılığı belirlemek için yüksek hücre popülasyon yoğunluğunda çevreyi algılama sistemleri model çalışmaları da yapılmıştır (Şekil 2.5.).

Çoğu patojenik bakteri için virölens faktörlerinden proteazlar ve pigmentlerin üretimi biyofilm oluşturma kapasitesiyle eşdeğerdir. Sonuç olarak vanT, *V. anguillarum* infeksiyonlarının patogenezi için esaslı birşey olmadığı şaşırtıcıdır. *V. anguillarum* virölansına katkıda bulunan birçok faktör bilinmektedir. İyi karakterize edilen siderofor bazlı demir boşaltım sisteminin plasmid pJM1 üzerinde taşınması *in vivo* ve dolayısıyla virölensda büyümeye katkıda bulunması için önemlidir. Lipopolisakkaridler serum direncine katkıda bulunurken, hareketlilikte balık içine girebilmek için önemlidir. Ayrıca, genetik olarak ispatlanmamış olmasına rağmen, hemolizin, lipaz, proteaz ve bir nörotoksik asetilkolinesteraz gibi dış hücre ürünleri, vibriosis patolojisinde büyük bir rol oynadığı söylenmiştir.

VanT mutasyonunun *V. anguillarum* virölansını neden azaltmadığı henüz açık olmamasına rağmen, vanT'nin sadece metalloproteaz, pigment üretimi ve biyofilm oluşumu için gerekli olabileceği belirlenmiştir (Croxatto et al., 2001).



Şekil 2.5. *V. anguillarum* çevreyi algılama sistemlerinin modeli. Yalnızca türler arasında farklılığı belirlemek için yüksek hücre populasyon yoğunluğunda model gösterilmesi (Milton, 2006)

2.4.1.4. *Vibrio alginolyticus*'da, virölens faktörleri ve çevreyi algılama

LuxS; çevreyi algılama sisteminde proteaz üretimi ve EPS, biyofilm tabakası, flegella/motilite (hareket) gibi fenotipikle ilişkisi olan birçok düzenleme kadar *V. alginolyticus* 'un virölensinde de önemli bir rol oynamaktadır (Ye et al., 2008).

2.4.1.5. *Pseudomonas fluorescens*'de, virölens faktörleri ve çevreyi algılama

P. fluorescens'in LuxI ya da LuxM gruplarından her ikisine de ait olmayıp AHL sentaz (HdtS) üçüncü potansiyeli bakteriyel iletişimde kullandığı görülmüştür (Laue et al., 2000).

E. coli'de belirtilen ve HdtS yönetimiyle *P. fluorescens* trafında sentezlenen AHLs [*N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserin lakton (3-hydroxy-C14:1HSL), *N*-decanoylhomoserin lakton (C10-HSL) ve *N*-hexanoylhomoserin lakton (C6-HSL)] molekülleriyle aynıdır. *P. fluorescens* kontrolü çevreyi algılama sisteminde olan 3-Oxo-C10-HSL sinyal molekülünün dışarı bırakılmasından sonra Mupirosini fenotipik etki olarak gösterir (Williams, 2007).

2.4.1.6. *Aeromonas hydrophila*'da, virölens faktörleri ve çevreyi algılama

Aeromonas spp. Gram negatif çubuk şeklinde *Vibrionaceae* ailesine mensup olan, memeliler ve balıkların önemli ve fırsatçı patojenlerinden birisidir ve a-hemolizin (Ljungh et al., 1981), glisero-fosfolipid-kolesterol acyltransferaz (MacIntyre and Buckley 1978), lipaz (Anguita et al., 1993) ve serine proteaz (Whitby et al., 1992) içeren bir dizi virölens mekanizmalarına sahiptir. Bu dış ürünlerin bir çoğunun ifadesi, yüksek hücre yoğunlukları geç eksponansiyel/durağan faz (Ljungh et al., 1981; Whitby et al., 1992; Anguita et al., 1993) ile ilişkili ve onlar sonuç olarak çevreyi algılama ile kontrol için varsayılan fenotipik özellikleri temsil etmektedirler (Swift et al., 1997). Swift et al., (1997), yaptıkları çalışmada AHL (*N*-butanoyl-L-homoserin lakton [BHL])'nin *A. hydrophila*'da bir cognate LuxRI homolog AhyRI ve *A. salmonicida*'da ise cognate LuxRI homolog AsaRI'nin varlığını bildirmektedirler. Ayrıca, *A. hydrophila* ve *A. salmonicida*'da serine proteaza bağlı düzenlemelerinin çevreyi algılama için bir kanıt olduğunu rapor etmişlerdir (Swift et al., 1997).

Aeromonas'ların değişik virölans faktörleri ve toksijenik mekanizmaları vardır. Bunlar arasında, enterotoksinler, hemolizinler, hemaglutininler, endotoksinler, yüzey adezinleri (fimbria) ve çeşitli proteazlar sayılabilir (Baylan ve Yılmaz, 2004).

A. hydrophila'da *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (C4-HSL) çevreyi algılama sinyalinin sentezi için gerekli proteinden sorumlu olan *ahyI* geni kodlar. *A. hydrophila*'daki *ahyI* geni inaktive edilerek C4-HSL moleküllerinin oluşması engellenebilir. *A. hydrophila* ekzoproteaz aktivitelerinden serine proteaz ve metalloproteaz aktivitelerinin her ikisini de oluşturabildiğı gibi hem moleküldeki azot kökü taşıyan kazeini parçalama hem de jelatini eritme kabiliyetine sahiptir (Swift et al., 1999).

2.4.1.7. *Yersinia ruckeri*'de virölens faktörleri ve çevreyi algılama

Beyaz mutant *C. violaceum* CV0blu ile karşılıklı çapraz olarak *Y. ruckeri*'nin çevreyi algılama sistemine sahip olduğı saptanmıştır. Çevreyi algılama; Gram negatif patojenlerin virölens kontrolünü hücreler arasındaki gen ekspresyon aracılığıyla oluşturmasıdır. *Y. ruckeri*'nin çevreyi algılama sistemi pUC18 plazmit taşıyıcısı olarak kurgulanan gen kütüphanesinden klonlanmış ve *yruR/yruI* olarak adlandırılmıştır (Temprano et al., 2001).

2.4.1.8. *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1)'da çevreyi algılama sistemi ve virölens faktörleri

İnsanlarda infeksiyon oluşturan *P. aeruginosa*, virölensinin ortaya çıkmasında rolü olan, çok çeşitli hücre dışı ürün sentezler. Bu virölens faktörlerinin üretilmesi, hücre yoğunluğuna bağılı olarak düzenlenir. Bu gen mekanizması, *P. aeruginosa*'nın konağın savunma mekanizması ile baş etmesini sağlar. Ayrıca konakta infeksiyon oluşturabilecek gerekli hücre yoğunluğuna ulaşınca kadar bağışıklık sistemi tarafından mikroorganizmanın fark edilmemesini sağlar. Diğeri birçok Gram negatif bakteri gibi *P. aeruginosa*'da, AHL sinyal moleküllerine dayanan, kendi popülasyon yoğunluklarını algılamalarını sağlayan ve çevreyi algılama sistemi olarak adlandırılan mekanizmayı kullanırlar (Kleerebezem et al., 1997; Van Delden and Iglewski, 1998; Williams et al., 2000; Ulusoy,2007).

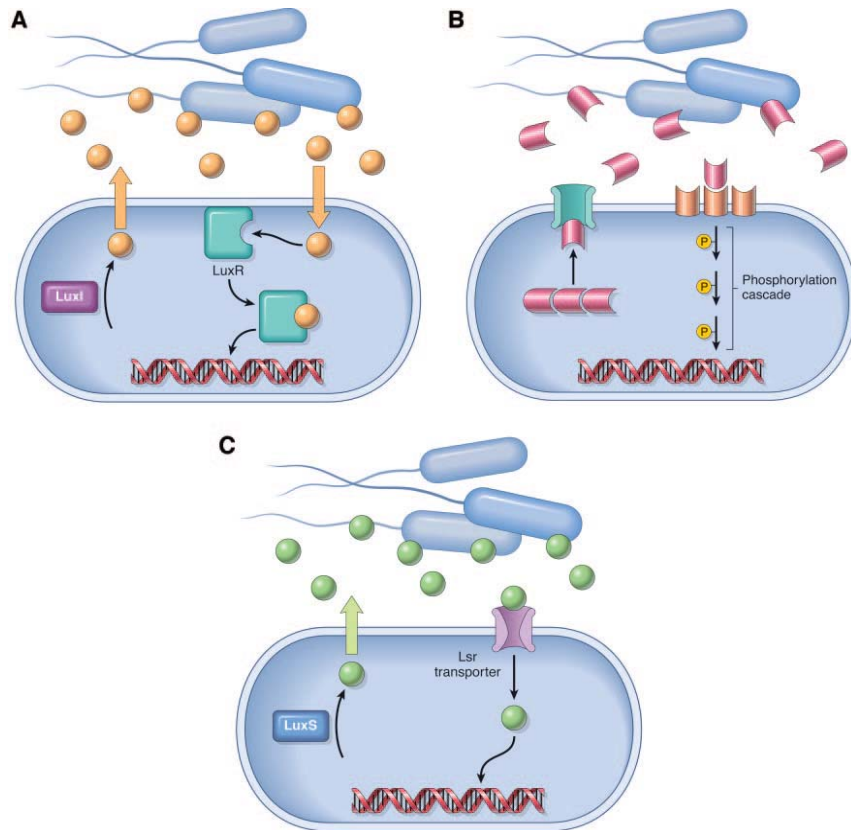
Bu iletişim sisteminin temeli iki protein molekülüne bağlıdır. Bunlardan birisi LuxI ailesine mensup AHL sentez ve diğeri de LuxR ailesine ait AHL reseptör proteindir. Hücre yoğunluğundaki artışa paralel olarak AHL sinyal moleküllerinde de artış gözlemlenir. Hücre yoğunluğunun artmasıyla AHL sinyal molekülleri sayıca artar ve sınır değere ulaştığı zaman AHL LuxR-tip reseptör proteine bağlanarak hedef genlerin uyarılmasını veya baskılanmasını sağlar. *P. aeruginosa*'da transkripsiyonal aktivatörü LasR ve AHL moleküllerinin sentezini sağlayan LasI, ayrıca *N*-(3-okzododekanoyl)-L-homoserin lakton (OdDHL) molekülünün sentezini kontrol eden las sistemi ve RhlR ve RhlI'den oluşan ve *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (BHL) molekülünün sentezini kontrol eden *rhl* olmak üzere iki adet çevreyi algılama sistemi mevcuttur. İki sistem birbirinden bağımsız değildir ve *las* sistemi *rhlR* ve *rhlI*'nin ekspresyonunu pozitif olarak düzenler. *las* sistemi, elastaz A, elastaz B ve alkalın proteaz gibi virülens faktörlerinin ekspresyonunu kontrol eder (Passador et al., 1993). *rhl* sistemi, ramnolipid ve piyosiyanın biyosentez enzimlerinin ekspresyonunu kontrol eder (Brint and Ohman, 1995; Pessi and Haas, 2000; Ulusoy, 2007). *las* ve *rhl* sistemleri birlikte iki yüzden fazla genin ekspresyonunda etkilidirler (Whiteley et al., 1999).

2.5. Çevreyi Algılama Sisteminin Moleküler Mekanizması

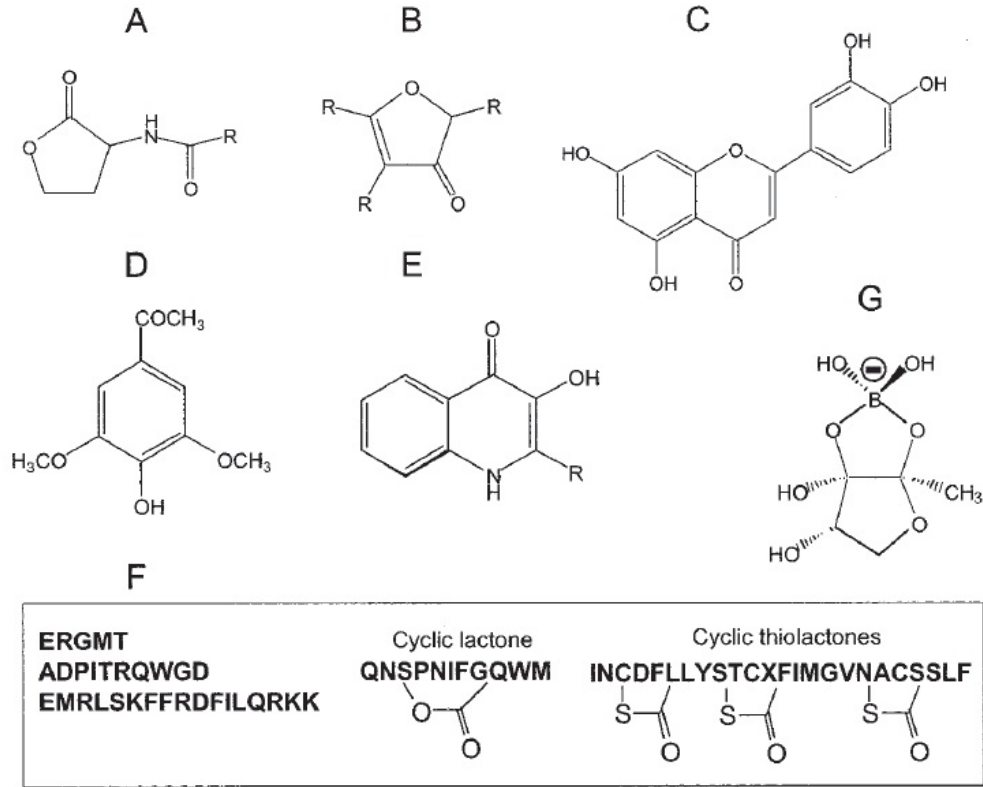
Salgılanan moleküler ve kullanılan algılama düzeneğine göre üç tip quorum-sensing mekanizması vardır: Gram negatif bakterilerde LuxI homologları denilen bazı enzimler türe özgü AHL moleküllerini katalizler. Bu AHL'lar LuxR tipi transkripsiyonel düzenleyiciler tarafından algılanır. Gram pozitif bakterilerde ise sinyal iletimi için oligopeptitlere bağlı olarak iki bileşenli fosforlama zinciri kullanılır (Örneğin *Bacillus subtilis*'de iyi araştırılmıştır). Üçüncü ve son mekanizma "Hibrit sistem"dir. *V. harveyi* modelide denir. Burada hem oligopeptidleri görürüz hemde LuxI/LuxR tipi proteinler hücre içinde sinyal yolunda görev alır. İki tip sinyal üretilir: LuxLM tarafından AI-1 ve LuxS tarafından; AI-2 sinyal molekülleri. AI-1 molekülü tür içi sinyalleşmeyi sağlarken; AI-2 (LuxS) türler arası sinyalleşme de görev alır. Türler arası sinyalleşmeye "cross-talk" da denir

(Sequences, 2008). Bakterilerin çevreyi algılama sisteminde kullandıkları ligandlarının (mesaj molekülü) kimyasal yapıları Şekil 2.7.'de gösterilmiştir.

Gram negatif basillerde otoindüksiyon (örneğin, homoserin laktonlar) ilgili LuxI kimyasal reaksiyon ürünleri aracılığıyla sentezlenir, salınır ve sonra bakteri ve bağlarla reseptöre doğru başka bir hücreye hücresel elementle (LuxR) cevap verir. Gram pozitif basillerde AIP'dir. Ayrıca bağa doğru bakteri dış yüzeye yayılır ardışık olarak fosforilasyon etkinleştirir, transkripsiyonal değişim başlatılır ve amino asitler ya da kısa peptidler dışarıya bırakılır. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin her ikisinde de taşıyıcı LuxS/Lsr'dir. Otoindüksiyon (örneğin, furanonlar) sentezlenir (örneğin, LuxS ile ilgili kimyasal reaksiyon ürünleri aracılığıyla) salınır ve bakteri ayrıca (örneğin, Lsr taşıyıcısı aracılığıyla) yeniden kaydeder ve genlerin düzenlenmesini yapar (Şekil 2.6.) (Raffa et al., 2005).



Şekil 2.6. Bilinen üç çevreyi algılama kimyasal reaksiyon sinyallerinin şematik gösterimi. A, Gram negatif; B, Gram pozitif; C, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde (Raffa et al., 2005)



Şekil 2.7. Bazı çevreyi algılama ligandlarının (mesaj molekülü) kimyasal yapıları. A-E, N-acyl-homoserin lakton, R türe özgü olan alifatik zincir. F, AIP otoindüksiyon. G, AI-2. Standart tek harf kısaltmalarıyla onların aminoasitlerinin ifadesi (Raffa et al., 2005)

2.6. Çevreyi Algılama Mekanizmasının Düzenlediği Fenotipler

Vibrio, *Agrobacterium*, *Erwinia* ve *Yersinia* gibi birçok bakteri türü gibi *Pseudomonaslar* da, çevreyi algılama adı verilen mekanizmayla ortamda kendi yoğunluklarını algılayabilirler. Bu sistemde bakterilerin ürettiği düşük molekül ağırlıklı moleküller, hücre dışı ortamda birikirler. Bu moleküllerin miktarı eşik değere ulaştığı zaman popülasyonun cevabı uyarılır (Ulusoy, 2007). Bu cevaplar sporulasyon, toplu kaçış, konjugasyon, hücre bölünmesi, antibiyotik üretimi, biyoluminesans, lag fazından çıkma, biyofilm oluşumu, nodül sayısını sınırlama, virülans faktörlerinin salgılanması, ekstrasellüler proteaz üretimi, eksoenzimlerin üretimi gibi fenotipikler türe özgü davranışlardır (Sequences, 2008). AHL'nin kontrolündeki bakteri türüne özgü bazı fenotipler Çizelge 2.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. QS sistemine bağımlı AHL'nin kontrolündeki bazı fenotipler (Williams, 2007)

Organizma	AHLs	Fenotip
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C4-HSL, C6-HSL	Biyofilm, ekzoproteaz, virülens
<i>Aeromonas salmonicida</i>	C4-HSL, C6-HSL	Ekzoproteaz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3-Oxo-C8-HSL	Plasmid konjugasyon
<i>Agrobacterium vitiae</i>	C14 : 1-HSL, 3-oxo-C16 : 1-HSL	Virülens
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	3-Hydroxy-C8-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL, C12-HSL, 3-hydroxy-C12-HSL, C14-HSL, 3-oxo-C14-HSL, 3-hydroxy-C14-HSL, 3-hydroxy-C16-HSL	Bilinmiyor
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	C6-HSL, C8-HSL	Ekzoenzim, biyofilm oluşumu, titreme motilite (hareket), siderefor, virülens
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	C8-HSL, C10-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL, 3-hydroxy-C14-HSL	Virülens, ekzoproteaz
<i>Burkholderia mallei</i>	C8-HSL, C10-HSL	Virülens
<i>Chromobacterium violaceum</i>	C6-HSL	Ekzoenzim, siyanid, pigment
<i>Erwinia carotovora</i>	3-Oxo-C6-HSL	Karbapenem, ekzoenzim, virülens
<i>Pantoea (Erwinia) stewartii</i>	3-Oxo-C6-HSL	Ekzopolisakkarid
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C4-HSL; C6-HSL, 3-oxo-C12- HSL	Ekzoenzimler, ekzotoksinler, protein salgılama, biyofilm, titreme motilite, ikincil metabolit 4-quinolone signalling, virulens
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	C6-HSL	Phenazinler, proteaz, koloni oluşumu, Bir araya toplanma, tutunan kolonizasyon

Çizelge 2.2. (devam)

<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	C6-HSL	Phenazin-1-carboksiamid
<i>Pseudomonas putida</i>	3-Oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL	Biyofilm gelişimi
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3-Oxo-C10-HSL	Mupirosin
<i>Pseudomonas syringae</i>	3-Oxo-C6-HSL	Ekzopolisakkarid, yüzme motilite, virülens
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i>	C14 : 1-HSL, C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL	Tutunan nodüller/simbiyozis, plasmid transferi, Büyümeyi engelleyiciler; adaptasyon fazında durağanlaşma
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	7-cis-C14-HSL	Bir araya toplanma
<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006	C4-HSL, C6-HSL	Antibiyotik, pigment, ekzoenzim
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	C4-HSL, C6-HSL	Titreme motilite, ekzoproteaz, biyofilm
<i>Serratia marcescens</i> SS-1	C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL	Kayma motilite, biyosürfaktan, pigment, nükleaz, Sık sık transpozisyon (yer değiştirme)
<i>Serratia proteamaculans</i> B5a	3-Oxo-C6-HSL	Ekzoenzimler
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	C8-HSL, C12-HSL, 3-oxo-C14-HSL, 3-oxo-C16 : 1-HSL, C16 : 1-HSL, C18-HSL	Etkinleşmiş nodüller, simbiyozis, ekzopolisakkarid
<i>Vibrio fischeri</i>	3-Oxo-C6-HSL	Biyoluminesans
<i>Yersinia enterocolitica</i>	C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C14-HSL	Yüzme ve titreme motilite
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C8-HSL	Motilite, bir araya toplanma

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriyel suşlar

Araştırmada S.D.Ü. Egirdir Su Ürünleri Fakültesi'nden ve Muğla Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden temin edilen bazı Gram negatif bakteriyel balık patojenlerinden *Vibrio anguillarum* (5 suş), *Vibrio alginolyticus* (3 suş), *Pseudomonas fluorescens* (3 suş), *Aeromonas hydrophila* (2 suş) ve *Y. ruckeri* (12 suş) izolatları kullanılmıştır. Patojenler 25°C'de üretilmiştir ve -80°C'de ve %20 gliserin içerisinde muhafaza edilmiştir.

S.D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen pozitif kontrol olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (1 suş) suşu, LB besiyerinde 30°C'de üretilmiştir ve -80°C'de ve %20 gliserol içerisinde muhafaza edilmiştir (Ausubel et al., 1988).

AHL sinyal moleküllerinin tespiti *Chromobacterium violaceum* CV026 (1 suş) suşu (McClellan et al., 1997) ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (1 suş) suşu (Shaw et al., 1997; Cha et al., 1998; Ravn et al., 2001) kullanılarak yapılmıştır. Bu suşlar %1.2 agar içeren katılaştırılmış ve *A. tumefaciens* NT1 suşu için gentamisin (20 µg/ml); *C. violaceum* suşu için kanamisin (20 µg/ml) LB (%1 tripton, %0.5 maya ekstraktı, %0.5 NaCl) besiyerinde üretilmiştir. Bu stok kültürler farklı testler için kullanılmıştır (Ulusoy, 2007). Araştırma sırasında kullanılan tüm suşlar Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

3.1.1.1. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* suşlarının üretim ve depolanması

Deneylerde kullanılan her bakteri suşları uzun süreli saklama amacıyla (3-6 ay), -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Depolanan bakteriler günlük kullanım için -80°C'den alınarak -20°C'de bekletildikten sonra TSA besiyerlerine ekilmiştir. Ekimleri yapılan bakteriler 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra günlük kullanım amacıyla maximum 7 gün süreyle +4°C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırma sırasında kullanılan suşlar

Suş Adı	Özellik	Kaynak
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PT5 orijinal tip	Doç. Dr. Gülgün TINAZ S.D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
<i>C.violaceum</i>	CV026	Doç. Dr. Gülgün TINAZ S.D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
<i>A. tumefaciens</i>	NT1	Doç. Dr. Gülgün TINAZ S.D.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
<i>V. anguillarum</i>	ATCC	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>V. anguillarum</i>	A4	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>V. anguillarum</i>	A6	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>V. anguillarum</i>	İstanbul levrek	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>V. anguillarum</i>	Mersu	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>V. alginolyticus</i>	V5	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>V. alginolyticus</i>	V6	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>P. fluorescens</i>	Ç1	Muğla Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi
<i>P. fluorescens</i>	NCIMB 1953	Muğla Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi
<i>P. fluorescens</i>	F1	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>A. hydrophila</i>	ATCC 700183	Muğla Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi
<i>A. hydrophila</i>	İ1	Muğla Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	Yavuzlar	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	15	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	17	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	18/1	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	18/2	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	28	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	29/1	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	30	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	33	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	34	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	35	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi
<i>Y. ruckeri</i>	36	S.D.Ü. Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi

3.1.1.2. *C. violaceum* CV026, *A. tumefaciens* NT1 ve *P. aeruginosa* PAO1 suşlarının üretim ve depolanması

Deneylerde kullanılan her bakteri suşları uzun süreli saklama amacıyla (3-6 ay), -80°C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Depolanan bakteriler günlük kullanım için LBA içeren besiyerlerine ekilmiş 30°C’de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra günlük kullanım amacıyla maximum 7 gün süreyle +4°C’de saklanmıştır.

3.1.2. Kimyasal maddeler

Çalışmada; gliserol, kristal viyole, X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid), gentamisin (Oxoid;10µg), etanol, kanamisin, lugol solüsyonu, L-Tyrosin, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl, MgSO₄.7H₂O, CaCl₂.2H₂O, glikoz, glutamat, metilen mavisi, cetiltrimetilamonyumbromid (CTAB), tris, CaCl₂, elastin kongo red (ECR) kullanılmıştır.

3.1.3. Besiyerleri ve çözeltiler

Besiyerleri ve kullanılan tüm çözeltiler saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Aynı zamanda besiyeri ve çözeltiler için otoklavda 121°C’de 15 dakika süreyle sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Kullanılan besiyeri ve çözeltiler Çizelge 3.2.’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyeri ve çözeltiler

Besiyeri ve Çözeltiler	Gram/Litre
Luria Bertani Agar (LBA)	10 g Tripton 5 g Yeast Extract 5 g NaCl 15 g Agar
Luria Bertani Broth (LBB)	10 g Tripton 5 g Yeast Extract 5 g NaCl
Luria Bertani Broth Salinity (LBBS)	10 g Tripton 5 g Yeast Extract 20 g NaCl
Tryptic Soy Broth (TSB)	30 g Tryptic Soy Broth
Tryptic Soy Agar (TSA)	40 g Tryptic Soy Agar
Tryptic Soy Broth Salinity (TSBS)	30 g Tryptic Soy Broth 10 g NaCl
Tryptic Soy Agar Salinity (TSAS)	40 g Tryptic Soy Agar 10 g NaCl
Tryptic Soy Broth L-Tyrosin (TSB)	30 g Tryptic Soy Broth 0.9 g L-Tyrosin
M9-glutamat minimal medium agar	48mM Na ₂ HPO ₄ 22mM KH ₂ PO ₄ 8.5mM NaCl 18.7mM NH ₄ Cl 2mM MgSO ₄ .7H ₂ O 0.1mM CaCl ₂ .2H ₂ O 15g Agar %0.2 Glikoz %0.05 Glutamat %0.0005 Metilen Mavisi %0.02 CTAB
Elastin Kongo Red (ECR) tamponu	100 mM Tris 1 mM CaCl ₂ pH 7.5 20 mg Elastin Kongo Red
Kristal viole	10 g Kristal viole

3.2. Yöntem

3.2.1. AHL moleküllerinin tespiti

AHL sinyal moleküllerinin tespiti, *C. violaceum* CV026 (McClellan et al., 1997) ve *A. tumefaciens* NT1 (Shaw et al., 1997; Cha et al., 1998; Ravn et al., 2001) indiktor suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Acyl yan zincirinde 4-8 karbona sahip AHL moleküllerinin tespiti için, *C. violaceum* CV026 indiktor suşu kullanılmıştır. Ortamdaki mevcut AHL molekülleri, *C. violaceum* CV026 indikatör suşunda mor bir pigment olan viyolasinin üretimini uyarır (McClellan et al., 1997). Diğer bir indiktor olarak, pZLR4 plazmiti taşıyan *A. tumefaciens* NT1 suşu kullanılmıştır (Shaw et al., 1997; Cha et al., 1998; Ravn et al., 2001). *A. tumefaciens* NT1 indiktor suşu, ortamda X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid) varlığında, *N*-acyl yan zincirinde 6-12 karbona sahip AHL molekülünün uyarılmasıyla mavi renk meydana getirir (Bruhn et al., 2005; Ulusoy, 2007).

3.2.1.1. *C. violaceum* CV026 indikatör suşu kullanılarak *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'de AHL sinyal moleküllerinin üretiminin araştırılması

V. anguillarum, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşları TSA besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. AHL molekül varlığının tespiti için *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşları steril eküvyon ile bir koloni olacak şekilde TSA kültüründen alınarak Luria-Bertani Agar (LBA) besiyeri içeren petrilerdeki besiyerine üzerine 1.5 cm'lik çizgi şeklinde ekilmiş *C. violaceum* CV026 indikatör suşu da patojen bakterilerle arasında birkaç mm aralık olacak şekilde 1.5 cm'lik çizgi şeklinde ekilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ortamdaki mevcut AHL molekülleri, *C. violaceum* CV026 indikatör suşunda mor bir pigment olan viyolasinin üretimini uyarmaktadır (McClellan et al., 1997; Ulusoy, 2007). Böylece inkübasyon sonucunda mor renk oluşumuna bakılarak çevreyi algılama sisteminin sinyal molekülünden *N*-butanoyl-L-homoserin lakton (BHL)'nin varlığı belirlenmiştir.

3.2.1.2. *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşu kullanılarak *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'de AHL sinyal moleküllerinin üretiminin araştırılması

V. anguillarum, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşları TSA besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. AHL molekül varlığının tespiti için *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşları steril kürdanla bir koloni olacak şekilde TSA kültüründen alınarak 20 µg X-Gal boya maddesi ilave edilmiş Luria-Bertani Agar (LBA) besiyeri içeren petrilerdeki besiyerine üzerine 1.5 cm'lik çizgi şeklinde ekilmiş *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşu da patojen bakterilerle arasında birkaç mm aralık olacak şekilde 1.5 cm'lik çizgi şeklinde ekilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşu, ortamda X-Gal varlığında, AHL molekülünün uyarmasıyla renk meydana gelir (Shaw et al., 1997; Cha et al., 1998; Ravn et al., 2001; Ulusoy, 2007). İnkübasyon sonucunda yeşil renk oluşumu incelenen söz konusu bakterilerin çevreyi algılama sisteminin sinyal molekülünden *N*-(3-okzododekanoyl)-L-homoserin lakton (OdDHL)'nin varlığı belirlenmiştir.

3.2.1.3. AHL moleküllerinin tespiti için çapraz doğrulama testi

Çalışılan suşlarda AHL moleküllerinin üretimi, her iki indikatör suş (CV026 ve NT1) ile besiyeri üzerinde paralel çizilerek test edilmiştir. Sonuçlar *P. aeruginosa* PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Ulusoy, 2007).

3.2.2. Biyofilm testi

O'Toole and Kolter (1998)' de tanımladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir (Ye et al., 2008). Kısaca *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *P. fluorescens* suşları Luria-Bertani ortamda (%3 NaCl eklenmiş) (LBS) 16 saat üretilmiştir. İnkübasyondan sonra bakteri yoğunluğu OD₆₀₀'de 0,8'e ayarlanmıştır. Bakteri kültürü 1/100'lük steril LBS ortamı ile sulandırılmıştır. Sulandırılan kültürlerin tümünden düz tabanlı 96 çukurlu pleytlere (mikroplak) 100 µl olarak 24 çukura ilave edilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben çukurlar distile su ile yıkandı ve biyofilmle ilişkili hücre kalıntıları %1'lik kristal viole ile 15 dk

süresince boyanmıştır. Boya fazlası hafif akan çeşme suyunda dikkatli bir şekil yıkanmış ve bakterilerin oluşturduğu 96 çukurlu plakalara tutunmuş biyofilm fotoğraflanmıştır. Biyofilm oluşumunu kantitatif olarak belirlemek için pleytlere 2x200 µl %95 etanol saf su ile 4 ml ye tamamlanarak ilave edilmiştir. Pleytlerin 490 nm’de ELİSA okuyucusunda (BioTek) optik yoğunlukları ölçülmüştür (Ye et al., 2008). Her bakteri için 24 sonucun OD değerleri ortalamaları alınmıştır. Sonuçlar test sırasında LBS negatif kontrol, PAO1 suşu ise pozitif kontrol olarak çalışılıp değerlendirilmiştir.

3.2.3. Pigment testi

Test edilecek *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları %1 NaCl içeren 10 ml LBS besiyerinde 25°C’de 24 saat üretilmiştir. *P. fluorescens* suşları ise 10 ml LB besiyerinde 25°C’de 24 saat üretilmiştir. İnkübe edilen bakteri kültürleri OD₆₀₀’de 0.05’e ayarlanmıştır. Dilüsyonda LB ve LB içinde 5mM’lık L-Tyrosine (Tirozin) içeren ortam kullanılmış ve hazırlanan kültürler 25°C’de karıştırılarak 24 saat inkübe edilmiştir. Çeşitli zaman aralıklarında tirozin içeren ve içermeyen kültürlerden 1 ml örnek alınarak 12000 devirde 2 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantı toplanmıştır. Süpernatantlardan 96 çukurlu düz tabanlı pleytlere 100 µl olarak her bakterinin süpernatantından 8 çukura ilave edilerek çalışılmıştır. Pigment üretimi; süpernatantın her defasında 405 nm’de ELİSA okuyucusunda (BioTek) optik yoğunluklarının ölçümü ile hesaplanmıştır (Croxatto et al., 2002). Her bakteri için 8 sonucun OD değerlerinin ortalamaları alınmıştır. Sonuçlar test sırasında LB negatif kontrol, *C. violaceum* 12472 suşu ise pozitif kontrol olarak çalışılıp değerlendirilmiştir.

Bakterilerde pigment oluşumu ayrıca tirozin saydamlaştırma testi ile de yapılmıştır. TSA içerisine 0.1% tirozin ilave edilerek ekim yapılmıştır, 30°C’de inkübe edilerek tirozinli agara ekim yapıldıktan sonra her gün koloni oluşumu yanında, koloni çevresinde ve altında saydamlaşma görülmesi beklenmiştir. Koloni çevresinde agarda saydamlaşma pozitif test sonucu olarak yorumlanmıştır (Aydın 2004).

2.3.4. Ramnolipid üretimi testi

Ramnolipid üretimi testi; 0,2 g cetiltrimetilamonyumbromid (CTAB) ve 5 mg/l⁻¹ metilen mavisi içeren M9-glutamat minimal medium agar petrileri kullanılarak

gerçekleştirilmiştir (Siegmund and Wagner, 1991). Test edilecek *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları %1 NaCl içeren Luria Bertani Broth Salinity (LBBS) besiyerinde 25°C’de 24 saat üretilmiştir. *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşları ise Luria Bertani Broth (LBB) besiyerinde 25°C’de 24 saat üretilmiştir. Bu suşların bir gecelik LBB kültürlerinden 20’şer µl alınarak M9-glutamat minimal medium agar petrilerinin ortasına damlatılmış ve 30°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon ramnolipid aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Test sırasında LBB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Ulusoy, 2007). Ramnolipid üretim testi üç defa tekrarlanmıştır.

2.3.5. Elastaz testi

Elastaz aktiviteleri test edilecek *V. anguillarum*, *V.alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşlarına Elastin Kongo Red (ECR) testi uygulanmıştır (Ohman et al., 1980). *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları %1 NaCl içeren Luria Bertani Broth Salinity (LBBS) besiyerinde 25°C’de 14 saat üretilmiştir. *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşları ise Luria Bertani Broth (LBB) besiyerinde 25°C’de 14 saat üretilmiştir. Bu kültürlerin süpernatantlarından 100 µl üzerine 900 µl ECR tamponu (100 mM Tris, 1 mM CaCl₂, pH 7.5, 20 mg ECR) ilave edilmiş ve 30°C’de 3 saat karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda çözülmemiş olan ECR 12000 devirde 2 dk santrifüj edilerek uzaklaştırılmış ve süpernatantlar 96 çukurlu yuvarlak tabanlı platlere 100 µl olarak her bir bakteri süpernatantından 7 çukura ilave edilerek çalışılmıştır. Pleytler OD’si 630 nm’de ELİSA okuyucusunda (BioTek) optik yoğunlukları ölçülerek hesaplanmıştır. Her bakteri için 7 sonucun OD değerlerinin ortalamaları alınmıştır. Test sırasında LBB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Ulusoy, 2007).

3.2.6. Proteaz testi

Test edilecek *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları %1 NaCl içeren Tryptic Soy Broth (TSBS) besiyerinde 25°C’de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden % 2 yağsız süt tozu içeren %1 oranında tuz (NaCl) ilaveli Tryptic Soy Agar (TSAS) petrilerinin

ortasına açılan 3 mm'lik çukurlara 20 µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşları ise TSB besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden % 2 yağsız süt tozu içeren TSA petrilerinin ortasına açılan 3 mm'lik çukurlara 20 µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Suşların proteolitik aktiviteleri bakteri kültürü ilave edilen bölgedeki berrak zon çapı ölçülerek kaydedilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon proteolitik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Arda, 1997; Swift et al., 1999; Dong et al., 2005; Ulusoy, 2007) Proteaz testi üç defa tekrarlanmıştır. Aynı zamanda proteolitik aktiviteyi görmek için besiyerine çizgi tarzında ekimlerde yapılmıştır.

3.2.7. Amilaz testi

Test edilecek *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları %1 NaCl içeren TSBS besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden % 2 nişasta içeren %1 oranında tuz (NaCl) ilaveli TSA besiyerine çizgi tarzında ekim yapılmış ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşları ise TSB besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden % 2 nişasta içeren %1 oranında tuz (NaCl) ilaveli TSA besiyerine çizgi tarzında ekim yapılmış ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra koloniler üzerine lugol solüsyonu dökülmüş, pozitif reaksiyonlar koloni etrafında berrak alan oluşmasıyla tespit edilmiştir (Arda, 1997; Swift et al., 1999). Pozitif reaksiyonlarda, koloni etrafında renksiz bir halka oluşmuştur (α -amilaz enziminin nişastayı hidrolizasyonu sonu). Negatif durumlarda ise besiyeri mavi renkte görülmüştür. Koloni etrafındaki oluşan pembe-esmer bölge şüpheli reaksiyonu ifade etmektedir. Reaksiyon 5 dk içinde okunmuştur (Arda, 1997; Swift et al., 1999). Amilaz testi her bakteri için üç defa tekrarlanmıştır.

3.2.8. Hemoliz testi

Test edilecek *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları %1 NaCl içeren TSBS besiyerinde 25°C'de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden %5 insan kanı içeren %1 oranında tuz (NaCl) ilaveli TSAS petrilerinin ortasına, 20'şer µl ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve

Y. ruckeri suşları ise TSB besiyerinde 25°C’de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden %5 insan kanı içeren TSA petrilerinin ortasına, 20 µl ilave edilmiş ve 25°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Suşların hemolitik aktiviteleri bakteri kültürü ilave edilen bölgedeki berrak zon çapı ölçülerek kayıt edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon hemoliz aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Swift et al., 1999).

Aynı zamanda hemolitik aktiviteyi görmek için besiyerine çizgi tarzında ekimlerde yapılmıştır. Hemoliz testi her bakteri için üç paralel olarak çalışılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

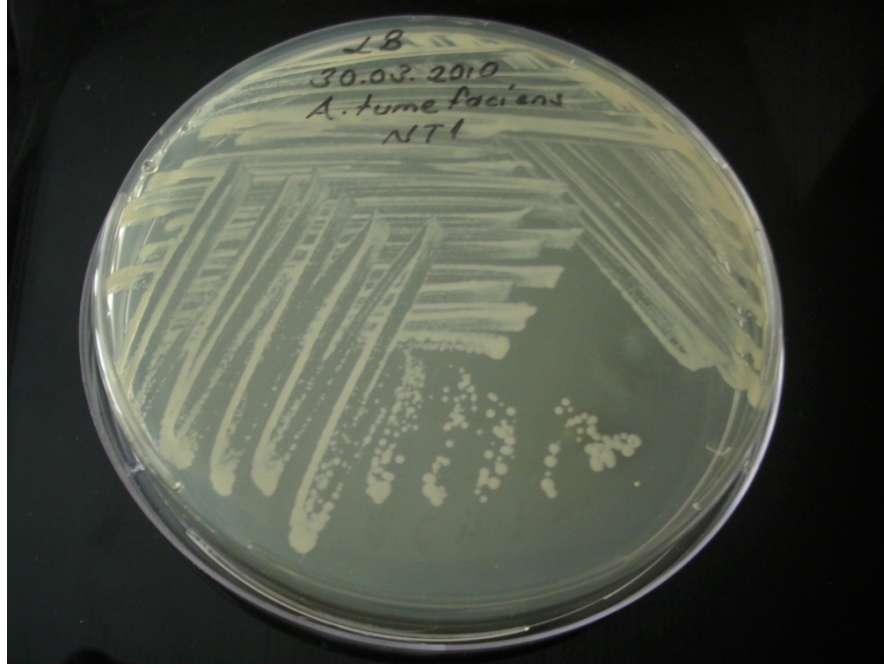
4.1. İndikatör Suşlar (*C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1), Pozitif Kontrol Suşu *P. aeruginosa* PAO1, Gram Negatif Balık Patojenleri *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'nin Koloni Yapıları

C. violaceum 12472 orijinal suşta oluşan mor renkte koloni ve *C. violaceum* CV026 mutant suşta ise pigmentsiz koloni oluşumu LB agar üzerinde gözlenmiştir (Şekil 4.1.).



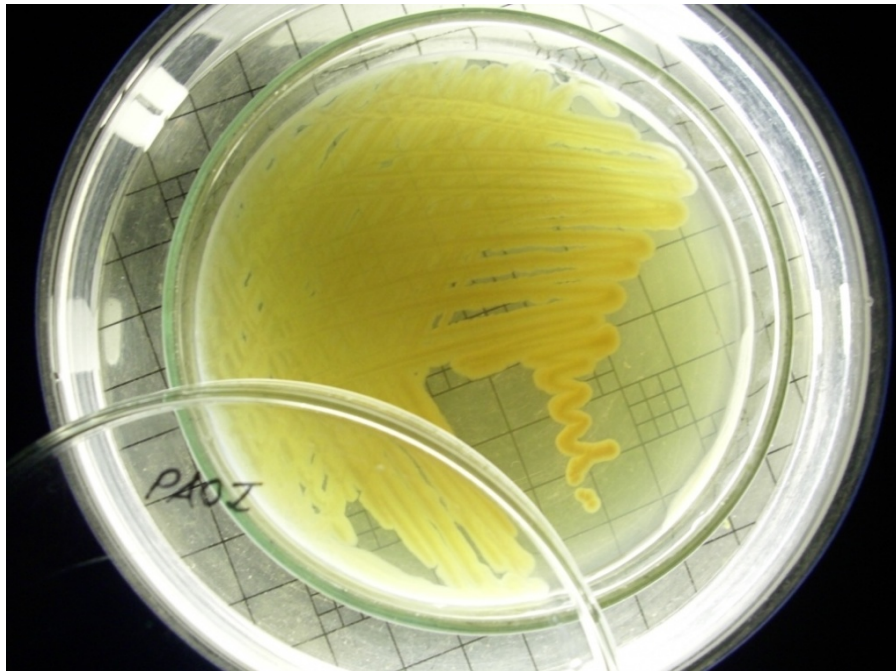
Şekil 4. 1. *Choromacterium violaceum* 12472 orijinal suş (sol tarafta) ve mutant suş *Choromacterium violaceum* CV026 (sağ tarafta)

OdDHL sinyal molekülünü üretimini gösteren *A. tumefaciens* NT1 mutant suşunun LB agar üzerinde koloni oluşumu Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

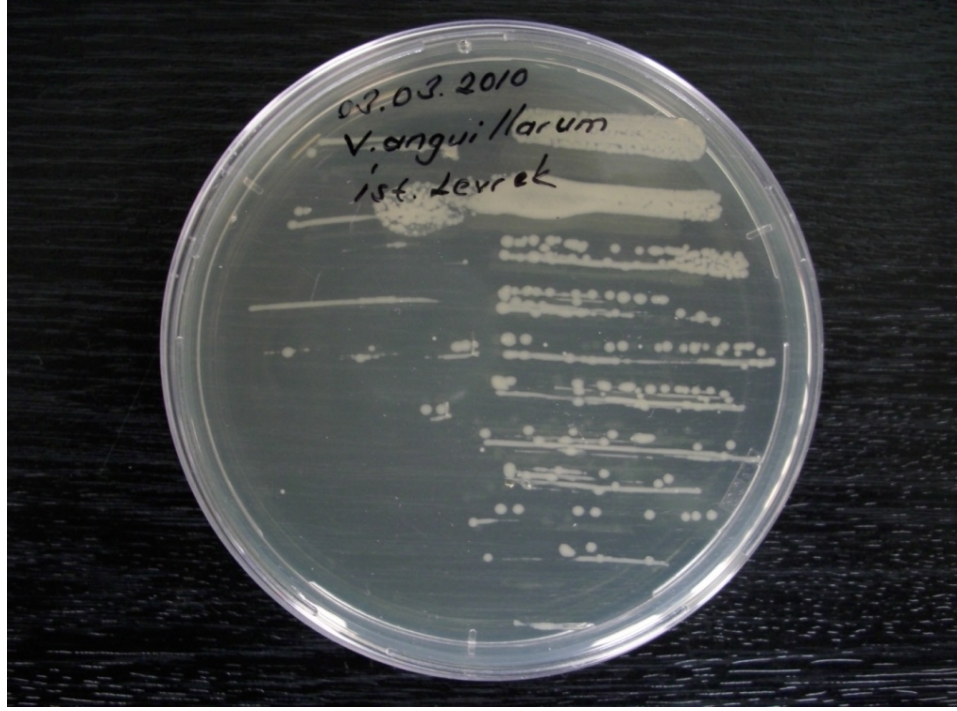


Şekil 4.2. *Agrobacterium tumefaciens* NT1

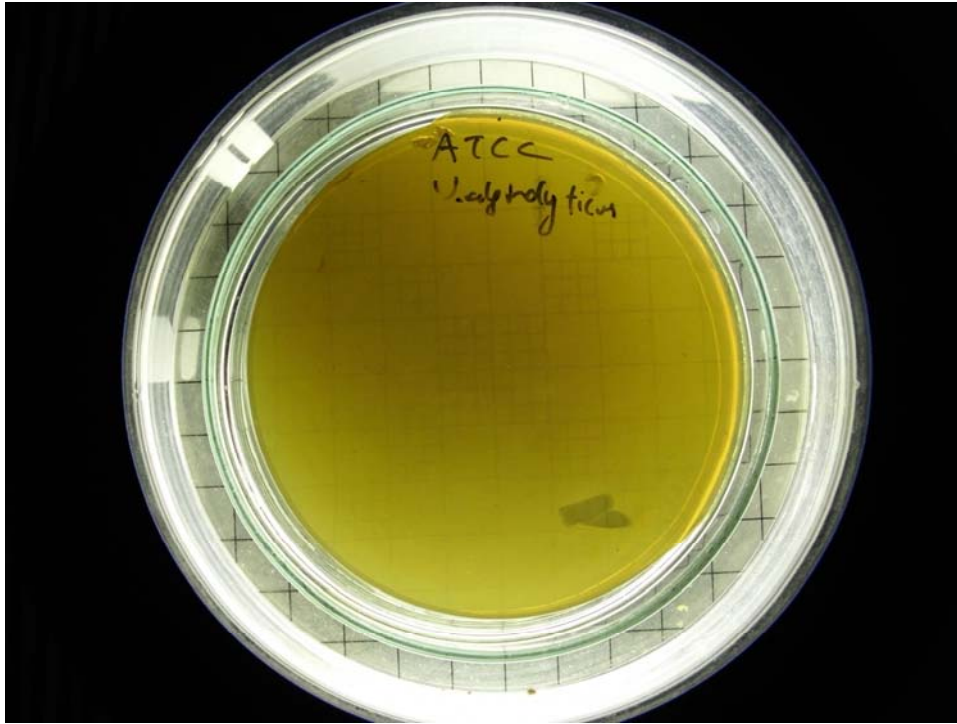
Denemelerde pozitif kontrol olarak kullanılan insan patojeni *P. aeruginosa* PAO1 ve balık patojenlerinden *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'nin LB agar üzerinde koloni oluşumu Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.' de verilmiştir.



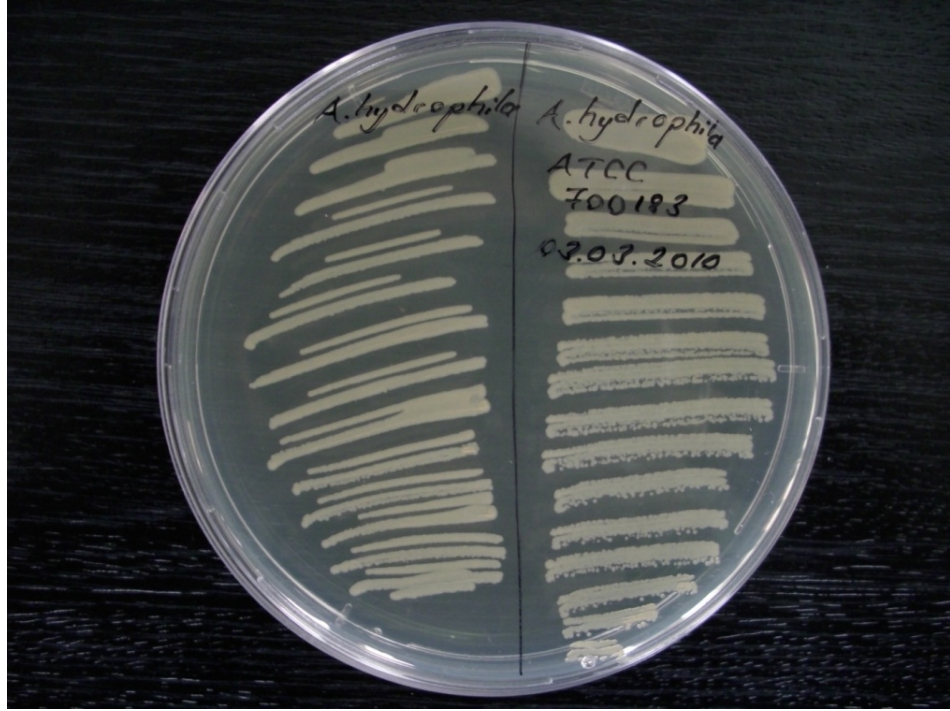
Şekil 4.3. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1



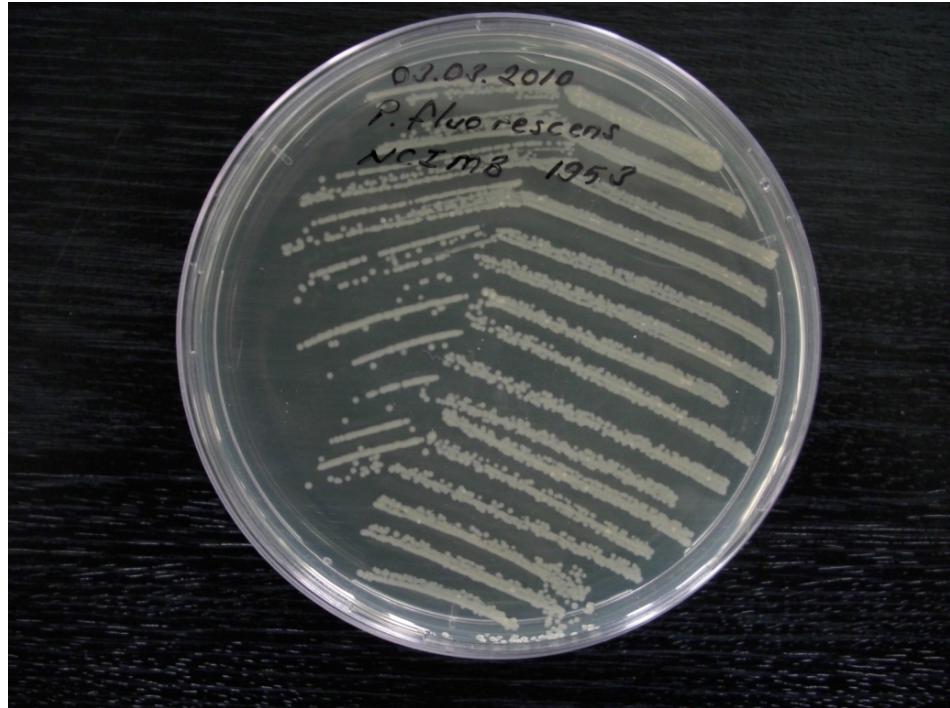
Şekil 4.4. *Vibrio anguillarum*



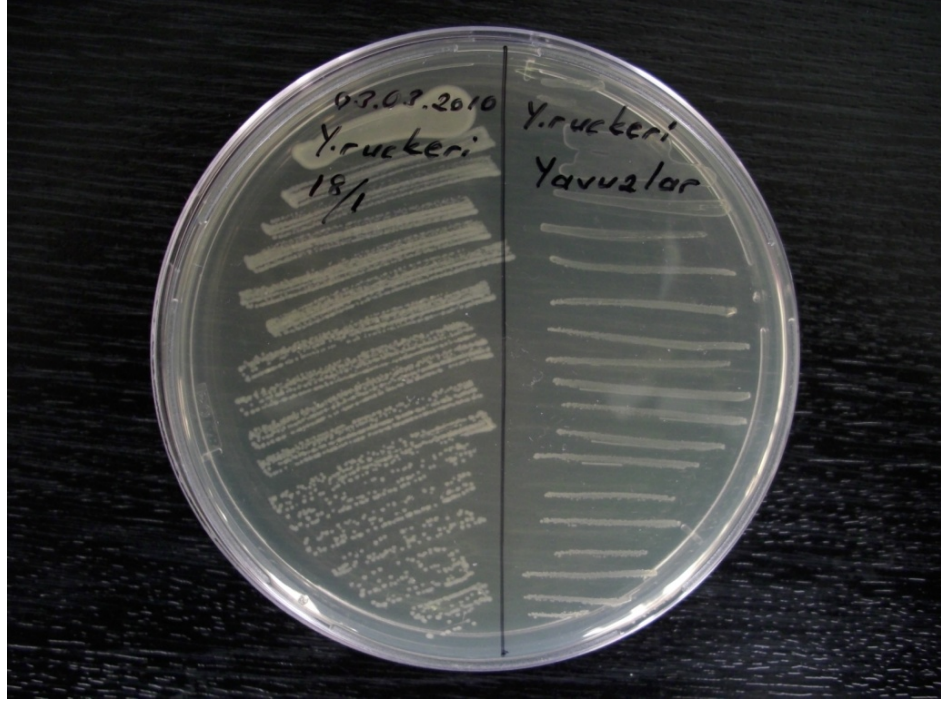
Şekil. 4.5. *Vibrio alginolyticus*



Şekil 4.6. *Aeromonas hydrophila*



Şekil 4.7. *Pseudomonas fluorescens*

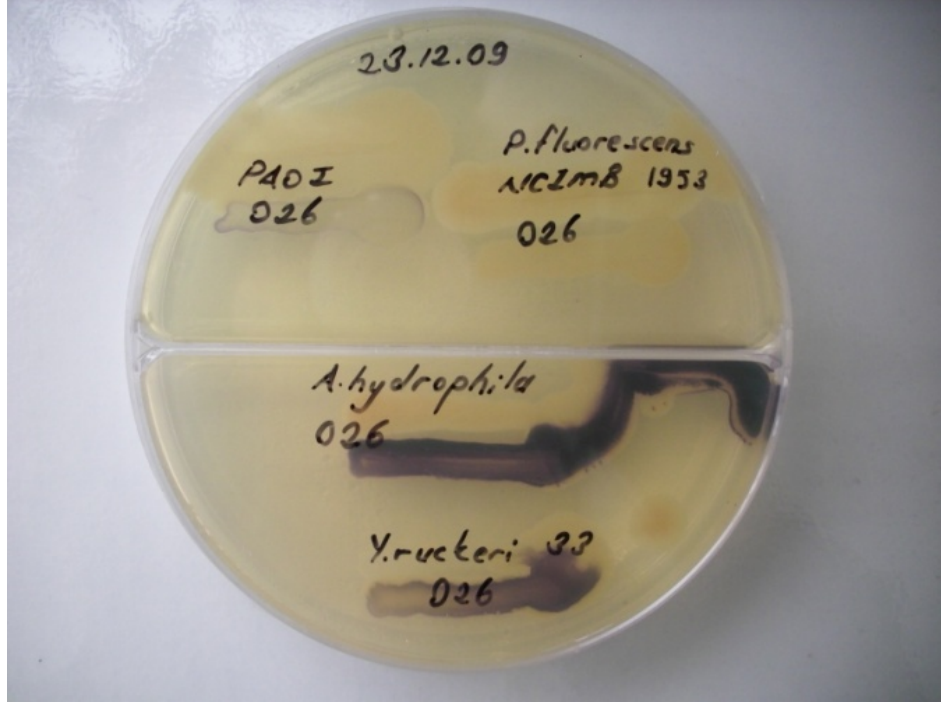


Şekil 4.8. *Yersinia ruckeri*

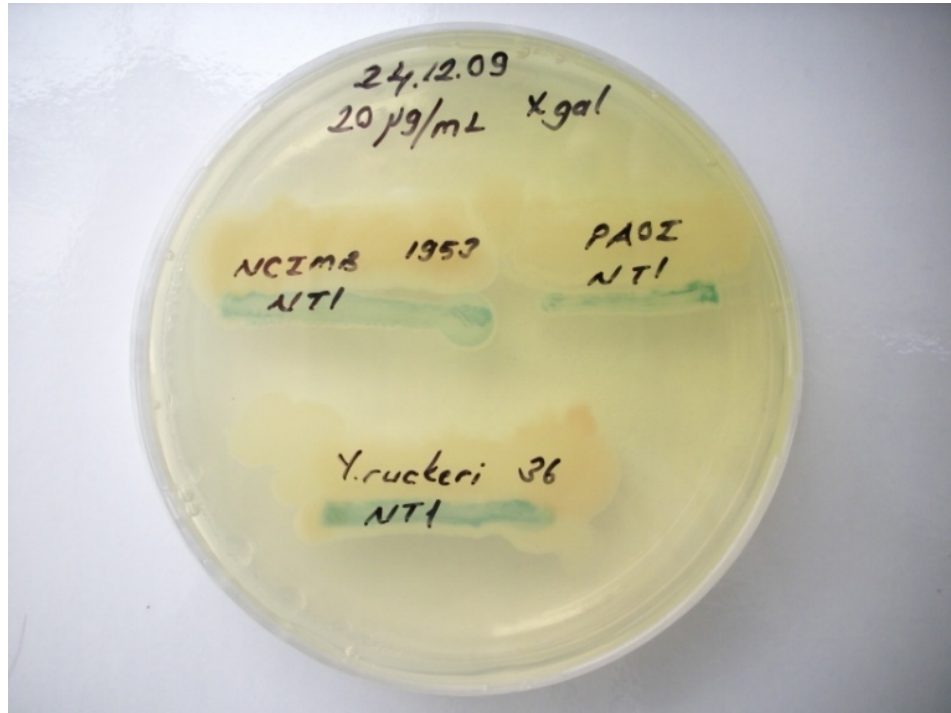
4.2. İndikatör Suşlar Aracılığıyla *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'de *N*-acyl Homoserin Lakton (AHL) Sinyal Moleküllerinin Tespiti

Araştırmada hasta balıklardan izole edilen bazı Gram negatif bakteriyel patojen suşlar ve referans suşlarında sinyal molükülünün varlığı fenotipik olarak araştırılmıştır.

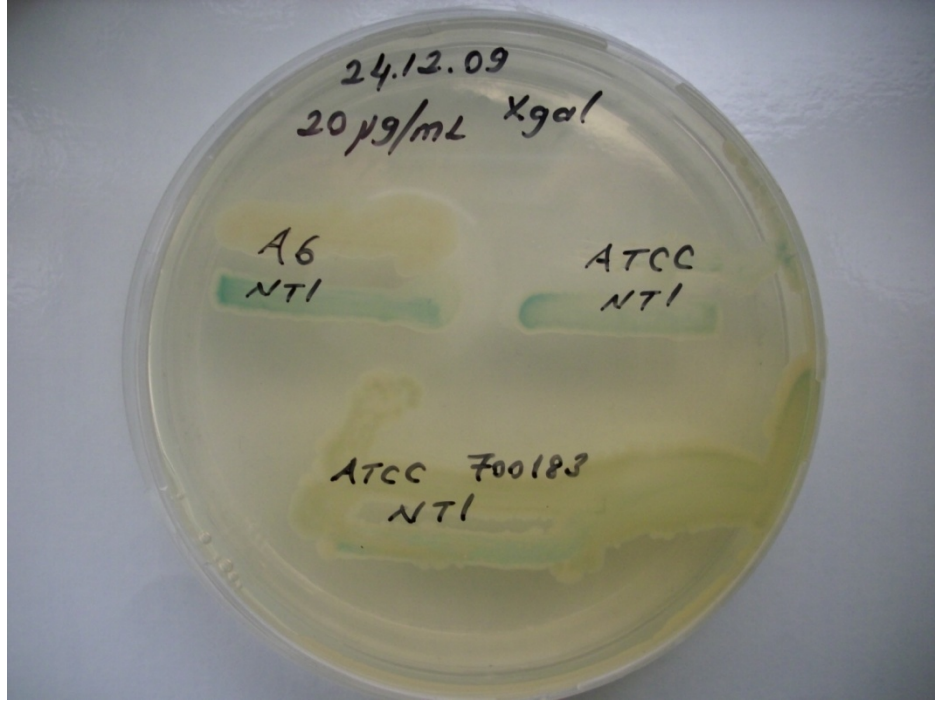
İzolatlarda öncelikle BHL ve OddHL sinyal moleküllerinin üretimi, *C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşları kullanılarak araştırılmıştır. *C. violaceum* CV026 suşu kullanılarak yapılan testlerde *A. hydrophila*'da, *Y. ruckeri* suşlarının BHL sinyal molekülünü ürettiğinin tespiti Şekil 4.9.'de gösterilirken *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens* suşlarının ise üretmediği tespit edilmiştir. BHL sinyal molekülünü üretmeyen suşlar ve üreten suşların tamamının *A. tumefaciens* NT1 suşu kullanılarak yapılan testte ise OddHL sinyal molekülünü üretebildiklerini göstermiştir. Araştırmada çalışılan tüm Gram negatif bakteriyel balık patojenlerinde OddHL sinyal molekülünü üretebildikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.10. ve Şekil 4. 11.).



Şekil 4.9. *C. violaceum* CV026 indikatör suşu kullanılarak *A. hydrophila*, *Y. ruckeri* ve pozitif kontrol *P. aeruginosa* PAO1 suşunda BHL sinyal moleküllerinin üretimi



Şekil 4.10. *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşu kullanılarak *P. fluorescens*, *Y. ruckeri* ve pozitif kontrol *P. aeruginosa* PAO1 suşunda OddHL sinyal moleküllerinin üretimi



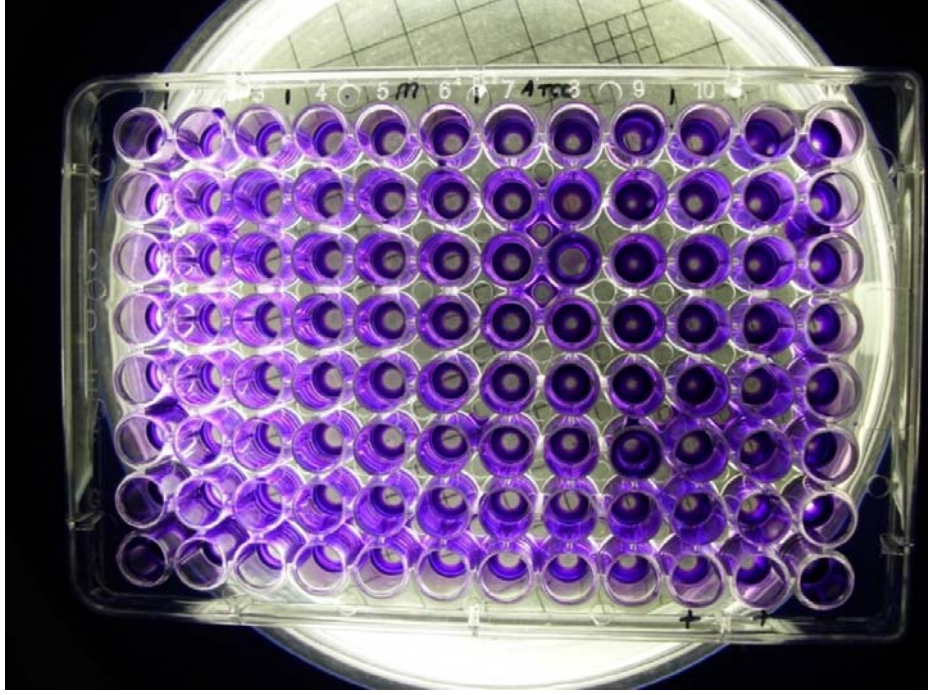
Şekil 4.11. *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşu kullanılarak *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* ve *A. hydrophila*'da, OdDHL sinyal moleküllerinin üretimi

4.3. BHL ve OdDHL Sinyal Moleküllerine Bağımlı Virülens Faktörlerinin Üretimi

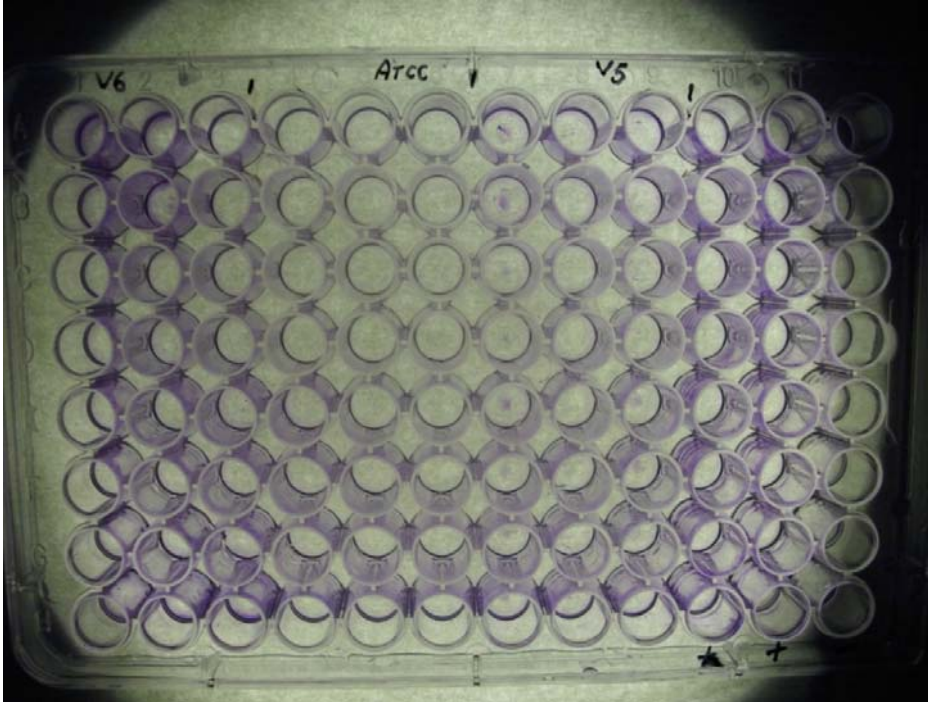
Deneysel çalışmalarla Gram negatif bakteriyel balık patojenleri; biyofilm, pigment, ramnolipid, elastaz, proteaz, amilaz, hemoliz üretimi gibi çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen virülens faktörlerinin varlığı bakımından test edilmiştir.

4.3.1. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* ve *P. fluorescens*'da biyofilm testi ve bulgular

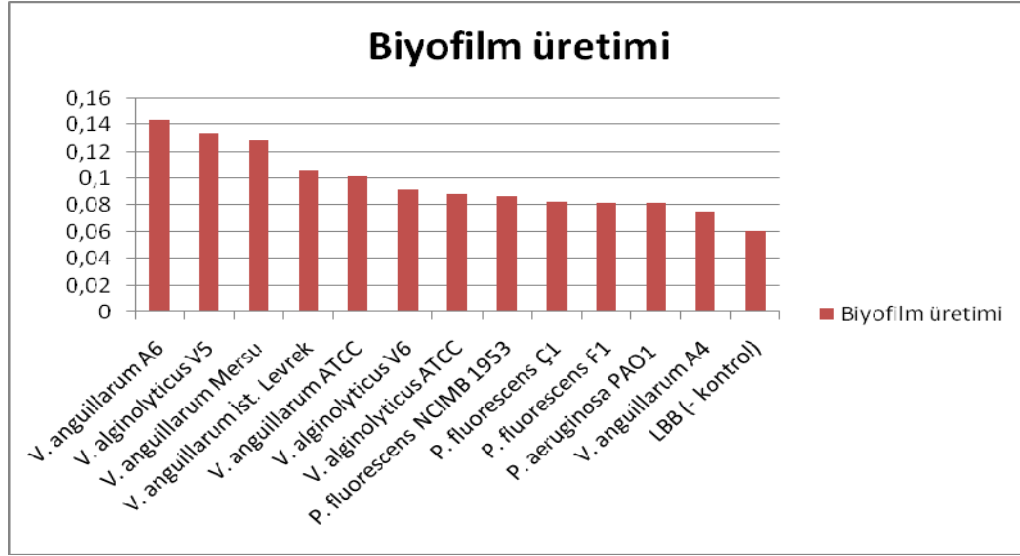
Kristal viole ile boyanmış pleytlerin (Şekil 4.12.) etanol ilavesinden sonraki (Şekil 4.13.) absorbans ölçümüyle *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens* suşları için yapılan biyofilm testinde *V. anguillarum* (A4, A6, ATCC, İst. Levrek, Mersu), *V. alginolyticus* (V5, ATCC, V6), *P. fluorescens* (Ç1, F1, NCIMB 1953) suşlarının tümünde biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Bununla birlikte özellikle V5 ve A6 suşlarında biyofilm virülens faktörü oluşumunun PAO1 pozitif kontrol suşuna oranla absorbans değerlerinin yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14.).



Şekil 4.12. Kristal viole ile boyanmış pleytlerde biyofilm oluşumu



Şekil 4.13. Kristal viole ile boyandıktan sonra pleytlere etanol ve saf su ilave edilen pleytlerde biyofilm oluşumunun görünümü

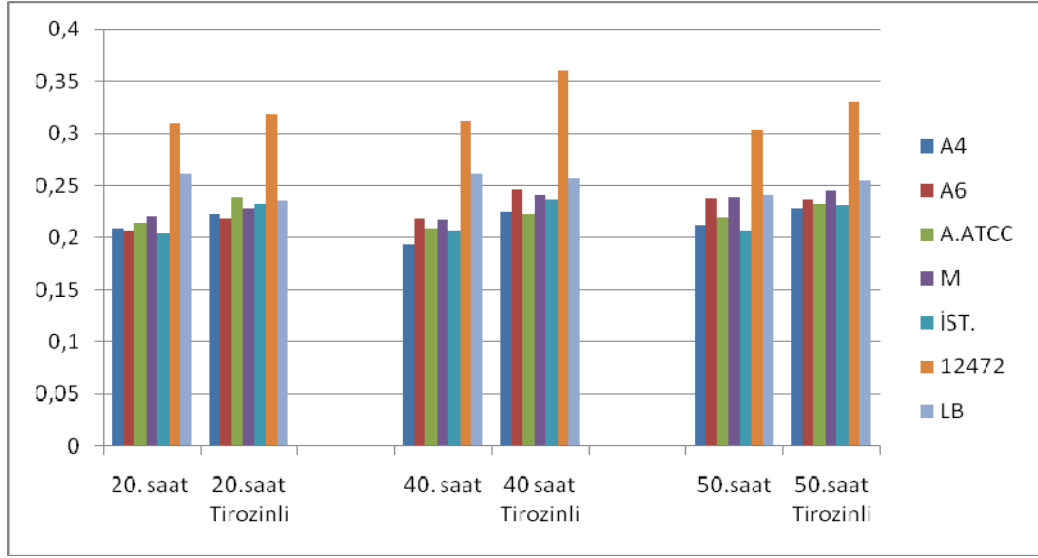


Şekil 4.14. LBB (- kontrol) ve *P. aeruginosa* PAO1 (+ kontrol), *V. anguillarum* (A4, A6, ATCC, Mersu, İstanbul Levrek), *V. alginolyticus* (V5, ATCC, V6), *P. fluorescens* (NCIMB 1953, Ç1, F1) suşlarında biyofilm üretiminin grafik gösterimi

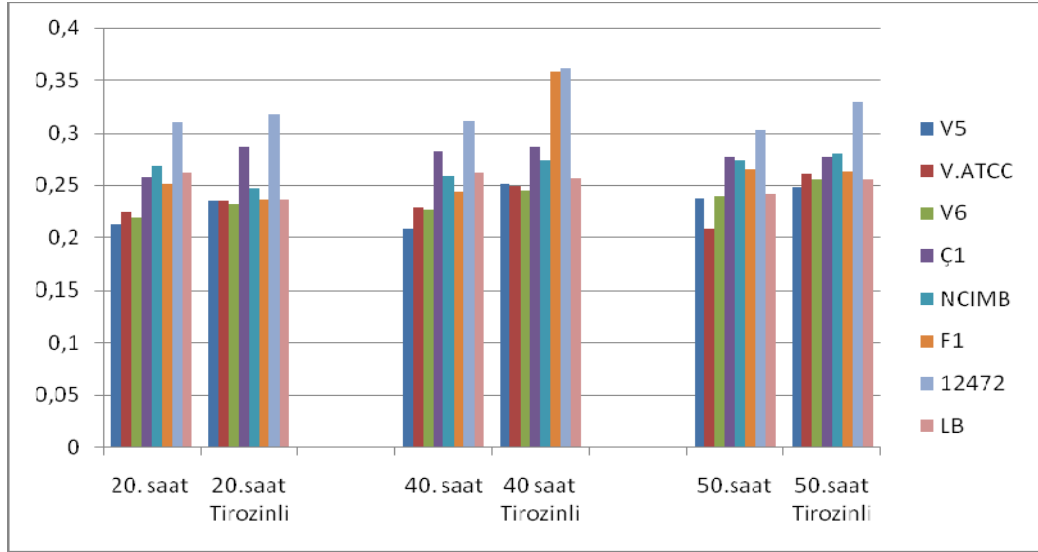
4.3.2. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*'de pigment testi ve bulgular

V. anguillarum, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens* suşlarının virülansında etkili olduğu bilinen pigmentin varlığının araştırılması için tirozin kullanılmıştır. Pigment üretiminin ölçümünün sonuçlarına bakıldığında tirozin ilave edilen suşlarda pigment üretiminin optik yoğunluğu 20., 40. ve 50. saatlerde yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.). 20., 40. ve 50. saatlerde yapılan ölçümlerde pigment yoğunluğunun değişimi Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Pigment üretiminin 20. saatte (*P. fluorescens*) NCIMB 1953, F1 suşları hariç tüm suşlarda arttığı gözlenmiştir. 40. saatte de (20. saatte azalış gösteren) NCIMB 1953, F1 suşları da dahil olmak üzere tüm suşlarda artışın devam ettiği belirlenmiştir. Ancak 50. saate gelindiğinde yapılan ölçümde pigment üretimindeki artış tüm suşlarda devam ederken (*V. anguillarum*) A6 ve (*P. fluorescens*) F1 suşlarının pigment üretiminde azalma, (*P. fluorescens*) Ç1 suşunda ise herhangi bir değişimin olmadığı belirlenmiştir.

Sonuçta *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens* suşlarının tümünde tirozinin varlığı pigment üretimini artırmıştır. En yüksek değer pozitif kontrol olarak kullanılan *C. violaceum* 12472 suşunda görülmüştür. Test edilen bakteriyel suşlardan en yüksek değer *P. fluorescens* F1 suşunda bulunmuştur.



Şekil 4.15. *C. violaceum* 12472 (+ kontrol), LBB (- kontrol), *V. anguillarum* A4, A6, ATCC, Mersu, İstanbul levrek suşlarında tirozinli ve tirozinsiz LBB ortamında pigment üretiminin gösterimi

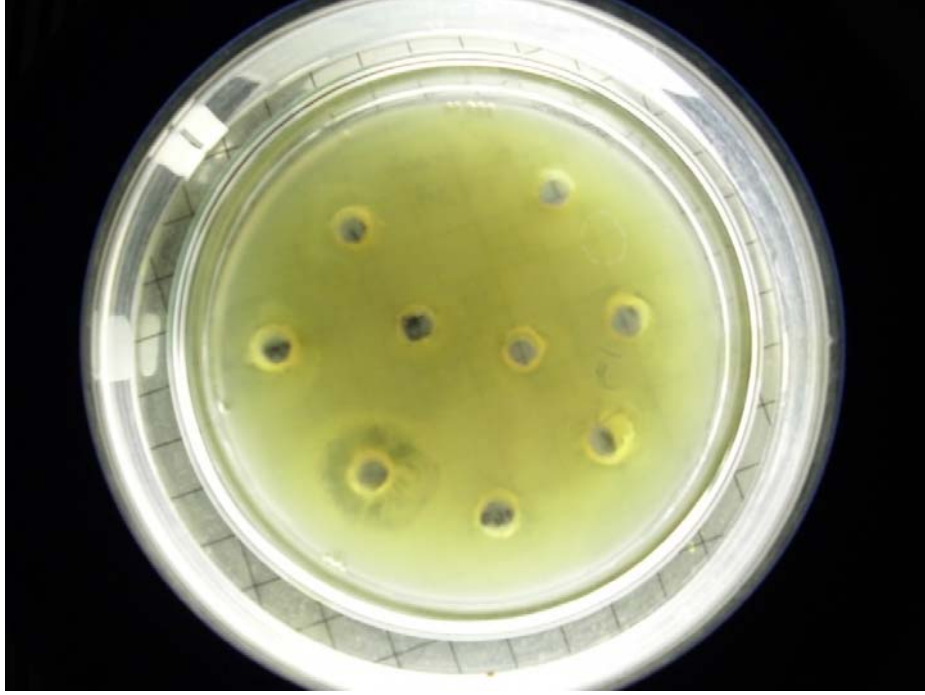


Şekil 4.16. *C. violaceum* 12472 (+ kontrol), LBB (- kontrol), *V. alginolyticus* (V5, ATCC, V6), *P. fluorescens* (NCIMB 1953, Ç1, F1) suşlarında tirozinli ve tirozinsiz LBB ortamında pigment üretiminin gösterimi

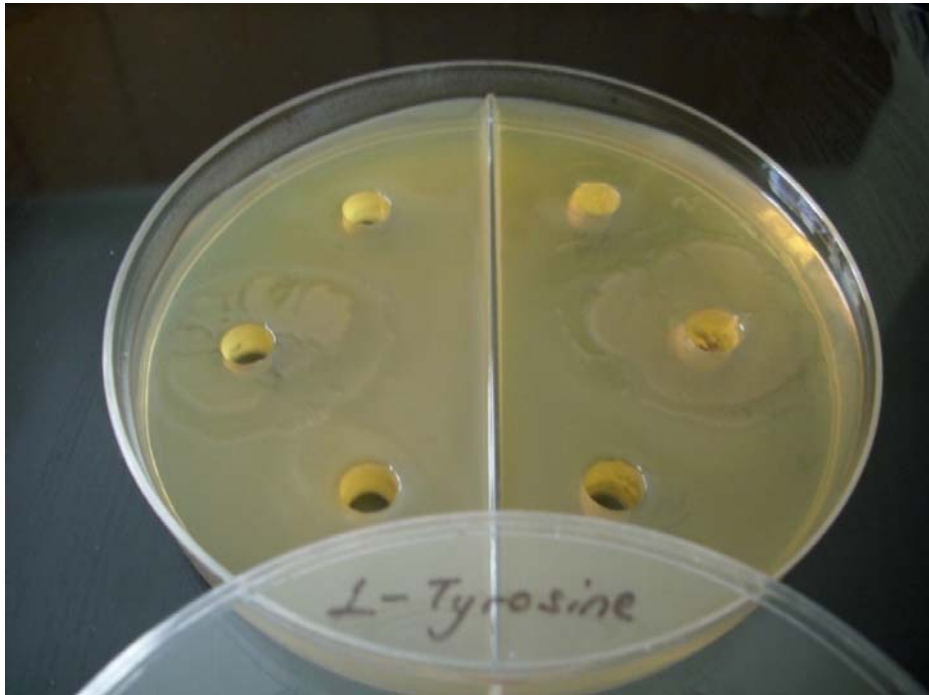
Çizelge 4.1. *C. violaceum* 12472 (+ kontrol), LBB (- kontrol), *V. alginolyticus* (V5, ATCC, V6), *P. fluorescens* (NCIMB 1953, Ç1,F1) suşlarının tirozinli LBB ortamında pigment artışı

Suş Adı	20. saat	40. saat	50.saat
<i>V. anguillarum</i> ATCC	↑	↑	↑
<i>V. anguillarum</i> A4	↑	↑	↑
<i>V. anguillarum</i> A6	↑	↑	↓
<i>V. anguillarum</i> İstanbul levrek	↑	↑	↑
<i>V. anguillarum</i> Mersu	↑	↑	↑
<i>V. alginolyticus</i> ATCC	↑	↑	↑
<i>V. alginolyticus</i> V5	↑	↑	↑
<i>V. alginolyticus</i> V6	↑	↑	↑
<i>P. fluorescens</i> Ç1	↑	↑	↔
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 1953	↓	↑	↑
<i>P. fluorescens</i> F1	↓	↑	↓
<i>C. violaceum</i> 12472 (+kontrol)	↑	↑	↑
LB (- kontrol)	↓	↓	↑

Bakterilerde pigment oluşumu ayrıca tirozin saydamlaştırma testi ile de yapıldığında inkübasyondan 24 saat sonra Şekil 4.17.' de gösterilen *P. fluorescens* F1 suşunda ve pozitif kontrol olarak kullanılan Şekil 4.18'de gösterilen *P. aeruginosa* PAO1 suşlarında koloni çevresinde saydamlaşma görülmüştür. Ancak diğer suşlarda koloni oluşmasına rağmen herhangi bir saydamlaşma görülmemiştir. Pigment tespiti için agarda yapılan tirozin saydamlaştırma sonuçları Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Tirozin saydamlaştırma testi iki defa tekrarlanmıştır.



Şekil 4.17. *P. fluorescens* F1 suşunda tirozin saydamlaştırma testinde pozitif sonuç



Şekil 4.18. Pozitif kontrol *P. aeruginosa* (PAO1) suşunda tirozin saydamlaştırma testinde pozitif sonuç

Çizelge 4.2. Pigment tespiti için agarda tirozin saydamlaştırma sonuçları

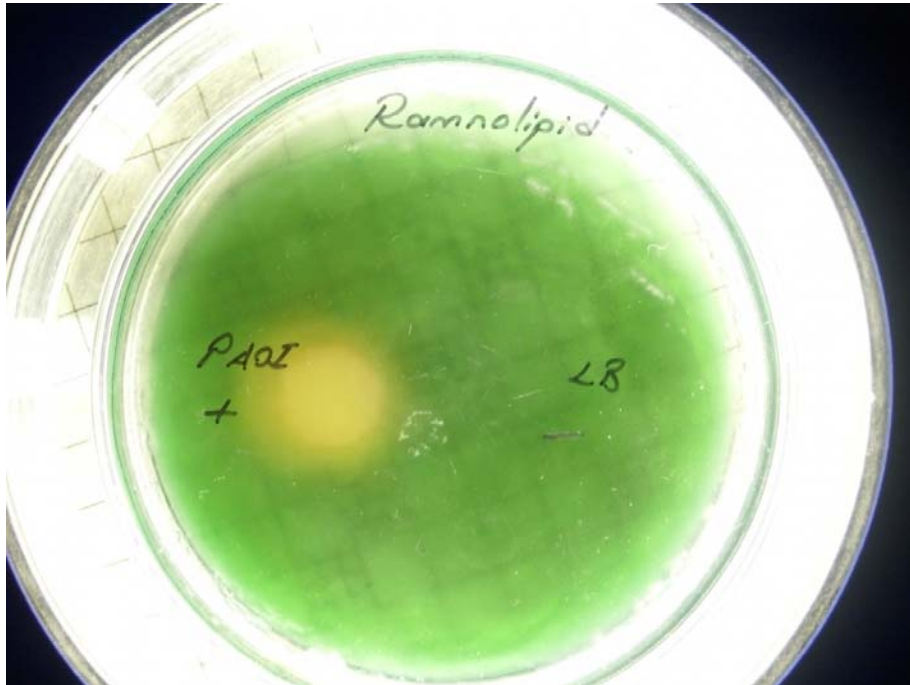
Suş adı	Tirozin saydamlaştırma testinin sonuçları
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	+
<i>V. anguillarum</i> ATCC	-
<i>V. anguillarum</i> A4	-
<i>V. anguillarum</i> A6	-
<i>V. anguillarum</i> İstanbul levrek	-
<i>V. anguillarum</i> Mersu	-
<i>V. alginolyticus</i> ATCC	-
<i>V. alginolyticus</i> V5	-
<i>V. alginolyticus</i> V6	-
<i>P. fluorescens</i> Ç1	-
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 1953	-
<i>P. fluorescens</i> F1	+
<i>A. hydrophila</i> ATCC 700183	-
<i>A. hydrophila</i> İ1	-
<i>Y. ruckeri</i> Yavuzlar	-
<i>Y. ruckeri</i> 15	-
<i>Y. ruckeri</i> 17	-
<i>Y. ruckeri</i> 18/1	-
<i>Y. ruckeri</i> 18/2	-
<i>Y. ruckeri</i> 28	-
<i>Y. ruckeri</i> 29/1	-
<i>Y. ruckeri</i> 30	-
<i>Y. ruckeri</i> 33	-
<i>Y. ruckeri</i> 34	-

Çizelge 4.2. (devam)

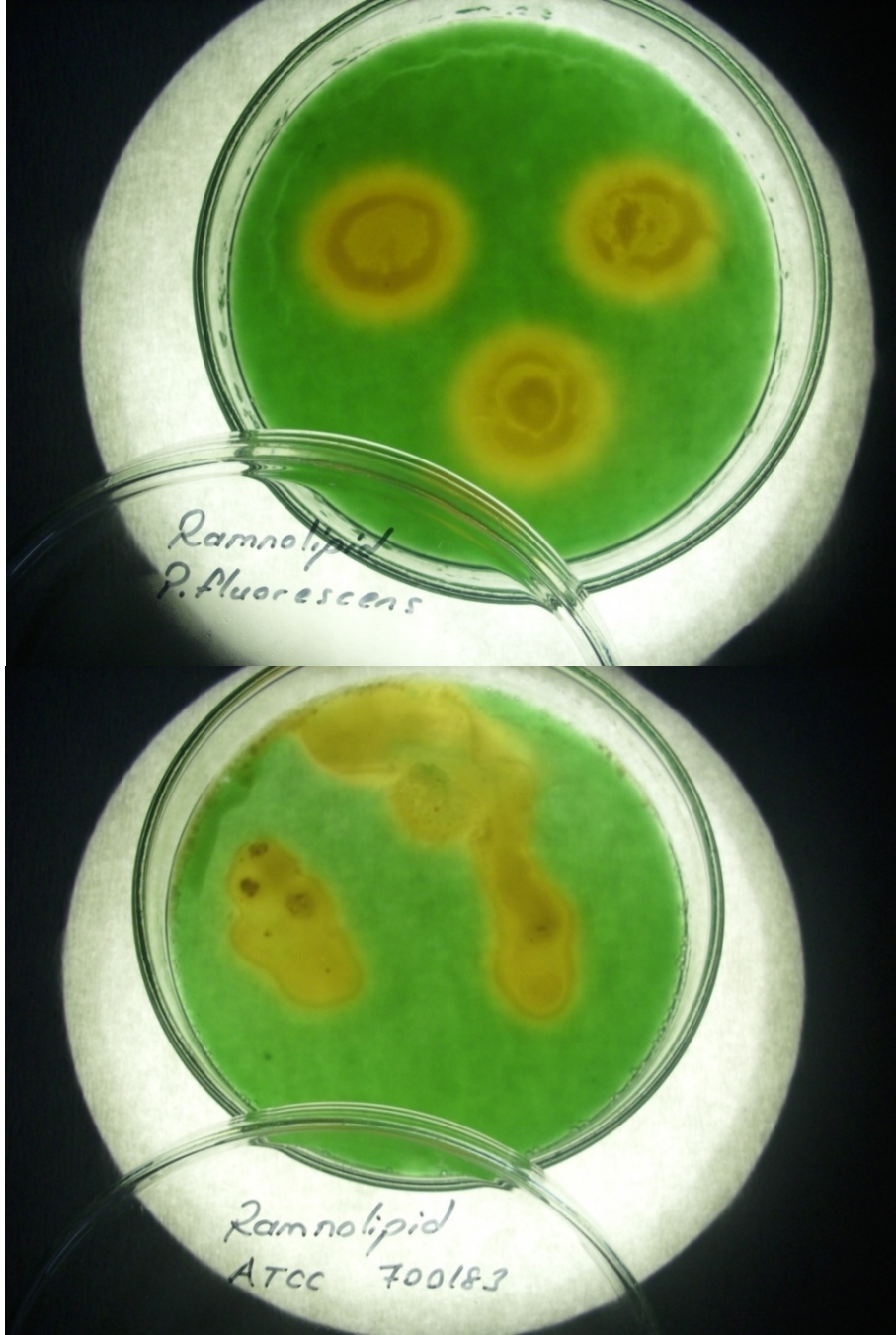
<i>Y. ruckeri</i> 35	-
<i>Y. ruckeri</i> 36	-

4.3.3. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'de ramnolipid üretim testi ve bulgular

V. anguillarum, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri*' de yapılan ramnolipid testi sonuçları Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Sonucunda *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* ve *Y. ruckeri* suşlarında ramnolipid üretimi tespit edilmemiştir. *P. fluorescens* ve *A. hydrophila* suşlarının ise ramnolipid ürettiği görülmüştür (Şekil 4.20.). Pozitif kontrol *P. aeruginosa* PAO1 suşunun yeşil renkli M9-glutamat minimal medium agar üzerinde sarı renk vererek zon oluşturmaması ve negatif kontrol LBB'nin herhangi bir renk değişimi ile zon oluşumu göstermeyerek verdiği ramnolipid cevabı Şekil 4.19.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Pozitif kontrol olarak kullanılan *P. aeruginosa* (PAO1) suşunun M9-glutamat minimal medium agar üzerindeki sarı renk ve zon oluşumuyla ramnolipid üretimi ve negatif kontrol steril LBB



Şekil 4.20. *P. fluorescens* F1 ve *A. hydrophila* ATCC 700183 suşlarında M9-glutamat minimal medium agar üzerindeki sarı renkli zon oluşumuyla rhamnolipid üretimi

Çizelge 4.3. Ramnolipid üretimi için test sonuçları

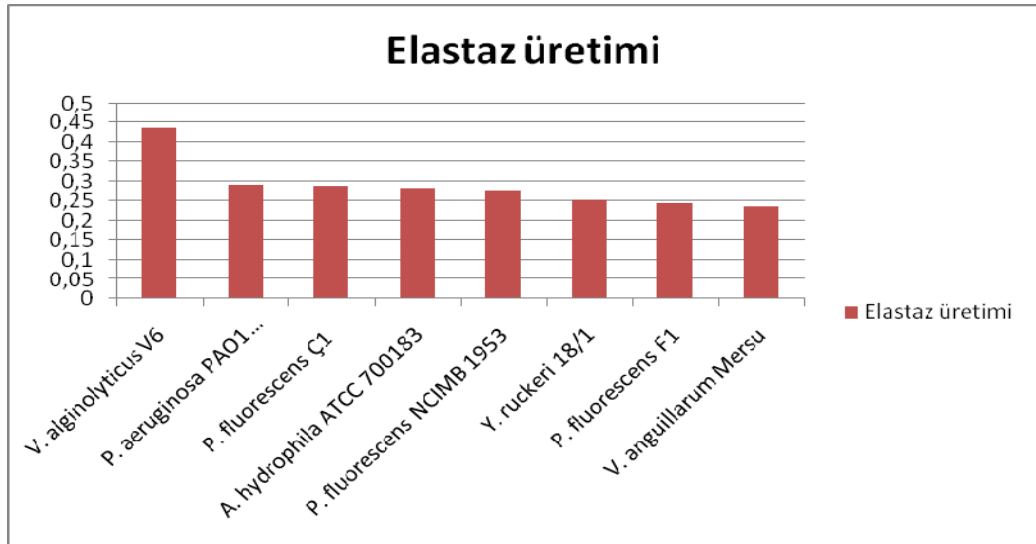
Suş Adı	Ramnolipid aktivitesi
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	+
<i>V. anguillarum</i> ATCC	-
<i>V. anguillarum</i> A4	-
<i>V. anguillarum</i> A6	-
<i>V. anguillarum</i> İstanbul levrek	-
<i>V. anguillarum</i> Mersu	-
<i>V. alginolyticus</i> ATCC	-
<i>V. alginolyticus</i> V5	-
<i>V. alginolyticus</i> V6	-
<i>P. fluorescens</i> Ç1	+
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 1953	+
<i>P. fluorescens</i> F1	+
<i>A. hydrophila</i> ATCC 700183	+
<i>A. hydrophila</i> İ1	+
<i>Y. ruckeri</i> Yavuzlar	-
<i>Y. ruckeri</i> 15	-
<i>Y. ruckeri</i> 17	-
<i>Y. ruckeri</i> 18/1	-
<i>Y. ruckeri</i> 18/2	-
<i>Y. ruckeri</i> 28	-
<i>Y. ruckeri</i> 29/1	-
<i>Y. ruckeri</i> 30	-
<i>Y. ruckeri</i> 33	-
<i>Y. ruckeri</i> 34	-

Çizelge 4.3. (devam)

<i>Y. ruckeri</i> 35	-
<i>Y. ruckeri</i> 36	-

4.3.4. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'de elastaz testi ve bulgular

V. anguillarum, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri*' de yapılan elastaz testi sonuçları Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir. Sonucunda pozitif kontrolün optik yoğunluğuna bakılarak *V. alginolyticus* (V6) suşunda yüksek elastaz aktivitesinin olduğu bulunurken *P. fluorescens* (Ç1 ve NCIMB 1953), *A. hydrophila* (ATCC 700183), *P. fluorescens* (F1), *V. anguillarum* (Mersu) ve *Y. ruckeri* (18/1) suşlarının daha az elastaz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyel balık patojenlerinin elastaz testinde optik yoğunlukları Şekil 4.21.'de gösterilmiştir.



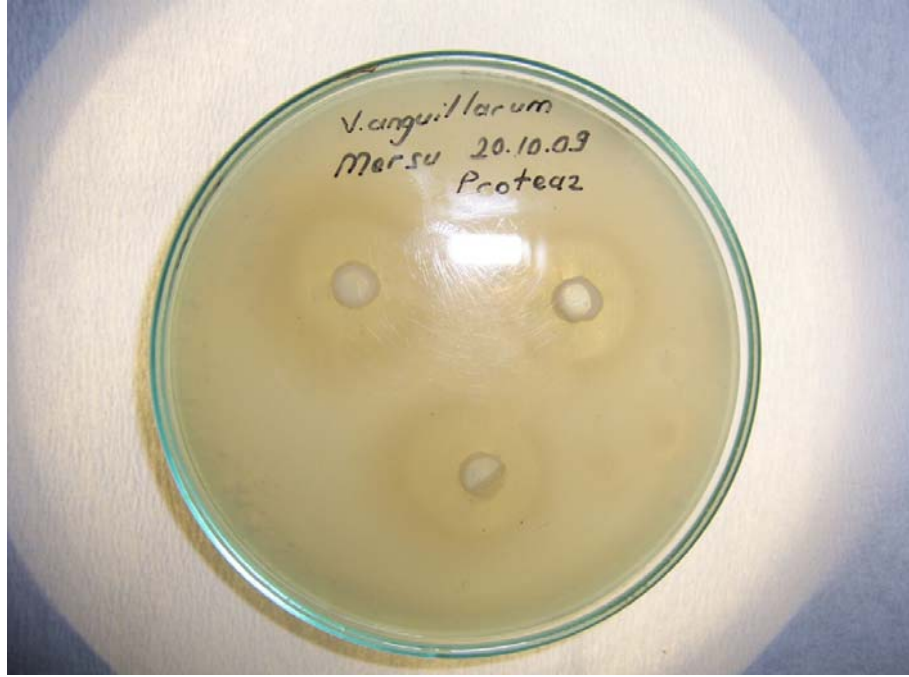
Şekil 4.21. *P. aeruginosa* PAO1 (+kontrol), *V. anguillarum* (Mersu), *V. alginolyticus* (V6) *P. fluorescens* (NCIMB 1953, Ç1, F1), *A. hydrophila* (ATCC 700183), *Y. ruckeri* (18/1) suşlarında elastaz üretiminin grafik gösterimi

Çizelge 4.4. Elastaz üretimi için test sonuçları

Bakteriyel suşlar	Elastaz üretimi OD ₆₃₀ (nm)
<i>V. alginolyticus</i> V6	0,436
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (+kontrol)	0,292
<i>P. fluorescens</i> Ç1	0,290
<i>A. hydrophila</i> ATCC 700183	0,284
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 1953	0,277
<i>Y. ruckeri</i> 18/1	0,254
<i>P. fluorescens</i> F1	0,247
<i>V. anguillarum</i> Mersu	0,236

4.3.5. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'de proteaz testi, zon çapları ve bulguları

V. anguillarum, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri*'de yapılan proteaz testi sonuçları Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Sonucunda *V. alginolyticus*, *Y. ruckeri* suşlarında proteaz tespit edilmemiştir. *P. fluorescens* suşlarından iki suшта proteaz testi pozitif iken bir suşun negatif olduğu görülmüştür. *V. anguillarum* ve *A. hydrophila* suşlarının tümüne proteaz varlığı fenotipik olarak tespit edilmiştir (Şekil 4. 22.). *V. anguillarum* suşlarında proteaz aktivitesinin diğer suşlardan fazla olduğu görülmüştür. Zon çaplarına bakılarak proteaz virülens faktörünün *V. anguillarum* (A6) suşunda en fazla olduğu görülürken *P. fluorescens* (Ç1 ve NCIMB 1953) suşları *V. anguillarum* suşlarını takip etmektedir. *A. hydrophila* (İ1 ve ATCC 700183) suşlarının ise proteaz aktivitesi bakımından son sırada yer aldığı görülmüştür.



Şekil 4. 22. *V. anguillarum* Mersu suşunda proteaz zonu

Çizelge 4.5. Proteaz aktivitesi için well diffusion agar testi sonuçları

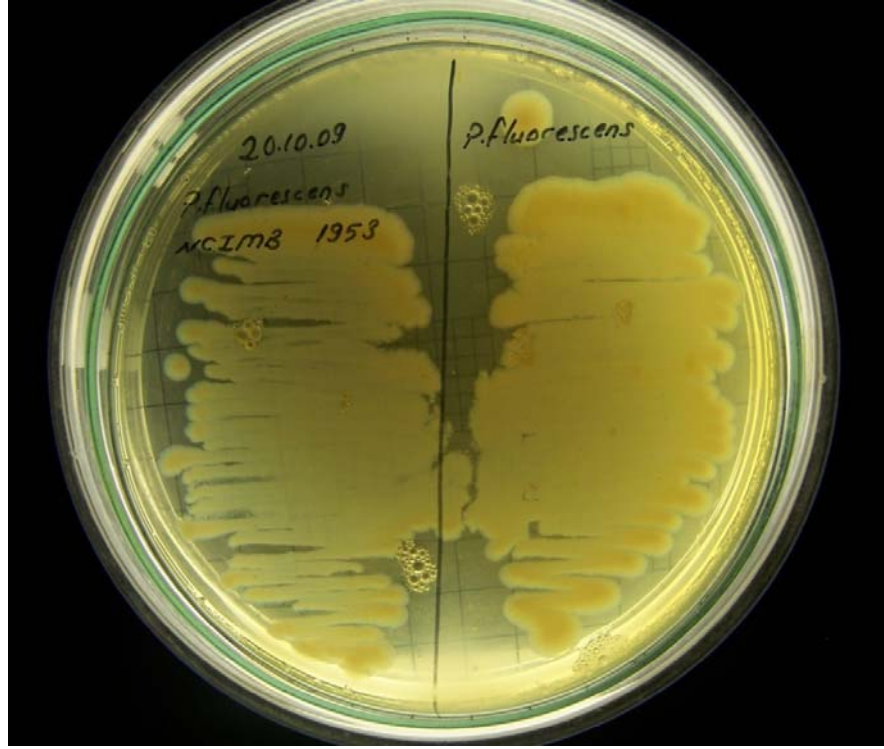
Suş Adı	Oluşan ortalama zon çapı (mm)
<i>V. anguillarum</i> ATCC	12,3
<i>V. anguillarum</i> A4	16
<i>V. anguillarum</i> A6	18
<i>V. anguillarum</i> İstanbul levrek	16
<i>V. anguillarum</i> Mersu	17
<i>V. alginolyticus</i> ATCC	-
<i>V. alginolyticus</i> V5	-
<i>V. alginolyticus</i> V6	-
<i>P. fluorescens</i> Ç1	13,3
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 1953	14,6
<i>P. fluorescens</i> F1	-
<i>A. hydrophila</i> ATCC 700183	11,6
<i>A. hydrophila</i> İ1	13

Çizelge 4.5. (devam)

<i>Y. ruckeri</i> Yavuzlar	-
<i>Y. ruckeri</i> 15	-
<i>Y. ruckeri</i> 17	-
<i>Y. ruckeri</i> 18/1	-
<i>Y. ruckeri</i> 18/2	-
<i>Y. ruckeri</i> 28	-
<i>Y. ruckeri</i> 29/1	-
<i>Y. ruckeri</i> 30	-
<i>Y. ruckeri</i> 33	-
<i>Y. ruckeri</i> 34	-
<i>Y. ruckeri</i> 35	-
<i>Y. ruckeri</i> 36	-

4.3.6. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'de amilaz testi ve bulgular

V. anguillarum, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'de yapılan amilaz testi sonuçları Çizelge 4.6.'de verilmiştir. Sonucunda *Y. ruckeri* suşlarında amilaz tespit edilmemiştir. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *A. hydrophila* ve *P. fluorescens* suşlarının tümünde ise amilaz testi pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.23. ve Şekil 4.24.).



Şekil 4. 23. *P. fluorescens* (Ç1 ve NC1MB 1953) suşlarında lugol solüsyonu damlatılmadan önce amilaz aktivitesi



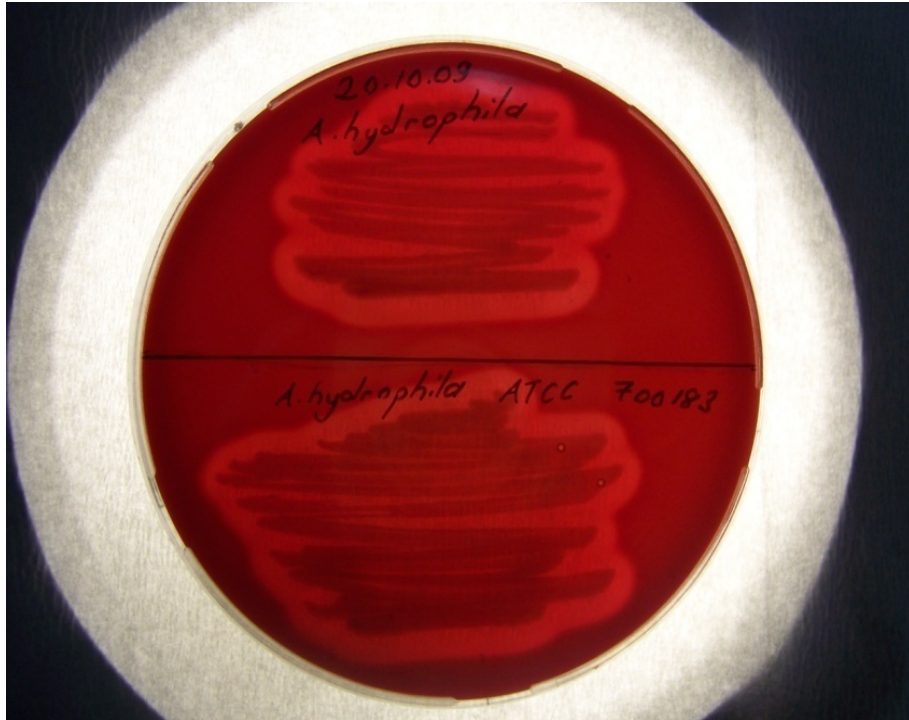
Şekil 4. 24. Lugol solüsyonu damlatılmış *A. hydrophila* (ATCC 700183 ve İ1) suşlarında net amilaz zonu oluşumu

Çizelge 4.6. Amilaz aktivitesi için test sonuçları

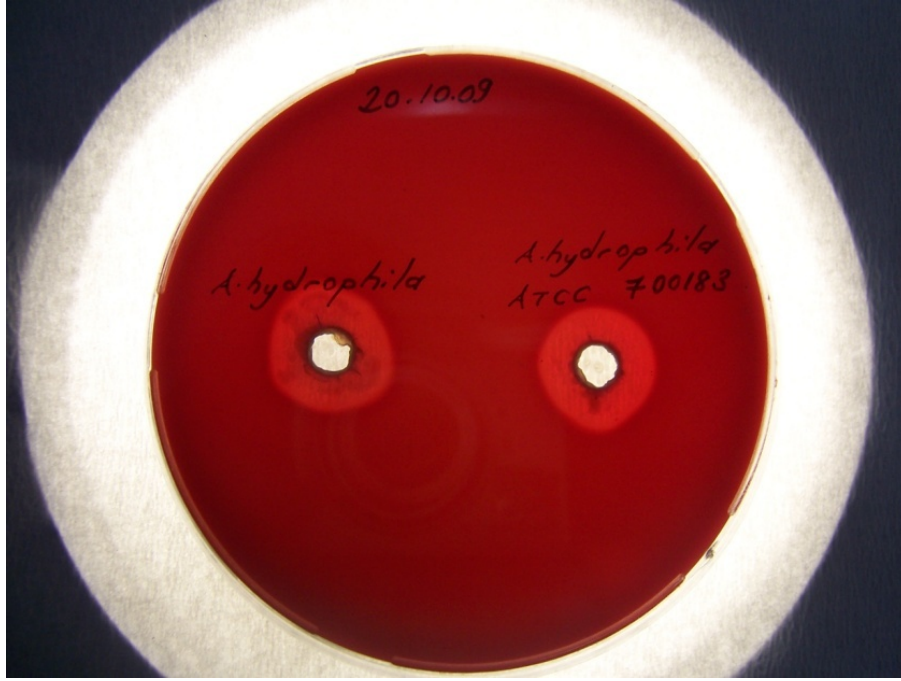
Suş Adı	Amilaz aktivitesi
<i>V. anguillarum</i> ATCC	+
<i>V. anguillarum</i> A4	+
<i>V. anguillarum</i> A6	+
<i>V. anguillarum</i> İstanbul levrek	+
<i>V. anguillarum</i> Mersu	+
<i>V. alginolyticus</i> ATCC	+
<i>V. alginolyticus</i> V5	+
<i>V. alginolyticus</i> V6	+
<i>P. fluorescens</i> Ç1	+
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 1953	+
<i>P. fluorescens</i> F1	+
<i>A. hydrophila</i> ATCC 700183	+
<i>A. hydrophila</i> İ1	+
<i>Y. ruckeri</i> Yavuzlar	-
<i>Y. ruckeri</i> 15	-
<i>Y. ruckeri</i> 17	-
<i>Y. ruckeri</i> 18/1	-
<i>Y. ruckeri</i> 18/2	-
<i>Y. ruckeri</i> 28	-
<i>Y. ruckeri</i> 29/1	-
<i>Y. ruckeri</i> 30	-
<i>Y. ruckeri</i> 33	-
<i>Y. ruckeri</i> 34	-
<i>Y. ruckeri</i> 35	-
<i>Y. ruckeri</i> 36	-

4.3.7. *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Y. ruckeri*'de hemoliz testi, zon çapları ve bulguları

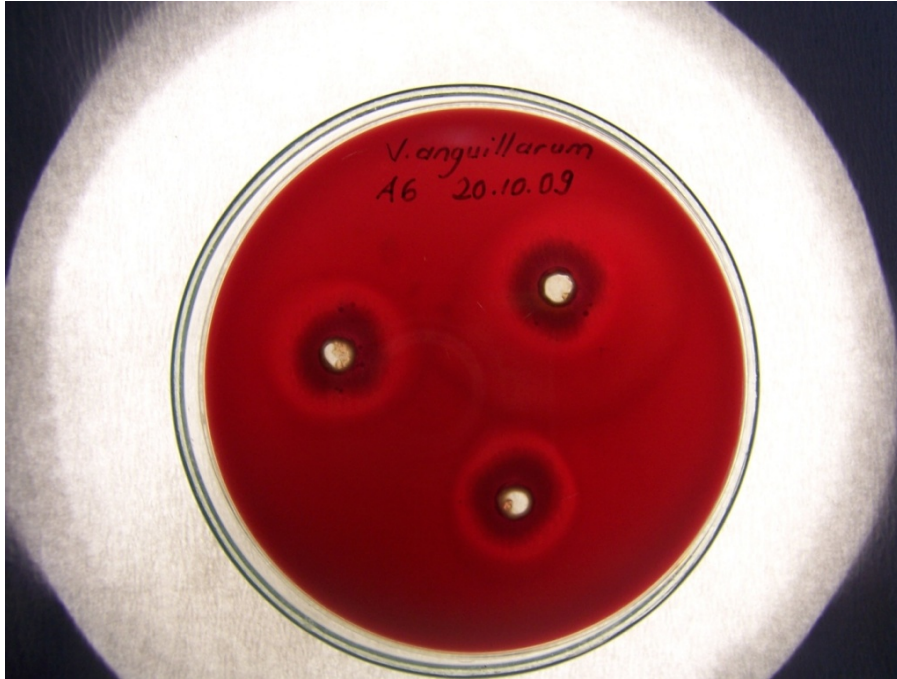
V. anguillarum, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri*'de yapılan hemoliz testi sonuçları Çizelge 4.7.'de verilmiştir. Sonucunda *V. alginolyticus*, *Y. ruckeri* suşlarında hemoliz virülens faktörü tespit edilmemiştir. *V. anguillarum*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* suşlarının tümünde ise hemoliz virülens faktörü tespit edilmiştir (Şekil 4.26. ve Şekil 4.27.). (*A. hydrophila*) İ1 suşunda hemoliz aktivitesinin en yüksek seviyede olduğu görülmüş ve zon çap seviyelerinin sırasıyla (*A. hydrophila*) ATCC 700183, (*V. anguillarum*) A6, ATCC, A4, Mersu, İst. Levrek, (*P. fluorescens*) Ç1, F1 ve NCIMB 1953 suşlarında olduğu görülmüştür. Aynı zamanda hemoliz aktivitesi için çizgi tarzında da ekimler yapılmış ve sonuçların well difüzyon testiyle aynı olduğu görülmüştür (Şekil 4.25.).



Şekil 4.25. *A. hydrophila*'da, çizgi ekiminde hemoliz zonu



Şekil 4.26. *A. hydrophila* (İl ve ATCC 700183) suşlarında well difüzyon testinde hemoliz zonu



Şekil 4.27. *V. anguillarum* (A6) suşunda, well difüzyon testinde hemoliz zonu

Çizelge 4.7. Hemoliz aktivitesi için well diffusion agar testi sonuçları

Suş Adı	Oluşan ortalama zon çapı (mm)
<i>V. anguillarum</i> ATCC	14,6
<i>V. anguillarum</i> A4	14
<i>V. anguillarum</i> A6	15,3
<i>V. anguillarum</i> İstanbul levrek	12
<i>V. anguillarum</i> Mersu	12
<i>V. alginolyticus</i> ATCC	-
<i>V. alginolyticus</i> V5	-
<i>V. alginolyticus</i> V6	-
<i>P. fluorescens</i> Ç1	11
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 1953	8
<i>P. fluorescens</i> F1	9
<i>A. hydrophila</i> ATCC 700183	16
<i>A. hydrophila</i> İ1	17
<i>Y. ruckeri</i> Yavuzlar	-
<i>Y. ruckeri</i> 15	-
<i>Y. ruckeri</i> 17	-
<i>Y. ruckeri</i> 18/1	-
<i>Y. ruckeri</i> 18/2	-
<i>Y. ruckeri</i> 28	-
<i>Y. ruckeri</i> 29/1	-
<i>Y. ruckeri</i> 30	-
<i>Y. ruckeri</i> 33	-
<i>Y. ruckeri</i> 34	-
<i>Y. ruckeri</i> 35	-
<i>Y. ruckeri</i> 36	-

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Birçok mikroorganizma türü sosyal bir davranış sergilemektedir. Üretmiş oldukları sinyal molekülleri aracılığı ile birbirleri ile iletişim kurmakta, belirli bir çoğunluğa ulaşp ulaşmadıklarını izlemekte ve yeter çoğunluğa ulaştıkları anda da virülens faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetiklemektedir. Böylelikle, konağın bağışıklık sistemini zamanından önce uyararak başarılı bir infeksiyon sürecini oluşturmaktadır (Saraçlı, 2006).

Bakterilerin kullandıkları sinyallerin yapay sinir ağları ile olan benzerlikler göze çarpmaktadır. Bakterilerin bir sinir ağı özelliklerinin birçoğunu barındırdığı bulgusundan hareketle bakteriler için düşük düzeyde bir zeka yapısı söz konusu olabilir (Hellingwerf, 2005).

Çevreyi algılama taraması için tüm hücrelerde çok yararlı ve pratik bir yaklaşım olan özel bakteriyel biyosensörler kullanılarak yapılan fenotipik biyoassay testlerinden yararlanılmaktadır. Bu yöntem oldukça hassastır ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography [HPLCs]) ile yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry [LC-MS]) gibi kapsamlı enstrümantasyon (cerrahi aletlerle yapılan çalışma) araştırması gerektirmez (Kawaguchi et al., 2008). Bu çalışmada da bakterilerde çevreyi algılama sistemi fenotipik testlerle yapılmıştır.

İzolatlarda öncelikle BHL ve OdDHL sinyal moleküllerinin üretimi, *C. violaceum* CV026 ve *A. tumefaciens* NT1 indikatör suşları kullanılarak araştırılmıştır. *C. violaceum* CV026 suşu kullanılarak yapılan testlerde *A. hydrophila*'da, *Y. ruckeri* suşlarının BHL sinyal molekülünü ürettiğinin tespit edilirken *V. anguillarum*'un, *V. alginolyticus*'un, *P. fluorescens* suşlarının ise üretmediği tespit edilmiştir. BHL sinyal molekülünü üretmeyen suşlar ve üreten suşların tamamının *A. tumefaciens* NT1 suşu kullanılarak yapılan testte ise OdDHL sinyal molekülünü üretebildiklerini göstermiştir. Araştırmada çalışılan tüm Gram negatif bakteriyel balık patojenlerinde OdDHL sinyal molekülünü üretebildiklerinin tespitiyle bu bakteriyel balık patojenlerinde çevreyi algılama sisteminin varlığı ortaya konmuştur. Testin prensibine göre renk değişimine bakılarak söz konusu balık patojenlerinin

çevreyi algılama sistemini kullandığı ispatlanmıştır. Bakterilerdeki çevreyi algılama sistemi; bakterilerin kendi arasında oluşturduğu operasyonun ta kendisi olup yeterli çoğunluğa ulaştıklarını algılayarak virülens faktörlerini aynı anda aktifleştirmelerini sağlayan bir sistemdir.

Daha önce ki araştırmalarda, balık patojenlerinden *A. hydrophila* BHL ve HHL, *A. salmonicida* BHL ve HHL, *V. anguillarum* (Milton et al. 1997) ODHL, *V. harveyi* OHBHL ve AI-2, *V. vulnificus* AL-2, *V. fischeri* (Williams, 2007) 3-Oxo-C6-HSL, *P. fluorescens* (Allison et al., 1998) HHL, *P. fluorescens* (Williams, 2007) 3-Oxo-C10-HSL sinyal moleküllerinin varlığı bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmalar ile *A. hydrophila*'da BHL, *V. anguillarum*'da ODHL suşlarındaki sonuçlar benzerlik göstermiştir. Ancak Temperano et al. (2001)'de, *Y. ruckeri*'de sinyal moleküllerinin varlığının belirlenmediği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada kullanılan *Y. ruckeri* suşlarında BHL ve ODHL'nin varlığı tespit edilmiştir. Bununla beraber bildirilen çalışmalardan farklı olarak *P. fluorescens* suşlarında BHL tespit edilmiştir.

Çevreyi algılama aracılığı ile kontrol edilen davranış biçimleri, ancak bir grup bakteri tarafından gerçekleştirildiğinde fonksiyonel olabilmektedir. Bu davranış biçimleri arasında bazı *Vibrio* türlerinde ışık oluşturulması, *P. aeruginosa*'da biyofilm yapımı, *Photorhabdus luminescences*'de antibiyotik üretimi, ayrıca değişik tür bakterilerde çeşitli virülens faktörlerinin sekresyonu, sporülasyon, konjugasyon ve pigment üretimi sayılabilir (Xavier and Bassler, 2003).

Adezyon ve biyofilm oluşumunun, çevresel koşullara ve kullanılan biyofilm araştırmasının tipine göre tek başına veya birbiriyle uyum içinde hareket eden birden çok bakteriyel faktörün katılımını gerektiren karmaşık bir mekanizma olduğu görüşü giderek daha fazla kabul görmektedir (Willems and Bonten, 2007). Bu denli karmaşık bir yapının oluşumu, hücreler arasında iletişimi gerekli kılmaktadır; bu iletişim, bakteriler tarafından, konsantrasyona bağımlı bir biçimde bakteriyel genlerin düzenlenmesinde değişikliğe yol açan küçük moleküllerin salınması ve bağlanması aracılığıyla gerçekleşir. Bu moleküller, DNA alışveriş sinyalleşmesi ve toksin yapımı gibi çeşitli işlevlere sahiptirler (Post et al., 2008). Biyofilm özelliklerinden bazıları; keratinositlere tutunma, çevreyi algılama genlerinin

ekspresyonu ve *in vitro* biyofilm oluşturma sayılabilir (Wang et al., 2005; Post et al., 2008).

Balıklarda ciddi virölans oluşturarak çeşitli dokularda zararlara sebep olan bakteriyel patojenlerden *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens* suşlarının tümünde fenotipik olarak biyofilm oluşumunun pozitif olduğu belirlenmiştir. Biyofilm oluşumunu *A. hydrophila*'da (Swift et al. 1997; Swift et al., 1999; Lynch et al., 2002), *V. alginolyticus* (Ye et al., 2008) suşlarında, *V. anguillarum* (Croxatto et al., 2002) suşlarında ele almışlardır. Bununla birlikte *P. fluorescens*'in (Gün ve Ekinci, 2009) LapA yüzey proteini aracılığıyla biyofilm oluşumunda dönüşümsüz, tutunma aşamasında ise destekleme fonksiyonlarını oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bildirilen bu çalışmalardaki *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *P. fluorescens* suşlarındaki biyofilm oluşumu araştırmamızda da benzerlik göstermiştir.

Kjelleberg et al. (1997), *C. violaceum* pigment üretimini fenotipik olarak düzenlediğini bildirmişlerdir. Araştırmamızda *C. violaceum* suşu bildirilen bu çalışmayla benzerlik göstermiş ve aynı zamanda bu suş pigment aranan balık patojenlerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Croxatto et al. (2002), yaptıkları kapsamlı bir çalışmayla *V. anguillarum* suşlarında tirozinle pigment tespitini belirtmişlerdir. Yaptığımız alışmada *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* ve *P. fluorescens* suşlarının tamamında tirozinin pigment üretimini artırdığı optik yoğunluklarla görülmüştür. Ağarda yapılan çalışma da *P. fluorescens*'in bir suşu ve *P. aeruginosa* PAO1 tirozini saydamlaştırmıştır. Testteki saydamlaşma gösteren bakteriyel balık patojenlerinde tirozin aminoasidinin pigment üretimini uyardığı sonucuna varılmıştır.

Çevreyi algılama sistemi, besin kaynaklarının yetersiz olduğu durumlarda ramnolipid üretimini uyararak besin kaynaklarının bulunduğu ortamlara doğru bakterinin hareket etmesini sağlar (Ulusoy, 2007; Göze 2009). İnsan patojeni olan *P. aeruginosa* PAO1 suşuna özđü bir virölans faktörü olan ramnolipid aktivitesi *P. aeruginosa* PAO1 suşu pozitif kontrol olarak kullanılan bu testte, bakteriyel balık patojenlerinden *P. fluorescens* ve *A. hydrophila* suşlarının da tümünün ramnolipidi ürettiği tespit edilmiştir. Ancak *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* ve *V. alginolyticus* suşları ramnolipid

testine cevap vermemiştir. *P. aeruginosa* PAO1 suşuna özgü bir diğer virülans faktörü olan elastaz aktivitesi *P. aeruginosa* PAO1 pozitif kontrol suşunun olarak kullanılan bu testte, pozitif kontrolün OD değerine bakılarak bakteriyel balık patojenlerinden *V. anguillarum*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* suşlarında daha az elastaz aktivitesine rastlanırken *V. alginolyticus* suşlarında yüksek seviyede elastaz aktivitesine rastlanmıştır.

Ye et al. (2008), *V. alginolyticus* suşlarını çalışıp bazı proteazların üretiminin çevreyi algılama sisteminde LuxS tarafından gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Ancak araştırdığımız *V. alginolyticus* suşları proteazı üretmemiştir. Balıklarda hastalık oluşumuna zemin hazırlayan ciddi virülens faktörlerinden biri olan proteaz; *A. hydrophila*, *V. anguillarum*'un tüm suşlarında ve *P. fluorescens* (Ç1 ve NCIMB 1953) suşlarında tespit edilirken bu aktiviteye *V. alginolyticus* suşlarında ve *P. fluorescens*'in bir suşunda rastlanmamıştır.

Swift et al. (1997), *A. hydrophila* ve *A. salmonicida* üzerinde yaptıkları bir çalışmada proteaz aktivitesinin pozitifliğiyle çevreyi algılama sisteminin bu bakterilerde olduğu belirtmiştir. İncelenen *A. hydrophila* suşlarında da proteaz sonuçları pozitifdir.

A. hydrophila, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus* ve *P. fluorescens*'in tüm suşlarında amilaz aktivitesi tespit edilmiştir. Ancak çalışılan *Y. ruckeri* suşlarında amilaz aktivitesi yoktur. Hatha et al. (2005), izole ettikleri hareketli *Aeromonas* suşlarının kanlı besiyerinde β -hemoliz oluşturdıklarını yaptıkları çalışmayla bildirmiştir. *A. hydrophila*, *P. fluorescens* ve *V. anguillarum*'un tüm suşlarında tespit edilen hemoliz aktivitesi balıklarda hastalık oluşumuna zemin hazırlayan ciddi virülens faktörlerindendir.

Araştırmacılar DNA'larına yüklenen programla bakterileri birbirleriyle iletişime sokarak yaptıkları deneyde, milyarlarca bakterinin topluca aynı komutu yerine getirdiğini belirtmişlerdir. Bilim insanları birbirleriyle iletişim kurabilen milyarlarca bakterinin aynı anda yönetilebileceğini ve belli görevlere yönlendirilebileceğini belirtmektedirler. Gelecekte akıllı biyolojik cihazların günlük yaşama da

yansıyacağını işaret etmektedirler. Akıllı biyolojik cihazların başarıyla tıp alanı başta olmak üzere, doku rejenerasyonunda dahi kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Aleksandra, 2010).

Balıklarda hastalık yapabilmek için bakteriyel patojenler birbirlerini sinyal molekülleri ile hissederek istedikleri çoğunluğa ulaştıklarını anladıkları anda virülens faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetikler ve konak üzerindeki etkisini gösterirler. En basit yapıları canlılardan biri olarak bilinen bakterilerin sistemleşmiş milyarlarca hücreden oluşan balıklarda hastalık oluşturarak doğal ortamda ve yetiştiricilik ünitelerinde nasıl ciddi kayıplara sebep olduğu sorusunun cevaplarından birisi: çevreyi algılamadır. Hatta çevreyi algılamanın kontrolündeki en etkili virülens faktörü olan biyofilm; cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin salgıladıkları mukoz yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşan, “mikroplar şehri” (Watnick and Kolter, 2000) olarak nitelenmiştir. Bütün bunlar ne akıllıca davrandıklarını ispatlar niteliktedir. Çevreyi algılama bakterilerin düşünerek hareket ettiklerinde bir göstergesidir. Aralarındaki bakteriyel iletişimin kesilmesi balıklar üzerindeki olumsuz etkilerini de büyük oranda bitirecektir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde iyi bir yönetim için alternatif stratejiler olan probiyotiklerin uygulanması (Gatesoupe, 1999; Verschuere et al., 2000), immunostimulantlar (Sakai, 1999) ve aşılar (Newman, 1993; Gudding et al., 1999; Heppell and Davis, 2000) gibi antimikrobiyeller başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak bu metotlara alternatif yeni metotlara gereksinim vardır çevreyi algılama da bunlardan bir tanesidir (Defoirdt et al., 2004).

Bakteriyel patojenitenin hücumunda, bakteriyel çevreyi algılama karmaşık olduğu için (Wu et al., 2000; Kendall and Sperandio, 2007; Boyen et al., 2009), bakteriyel patojenler tarafından üretilen sinyal molekülleri, bakteriyel infeksiyonların takibi ve teşhis için biyolojik işaretleyicilerdir (Kumari et al., 2008; Boyen et al., 2009). Çevreyi algılama sinyal moleküllerinin tespiti, bakteriyel infeksiyonları belirlemek için bir araç olarak, çok erken bir safhada daha yararlı olabilir. Şu anda önemli

veteriner bakteriyel patojenlerin çevreyi algılama sinyal moleküllerinin belirlendiği mevcut olan raporlar bulunmamaktadır (Boyen et al., 2009).

Bakteri kadar küçük bir canlının tek gücü genleridir. Çevreyi algılama genlerinin ekspresyonuna hükmeden bir sistem olduğuna göre bu alanda çalışmaların artırılması çevreyi algılama ile ilgili her sorunun detaylıca araştırılması bakteri dünyasındaki infeksiyon gücünün azaltılması su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıktan korunmanın alternatif bir metodu olarak önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Akova, M., 2005. Bakteriler Arası İletişimin Engellenmesi: Umut Vaadeden Yeni Bir Antibakteriyel Tedavi Yaklaşımı. *Ankem Derg*, 19(Ek 2):126-128.
- Aleksandra, D., 2010. The Dawn of the Living, Talking Robots. *The Journal of Young Investigators: An Undergraduate, Peer-Reviewed Science Journal*. 19(22), <http://www.jyi.org>. <http://www.jyi.org/features/ft.php?id=285>. Erişim Tarihi:03.05.2010.
- Allison, D.G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A., Gilbert, P., 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 179-184.
- Altun, H.U., Şener, B., 2008. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 82-88.
- Anguita, J., Rodríguez-Aparicio, L.B., Naharro, G., 1993. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Appl Environ Microbiol.*, 59(8), 2411-2417.
- Arda, M., 1997. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, Medisan Yayın Serisi No:25, 490s. Ankara.
- Austin, B., Austin, D.A., 1999. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish, Second edition. Ellis Horwood Limited Chichester, 457, U.K.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moor, D., Seidman, J., Smith, J. Stauhle, K., 1988. Current Protocols in Molecular Biology. New York: Wiley Intersciences.
- Aydın, M., 2004. Bakteri İdentifikasyonunda Kullanılan Standart, Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler. Ed. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel Mikrobiyoloji. Konu 11. 91-110s. Güneş Yayınevi, Ankara.
- Baskın, H., 2005. Mikroorganizmanın Çevreye Uyumu ve Biyofilm: "Quorum Sensing" (Çoğunluğu Algılama). *Klinik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi*. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, 9-10.
- Baylan, O., Yılmaz, S., 2004. İntestinal ve Ekstraintestinal İnfeksiyonların Bir Etkeni: *Aeromonas*. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 34, 262-272.
- Boşgelmez-Tınaz, G., 2003. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Turk J Biol*, 27, 85-93.
- Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2009. Quorum sensing in veterinary pathogens:

Mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary Microbiology*, 135, 187-195.

- Brint, J. M., Ohman D. E., 1995. Synthesis of multiple exoproducts in *P. aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol*, 177, 7155-7163.
- Bruhn, J. B, Dalsgaard, I., Nielsen, K. F., Buchholtz, C., Larsen J. L., Gram L., 2005. Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in Gram-negative fish pathogenic bacteria. *Diseases of Aquatic Organisms*, Vol. 65, 43-52.
- Cao, J.G., Meighen, E.A., 1989. Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *J Biol Chem* 264, 21670-21676.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D., Farrand, S.K., 1998. Production of acylhomoserine lactone signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact*, 11, 1119-1129.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P., 1999. Bacterial Biofilms: A common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284, 1318-1322.
- Croxatto, A., Chalker, V.J., Lauritz, J., Jass, J., Hardman, A., Williams, P., Camara, M., Milton D.L., 2002. VanT, a Homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, Regulates Serine, Metalloprotease, Pigment and Biofilm Production in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, 184(6), 1617-1629.
- Çiftçi, Z., 2005. Kronik Tonsillit Biofilmin Rolü. T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi, 69s, İstanbul.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P., Verstraete, W., 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, 240, 69-88.
- Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2005. The impact of mutations in the quorum sensing systems of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* on their virulence towards gnotobiotically cultured *Artemia franciscana*. *Environmental Microbiology*, 7(8), 1239-1247.
- Demirkan, E., 2009. *Bacillus subtilis* α -amilaz Enziminin Nisasta Granüllerine Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi. U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi (Journal of Agricultural Faculty of Uludag University), 23 (1), 13-19.
- Donabedian, H., 2003. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases, *Journal of Infection* 46, 207-214.

- Dong, Y., Zhang, X., Soo, H.L., Greenberg, P., Zhang, L., 2005. The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *P. aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 56, 1287-1301.
- Donlan, R. M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.
- Ekici, S., 2010. Gökkuşığı Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Vibriosis'e Karşı Aşı Uygulanmasının Bağışıklık Sistemine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 112s, Isparta.
- Farrand, S.K., 1998. Conjugation in Rhizobiaceae. In: *The Rhizobiaceae, Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria* (Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J., Eds.), 199-233. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Fussenegger, M., 2010. Synchronized bacterial clocks. *Nature, News & Views*, 463, 301-302.
- Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- Gawande, B.N., Patkar, A.Y., 2001. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 735-743.
- Givskov, M., De Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactonemediated prokaryotic signaling. *J Bacteriol.*, 178(22), 6618-6622.
- Göze, E.Y., 2009. Çeşitli Bitki Ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa*'da Çevreyi Algılama Sistemi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 64s, Isparta.
- Gudding, R., Lillehaug, A., Evensen, Ø., 1999. Recent developments in fish vaccinology. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 72, 203-212.
- Gülay, Z., 2010. İnfeksiyon Patogenezi. *Solunum Sistemi Enfeksiyonları*, 11-47, <http://www.toraks.org.tr>, http://www.toraks.org.tr/toraks-kitap-pdf/solunum_sistemi_PDF/03.pdf. Erişim Tarihi: 14.04.2010.
- Gün, İ., Ekinci, F.Y., 2009. Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda, Derleme/Review*, 34(3), 165-173.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T., Fogarty, W.M., 1999. Purification and properties of the raw starch degradin amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Biotechnol. Lett.*, 21, 111-115.

- Hardman, A.M., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1998. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 74, 199-210.
- Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., Julie Joice Christol, G., 2005. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, 98(2), 131-134.
- Hellingwerf, K.J., 2005. Bacterial observations: a rudimentary from of intelligence?. *Trends in Microbiology*, 13(4), 152-158.
- Henke, J.M., Bassler, B.L., 2004. Quorum Sensing Regulates Type III Secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 186(12), 3794-3805.
- Henke, J.M., Bassler, B.L., 2004. Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology* 14(11), 648-656.
- Heppell, J., Davis, H.L., 2000. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 43, 29-43.
- Hoiby, N., 2002. New antimicrobials in the management of cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 235-238.
- Jangid, K., Kong, R., Patole, M.S., Shouche, Y.S., 2007. *luxRI* homologs are universally present in the genus *Aeromonas*. *BMC Microbiology*, 7:93, 1-11.
- Jones, S., Yu, B., Bainton, N.J., Birdsall, M., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Cox, A.J.R., Golby, P., Reeves, P.J., Stephens, S., Winson, M.K., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1993. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO Journal*, 12(6), 2477-2482.
- Karatuna, O., Yağcı, A., 2008. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing (Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and quorum sensing). *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 38 (1), 42-51.
- Kawaguchi, T., Chen, Y.P., Norman, R.S., Decho, A.W., 2008. Rapid Screening of Quorum-Sensing Signal *N*-Acyl Homoserine Lactones by an In Vitro Cell-Free Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3667-3671.
- Kendall, M.M., Sperandio, V., 2007. Quorum sensing by enteric pathogens. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23, 10-15.
- Kjelleberg, S., Steinberg, P., Givskov, M., Gram, L., Manefield, M., De Nys, R., 1997. Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems?. *Aquat. Microb. Ecol.*, 13, 85-93.

- Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P., de Vos, V.M., 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 24, 895-904.
- Kumari, A., Pasini, P., Daunert, S., 2008. Detection of bacterial quorum sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1619-1627.
- Laue, B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S., Hardman, A., Downie, J.A., O'Gara, F., Williams, P., 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology*, 146, 2469-2480.
- Ljungh, A., Wretling, B., Möllby, R., 1981. Separation and Characterization of Enterotoxin and Two Haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, 89B(1-6), 387-397.
- MacIntyre, S., Buckley, J.T., 1978. Presence of Glycerophospholipid:Cholesterol Acyltransferase and Phospholipase in Culture Supernatant of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Bacteriology*, 135(2), 402-407.
- McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143, 3703-3711.
- Meluleni, G.J., Grout, M., Evans, D.J., Pier, G.B., 1995. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *The Journal of Immunology*, 155(4), 2029-2038.
- Middleton, B., Rodgers, H.C., Camara, M., Knox, A.J., Williams, P., Hardman, A., 2002. Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiol Lett*, 207, 1-7.
- Mikrobiyoloji, 2010. Genel İdentifikasyon Testleri. <http://www.mikrobiyoloji.org>. <http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210013601.pdf>. Erişim Tarihi: 28.04.2010.
- Milton, D.L., Hardman, A., Camara, M., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P., 1997. Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the vanI/vanR locus and identification of the autoinducer N-(3-oxodecanoyl)-l-homoserine lactone. *J. Bacteriol.*, 179, 3004-3012.

- Milton, D.L., 2006. Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification International Journal of Medical Microbiology, 296, 61-71.
- Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W., 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. J Bacteriol, 104, 313-22.
- Newman, S.G., 1993. Bacterial vaccines for fish. Annu. Rev. Fish Dis., 3, 145-185.
- Ohman, D.E., Cryz, S.J., Iglewski, B.H., 1980. Isolation and characterization of a *P. aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. J Bacteriol, 142, 836-842.
- OpenWetWare, 2010. IGEM:IMPERIAL/2006/project/Oscillator/Design, Quorum Sensing/Quenching. <http://www.openwetware.org>.
<http://openwetware.org/wiki/IGEM:IMPERIAL/2006/project/Oscillator/Design>. Erişim Tarihi:13.04.2010
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H., 1993. Expression of *P. aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. Science, 260, 1127-1130.
- Pessi, G., Haas, D., 2000. Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorumsensing regulators LasR and RhlR in *P. aeruginosa*. J Bacteriol, 182, 6940-6949.
- Polaina, J., MacCabe, A.P., 2007. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Springer. The Netherlands.
- Post, J.C., Hiller, N.L., Nistico, L., Stoodley, P., Ehrlich, G.D., 2008. Biyofilmlerin otolaringolojik infeksiyonlardaki rolü:2007 yılına ait bir güncelleme. Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery, 2(1), 52-58.
- Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., Terleckyj, O.D., Young, J.M., 2005. Bacterial Communication (“Quorum Sensing”) via Ligands and Receptors: A Novel Pharmacologic Target for the Design of Antibiotic Drugs. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 312 (2), 417-423.
- Rasch, M., Buch, C., Austin, B., Slierendrecht, W.J., Ekmann, K.S., Larsen, J.L., Johansen, C., Riedel, K., Eberl, L., Givskov, M., Gram, L., 2004. An Inhibitor of Bacterial Quorum Sensing Reduces Mortalities Caused by Vibriosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). System. Appl. Microbiol., 27, 350-359.
- Ravn, L., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M., Gram, L., 2001. Methods for acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their

application in studies of AHL-production kinetics. Journal of Microbiological Methods, 44, 239-251.

Rodkhuma, C., Hirono, I., Crosab, J.H., Aoki, T., 2005. Four Novel Hemolysin Genes Of *Vibrio anguillarum* And Their Virulence To Rainbow Trout. Microbial Pathogenesis 39, 109-119.

Sakai, M., 1999. Current status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172, 63-92.

Sakarya, S., 2005. Biyofilm Yapısı ve İnfeksiyon Hastalıklarının Virülans ve Tedavisindeki Rolü. Klimik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aydın, 3-8. <http://klimikdergisi.org/sayilar/65/3-8.pdf>.

Salyers, A.A., Whitt, D.D., 1994. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 1st ed. Washington, D.C: ASM Press, 260-268, USA.

Saraçlı, M.A., 2006. "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?. Gülhane Tıp Dergisi, 48(4), 244-250.

Sequences, 2008. Bakteri hücreleri arasında haberleşme (Cell-to-cell communication: quorum sensing). <http://www.genotyping.wordpress.com>. <http://genotyping.wordpress.com/2008/05/12/bakteri-hucreleri-arasinda-haberlesme-cell-to-cell-communication-quorum-sensing/>. Erişim Tarihi: 28.03.2010.

Sharma, A., Sahgal, M., Johri, B.N., 2003. Microbial communication in the rhizosphere: Operation of quorum sensing, Current Science, 85(8), 1164-1172.

Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., JR., Rinehart, K.L., and Farrand, S.K., 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 6036-6041.

Siegmund, I., Wagner, F., 1991. New methods for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth in mineral agar. BioTechniques, 5, 265-268.

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.

Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomas, J.M., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P., 1999. Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*. Infection and Immunity, 67 (10), 5192-5199.

- Swift, S., Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E. L., Winson, M.K., Chhabra, S.R., Williams, P., Macintyre, S., Stewart, G.S.A.B., 1997. Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the LuxRI Homologs AhvRI and AsaRI and Their Cognate N-Acylhomoserine Lactone Signal Molecules. *Journal of Bacteriology*, 179 (17), 5271-5281.
- Temprano, A., Yugueros, J., Hernanz, C., Sánchez, M., Berzal, B., Luengo, J.M., Naharro, G., 2001. Rapid identification of *Yersinia ruckeri* by PCR amplification of yruI–yruR quorum sensing, *Journal of Fish Diseases*, 24(5), 253-261.
- Ulusoy, S., 2007. Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretiminin Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 100s, Isparta.
- Valiente, E., Bruhn, J.B., Nielsen, K.F., Larsen, J. L., Roig, F.J., Gram, L., Amaro, C., 2009. *Vibrio vulnificus* produces quorum sensing signals of the AHL-class. *FEMS Microbiol Ecol*, 69, 16–26.
- Van Delden, C., Iglewski, B., 1998. Cell-to-cell signaling and *P. aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis*, 4, 551-560.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 655-671.
- Wang, E.W., Jung, J.Y., Pashia, M.E., Nason, R., Scholnick, S., Chole, R.A., 2005. Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Strains as Competent Biofilm Formers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 131, 983-989.
- Watnick, P., Kolter, R., 2000. Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2675-2679.
- Whitby, P.W., Landon, M., Coleman, G., 1992. The cloning and nucleotide sequence of the serine protease gene (*aspA*) of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*. *FEMS Microbiology Letters*, 99(1), 65-71.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., Salmond, G.P.C., 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 365-404.
- Whiteley, M., Lee, K.M., Greenberg, E.P., 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *P. aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci (PNAS) USA*, 96, 13904-13909.
- Wikipedia, 2010. Proteaz. <http://www.wikipedia.org>.
<http://tr.wikipedia.org/wiki/Proteaz>. Erişim Tarihi:17.03.2010.
- Wikipedia, 2010. Biyofilm. <http://www.wikipedia.org>.
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biofilm.jpg>. Erişim Tarihi: 29.03.2010.

- Wikipedia, 2010. Pigment. <http://www.wikipedia.org>.
<http://tr.wikipedia.org/wiki/Pigment>. Erişim Tarihi:12.04.2010.
- Wikipedia, 2010. Vir lans. <http://www.wikipedia.org>.
<http://tr.wikipedia.org/wiki/Vir%C3%BClans>. Erişim Tarihi: 11.04.2010.
- Williams, P., 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 153, 3923-3938.
- Williams, P., Camara, M., Hardman, A. Swift, S., Milton, D., Hope, V.J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D.I., Bycroft, B.W., 2000. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci*, 355, 667-680.
- Willems, R.J.L., Bonten, M.J.M., 2007. Glikopeptide dirençli enterokoklar: vir lans, direnç ve epidemiye ait  zellikler. *Current Opinion in Infectious Diseases T rk e Baskı*, 2(3).
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J.B., Heydorn, A., Mathee, K., Moser, C., Eberl, L., Molin, S., H iby, N., Givskov, M., 2000. Detection of *N*-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology- (UK)* 146, 2481-2493.
- Xavier, K.B., Bassler, B.L., 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol*, 6, 191-197.
- Yamamoto, K., Zhang, Z.Z., Kobayashi, S., 2000. Cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase degrades intact granules of potato raw starch. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 962-966.
- Ye, J., Ma, Y., Liu, Q., Zhao, D.L., Wang, Q.Y., Zhang, Y.X., 2008. Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Journal of Fish Diseases*, 31, 161-169.
- Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., Farrand, S.K., Winans, S.C., 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.*, 182, 3885-3895.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nurdan NURCAN

Doğum Yeri ve Yılı: Isparta 07.06.1986

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Isparta Şaik Lisesi 2002-2003

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi 2004-2008

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı 2008-2010

