

**T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENDÜSTRİYEL SİSTEMLERDE İSTENMEYEN
BİYOFİLMLERE NEDEN OLAN GRAM NEGATİF
BAKTERİLERİN VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN VE
QUORUM SENSİNG İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZÜHAL ZORLU

**OCAK 2014
MUĞLA**

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ENDÜSTRİYEL SİSTEMLERDE İSTENMEYEN
BİYOFİLMLERE NEDEN OLAN GRAM NEGATİF
BAKTERİLERİN VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN VE
QUORUM SENSİNG İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZÜHAL ZORLU

OCAK 2014
MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

ZÜHAL ZORLU tarafından hazırlanan ENDÜSTRİYEL SİSTEMLERDE İSTENMEYEN BİYOFİLMLENE NEDEN OLAN GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN VE QUORUM SENSİNG İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI başlıklı tezinin, 09/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

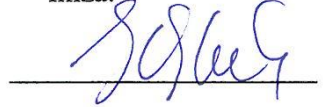
Doç. Dr. Nur CEYHAN GÜVENSEN (Danışman) (Jüri Başkanı)
Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Doç. Dr. Evrim ÖZKALE (Üye)
Biyoloji Anabilim Dalı, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Nurdan SARAÇ (Üye)
Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

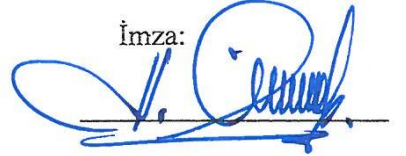
İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK
Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla
Doç. Dr. Nur CEYHAN GÜVENSEN
Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



İmza:



Savunma Tarihi: 09/01/2014

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Zühal Zorlu

09/01/2014



ÖZET

ENDÜSTRİYEL SİSTEMLERDE İSTENMEYEN BİYOFİMLERE NEDEN OLAN GRAM NEGATİF BAKTERİLERİN VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN VE QUORUM SENSİNG İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Zühal ZORLU

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nur CEYHAN GÜVENSEN

Ocak 2014, 137 sayfa

Bu çalışmada, endüstriyel sistemlerde istenmeyen biyofilm oluşturan Gr(-) bakterilerde quorum sensing (QS) sisteminin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda; N-açıl homoserin lakton (AHL) sinyal moleküllerinin tespiti ve QS sisteminin etkisi altında olan virülans faktörlerinden biyofilm, pigment, ramnolipit, proteaz, amilaz, fosfolipit, DNaz, üreaz, koagülaz, clumping faktör, esterase, kayma, yüzme, titreme ve hemoliz üretimi araştırılmıştır. Biyofilm oluşturan izolatların belirlenmesinde standart tüp yöntemi ve mikropilaka yöntemleri olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon testi ile izolatların kloramfenikol, sulbaktam/sefoperazon, imipenem, amoksillin/klavulanik asid, streptomisin ve tetrasikline direnç durumları araştırılmıştır. AHL sinyal moleküllerinden bütanol homoserin lakton (BHL) sinyal molekülü varlığının tespit edilmesinde TLC plaka yöntemi kullanılmış ve QS yanıtlarının belirlenmesinde mikropilaka yöntemi ve referans suşlar kullanılarak fenotipik testlerle incelemeler yapılmıştır.

Günümüzde klinik olarak önemli patojen bakterilerin kontrolü ve önlenmesi açısından bu bakterilerin patogenezi ve stratejileri ile ilgili araştırmalara ihtiyaç duyulmakta ve buna bağlı olarak enfeksiyonlara sıklıkla neden olan Gr(-) bakteri türlerinin patogenezinde rol alan virülans faktörleri halen araştırılmaktadır. Buradan yola çıkarak, bu tezde çeşitli endüstriyel sistemlerde istenmeyen biyofilm oluşturan Gr(-) bakterilerin virülans faktörleri incelenmiştir. Bunun nedeni bu bakterilerin bulundukları endüstriyel sistemlerden biyofilmden kopmalar, kaçak, sızıntı gibi çeşitli yollardan kontaminasyonlarla çevre ve halk sağlığı açısından önemli riskler oluşturabileceklerinin düşünülmesidir.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, Gr(-) bakteriler, virülans faktör, quorum sensing (QS)

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RELATION BETWEEN QUORUM SENSING AND VIRULENCE FACTORS OF UNWANTED BIOFILM-FORMING GRAM NEGATIVE BACTERIA IN INDUSTRIAL SYSTEMS

Zühal ZORLU

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nur CEYHAN GÜVENSEN

January 2014, 137 pages

In this study has been aimed to investigation quorum-sensing (QS) of Gr(-) unwanted biofilm bacteria in industrial systems. In this including; we have been determined N-acyl homoserine lactone (AHL) and researched for the production of several virulence factors such as biofilm formation, pyocyanine, pigmentation, rhamnolipit, protease, amylase, phospholipit, DNase, urease, coagulase, clumping factor, esterase, swarming, swimming, twitching and hemolyse controlled via AHL-mediated QS in Gr(-) bacteria. We have been used qualitative method (standart biofilm ring test) and quantitative (microtiter plate) method for detection of biofilm production. In study aimed to investigate the in vitro activity of chloramphenicol, imipenem, streptomycin, sulbactam+cefoperazone, amoxycillin+clavulanicacid and tetracycline with discdiffusion method on biofilms bacteria. These isolates have been tested for production of BHL using TLC plate method and have been tested for AHLs in QS with microtiter plate and repertor strains.

In this time, controled and prevent most important clinic isolates and needed to investigate their pathological behaviors and strategy and isolated to cause infection Gr(-) bacteria. To result from this, this thesis has been aimed to investigation virulence factors of Gr(-) unwanted biofilm bacteria in industrial and waste watersystems. This case, thinking that these isolates their biofilm structure as fall off, leak, trickled from industrial systems.

Keywords: Biofilm, Gr(-) bacteria, virulence factor, quorum sensing (QS)

ÖNSÖZ

Eğitimimin her aşamasında sıcak ilgisini, anlayışını, desteğini ve bilgilerini benden esirgemeyen, tez çalışmalarımın büyük bir titizlikle yürütülmesini sağlayan, yerinde tespitlerine, tecrübelerine ve değerli görüşlerine her zaman saygı duyduğum, disiplini ve hoşgörüsü ile kendime her zaman örnek alacağım Değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Nur CEYHAN GÜVENSEN'e en derin saygı ve şükranlarımı sunar teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nın tüm imkânlarını kullanmam konusunda desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile desteklerini gördüğüm Değerli Hocalarım Prof. Dr. Aysel UĞUR'a, Yrd. Doç. Dr. Nurdan SARAÇ'a, Yrd. Doç. Dr. Özgür CEYLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Moleküler çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, karşılaştığım problemlerin çözümünde tecrübeleriyle ve değerli bilgileriyle destek olan Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her anında sabırla yanımda oldukları, maddi ve manevi desteklerini bana her an hissettirdikleri için canım annem, babam ve kız kardeşim Nihal ZORLU'ya, tezimin yazım aşamasında yardımlarından dolayı Tuncay KÖSE ve İbrahim TURAN'a, laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen Özge DURAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

BAP-012-82 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	1
1.1.1. Virülans ve Virülans Faktörler	1
1.2. Kaynak Özetleri	5
1.2.1. Başlıca Virülans Faktörleri	5
1.2.1.1. Piyosiyanın.....	5
1.2.1.2. Ramnolipit.....	6
1.2.1.3. Proteaz	7
1.2.1.4. Fosfolipaz.....	9
1.2.1.5. Koagülaz	10
1.2.1.6. Esteraz.....	11
1.2.1.7. Üreaz	12
1.2.1.8. Amilaz	13
1.2.1.9. DNaz	13
1.2.1.10. Hemolitik aktivite	14
1.2.1.11. Kayma (swarming), yüzme (swimming), titreme (twitch) hareketi	14
1.2.1.12. Pigment üretimi.....	17
1.2.1.13. Antibiyotik dirençliği	18
1.2.1.14. Biyofilm oluşturma.....	20
1.3. Quorum Sensing (QS)	26

2. MALZEME VE YÖNTEM	36
2.1. Malzeme	36
2.1.1. Örneklerin toplanması.....	36
2.1.2. Besiyerleri	37
2.1.3. Kullanılan çözeltiler ve kimyasal maddeler.....	49
2.1.4. Kullanılan başlıca cihazlar	51
2.2. Yöntem	51
2.2.1. EPS üretici bakterilerin izolasyonu.....	51
2.2.2. İzolatların tanılamaları	52
2.2.2.1. Kültürel özellikler	52
2.2.2.2. Mikroskopik özellikler.....	52
2.2.2.3. Biyokimyasal özellikler	53
2.2.3. Moleküler tanılama: Genomik DNA izolasyonu, PZR ve 16SrRNA gen dizi analizi çalışmaları	56
2.2.4. Biyofilm oluşumunun tespiti.....	57
2.2.4.1. Biyofilm oluşumunun kalitatif tayini.....	57
2.2.4.2. Biyofilm oluşumunun kantitatif tayini.....	57
2.2.5. Biyofilm üretici bakterilerin QS yanıtlarının tespiti	58
2.2.5.1. İzolatların hazırlanması.....	58
2.2.5.2. <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 ve <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> NT1 referans suşlarının üretim ve depolanması	59
2.2.5.3. QS yanıtlarının tespiti	59
2.2.5.4. İnce tabaka kromatografi ile BHL sinyal moleküllerinin tespiti.....	60
2.2.5.5. <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal moleküllerinin üretiminin araştırılması.....	61
2.2.5.6. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal molekülünü üretiminin araştırılması	61
2.2.6. Virülans faktörlerin belirlenmesi	62
2.2.6.1. Pigment testi.....	62
2.2.6.2. Ramnolipit testi	62
2.2.6.3. Proteaz testi	63
2.2.6.4. Amilaz testi.....	63
2.2.6.5. Hemoliz testi.....	63
2.2.6.6. Fosfolipit testi	64

2.2.6.7. DNaz üretimi testi	64
2.2.6.8. Koagülaz üretimi testi	64
2.2.6.9. Clumping faktör testi.....	65
2.2.6.10. Esteraz testi.....	65
2.2.6.11. Üre hidrolizi testi	65
2.2.6.12. Slime faktör testi.	65
2.2.6.13. Kayma testi.....	66
2.2.6.14. Yüzme testi	66
2.2.6.15. Titreme testi	66
2.2.6.16. Antibiyotik hassasiyeti.....	67
3. BULGULAR VE İRDELEME.....	68
3.1. EPS Üretici Biyofilm Oluşturan Bakterilerin İzolasyonu	68
3.2. İzolatların Temel Kültürel ve Mikroskopik Özellikleri.....	68
3.3. Biyokimyasal Testler ile Tanılama.....	69
3.4. Seçici Besiyerlerine Göre Tanılama	69
3.5. Moleküler Yöntemlerle Tanılama.....	70
3.6. İzolatların Biyofilm Üretim Kapasiteleri.....	72
3.6.1. Biyofilm oluşumunun standart tüp yöntemi ile kalitatif tayini	72
3.6.2. Biyofilm oluşumunun mikropilaka cihazı ile kantitatif tayini	74
3.7. İzolatların Virülans Faktörleri Test Bulguları	82
3.7.1. Pigment tayini (Tirozin saydamlaştırma testi).....	82
3.7.2. İzolatların ramnolipit üretimi testi bulguları.....	83
3.7.3. İzolatların proteaz testi bulguları	84
3.7.4. İzolatların amilaz testi bulguları	86
3.7.5. İzolatların hemoliz testi bulguları	87
3.7.6. İzolatların fosfolipit hidrolizi bulguları	88
3.7.7. İzolatların DNaz üretimi bulguları.....	89
3.7.8. İzolatların koagülaz üretimi ve clumping faktör testi bulguları.....	90
3.7.9. İzolatların esteraz testi bulguları	91
3.7.10. İzolatların üreaz testi bulguları	92
3.7.11. İzolatların kayma, yüzme, titreme testleri bulguları	92
3.7.12. Antibiyotik duyarlılık bulguları	94
3.8. İzolatların QS Test Bulguları.....	96
3.8.1. QS yanıtları	96

3.8.2. İnce tabaka kromatografisi ile BHL sinyal moleküllerinin tespiti.....	98
3.8.3. <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal moleküllerinin üretimi	99
3.8.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal molekülünü üretimi	100
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	102
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ.....	138

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Patojen bakterilerde flajella hareketi konusunda oluşturulmuş yeni deneysel kanıtlar	15
Çizelge 1.2. Biyofilmlerle ilişkili medikal enfeksiyonlar	22
Çizelge 1.3. Başlıca endüstriyel, çevresel ve tarımsal biyofilm zararları	25
Çizelge 1.4. Gr(-) bakterilerde bulunan QS sistemleri ve bu sistemler tarafından kodlanan özellikler	32
Çizelge 1.5. QS sistemini kullanan bazı bakteriler ve bunların QS sisteminde rol alan homoserin lakton molekülleri.....	33
Çizelge 2.1. Çalışmada örneklemelerin yapıldığı tesislere ait kısımlar ve toplanan örnek tipi	36
Çizelge 3.1. İzolatların temel kültürel ve mikroskopik özellikleri.....	68
Çizelge 3.2. İzolatların biyokimyasal özellikleri	69
Çizelge 3.3. Bakterilerin seçici besiyerlerinde üreme durumları	69
Çizelge 3.4. İzolatların 16SrRNA gen dizilerinin BlastN analiz sonuçları.....	70
Çizelge 3.5. İzolatların TSB, ESP ve CRA besiyerlerinde biyofilm üretimi	72
Çizelge 3.6. Kullanılan besiyeri tipine göre, standart tüp yöntemi kullanılarak biyofilmi pozitif ve negatif bakteri sayıları ve yüzdeleri	74
Çizelge 3.7. İzolatların ESP besiyerinde biyofilm üretiminin mikropilaka cihazı ile kantitatif tayini	76
Çizelge 3.8. İzolatların LB besiyerinde biyofilm üretiminin mikropilaka cihazı ile kantitatif tayini	78
Çizelge 3.9. Mikropilaka yöntemi kullanılarak absorban ölçümlerine göre biyofilm negatif, orta derece ve kuvvetli biyofilm üretiminin saptandığı bakterilerin sayıları ve yüzdeleri	80
Çizelge 3.10. Biyofilm üretiminin belirlenmesinde kalitatif ve kantitatif tayin arasındaki ilişki	81
Çizelge 3.11. Pigment tespiti için agarda tirozin saydamlaştırma sonuçları.....	82
Çizelge 3.12. Ramnolipit üretimi sonuçları	83
Çizelge 3.13. İzolatların proteaz test bulguları ve zon çapları	84
Çizelge 3.14. Amilaz testi sonuçları	86
Çizelge 3.15. İzolatların hemoliz testi bulguları	87

Çizelge 3.16. İzolatların fosfolipit hidrolizi bulguları	88
Çizelge 3.17. İzolatların DNaz üretimi bulguları.....	89
Çizelge 3.18. Koagülaz testi ve clumping testi bulguları.....	90
Çizelge 3.19. İzolatların esterase testi bulguları.....	91
Çizelge 3.20. Üreaz testi bulguları.....	92
Çizelge 3.21. İzolatların kayma, yüzme, titreme testi bulguları	92
Çizelge 3.22. Antibiyotik duyarlılık bulguları	94
Çizelge 3.23. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları.....	94
Çizelge 3.24. İzolatların antibiyotik dirençlilik düzeyleri	94
Çizelge 3.25. QS yanıtı sonuçları.....	96
Çizelge 3.26. İnce tabaka kromatografisi ile BHL sinyal moleküllerinin tespiti sonuçları	98
Çizelge 3.27. <i>C. violaceum</i> CV026 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal molekülünün üretimi	99
Çizelge 3.28. <i>A. tumefaciens</i> NT1 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal molekülünün üretimi	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bakterilerde hücreler arası temel faktörler, hücre içi temel faktörler ve virülans faktörlerin sınıflandırılması.....	1
Şekil 1.2. Patojenik bakterilerdeki ana virülans faktörleri.....	2
Şekil 1.3. Gr(+) ve Gr(-) bakterilerde virülans faktörlere karşı yeni tedavi edici olası hedefler.....	4
Şekil 1.4. <i>P. aeruginosa</i> 'nın ürettiği piyosiyanın molekülü	5
Şekil 1.5. <i>P. aeruginosa</i> 'nın ürettiği ramnolipit molekülleri	6
Şekil 1.6. Bir yabancı cisim yüzeyinde oluşmuş biyofilm tabakasının elektron mikroskopik görüntüsü.....	2
Şekil 1.7. Biyofilm oluşum basamakları	24
Şekil 1.8. Quorum sensing mekanizmasını anlatan basitleştirilmiş dört model	28
Şekil 1.9. Quorum sensing ve sinyal moleküllerinin şematik gösterimi.....	29
Şekil 1.10. Homoserin lakton molekülleri	30
Şekil 2.1. <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	59
Şekil 3.1. PZR amplifikasyon sonucu elde edilen verilere göre izolatlar arasındaki genetik benzerlik	71
Şekil 3.2. Biyofilm tayini	73
Şekil 3.3. Biyofilm oluşumunun mikropalakalarda değerlendirilmesi	80
Şekil 3.4. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>A. hydrophila</i> ve 13 no'lu izolatın M9-glutamat minimal agar üzerindeki şeffaf zon oluşumuyla ramnolipit üretimi ve negatif kontrol <i>B. cereus</i>	83
Şekil 3.5. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>B. subtilis</i> 'in ve 8 no'lu izolatın %3 SMA üzerindeki şeffaf zon oluşumuyla proteaz üretimi ve negatif kontrol olarak kullanılan <i>B. megaterium</i>	85
Şekil 3.6. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>B. subtilis</i> 'in ve 8 no'lu izolatın %2 SMA üzerindeki şeffaf zon oluşumuyla proteaz üretimi ve negatif kontrol olarak kullanılan <i>B. megaterium</i>	85
Şekil 3.7. 8 no'lu ve 40 no'lu izolatların nişasta agar üzerindeki amilaz testi görüntüsü.....	86
Şekil 3.8. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>B. subtilis</i> ve negatif kontrol olarak kullanılan <i>S. facealis</i>	87

Şekil 3.9. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>E. aerogenes</i> 'in ve 40 no'lu izolatin DNaz test agar üzerindeki şeffaf zon oluşumuyla DNaz hidrolizi ve negatif kontrol olarak kullanılan <i>S. aureus</i> ve 13 no'lu izolat	89
Şekil 3.10. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>S. aureus</i> 'un ve 73 no'lu izolatin seyreltilmiş plazma içerisinde keçe oluşumuyla koagülaz üretimi ve negatif kontrol olarak kullanılan <i>E. aerogenes</i>	90
Şekil 3.11. Negatif kontrol olarak kullanılan <i>C. violaceum</i> suşu ve 13 no'lu izolat	91
Şekil 3.12. İzolatlara uygulanan kayma testi, yüzme testi, titreme testi pozitif sonuçları	93
Şekil 3.13. İzolatların MHA üzerindeki şeffaf zon oluşumuyla antibiyotik duyarlılık testi	95
Şekil 3.14. İzolatların QS yanıtları	96
Şekil 3.15. İzolatların TLC plaka üzerinde BHL sinyal molekülü tespiti	98
Şekil 3.16. <i>A. tumefaciens</i> NT1 referans suşu kullanılarak 8 no'lu izolatta pozitif AHL sinyal molekülünün üretimi ve 40 no'lu izolatta negatif AHL sinyal molekülü üretimi	100

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μL	mikrolitre
mL	mililitre
mm	milimetre
dk	dakika
gr	gram
kDA	kilodalton
Gr(-)	Gram Negatif
Gr(+)	Gram Pozitif
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
AHL	Açıl Homoserin Lakton
PLA	Fosfolipaz A
PLB	Fosfolipaz B
PLC	Fosfolipaz C
PLD	Fosfolipaz D
CRF	Coagulase Reacting Factor
$\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$	Üre
EPS	Ekstraselüler Polimerik Madde
CDC	Hastalık Kontrol Merkezi
QS	Quorum Sensing
AIPs	Oligopeptitler Otoindükleyici Peptitler
GYC Agar	Glukoz Maya Kazein Hidrolizatı Agar
EA	Enterococcus Agar
EMB	Eosin Metilen Mavisi Agar
SSA	Salmonella Shigella Agar
MSA	Mannitol Salt Fenol Kırmızı Agar
TSA	Tryptik Soy Broth

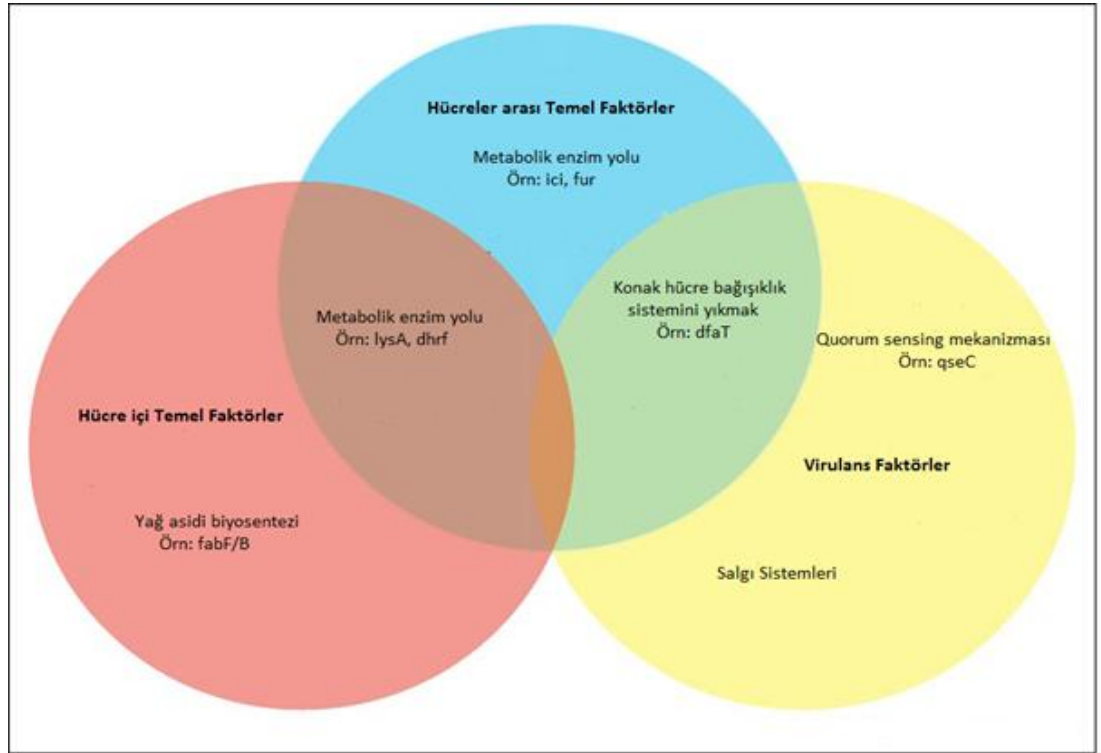
RZB	Rizobium Medium
LB	Luria-Bertani Medium
SMA	Skim Milk Agar
CRA	Slime Faktör Agar
BSA	Bizmut Sülfat Agar
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofez
PZR	Polimerik Zincir Reaksiyonu
BHL	N-Bütanol-L-Homoserin Lakton
X-Gal	5-Bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid
ATCC	American Type Culture Collection
OdDHL	N-(3-okzododekanol)-L-Homoserin Lakton
TLC	Thin Layer Chromatography
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
VP	Voges-Proskauer
KOH	Potasyum Hidroksit
O/F	Oksidatif/Fermentatif
C	Kloramfenikol
SCF	Sulbaktam/sefoperazon
Ipm	İmipenem
AMC	Amoksillin/Klavulanik asit
S	Streptomisin
TE	Tetrasiklin
S	Duyarlı
I	Orta Dirençli
R	Dirençli

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

1.1. Virülans ve Virülans Faktörler

Virülans, bir mikroorganizma grubu veya türü içerisinde hastalık oluşturma yeteneğinin (patojenitenin) derecesini tanımlamaktadır. Bakteriler taşıdıkları virülans faktörleri sayesinde konakçı savunmasına karşın enfeksiyon oluşturabilirler (Şekil 1.1.).

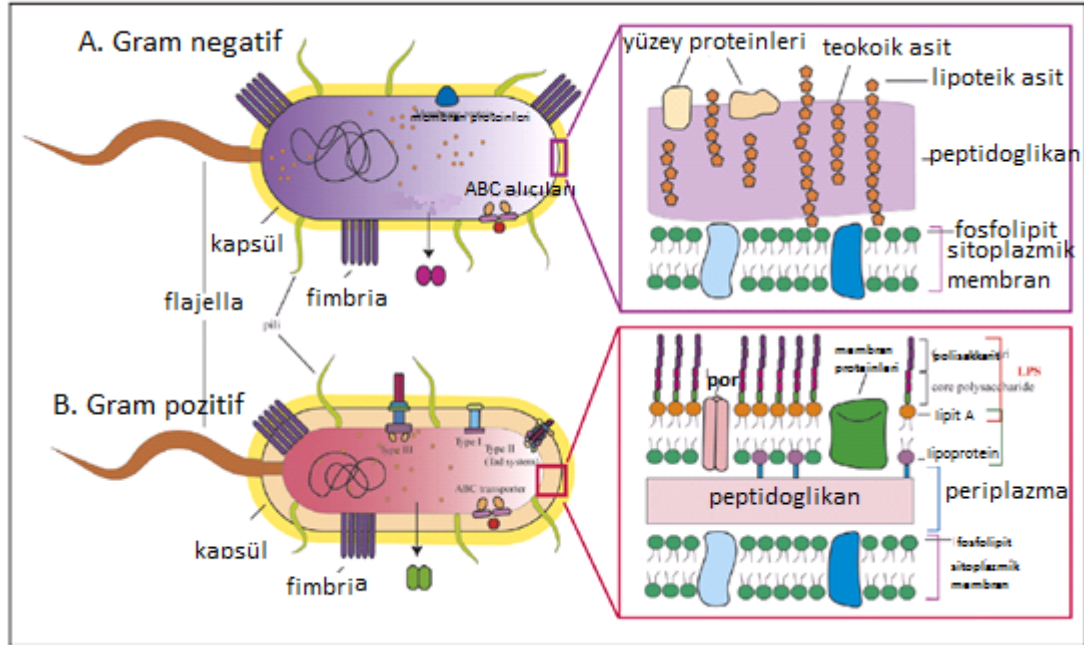


Şekil 1.1. Bakterilerde hücreler arası temel faktörler, hücre içi temel faktörler ve virülans faktörlerin sınıflandırılması (Barczak ve Hung, 2009)

Genel olarak iki özelliği kapsamaktadır:

- Mikroorganizmanın hastalık başlatabilme yeteneği (infektivite),
- Ortaya çıkan hastalığın şiddeti (derecesi).

Bu özellikler göz önüne alındığında patojen bir tür içerisinde az, orta ve çok virulan suşlar bulunabilmektedir. Bu değişkenliğin temel nedeni mikroorganizmanın içerdiği virülans faktörleridir (Şekil 1.2.) (Gülay, 2010).



Şekil 1.2. Patojenik bakterilerdeki ana virülans faktörleri (A) Gr(+) (B) Gr(-) bakteri (Hsing vd., 2008)

Mikrobiyal bir enfeksiyonun hızlı ilerleme ve gelişim süreci, mikroorganizmanın virülansı, konağın mikrobiyal kolonizasyonu veya konağın invazyona karşı koyma ile önleme yeteneği arasındaki mücadele olarak kabul edilmektedir. Patojenik bakteriler, konak hücrelere saldırmak ve enfeksiyona yol açmak üzere çeşitli stratejiler kullanırlar. Bu stratejiler konağın spesifik bir hücresinde hücre içi yaşama yeteneği veya tek bir toksin üretimi olabilir. Gr(-) veya Gr (+) bakterilerdeki virülans faktörler konak direnç mekanizmalarına karşı koyabilir, yanıltabilir, ağır hasar verebilir veya bu mekanizmaları inaktive edebilirler (Hube ve Naglik, 2001).

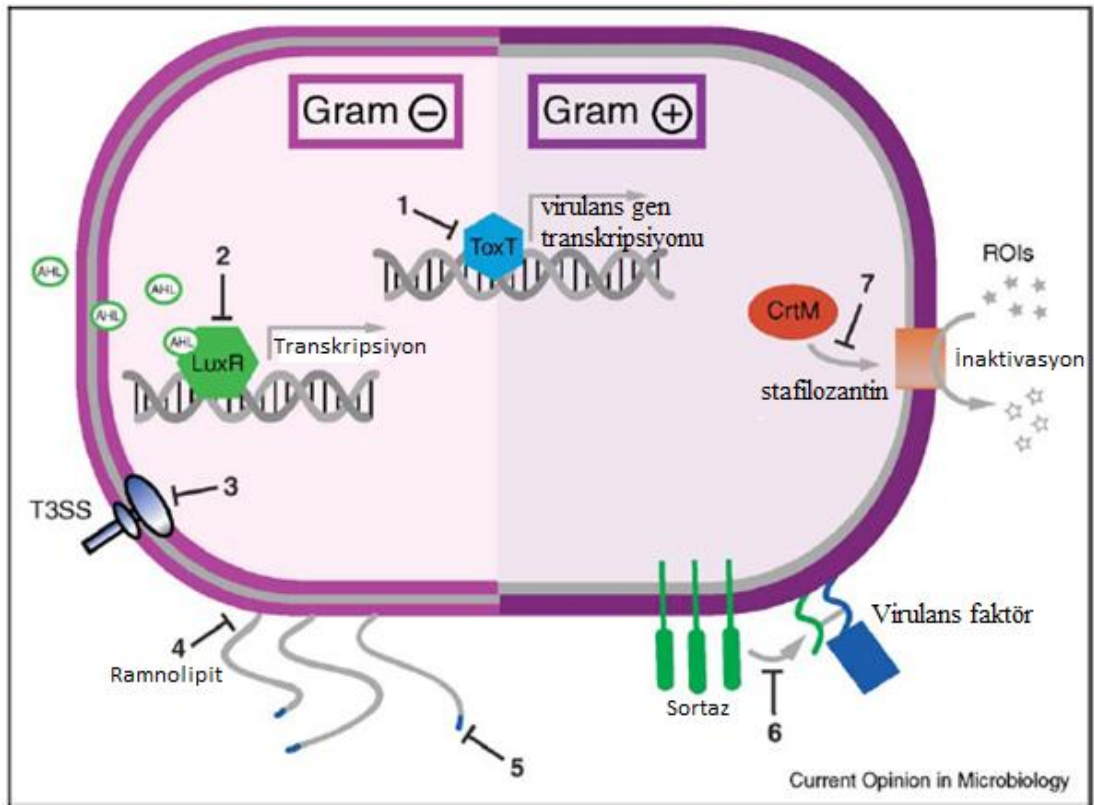
Bakteri organizmaya girdikten sonra genellikle epitel hücrelerine tutunur, daha sonra çoğalır. Bu aşamada bakteri virülans faktörleri hastalık oluşturma mekanizmasını belirler (Ruwandeeepika vd., 2011). Bazı bakteriler içeri girer, lenfatik sistem yoluyla kana karışır, kanda geçici veya kalıcı bakteriyemiye neden olur. Bakteriyemi sayesinde doku ve organa ulaşarak oralarda da çoğalır. Bazı bakteriler ise konakta tutunma işlemini başardıktan sonra orada kolonize olurlar. Daha sonra toksin salgılayarak hastalık oluşturlar (Anonim, 2013).

İlk grup için *Haemophilus influenzae* tip b enfeksiyonu örnek olarak verilebilir. *H.influenzae* tip b, sağlıklı insanların sadece %1-2'sinin normal floralarında bulunur. Konak tarafından alındıktan sonra kolonize olur ve translokasyon ile epitel hücrelerini geçerek kan dolaşımına katılmaktadır. Kapsül, doğal fagositoz ve kompleman etkisinden bakteriyi korumaktadır. Bakteri, kapsüle karşı gelişmiş antikoru olmayan bireylerde, epiglottit, menenjit ve pnömoniye neden olur. Bir başka örnek olarak *Vibrio cholerae* verilebilir. Polar flagellası sayesinde barsak yüzeyinde mukus tabakasını geçer ve pilileri ile epitel yüzeyine tutunur. Burada çoğalarak toksin salgılar ve hastalığa neden olur. Kana karışmaz. Toksin etkisi ile lümene su ve tuz atılımı sonucunda elektrolit bozukluğu ortaya çıkar (Anonim, 2013).

İnsanlarda sık olarak enfeksiyonlara neden olan *Salmonella* ve *Campylobacter*, hayvanlarda hastalık yapmadan bulunabilirler. İnsanlara hayvansal gıdalar ile bulaşırlar. Hayvanlarda hafif şiddette enfeksiyona yol açan bazı bakteriler insanlara bulaştıkları zaman çok daha şiddetli enfeksiyonlara neden olabilirler. Örneğin *Yersinia pestis*, kemirici ve bunların pirelerinde bulunur, insanlarda şiddetli hastalık yapar. Toprakta bulunan *Bacillus anthracis* hayvanları enfekte eder, hayvanlardan insanlara bulaşarak enfeksiyon hastalığına neden olur. Toprakta bulunan *Clostridium* türleri gıdaları kontamine edebilir, bütünlüğü bozulmuş deri ve yumuşak dokuda enfeksiyon meydana getirirler. Gastroenterit, botulizm, yara enfeksiyonu ve tetanoza neden olurlar. Hastalığın kliniği bulaşma yolunu da gösterir. Örneğin *Vibrio cholerae* su ile bulaşır ve şiddetli ishale neden olur. İshal ile ortama atılan bakteri su kaynağına ulaşır ise başka kimselerin de hastalanmasına neden olur. Benzer olarak *Escherichia coli* taşıyan atık sular ile yiyeceklerin kontamine olması sonucu ishal oluşur. *Mycobacterium tuberculosis* solunum sisteminde enfeksiyona neden olup damlacık yoluyla başka insanlara bulaşır. Birçok hastalık insanlar arasında eller ile bulaşır. El yıkama hastane enfeksiyonlarının geçişini engellemede en önemli yollardan birisidir. Bakterilerin insan vücuduna başlıca giriş yolları; deri ve mukozalar, solunum sistemi, gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistemdir. Bunların dışında kan, vertikal ve prenatal yol ile bulaşma olabilir (Anonim, 2013).

Virülans faktörleri, mikroorganizmaların konak savunma sistemleri tarafından elimine edilmelerini önlemek üzere oluşturulan mikrobiyal ürünlerdir. Gr(-) ve Gr(+) bakterilerdeki bazı virülans faktörleri Şekil 1.3.'de gösterilmiştir. Bu kapsamda, bakteriyel virülans faktörleri işlevlerine göre “kolonizasyonu başlatan ve ilerleten”

ve “konağa zarar veren” ürünler olarak sınıflandırılabilir. Bu faktörlerden bazıları; proteaz, fosfolipit, pigment, üreaz, ramnolipit, amilaz, hemoliz, DNaz, koagülaz, clumping faktör, esteraz, swimming, swarming, twitch ve antibiyotik dirençliliğidir (Huffnagle vd., 2000; Defoirdt vd., 2004; Natrah vd., 2011; Çerikçioğlu, 2012; Perie', 2013). Bir enfeksiyonun meydana gelebilmesi için, bu virülans faktörleri ile bakterilerin konakçıyı istila etmeleri, konakçı savunma sistemine galip gelmeleri, dokuda çoğalmaları ve hasar vermeleri gereklidir (Carter vd., 1991; Otlı, 2002).



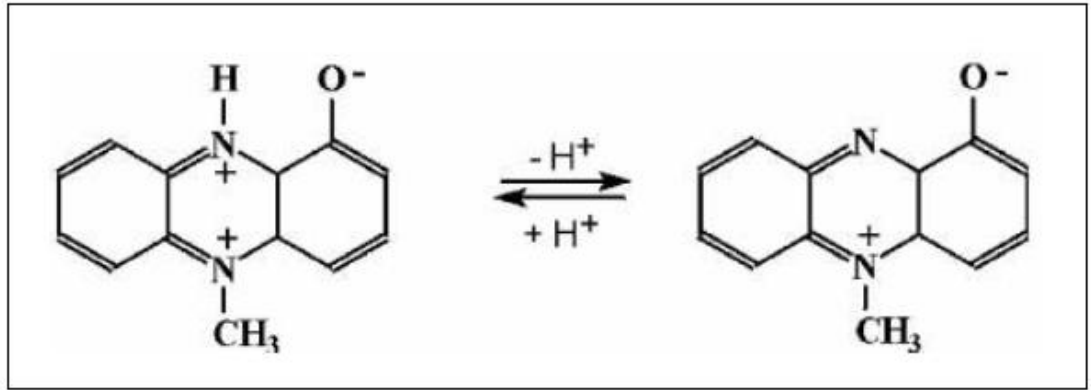
Şekil 1.3. Gr(+) ve Gr(-) bakterilerde virülans faktörlere karşı yeni tedavi edici olası hedefler (1) Toksin gen transkripsiyonu, örneğin, *V.cholera*'da ToxT-bağlı kolera toksini ve pilus toksini transkripsiyonu. (2) Quorum sensing, örneğin, Gr(-) organizmalarda düzenleyici LuxR transkripsiyonu ve açıl-homoserin laktonu (AHL) bağlaması. (3) Salgı sistemleri, örneğin, *S. typhimurium*'da tip III salgısı. (4) Ramnolipit, örneğin, *E.coli*'de fosfolipitleri çözer. (5) Tutunma, örneğin, *E. coli* kamçıların karbonhidrat yapısına tutunması. (6) Tutunma, örneğin, *S. aureus*'da sortaz aktivitesi. (7) Konak hücre bağışıklık sistemini yıkmak, örneğin, *S. aureus*'da CrtM üretimi sonucu stafiloanthin oluşumu (Barczak ve Hung, 2009)

1.2. Kaynak Özetleri

1.2.1. Başlıca Virülans Faktörleri

1.2.1.1. Piyosiyenin

Pek çok *Pseudomonas aeruginosa* suşu bakteriyel kolonilere mavi-yeşil renk veren piyosiyenin (N-metil-1-hidroksifenazin) pigmentini üretirler (Denning vd., 1998) (Şekil1.4.). *P. aeruginosa* tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan piyosiyenin molekülü, önemli patojenite faktörlerinden biridir ve üretimi çevreyi algılama sisteminin kontrolü altındadır (Brint vd., 1995; Latifi vd., 1995; Fuqua vd., 2001). Bu molekül birçok bakteri türüne karşı antibiyotik özelliği göstererek, *P.aeruginosa*'nın bulunduğu ortamda rekabet şansını artırır (Hassett vd., 1992).



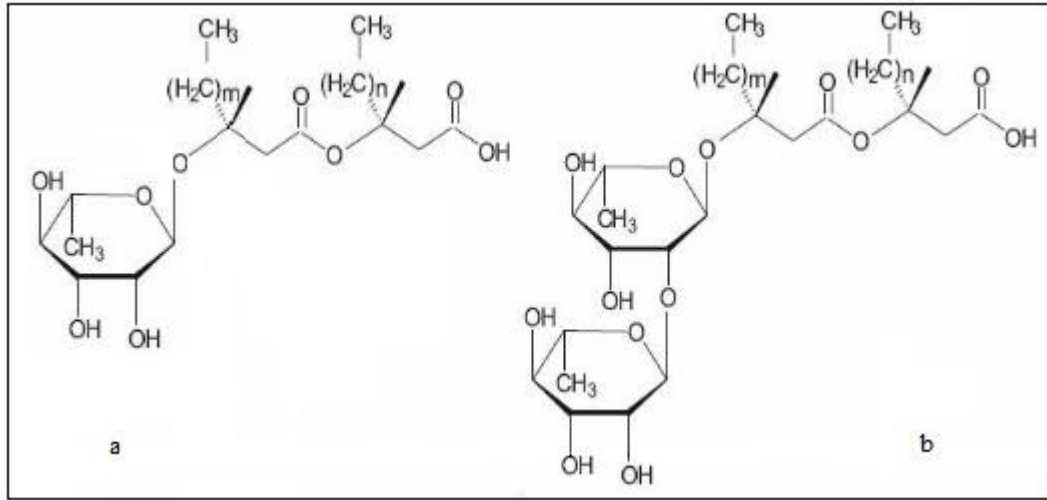
Şekil 1.4. *P. aeruginosa*'nın ürettiği piyosiyenin molekülü a) nötr veya bazik pH'ta zwitteriyon olarak davranır ve mavi renklidir b) asidik ortamda ise kırmızı renklidir

Yapılan in vitro çalışmalar, piyosiyenin kistik fibrozisli hastaların akciğerlerinde oldukça fazla hücresel hasara neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu molekül insan hücrelerinde hücresel solunumun, epidermal hücre büyümesinin engellenmesi gibi fonksiyonlara sahiptir (Denning vd., 1998). Bu molekülün konak hücreye sitotoksitesi genellikle redoks döngüsünün potansiyeliyle güçlü bir şekilde ilişkilidir (Şekil 1.4.). Elektronları doğrudan NADH veya NADPH moleküllerinden alır ve aerobik koşullarda bu elektronları, reaktif oksijen türevleri (ROS) superoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuna yol açan O_2 molekülüne aktarır (Griffith, 1999). Yine piyosiyenin epitel hücrelerinde katalaz aktivitesini inhibe ederek akciğerde oksidatif hasara neden olur.

Bu pigment ayrıca solunum yolları siliyer aktivitesinin kesintiye uğramasından ve akciğerde oksidatif ve nötrofil bağlantılı doku hasarından sorumludur (Erdem, 1999; Bergagne, 2004; Pier vd., 2005).

1.2.1.2. Ramnolipit

Patojen bakteriler belirli çevresel koşullar altında ramnolipit olarak adlandırılan, hidrofilik kısmı bir veya iki ramnoz molekülü içeren ve hidrofobik kısmı yağ asiti yapısında olan biyosürfaktan üretirler. Bunlar ramnolipit I, Ramnosil-L-ramnosil-hidroksi-dekanoil- β -hidroksi-dekanoat (mono ramnolipit) ve Ramnolipit II ise ramnosil-ramnosil- β -hidroksidekanoil- β -hidroksi-dekanoat (di ramnolipit) şeklindedir (Şekil 1.5.). Ramnolipitler yüzey gerilimini azaltıcı özelliklerinden dolayı, endüstriyel ve çevreyle ilgili pek çok alanda kullanılmaktadır. Bunlar arasında hidrokarbonlar gibi düşük çözünürlüğe sahip kirleticilerin uzaklaştırılması ya da biyodegradasyonunun arttırılması sayılabilir (Maier ve Chavez, 2000).



Şekil 1.5. *P. aeruginosa*'nın ürettiği ramnolipit molekülleri a) mono b) di ramnolipit

Yine patojen bakterilerin ürettiği bu molekül, diğer birçok bakteri için antibakteriyel özellik göstererek bulundukları ortamda bu bakterilere avantaj sağlar (Ochsner ve Reiser, 1995). Ramnolipitler, konakta, akciğer yüzeyindeki fosfolipitleri çözerek patojen bakteriler tarafından üretilen fosfolipaz C molekülünün etki etmesini kolaylaştırırlar. Ayrıca bu bakterilerin kayma hareketinin (Kohler vd., 2000; Deziel vd., 2003) ve biyofilm oluşturmalarının da (Deziel vd., 2003) ramnolipit üretimiyle yakından ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Ramnolipit; hemolitik etkisi olan bir hemolizindir (Pearson vd., 1997). Yapısındaki ramnoz içeren glikolipit sayesinde biyosüpfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer süpfaktanı fosfolipitlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosiliyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (Salyers ve Whitt, 1994; Karatuna ve Yağcı, 2008). Siliyer aktivitenin azalması ve alt solunum yolu enfeksiyonlarının oluşmasından (Bergagne, 2004; Pier ve Ramphal, 2005) lesitin içeren dokuların harabiyeti ve pulmoner siliyer aktivitenin inhibisyonundan sorumludur (Yücesoy-Dede, 2006).

Transkripsiyondaki değişiklikler vasıtasıyla AHL'ler, ramnolipit üretimini kontrol eden *rhlAB* dahil birçok operonun kontrolünü etkiler (Ochsner ve Reiser, 1995). *rhlAB* mutasyonunun oluşturduğu biyofilm, sap ve başlığı ile mantar benzeri yapı gösteren doğal tip biyofilm ile karşılaştırıldığında, mimari olarak düz ve ayrılaşmamıştır (Davey vd., 2003). Son yıllarda Lequette ve Greenberg (2005), ramnolipitlerin önemi üzerine çalışmış ve bunların gövdede ifade edilmesine karşılık, mantar benzeri yapı gösteren biyofilm baş kısmında olmadığını bulmuşlardır. Bu araştırmacıların hipotezlerine göre; AHL quorum sensing özellikle sap kısmında sentezlenen, süpfaktan gibi davranıp hücre alt grubunun çekme hareketi ile başlık yapmasını sağlayan, ramnolipit oluşumu ile sonuçlanır (Lequette ve Greenberg, 2005).

1.2.1.3. Proteaz

Proteaz proteinlerin parçalanmasından sorumlu enzim grubudur (Rajamani ve Sayre, 2011). Hücrede protein sentezi ve yıkımı hücresel bileşenlerin ihtiyaç duyduğu homeostasisi sağlar (Gambello vd., 1993). Proteazlar veya peptitazlar peptit bağlarının yıkımını katalizler (Latifi vd., 1995). Katalitik mekanizmalarına göre 5 ana sınıfa ayrılırlar; serin, treonin, sistein, aspartat ve metallo proteazlar (Miyoshi ve Shinoda, 1997).

Proteolitik reaksiyonlar basit veya karmaşık biyolojik proseslerdir ve iyi şekilde düzenlenmeleri gerekir (Lawrence vd., 2004; Bentley vd., 2008; Nurcan, 2010; Zhang vd., 2011).

Patojenik bakteriler tarafından sentezlenen LasA proteaz, *lasA* tarafından kodlanan 41 kDa'luk prekursor olarak sentezlenir ve 22 kDa'luk aktif proteini oluşturmak için

kesilir. LasA'ya benzer özellikler gösteren diğer bir proteaz *lasD* geni tarafından kodlanan LasD'dir. LasD yalnız yüksek pH değerlerinde aktifken, LasA geniş bir pH aralığında aktivite gösterir. Bu proteinler aynı zamanda önemli virülans faktörleri olarak kabul edilmektedirler (Ulusoy, 2007).

Proteaz genlerinin ekspresyonu transkripsiyonel düzeyde düzenlenir. Hidroliz ettikleri konak proteinleri; kollajen, laminin, fibronektin, musin, laktoferrin, α 2-makroglobulin, immünoglobulinler, interlökin 1-1 β , kompleman, albumin ve pıhtılaşma faktörleri öncüleridir (Khan vd., 2000; Albrecht vd., 2006; Çerikçioğlu, 2008; Karkowska-Kuleta vd., 2009).

Proteazların, konak dokusuna invazyonu başlatarak virülans mekanizmasına katıldığı belirlenmiştir (Aoki, 1994; Buchanan, 1998).

Örneğin, ağız hijyeni zayıf olan kişilerin dişeti ve ağız mukozasında da belirgin bir proteaz aktivitesi tespit edilmiştir. Enzim enfekte kök kanalı içerisinde, bakteriler tarafından ortama salınır. Pulpa odası uzun süre açık kalan dişlerin dentin duvarları yüzeyine bakteri tutunması bu yol ile olur (Gibbons, 1989).

Patojenik bakterilerin *apr* geninin kodladığı proteaz korneayı enfekte eder (Ulusoy, 2007). Proteazlar, elastinolitik aktivite ile akciğerdeki elastini hidroliz ederek enfeksiyon sürecinde de rol alırlar (Karkowska-Kuleta vd., 2009).

49 kDa alkali proteaz ağırlığındaki enzimi *apr* geni tarafından kodlanır ve en iyi alkali pH değerlerinde etkinlik gösterir. Akut akciğer hasarında erken dönemde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin alkali proteaz ile eritilmesinin enfeksiyonun ilerlemesine yol açtığı gösterilmiştir (Kipnis vd., 2004). Alkali proteazın doku invazyonu ve sistemik enfeksiyonlardaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, kornea enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Howe ve Iglewski, 1920).

Proteinleri parçalayan bir enzimdir. Özellikle mukozal savunmada önemli rol alan salgısal IgA'yı parçalayarak konak reseptörlerine kolayca tutunmayı sağlar (Akşit vd., 2007).

1.2.1.4. Fosfolipaz

İlk kez 1960’larda Costa tarafından rapor edilmiştir. Werner, yumurta sarısı ve lesitinli katı besiyerinde mayaları üreterek lipid yıkım ürünlerini analiz etmiştir (Ghannoum, 2000). Fosfolipazlar, gliserofosfolipitlerdeki bir veya daha fazla ester bağına hidrolize etme yeteneğine sahip enzim grubunu kapsamaktadır. Tüm fosfolipazlar substrat olarak fosfolipitleri hedeflese de her bir enzim, spesifik bir ester bağına parçalama yeteneğine sahiptir (Ghannoum, 2000). Fosfolipaz A (PLA), Fosfolipaz B (PLB), fosfolipaz C (PLC) ve fosfolipaz D (PLD) olmak üzere 4 çeşit fosfolipaz enzimi, ayrıca daha ileri bir basamak olan lizofosfolipitleri de parçalayan lizofosfolipaz enzimi farklı oranlarda ve farklı işlevleri görmek üzere çeşitli hücrelerde bulunmaktadır (Ener, 2002; Schunder, 2010). Fosfolipazlar konak doku invazyonunda önemli bir rol üstlenir (Rezusta vd., 1989; Yücesoy ve Yuluğ, 1999; Lapaque vd., 2005). Fosfolipaz enzimi (PL) patojenik bakterilerin yanı sıra bazı mantar ve parazit enfeksiyonlarında da patojenite faktörü olarak gösterilmiştir (Ener, 2002; Schaller, 2005). Patojenik bakteriler için önemli virülans faktörlerinden biri olan fosfolipaz enzimi, konak hücre zarının başlıca kimyasal bileşenleri olan fosfolipitleri hidrolize ederek konak hücreyi lizize uğratmakta ve hücrenin yüzey özelliklerini değiştirerek aderensi ve penetrasyonu kolaylaştırdığı ve virülansa katkı sağladığı düşünülmektedir (Ghannoum, 2000). Fosfolipazlar büyük olasılıkla, konak hücre invazyonu sırasında oluşan membran hasarı sürecinde rol oynamaktadırlar (Ghannoum, 2000; Arslan ve Fındık, 2003). Özellikle membran fosfolipitlerini parçalayarak epitel hücrelere tutunmada bu enzimlerin rolü olduğu ve dolayısıyla virülansa katkıda bulundukları belirtilmektedir (Culter, 1991; Hoeprich vd., 1994; Schaller vd., 2005). Fosfolipaz üretme yeteneğini değerlendirmek için yapılan yumurta sarısı bazlı testler önceleri yalnızca *Candida albicans*’ın ekstraselüler fosfolipaz ürettiğini göstermiş, bunun tersine, son zamanlarda çoğu bakterisinde fosfolipaz ürettiği belirlenmiştir (Ghannoum, 2000). Ayrıca fosfolipaz aktivitesinin maya formlarında misel formlarına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Rezusta vd., 1989; Yücesoy ve Yuluğ, 1999).

Fosfolipazları patojenik bakterilerde hemolitik ve hemolitik olmayan olmak üzere iki tipe ayırmak mümkündür (Austin vd., 2005).

1) Hemolitik Fosfolipaz: 78 kDa büyüklüğünde ısıya dayanıklı bir protein olup, lipaz aktivitesini fosfotidil kolin ve sfingomiyelin üzerinde gösterir.

2) Nonhemolitik Fosfolipaz: Bu, patojen bakteriler tarafından üretilen ikinci fosfolipazdır. 73 kDa büyüklüğündedir. Fosfotidil kolin ve fosfotidil serine etkiliyken koyun eritrositlerine etkili değildir.

Ortamda düşük fosfat varlığı ve aerobik şartlar hemolitik fosfolipaz sentezini ve aktivitesini uyarırken yüksek NaCl mevcudiyeti hemolitik fosfolipaz aktivitesini baskılar. Hem hemolitik fosfolipaz hem de nonhemolitik fosfolipaz fosfotidil kolini, diaçil gliserol ve koline parçalar. Bu olay akciğer sürfaktanının parçalanarak akciğerin şişmesine ve doku hasarına yol açar. Ayrıca hemolitik fosfolipaz aktivitesi akciğer dokusunda hemorajik nekroza neden olur (Ulusoy, 2007).

Yücel ve Kantarcıoğlu (2000) tarafından yapılan çalışmada, fosfolipaz enziminin potansiyel bir virülans faktörü olduğu ve enfeksiyon sırasında fosfolipaz B salgılanarak doğrudan konak hücrelerinin lizisine yol açtığı gösterilmiştir. Ghannoum (2000) tarafından yapılan çalışmada ise kandan izole edilen patojen bakterilerin kökeninin fosfolipaz aktivitelerinin, sağlıklı gönüllülerin ağız boşluğundan izole edilenlere oranla daha fazla olduğu bildirmiştir.

Fosfolipaz enziminin varlığı kadar miktarı da virülans açısından önem taşımaktadır (Ghannoum, 2000; Çerikçioğlu, 2012).

İbrahim vd. (1995), fare modelinde yaptıkları çalışmada kan kökenlerinde fosfolipaz üretiminin ağız kökenlerine oranla daha yüksek olduğu, düşük düzeyde fosfolipaz üreten kökenlerin invaziv olmadığını ve sadece fosfolipazın mortalitede belirleyici rol oynadığını gözlemlemişlerdir.

1.2.1.5. Koagülaz

Bakteriler tarafından üretilen ve plazmayı koagüle eden, molekül ağırlığı 12-22 kDa olan protein yapısında, ekstraselüler bir enzimdir. Etki mekanizması, fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlayan ‘trombin’in etki mekanizmasına benzer, bakteri hücresinin dış yüzünü ve hatta enfekte dokuyu fibrin ile örtterek fagositik hücrelerin buraya sokulmasına engel olur. Böylece bakteri hücresi hem serumun antibakteriyel etkisinden ve hem de fagositozdan korunur. Ayrıca endotoksik şoku amplifiye eder ve pirojendir. Birisi serbest ve diğeri bakteri hücrelerine bağlı olan iki tip koagülaz vardır.

1. Serbest koagülaz: Bakteri hücresinden ayrılabilir, bu anlamda bir eksotoksin sayılmalıdır. Konuşma dilinde koagülaz terimi serbest koagülazı ifade eder. Serbest koagülaz, plazmada bulunan CRF (Coagulase Reacting Factor)'ü aktive ederek etki gösterir. Bakteri hücresindeki varlığı 'tüp koagülaz testi' ile anlaşılır. Bugüne kadar, antijenik özellikleri birbirinden farklı olan en az 4 tip serbest koagülaz tanımlanmıştır. Periapikal lezyonun ekspansiyonunda rolü olduğu düşünülmektedir.
2. Bağlı koagülaz (clumping faktör): Bakteri hücresinin yüzeyinden ayrılmaz. Böyle bakteriler plazma ile temas ettiklerinde, plazmadaki CRF'e ihtiyaç duymaksızın, hücre yüzeyinde bir fibrin örtü oluştururlar. Bu örtü fagositozdan korunmayı sağlar. Bu tip koagülazların bakteri hücresindeki varlıkları 'lam koagülaz testi' ile anlaşılır (Aydın, 2000; Baba-Moussa, 2008).

Bu enzimlerin farklı mekanizmalarla plazmayı pıhtılaştırdıkları belirlenmiştir. Koagülaz pozitif mikroorganizmanın üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Cengiz, 1999; Alen vd., 2006; Biçer-Turaç, 2009). Fibrin oluşumunu sağlayarak, konak hücresinin mikroorganizmayı tanıma ve fagosit etmesini engeller (Topçu vd., 2008).

1.2.1.6. Esteraz

İlk kez 1978 yılında Rudek, Tween 80 opasite testi ile mayaların lipolitik aktivite gösteren esteraz enzimi salgıladığını göstermiştir (Soydan, 2005). Ekstraselüler esterazın fosfolipazdan farkı, sadece tek karbon kaynağı olarak Tween 80 içeren bir ortamda aktive olmasıyla anlaşılmıştır. Ancak, indüklenebilir ekstraselüler esterazın in vitro şartlarda üreme için mutlak gerekli olmadığı saptanmıştır (Stehr vd., 2000). Stratum korneum tabakasında yüksek oranda bulunan triaçilgliserol ve monoaçilgliserol, lipolitik enzimlerin aktivitesi ile parçalanarak, mikroorganizmanın invazyonunu ve kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Esteraz üretimleri incelendiğinde, türler arasında farklar olduğu, bu enzimin aynı zamanda üreme sürecinde de rol aldığı gösterilmiştir (Tsuboi vd., 1996).

Lizozimal bir enzim olan esteraz enzimi (Knowles vd., 1978; Zicca vd., 1981), doku ve perifer kan frotilerinde T-lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirlerinden ayırt edilmelerinde kullanılmaktadır (Knowles ve Halper, 1980; Pruthi vd., 1987; Blindar vd., 1993). Enzimin T-lenfosit olgunlaşmasının ileri aşamalarında kazanıldığı

bildirilmiştir (Basso vd., 1980). Esteraz grubu enzimler aktive olan T-lenfositlerin sitotoksik fonksiyonları ile makrofajların fagosit ettikleri materyalleri parçalamalarında rol aldığı düşünülmektedir (Mueller vd., 1975). Başta insan olmak üzere (Çelik vd., 1991), sığırlar (Kajikawa vd., 1983), tavuklar (Aştı vd., 1993), kediler (Yörük vd., 1998) ve farelerde (Mueller vd., 1975) T-lenfositlerin ayırımında yararlanılan esteraz enziminin, koyun T-lenfositleri için spesifik olmadığı ileri sürülmektedir (Dixon ve Moriarty, 1983).

1.2.1.7. Üreaz

Üre ($\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$), karbonik asitin bir diamid türevidir. Bütün diamidler kolayca amonyak ve CO_2 'e hidrolize olurlar, daha sonra amonyum karbonata dönüşürler.

Bazı bakteriler üreaz enzimleri ile şu reaksiyonu katalizlerler:



(Mobley, 1997; Michael ve Abbott, 2002; Aydın, 2004).

Patojen organizmalar üreaz enzimiyle etrafında yeterli miktarda bikarbonat ve amonyak katmanı oluşturarak güvenli bir şekilde bariyer oluşturmakta ve konak epitel dokusunu aşmayı başatabilmektedirler. Eaton vd. (1989), domuz denekleri kullanılarak yapılan hayvan modeli çalışmalarında motilite ve üreaz aktivitelerinin kolonizasyonda esansiyel olduğunu göstermişlerdir. Üreaz, üreyi amonyak ve bikarbonata çevirerek asit pH'dan korunmasına yardım etmekte ve bakteriyi çevreleyerek alkali bir katman oluşturmaktadır (Eaton ve Krakowka, 1994). Bakteri proteinlerinin %6'sından fazlasını oluşturan üreaz enzimi kofaktör olarak nikel ihtiyacı duymaktadır. Üreaz enzimi 550 kDa ağırlığında heksamerik bir moleküldür. 61.7 kDa (α) ve 26.5 kDa (β) ağırlığında iki farklı subünit içerir. Örneğin üreaz, *Helicobacter pylori*'nin neden olduğu kronik enfeksiyonun bir özelliği olan lamina propriada gözlenen inflamasyona katkıda bulunmaktadır. Ayrıca *in-vivo* üreaz aktivitesi insan gastrik epitel hücrelerine toksik etki göstermektedir (Yula ve Köksal, 2009). *H. pylori*, salgıladığı üreaz enzimiyle CO_2 ve NH_4 oluşturur. Bu, bakteriyi mide sıvısı içindeki düşük pH'dan korur. Öte yandan NH_4 , mide epitel hücreleri için toksiktir; hücreler arası tutunmayı azaltır ve etkenin salgıladığı sitotoksinlerin etkisini artırır (Graham, 1994; El-Omar vd., 1997; Graham, 1997).

Patojenik bakteriler beyin mikrovasküler endotellerine tutunduktan sonra, bakteri hücrelerinin ürettiği üreaz mikrokapiller sekrasyonunu sağlayarak kan-beyin bariyerinin aşılmasını kolaylaştırmaktadır (Çerikçioğlu, 2012).

Kolon florasında bulunan mikroorganizmalar bol miktarda üreaz enzimi sentezlerler. İdrar pH'sını arttırarak böbrek taşı gelişimine neden olurlar (Levinsone, 2008).

1.2.1.8. Amilaz

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

Nişasta; α -amilaz, 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 vd., 1999; Yamamoto vd., 2000; Gawande ve Patkar, 2001; Demirkan 2009).

1.2.1.9. DNaz

DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır. *Staphylococcus aureus* suşlarının %90'dan fazlasında bulunur. Isıya dirençli bir enzimdir (Alen vd., 2006; Barbosa vd., 2010).

Bazı bakterilerde bulunan, tek bir polipeptit zincirine sahip, kompakt, globüler bir proteindir. DNaz 65°C'ye ısıtıldığında reversible olarak bozunur. Konağın nükleik asitlerine karşı bakteri hücresi tarafından sentez edilir. DNaz konak antikorları ile reaksiyon verir (Aydın, 2000).

1.2.1.10. Hemolitik aktivite

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. Mikroorganizmalar kanlı agar besiyerinde α -, β - ve γ -hemolitik reaksiyon verirler. α -hemolitik mikroorganizmaların kanlı agar besiyerinde oluşturdıkları kolonilerin etrafında, kenarları keskin hatlı olmayan, bulanık ve yeşilimsi bir zon oluşur. β -hemolitik mikroorganizmalar, aynı besiyerinde tam hemoliz yaparak, kolonilerin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu oluşturur. γ -hemolitik mikroorganizmalar ise hemolizin enzimine sahip olmayan, kanlı agar besiyerinde hemoliz oluşturmayan mikroorganizmalardır (Barbosa vd., 2010; Chari vd., 2010).

Ekzoenzim serin proteaz, ekzotoksin, α -hemolizin ve hücre dışı protein olan siderofor gibi virülans faktörleri yüksek bakteri yoğunluğuna bağlı olarak çevreyi algılama sisteminin kontrolündeki genlerin ekspresyonu ile ortaya çıkar (Jangid vd., 2007).

α -hemolizin konak hücre proteinlerini hasara uğratar (Orskov ve Orskov, 1985). α -hemolizin üretiminden yoksun bırakılan mutant bakterilerde virülansın azaldığı belirlenmiştir (Reingold vd., 1999). Blanco vd. (1997), yapmış oldukları çalışmalarında tavuklardan izole edilen 625 *E. coli* izolatından sadece %2.6'sının hemolizin ürettiğini bildirmişlerdir.

1.2.1.11. Kayma (swarming), yüzme (swimming) ve titreme (twitch) hareketi

Bakterilerin hücre yüzeylerindeki saç benzeri eklentileriyle tutundukları ve kamçı ya da piluslarla hareketi sağladıkları bilinmektedir. Gr(-) bakterilerde, bu proteinimsi yapıların salgı yolları (şaperon yolağı, presipitasyon yolağı, tip IV pilus yolağı) aracılığıyla salgıları topladıkları gösterilmiştir. Piluslar patojenik bakterilerde bulunmakta ve konak hücreye tutunma, hücrelere saldırma ve biyofilm oluşumundan sorumludur. Bu özellikleri nedeniyle patojenik bakteriler birçok çalışmaya kaynaklık etmiştir (Alvin vd., 2013). *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bordetella*, *Helicobacter*, *Campylobacter* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi patojen bakterilerde enfeksiyonun ilk aşamasında hareketliliğin önemli bir rol oynadığı ispatlanmıştır. Ayrıca patojenik bakteriler hareket organları sayesinde tutunarak kolonizasyonu sağlarlar. Öte yandan bakteriler hareket organları sayesinde mekanik sinyaller yollayarak hücreler arası iletişim sağlarlar (Montie vd., 1982; Allen-Vercoe vd., 1999). Yapılan çalışmalar sonucunda hareketli bakterilerin hareketsizlere oranla daha patojen olduğu ve hareket organı

olmayan bakterilerin konak bağışıklık sisteminden kaçamadığı gösterilmiştir (Dietrich vd., 2001).

La Ragione vd. (2000a, 2000b), flagellasız bir APEC mutantının kullanıldığı çalışmalarında, tavuk bağırsak ve trake hücrelerine bu suşun bağlanması azalma olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, bu nedenle flagellanın mukus tabakasını geçerek adezyonun oluşmasında bir özellik olduğunu ve ayrıca kolonizasyon, invazyon ve tavuklarda kalıcılık açısından önemli olduğunu da bildirmişlerdir (Hossain, 2008).

Çizelge 1.1.Patojen bakterilerde flajella hareketi konusunda oluşturulmuş yeni deneysel kanıtlar (Eaton vd., 1996)

Bakteriler	Model sistemler	Hareketsiz mutantlarda virülans	Gözlenen diğer mutantlarda hareket ve kemotaksis genleri	Referanslar
<i>Helicobacter felis</i>	Fare		Hareketi azalmış mutantlarda koloni oluşmaması (flaA)	Josenhans vd., 1999
<i>Helicobacter pylori</i>	Fare		Kemotaksis genleri mutasyonlu mutantlarda koloni oluşmaması	Foynes vd., 2000
<i>Campylobacter jejuni</i>	İnsan bağırsak hücreleri	İstila azalmıştır.		Wassenaar vd., 1991
<i>Campylobacter jejuni</i>	Küçük fareler, küçük civciv	Koloni yok		Diker vd., 1992a, b Nachamkin vd., 1993
<i>Campylobacter jejuni</i>	Fare		Farelerde koloni oluşmaması, cheY geni diare kemotaksis mutantlarda oluşmaması	Yao vd., 1997
<i>Vibrio cholerae</i>	Küçük fareler	Koloni 50 kat azalmıştır.		Correa vd., 2000

Çizelge 1.1.^(devam)

Bakteriler	Model sistemler	Hareketsiz mutantlarda virülans	Gözlenen diğer mutantlarda hareket ve kemotaksis genleri	Referanslar
<i>Vibrio anguillarum</i>	Gökkuşağı alabalığı, bakteri süspansiyonu	FlaA delesyonlu mutantlar enfeksiyondan sonra LD50 olduğunu göstermiştir.		Milton vd., 1996
<i>Vibrio anguillarum</i>	Gökkuşağı alabalığı, bakteri süspansiyonu, içperiton enjeksiyonu		İmmersiyon testinde cheR kemotaksis mutantlarında LD50 400 kat azalmıştır fakat içpeiton enjeksiyonundavirülanslık değişmemiştir.	O'Toole vd., 1996
<i>Vibrio anguillarum</i>	Balık hücreleri	Tutunma görülmemiştir, istila azalmıştır.	Kemotaksis mutantlar yüksek istilacılıdırlar.	Ormonde vd., 2000
<i>Salmonella typhimurium</i>	Caco2 hücreleri	İstila azalmıştır.		van Asten vd., 2000
<i>Salmonella enteritidis</i>	Yarım günlük civcivler	Koloni azalmıştır. Amoebae'da istila azalmıştır, HL-60 hücrelerinde istila çoğalmıştır.		Allen-Vercos vd., 1999
<i>Legionella pneumophila</i>	Amoebae, HL-60 hücreleri			Dietrich vd., 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pulmoner enfeksiyonlu yenidoğan fareler	Virülans azalmıştır.		Feldman vd., 1998
<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	<i>Spodoptera littoralis</i> (böcek)	Virülans önemsiz derecede azalmıştır.		Givaudan ve Lanois, 2000
<i>Serpulina hyodysentery</i>	Swine dysentery, fareler	Mutant kolonilerde anormal hareketler azalmıştır.		Kennedy vd., 1997
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Epitel hücre kültürü	37°C'de hareket durmuştur. Konak hücrede hareket görülmez.		Young vd., 2000
<i>Shigella</i>		Flajellar mutantlarda azalma devam etmiştir.		La Ragione vd., 2000
<i>E.coli</i> O78:K80	Bir günlük civcivler			

Çizelge 1.1. ^(devam)

Bakteriler	Model sistemler	Hareketsiz mutantlarda virülans	Gözlenen diğer mutantlarda hareket ve kemotaksis genleri	Referanslar
<i>E.coli</i> , hareketsiz serotipleri		Hareketsiz serotipler (O157:H7) düşük dozda enfeksiyon etmiştir ve şiddetli hastalıklara neden olur. (<i>Shigella</i> benzeri)		
<i>Proteus mirabilis</i>	İnsan renal proksimal tubular hücreleri	Tutunma ve flajellasız mutantlarda istila azalmıştır		Mobley vd., 1996
<i>Proteus mirabilis</i>	Fare, yapılan yolu	Yabani tip suşlara göre flajellalı mutantlarda enfeksiyon yapma 100 kat azalmıştır. Hareketsiz ve swarming hareketi görülmeyen suşlarda istila yetersizdir.		Mobley vd., 1996
<i>Proteus mirabilis</i>	Nöroepitelyal hücreler			Allison vd., 1992

1.2.1.12. Pigment üretimi

Pigmentler, 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 (Nurcan, 2010).

Birçok patojen bakteride biyofilm gibi etkili bir virülansın enfeksiyon kapasitesi kadar proteaz ve pigment üretiminin de konak üzerinde enfeksiyon etkisi vardır (Croxatto vd., 2002).

Önemli bir pigment olan melanini oluşturan tirozin, fosfofenolpiruvat'tan sentezlenen hidoksifenilpiruvat'ın aminlenmiş bir derivasyondur. Aromatik bir

aminoasittir. Bilhassa *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acetobacter* ve *Mycobacteria*'lar bunu gerçekleştirir. Siyah koloni oluşumu yanında, koloni çevresinde ve altında (agar içerisinde) saydamlaşma görülmesi beklenir (Aydın, 2004). Örneğin; *hpdA* *Vibrio anguillarum*'u pigment üretimini hem tetiklemekte hem de pigmenti meydana getirmektedir (Croxatto vd., 2002).

1.2.1.13. Antibiyotik dirençliği

Enfeksiyon hastalıkları tedavisinde antibiyotikler son 50 yılda son derece faydalı olmuşlar ve eskiden öldürücü olduğu bilinen pek çok hastalığın tedavisi için vazgeçilmez unsurlar haline gelmişlerdir. Ancak bu maddelerin uzun süre ve bazen gereksiz yere kullanılmaları sonunda hastalık etkenlerinin ilaçlara karşı direnç kazanmaları son yıllarda çağdaş tıbbın en önemli problemi olarak ortaya çıkmıştır (Andrea vd., 2000; Berzeg, 2005).

Antimikrobiyal ajanlara karşı biyofilm direnç çeşitlerinden birisi, bu ajanların biyofilm kalınlığından dolayı biyofilmin içine penetre olamaması şeklindedir (Costerton vd., 1999). Bu nedenle, "enfeksiyon hastalıkları" hala dünyada en önde gelen ölüm nedenlerinden biridir (Baskın, 2005).

Özellikle biyofilm yapısı içerisindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı direnci büyük önem taşır. Yavaş büyüme, biyofilmin tabanında azalan oksijen miktarı, pozitif yüklü aminoglikozitlerin negatif yüklü alginat polimerlerine bağlanmasıyla oluşan penetrasyon bariyeri, bakteride beta laktamazların varlığı bu dirençte rol oynar (Anwar vd., 1992; Nichols vd., 1988; Stewart ve Costerton, 2001). Biyofilmler doğal gereği konak savunmasından ve antibiyotiklerden korunurlar. Biyofilm matriksi, biyofilm bakterilerinin konak savunmasından korunmasında anahtar rol oynar (Fux vd., 2005). Doğal ve kazanılmış immun yanıtı sağlam bireylerde bile, biyofilme bağlı enfeksiyonlar nadiren düzelir. Gerçekte, biyofilme bitişik dokular, immun kompleks ve nötrofillerin istilasına bağlı yandaş hasar geçirebilir (Nick, 1995). İn vitro biyofilm modellerinde çalışılan duyarlılık testlerinde, minimal inhibitör konsantrasyonunun yüzlerce hatta bin katı konsantrasyonda antibiyotik tedavisi sonrası bakteriyel biyofilmin sağ kalımı gösterilmiştir (Ceri vd., 1999). İn vivo olarak antibiyotikler, bağlı popülasyondan dökülen serbest bakterileri öldürerek enfeksiyon semptomlarını baskılayabilirler, ancak halen biyofilme gömülü olan

bakteriyel hücreleri eradike etmekte yetersizdirler. Biyofilm, antibiyotik tedavisi sonlandırıldığında enfeksiyonun tekrarı için bir odak oluşturur. Biyofilm enfeksiyonları, kolonize yüzeyin cerrahi olarak çıkarılmasına kadar sıklıkla tekrar eder (Stewart ve Costerton, 2001). Biyofilm içindeki bakteriler antibiyotiklere planktonik olanlarından yaklaşık 1000 kat daha dirençlidirler (Hoyle ve Costerton, 1991). Antibiyotik direncinin effluks pompası, enzim modifikasyonu ve hedef mutasyonu gibi bilinen mekanizmaları biyofilmdeki bakterinin korunmasında rol oynamaz. Hatta genetik olarak dirençli olmadığı bilinen bakteriler bile biyofilm formunda bulunduklarında azalmış duyarlılık gösterirler. Bakteriler biyofilmden ayrıldıkları zaman sıklıkla antibiyotiklere duyarlı hale gelirler (Anwar vd., 1989; Williams vd., 1997), bu da biyofilmdeki bakterilerin mutasyon veya taşınabilir genetik parçalar yoluyla direnç kazanmadığını düşündürür. Bakteriyel biyofilmlerin antibiyotik direncinde ilk hipotez, antibiyotiklerin biyofilm içine yavaşlamış ya da yetersiz geçiştir (Stewart ve Costerton, 2001). Biyofilm matriksi antibiyotiklerin biyofilm boyunca difüzyonunu sınırlayan, moleküllerin biyofilmden öldürmek için yetersiz birikimi ile sonuçlanan fiziksel bir bariyer rolü oynayabilir. Ancak antibiyotikler gibi küçük moleküller için, matriks difüzyon sınırlaması göstermez (Stewart, 1998) ve gerçekte birçok antibiyotik biyofilm boyunca serbestçe geçebilir (Shigeta vd., 1997; Vraný vd., 1997). Diğer yandan negatif yüklü olan biyofilm matriksi, pozitif yük taşıyan aminoglikozitler gibi bazı antibiyotiklerin geçişini geciktirir. Örneğin, tobramisin'in *P. aeruginosa* biyofilmi boyunca penetrasyonu 36 saatlik deneyin ilk 12 saati süresince tamamen gecikmiş, buna karşılık siprofloksasin biyofilm boyunca ilk 12 saatte tam olarak geçmiştir. Yine de 36 saatte tobramisin'in %40'ının difüze olması, önce matriksin bağlanma kapasitesinin aşıldığı ve serbest difüzyonun bunu izlediğinin göstergesidir (Walters vd., 2003). β -laktam antibiyotikler, β -laktamaz üreten biyofilm bakterileri tarafından aktif olarak azaltılırlar (Shigeta vd., 1997). Biyofilmin fiziksel bariyer oluşturma özelliğinin, özellikle vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptitlerin geçişinin engellenmesi ve vankomisin'in, gentamisin ile olan sinerjistik etkisinin bozulmasında en önemli mekanizma olduğu gösterilmiştir (Farber vd., 1990).

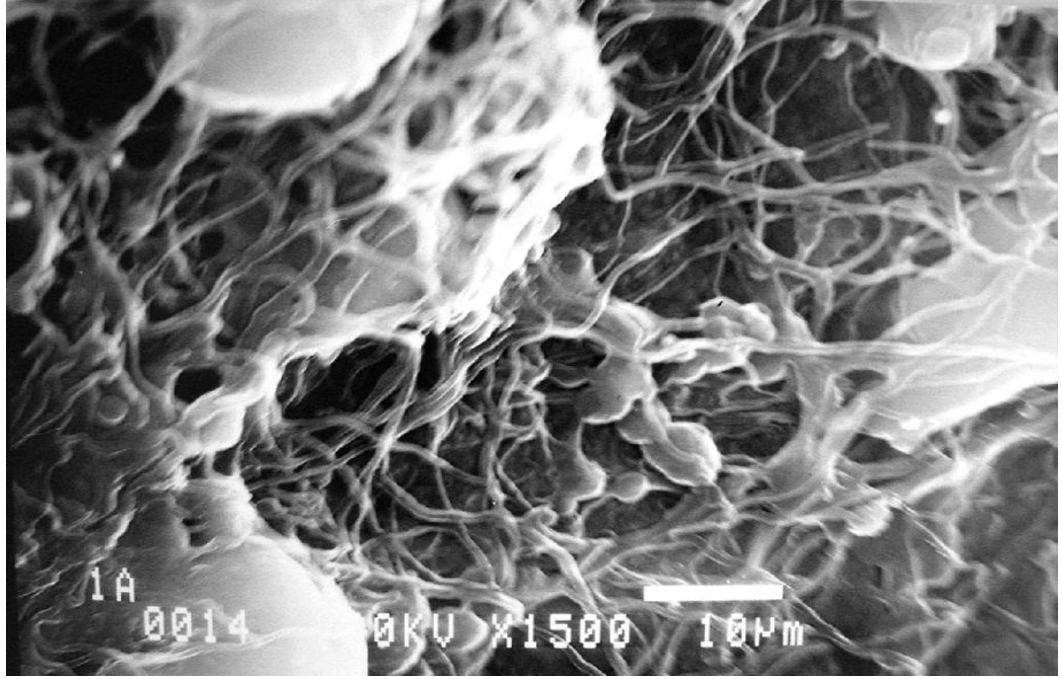
İkinci hipotez biyofilm içindeki değişmiş kimyasal mikro çevreye dayanır. Bu hipotez, besin ve oksijen kısıtlılığı sonucunda biyofilmden yavaş büyüme ve düşük metabolik aktivitenin antibiyotik toleransına yol açtığını öne sürer. Mikro elektrot ile

yapılan çalışmalar göstermiştir ki, oksijen biofilmin yüzey tabakalarında tamamen tüketilir ve bu durum biyofilmin derin tabakalarında anaerobik ortam oluşumuna yol açar. Böylece derin katlardaki biyofilm anaerob bir çevrede yaşar (Anderl vd., 2003; Walters vd., 2003). Anaerob koşullar hem aminoglikozitlerin hem de florokinolonların etkinliğini azaltır (Tack ve Sabath, 1985; Zabinski vd., 1995) ki bu da oksijen kısıtlılığının antibiyotik toleransını kolaylaştırabileceğine işaret eder. Ek olarak, asitik artık ürünlerin lokal birikimi esas sıvı ile biyofilmin içi arasında 1’den fazla pH farklılığına yol açar ve direkt olarak antibiyotik etkisini antagonize eder. Bundan başka, biyofilm içindeki osmotik evre değiştirilebilir ve böylece osmotik stres yanıtı indüklenir (Prigent-Combaret vd., 1999). Böyle bir yanıt porinlerin oranını değiştirip hücrenin antibiyotiklere geçirgenliğini azaltarak antibiyotik direncine katkıda bulunabilir (Stewart ve Costerton, 2001).

Antimikrobiyal ajanlara karşı biyofilm direncini açıklayan üçüncü hipotez, biyofilm ilişkili hücrelerin planktonik hücrelerden anlamlı olarak daha yavaş büyüdüğü ve sonuç olarak antimikrobiyal ajanı daha yavaş tuttuğu şeklindeyir. Bir substratın yokluğu ya da inhibitör bir artık ürünün birikmesi bazı bakterilerin gelişiminin durmasına ve öldürülmekten korunmasına yol açar. rnek olarak; hücre duvarı sentezini hedefleyen penisilin antibiyotikler yalnızca büyümekte olan bakterileri ldrebilirler (Stewart ve Costerton, 2001).

1.2.1.14. Biyofilm oluşturma

Biyofilm (slime) kavramı, ilk olarak 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek’un kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları göstermesi ile ortaya çıkmıştır. Uzun yıllar konu üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamasına karşın, biyofilmler ve özellikleri ile ilgili genel teori 1978’den sonra artarak bildirilmeye başlanmıştır. Bu teoriye göre; yeterli besine sahip ekosistemlerde bakterilerin büyük kısmı biyofilm tabakasını oluşturan matrikste büyürler ve bu sesil bakteriler planktonik eşdeğerlerinden farklılık göstermektedirler (şekil 1.6.) (Costerton vd., 1978).



Şekil 1.6. Bir yabancı cisim yüzeyinde oluşmuş biyofilm tabakasının elektron mikroskopik görüntüsü (80 KVx1500) (Öztuna, 2005)

Biyofilmler; hidrate bir matriks içine gömülü hücrelerin oluşturduğu çok katmanlı, yüzeye bağlı mikrobiyal topluluklar olarak tanımlanmışlardır (Kiersek-Pearson ve Karatan, 2005). En yeni tanımı ile biyofilmler; mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ekstraselüler polimerik madde (EPS) yoluyla, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışarak, büyüme oranları ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu matriks olarak tanımlanmıştır (Donlan, 2002). Polisakkarit yapıdaki bu matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil, aynı zamanda mikroorganizmaların türleri arasında da değişmektedir. Biyofilmin gelişme potansiyeli; yakın çevredeki besinlerin kullanımı ve hücre içine alınımı, atıklarının uzaklaştırılması ile yakın ilişkili olup, bunların dışında besin kısıtlanması sonucu eksprese olan quorum sensing moleküllerinin salınımı, ortam pH'ı, O₂ perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolarite de gelişimde çok etkilidir (Carpentier ve Cerf, 1993; McLean vd., 1997; Allison vd., 1998; Davies vd., 1998; Stickler vd., 1998; O'Toole ve Kolter, 1998; Sakarya vd., 2004).

Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden biri olmadığı takdirde biyofilm oluşmaz (Donlan, 2002). Bir biyofilmin yapısı %97 su olmak üzere %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarit, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır.

Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığıyla ayrılmıştır. Bu su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta zaman alır (Şekil 1.7.). Örneğin; *P. aeruginosa*'nın elektrik yüklü bir yüzeye yapışması sadece 30 saniye alır (Jones vd., 1969). Bu da farklı mikroorganizmaların biyofilm meydana getirme hızının farklı olabileceğini düşündürmektedir.

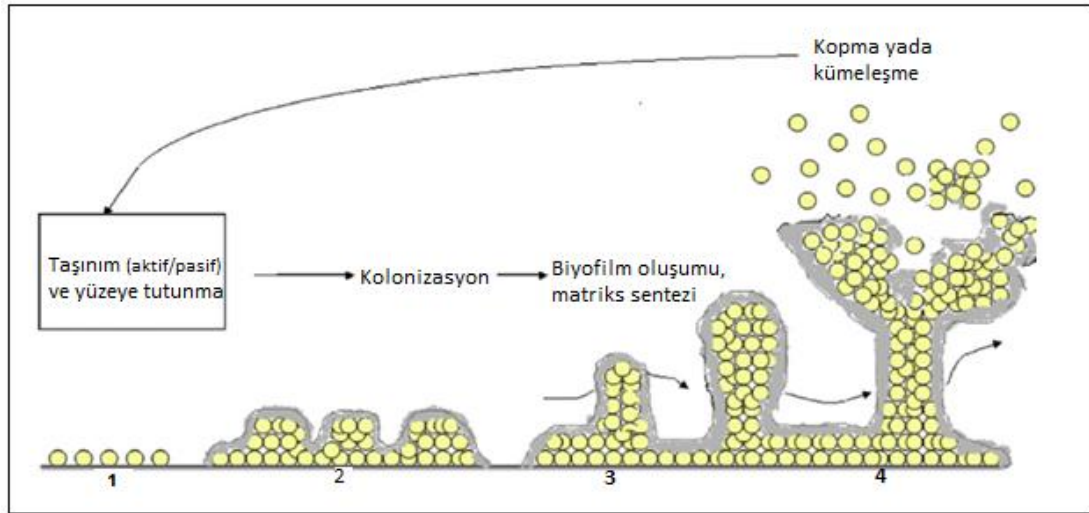
Mikrobiyal biyofilmler, birçok canlı ve cansız yüzeyde oluşarak, endüstriyel ve tıbbi birçok soruna neden olurlar (Kierck-Pearson ve Karatan, 2005). Biyofilmler, normal flora gelişiminden endokardite, kistik fibrozdan otitis mediaya, yabancı cisim enfeksiyonlarından üriner sistem enfeksiyonlarına kadar birçok enfeksiyonun gelişiminden sorumludur (Çizelge 1.2.). Biyofilm içindeki bakteri birçok antibiyotik tarafından öldürülmeye ve fagositoza direnç göstererek varlığını sürdürme özelliğine sahiptir (Stewart ve Costerton, 2001; Leid vd., 2002; Mah vd., 2003). Yabancı cisim ve diğer kronik enfeksiyonlarla, antibiyotiklere ve konak savunmasına karşı kazanılmış direnç gelişimleri ile ilgili çalışmalara dayanarak “Hastalık Kontrol Merkezi (CDC)”, tüm dünyada biyofilme bağlı enfeksiyonların oranını %65 olarak açıklamıştır (Costerton, 1999).

Çizelge 1.2. Biyofilmlerle ilişkili medikal enfeksiyonlar (Raad, 1998; Sönmez, 1998; Costerton vd., 1999; Davey ve Otoole, 2000; Watnick ve Kolter, 2000; Donlan, 2001; Donlan ve Costerton, 2002).

Enfeksiyon veya hastalık	Etken mikroorganizmalar
Dental plaklar (diş çürüğü, dişeti iltihapları)	Asitojenik Gr (+) koklar (<i>Streptococcus sanguis</i> vb.)
Periodontitis	Gr (-) anaerobik ağız bakterileri (<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Actinobacillus</i>), <i>Candida albicans</i>
<i>İnatçı enfeksiyonlar</i>	
Otitis media	Non-tipik <i>Haemophilus influenza</i>
Kaslar, iskelet enfeksiyonları	Gr (+) koklar (<i>Staphylococcus sp.</i>)

Çizelge 1.2.^(devam)

Enfeksiyon veya hastalık	Etken mikroorganizmalar
Safra yolu enfeksiyonları	Bağırsak bakterileri (<i>Escherichia coli</i> vb.)
Osteomiyelitis	Çeşitli bakteriyal ve fungal türler-genelde karışık olarak
Enfeksiyöz böbrek taşları	Gr (-) basiller
Meloidosis	<i>P. pseudomallei</i>
Bakteriyal prostat	<i>E. coli</i> ve diğer gr (-) bakteriler
Nektorizan fasiit	Grup A streptokoklar
Gastrointestinal ve bilier traktus enfeksiyonu	<i>E. coli</i> gibi bağırsak bakterileri
<i>İmplant kaynaklı enfeksiyonlar</i>	
Yapay kalp kapakçığı (endokarditis, sepsisemi)	<i>S.epidermidis</i> , <i>S.sanguis</i> , <i>S.aureus</i> (koagülaz (-) <i>Staphylococcus</i> sp.)
Kontakt lensler (keratitis)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i> (Gr(+)) koklar)
Üriner kateter enfeksiyonları (bakteriüri)	<i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Candida</i> sp.
İntravasküler kateterler (sepsisemi, endokarditis)	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , Gr(-) bakteriler
Merkezi venöz kateterler (sepsisemi)	<i>S.epidermidis</i> ve diğerleri (koagülaz (-) <i>Staphylococcus</i> sp.), <i>Enterococcus</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>C.albicans</i>
Hickman kateterleri (kontaminasyon, borularda tıkanma)	<i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i>
Kırık, çıkıklarda yerleştirilen platin vb. ortopedik aletler (sepsisemi)	<i>S. epidermidis</i> , <i>S.aureus</i> , <i>Peptokoklar</i> , <i>Streptokoklar</i> , Gr (-) bakteriler, <i>Propionibacterium acnes</i>
Endotrakeal tüpler (pnömoni)	<i>P.aeruginosa</i> , <i>E.coli</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>S.aureus</i> , geniş bir bakteri ve fungus çeşitliliği
Yapay ses teller	<i>Streptococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Candida</i> sp.
Peritoneal dializ (CAPD) peritonitisi	Çeşitli türler
Penis protezleri	<i>S.epidermidis</i> , <i>S aureus</i>



Şekil 1.7. Biyofilm oluşum basamakları (Veronica, 2011)

Biyofilm oluşumu basamaklar halinde gelişen bir olaydır:

1. Mikroorganizmanın yüzeye tutunması: Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikte tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır.
2. Geri dönüşümsüz tutunma: Yüzeye tutunan hücreler bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarit yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Ekzopolisakkarit aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlamaktadır.
3. Kolonizasyon: Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır.
4. Kopma: Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm oluşturabilir. Biyofilm oluştuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrasında hareketi sağlayacak olan flajeller sentezlenir, üst tabakadan kopmalar gerçekleşir ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır. Bu süreç bir dengeye oturunca süreklileşir (Altun ve Şener, 2008).

Biyofilm tabakasına su ile temas eden tüm yüzeylerde, örneğin; endüstriyel veya evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde, soğutma kulelerinde, kağıt makinelerinde ve diş ünitelerinde rastlanabilir (Fozard, 2012) (Çizelge 1.3.).

Çizelge 1.3. Başlıca endüstriyel, çevresel ve tarımsal biyofilm zararları (Morton vd. 1998; Donlan, 2002; Meyer, 2003)

Sistem	Biyofilm zararları
<i>Endüstriyel ve çevresel</i>	
Soğutma suyu kuleleri	Isı ve yoğunluk iletiminin azalması, verimde düşüş, biyofauling
Isı değiştiriciler - Vantilatör sistemleri	Isı iletiminin azalması, sağlık sorunları
Kağıt ve kağıt hamuru tesisleri	Ürün kalitesinde ve verimde düşüş, Biyofauling
Gıdaların işlenmesi	Kontaminasyonlar, sağlık sorunları, Ekipman hasarları, üretimde düşüş
Metal işçiliği	Metal işçiliği sıvısının degradasyonu
Madencilik	Madenlerin liçinginde biyofauling
Fotoğrafçılık	Hatalı basımlar, makina hasarları
Reverse osmosis	Membran geçirgenliğinin azalması, materyal degradasyonu
Yüzme havuzları	Sağlık sorunları
Lavabo, tuvalet vb. boruları, drenaj sistemleri	Akış hızında azalma, kontaminasyonlar
Klozetler	Kozmetik degradasyonu
Proses ekipmanları	Korozyon ve biyodeteriorasyon
Enerji santralleri kondansatörleri	Isı transfer dayanıklılığında artıştan dolayı enerji kayıpları
Petrol ve gaz direnajları, boru hatları	Su enjeksiyon kuyularının tıkanması, ekşime (H ₂ S üretimi), korozyon
İçme suyu boruları - Su dağıtım sistemleri	Sağlık sorunları, kontaminasyonlar, kötü koku, kötü lezzet, bulanıklılık, biyofauling, tıkanıklık
Gemi gövdeleri	Sıvı sürtünmesine duyarlılığın artışı nedeniyle güç kayıpları ve yüksek maliyet
<i>Tarımsal</i>	
Üzümler ve turunçgiller	Pierce's hastalığı
Patatesler	Halka-kök hastalığı
Sığırlar	Mastitis

Bu ortamlarda biyofilm tabakası, bakterileri başta klor olmak üzere dezenfektanlardan, besinsizlikten, kuraklıktan, pH dalgalanmalarından ve toksinlerden korur. Bu cansız yüzeylerin yanı sıra biyofilm canlı organizmada da çeşitli koşullarda, çeşitli dokularda oluşmaktadır (Jurecska vd., 2013). Biyofilmler insan vücudunda kateterler, kontakt lens, protez kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı ve cansız birçok yüzeyde

bulunabilir (Lindsay ve Von, 2006, Shao ve Bassler, 2012) (Çizelge 1.2.). Biyofilm oluşumu, mikroorganizmayı konağın savunma mekanizmalarından korur. Bu nedenle yapışma veya biyofilm yapımı ile gerçekleşen biyofilm oluşturma önemli bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir (Christensen vd., 1982; Kotilainen, 1990; Johansson ve Rasmussen, 2013). Birçok bakteri türünde yaygın olan biyofilm üretimi, patojenlerin antimikrobiyal ajanlardan ve konağın immün yanıtından kaçmasına olanak sağlamak suretiyle enfeksiyonların patogeneze katkıda bulunmaktadır (Gaddy ve Actis, 2009). Enfeksiyonların oluşumu açısından sürekli bir kaynak oluşturan biyofilmler bu açıdan önemli bir virülans özelliğidir (Gaddy ve Actis, 2009).

Özellikle geçtiğimiz on yıl içerisinde hızla öne çıkmış olan ve bağışıklığı bozulmuş kişilerde görüldüğü kabul edilen, çoğu ölümlü sonuçlanan fırsatçı patojenlerin sebep olduğu biyofilm kökenli enfeksiyonlara ek olarak; artık bağışıklığı tam konaklarda da yaşamı tehdit eden fırsatçı patojenlerden söz edilmeye başlanması dikkati çekmektedir (Arslan, 2007).

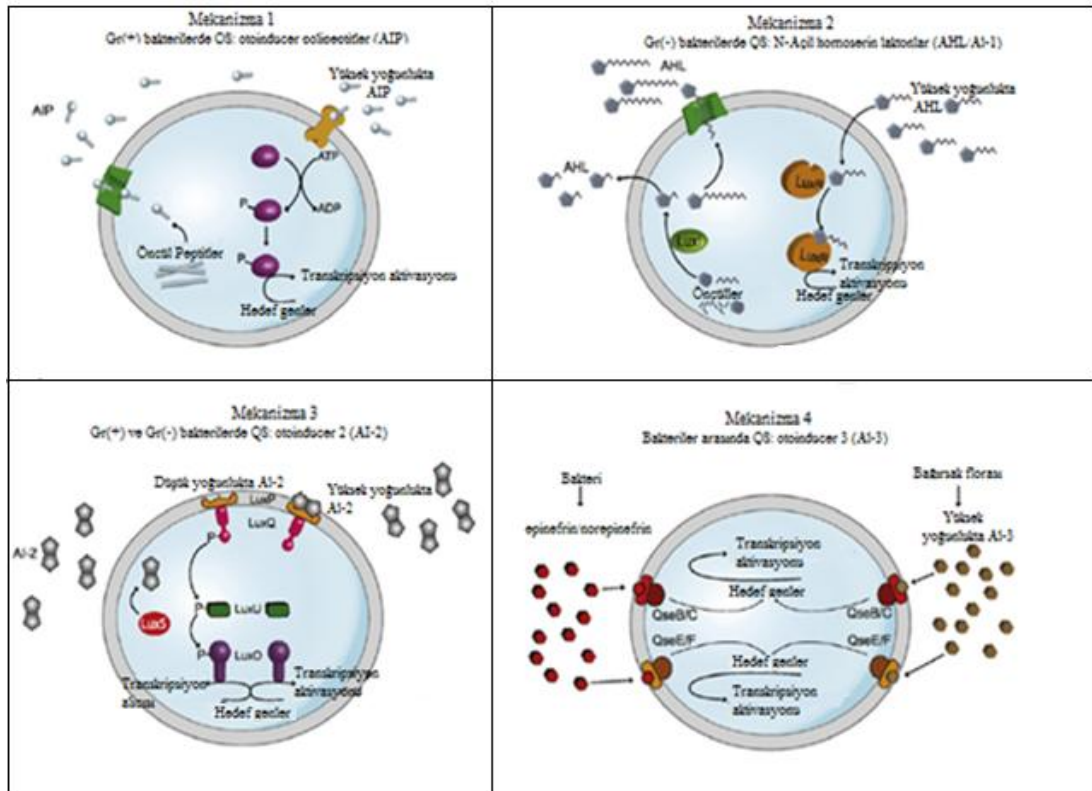
Biyofilmin derinliği ve biyofilm oluşumunun tüm aşamaları oldukça iyi korunmuş sinyallerle kontrol edilir. Bu düzenleyici sinyaller, biyofilm içerisindeki bakteri hücrelerinin besin gereksinimlerini optimize ederler (Stanley ve Lazazzerra, 2004). İşte biyofilmin temelini bu “Quorum Sensing” (QS) (çevreyi algılama) sinyalleri aracılığı ile bir arada toplanan mikroorganizmalar oluşturur (Altun ve Şener, 2008).

QS 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, enfeksiyon sırasında virülans faktörlerinin regülasyonu sonucu konakta immün yanıtı kaçabilir. QS sistemi içinde en önemli rolü sinyal molekülleri üstlenir. Bu moleküllere aynı zamanda “otoinducer” da denilmektedir (Altun ve Şener, 2008).

1.3. Quorum sensing (QS)

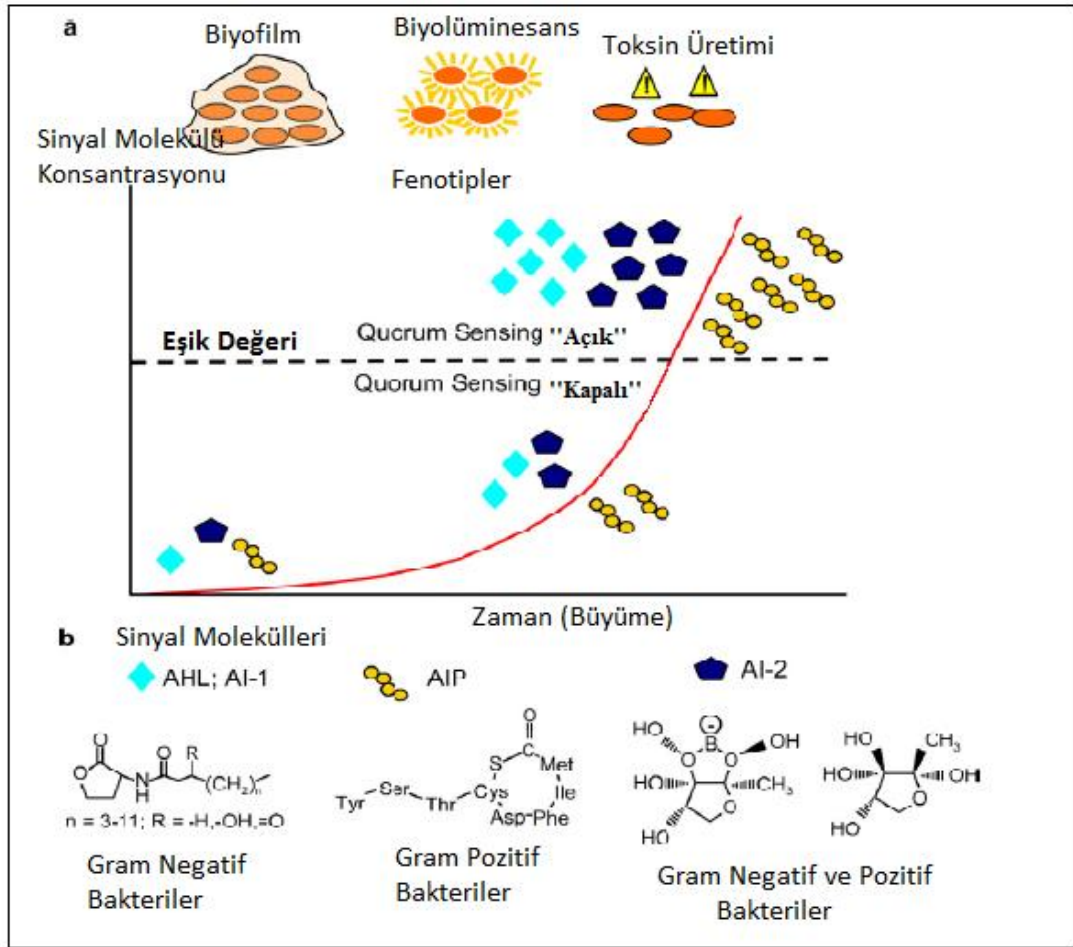
Bakterilerin birbirleri ile iletişim kurduklarının gösterilmesi, mikroorganizmaların oluşturduğu dünya hakkındaki düşünceleri değiştirmiştir. Bu iletişimde kullanılan dil, mikroorganizmaların çevreye saldıkları sinyal moleküllerinden oluşmaktadır.

Bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, böylece çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmektedir (Siddiqui vd., 2012). Son zamanlarda kullanılmaya başlanan çevreyi algılama "Quorum Sensing" (QS) terimi de bu özellikten hareketle "quorum: salt çoğunluk" ve "sense: hissetme" kelimelerinden oluşturulmuştur (Saraçlı, 2006; Spoering ve Gilmore, 2006; Nithya, 2010). Bir takım çevresel faktörlerin etkisi ile genetik modülasyon sonucu ortaya çıkan ve QS olarak bilinen hücreler arası sinyal hipotezi, biyofilm fizyolojisi ve gelişiminde önemlidir (Davies vd., 1998; Lynch vd., 2002; Hammer ve Bassler, 2003; Zhu ve Mekalanos, 2003; Labbate vd., 2004). Çeşitli bakteri türlerinde, sekonder metabolit üretimi, yüzme ve kümelenme hareketi, konjugal plazmit transferi, antibiyotik direnci, biyofilm gelişimi ve virülans gibi fizyolojik süreçler QS aracılığı ile düzenlenir (Williams, 2006; Adonizio vd., 2008). İlk kez Fuqua vd. (1994) tarafından kullanılan QS terimi, "otoinducer" veya bazen de "feromon" olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin, eşik konsantrasyonuna ulaşması sonrası, hücre popülasyon yoğunluğuna bağımlı olarak gen ekspresyonunun olduğu, bakteriyel hücreler arası iletişimin partiküler bir formu olarak tanımlanmıştır (Fuqua vd., 1994). Başka bir tanımla QS; bakterilerin, salgıladıkları "otoinducer" adı verilen küçük sinyal moleküllerinin konsantrasyonunu ölçerek, hücre popülasyon yoğunluğunu ölçmeleridir (Federle ve Bassler, 2003). Ekstraselüler "otoinducer" konsantrasyonunu izleme yoluyla, bakteriler diğerlerini sayabilir ve buna göre hedef gen ekspresyonunu değiştirebilirler (Miller ve Bassler, 2001). QS mekanizması Şekil 1.8.'de gösterilmiştir. QS mekanizmasının bakteriyel patojenitedeki önemi 1990'ların başında anlaşılmaya başlanmıştır. Birçok Gr(-) bakteride virülans faktörlerin üretimi ya da konak hücreleri parçalayan enzimlerin sentezi QS'ye bağlıdır (Çepni ve Gürel, 2011).



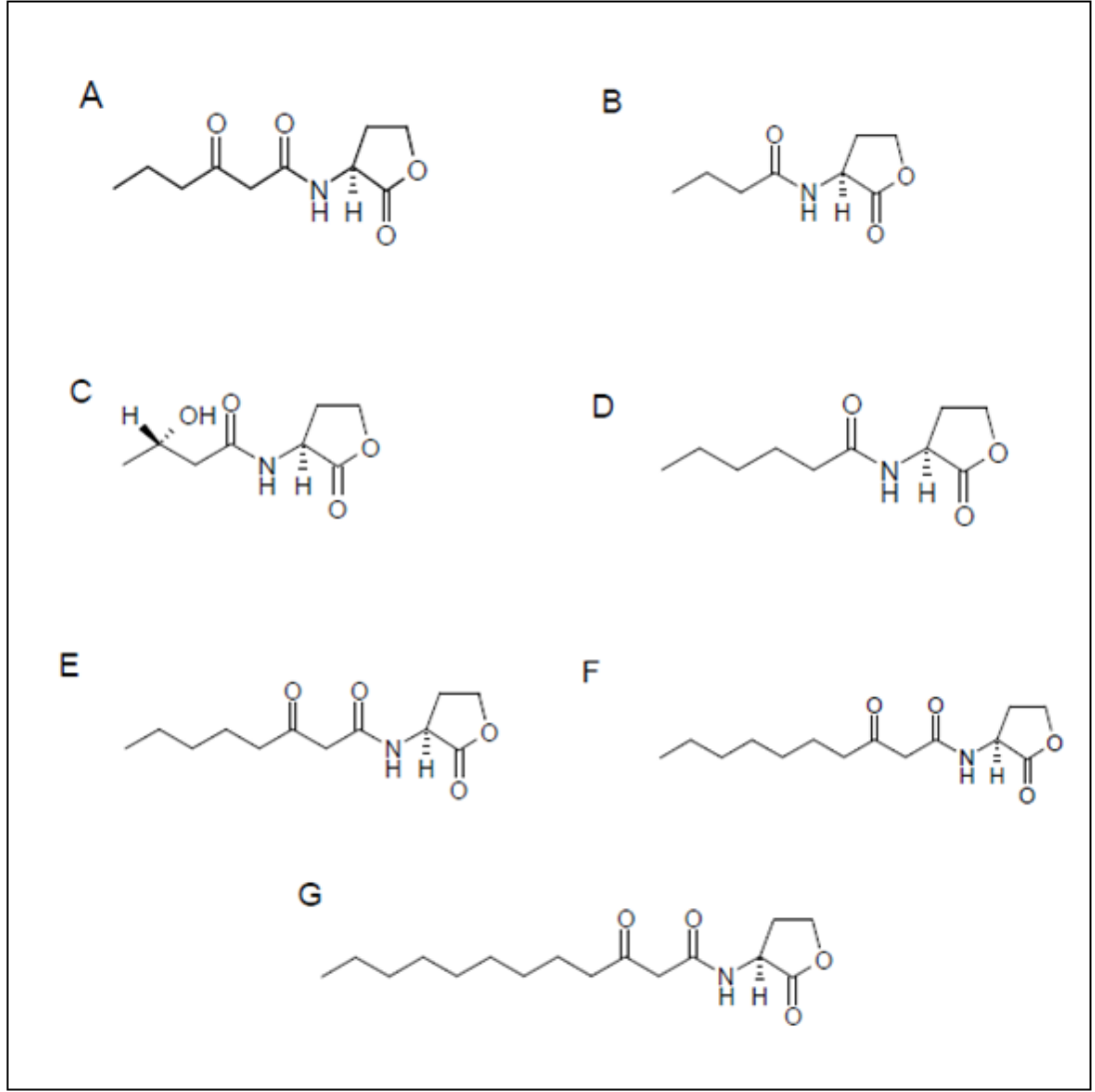
Şekil 1.8: Quorum sensing mekanizmasını anlatan basitleştirilmiş dört model (Boyen vd., 2009)

Birçok hücre dışı virülans faktörünün üretimi bakteri hücre yoğunluğunu izleyen ve bakteriler arasında iletişime olanak sağlayan QS mekanizması ile kontrol edilir. Bakteriler çevre koşullarını algılayabilir ve bu bilgiyi işleyerek uygun şekilde cevap verebilir (Greenberg, 1997; Kleerebezem vd., 1997). Gerek Gr(-) gerek Gr(+) bakteriler tarafından üretilen sinyal molekülleri, tür içinde ve türler arasında iletişimi sağlayarak bakterilerin yaşamlarını devam ettirmeleri ve doğal habitatlarıyla etkileşimleri açısından kritik önem taşır (Şekil 1.9.) (Miller ve Bassler, 2001).



Şekil 1.9. Quorum sensing ve sinyal moleküllerinin şematik gösterimi. (a) Bakterilerin sinyal molekülü üretimi ve hücre dışında toplanması. AI-2 konsantrasyonu eşik değerine ulaşması, QS genleri ve fenotipte genlerin açılması. Fenotip biyofilm oluşumu, biyolüminesans ve toksin üretimini içerir. (b) Çeşitli bakterilerde bulunan QS sinyal molekülleri (Varnika vd., 2011)

Otoinducerlar LuxI-tipinde otoinducer sentaz ve LuxR-tipinde transkripsiyonel aktive edici protein (R-protein) tarafından sentezlenir (Şekil 1.8.) (Fuqua vd., 1996). Gr(-) bakterilerde tanımlanmış çeşitli otoinducerlar açıl homoserin lakton (AHL) yapıdadır ve birbirlerinden açıl yan zincir uzunlukları ve içerikleriyle ayrılırlar (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10. Homoserin lakton molekülleri a) N-(3-okzohekzanoyil)-L-homoserin lakton (OHHL), b) N-butanoyil-L-homoserin lakton (BHL), c) N-(3-hidroksi butanoyil)-L-homoserin lakton (HBHL), d) N-hekzanoyil-L-homoserin lakton (HHL), e) N-(3-okzooktanoyil)-L-homoserin lakton (OOHL), f) N-(3-okzodekanoyil)-L-homoserin lakton (ODHL), g) N-(3-okzododekanoyil)-L-homoserin lakton (OdDHL) (Fuqua vd., 1996)

Düşük hücre yoğunluğunda otoinducer bazal seviyelerde sentezlenir ve bakteriyi çevreleyen ortama yayılır ve yayıldıkça yoğunluğu azalır. Hücre yoğunluğu arttıkça, hücre içi otoinducer yoğunluğu da belirli bir eşik değere dek artar, kritik konsantrasyona ulaşıldığında, otoinducer kendi özgül R-proteinine bağlanır. R-protein otoinducer olmadığı sürece etkin değildir, R-protein/otoinducer kompleksi özgül DNA dizilerine bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu artırır (Van Delden ve Iglewski, 1998).

Bugün için tanımlanan dört QS mekanizması mevcuttur (Şekil 1.8.).

1. Gr(+) bakterilerde QS: otoinducer oligopeptitler (AIP)
2. Gr(-) bakterilerde QS: N-Açıl homoserin laktonlar (AHL/AL-1)
3. Gr(+) ve Gr(-) bakterilerde QS: otoinducer 2 (AI-2)
4. Bakteriler arasında QS: otoinducer 3 (AI-3)

Gr(+) bakterilerde AHL-aracılı QS kullanımı gösterilmemiştir (Federle ve Bassler, 2003). Gr(+) bakteriler QS için peptit temelli sinyalleri kullanırlar (Spoering ve Gilmore, 2006). Gr(+) bakteriler, oligopeptit “otoinducer” larını yapar ve çevrelerine taşırlar. Bunlar “oligopeptitler otoindükleyici peptitler (AIPs)” olarak bilinirler ve tipik olarak 4-16 aminoasitten oluşmakla birlikte, bazen alışılmışın dışında yan zincir modifikasyonları içerirler (Lazazzera ve Grossman, 1998). Bunun yanı sıra, AHL sinyalinden farklı olarak, bakteri hücre membranı AIPs karşı geçirgen değildir. Bu da ekstrasellüler ortama AIPs salgılanmasını kolaylaştırmak için hücre yüzeyine özgü oligopeptit taşıyıcılarını gerekli kılmıştır. AIPs saptanması, iki komponentli duysal iletim sistemi aracılığı ile olur (Şekil 1.8.) (Federle ve Bassler, 2003).

Gr(-) bakterilerde “açıl homoserin laktonlar (AHLs)” QS’e etki eden ana moleküldür ve biyofilm mimarisini etkilediği gösterilmiştir (Parsek ve Greenberg, 2000; Morohoshi vd., 2007; Geske vd., 2008). AHL’ler, Lux I protein ailesi tarafından üretilen küçük moleküller olup, bir lakton halkası ile açıl yan zincirinden oluşurlar (Şekil 1.10.) (Parsek ve Greenberg, 2005). Lux I homologları, açıl yan zincirlerinde yapısal çeşitlilikler olan AHL’ler üretirler (Spoering ve Gilmore, 2006). Her Gr(-) bakteri türü, tek AHL veya birden fazla Lux I tip proteine sahipse tek AHL kombinasyonu üretir. Bunun sonucunda da sadece aynı türün üyeleri bunu tanıyarak yanıt verir. Diğer sinyal molekülleri gibi AHL’ler de hücrede sabit hızla üretilir ve hücrelerin bulunduğu ortamda birikerek dansiteyi artırır. Eşik konsantrasyonda gen ekspresyonunda değişikliği uyarırlar (Whiteley, 1999). AHL’ler sitoplazmaya difüze olarak ve her AHL için spesifik homolog Lux R’ye bağlanarak transkripsiyonu etkilerler. DNA-bağlayan proteinlerin Lux R ailesi, korunmuş bir başlatıcı zincire bağlanır ve transkripsiyonu pozitif ya da negatif yönde etkileyebilir (Spoering ve Gilmore, 2006).

Gr(-) bakteriler arasında en iyi çalışılmış bu LuxR/LuxI homolog sistemi (Şekil1.8.) ve temel sinyal molekülü AHL'lerdir. Konakla ilgili virülans faktörlerinin ve sekonder metabolitlerin üretiminin kontrol edilmesinde rol oynar (Hentzer vd., 2002). Gr(-) bakterilerden *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Choromobacterium*, *Serratia* gibi bitki ve hayvan patojenlerinde LuxI ve LuxR homologu olan TraI ve TraR proteinleri ve sinyal molekülü olan AHL aracılığıyla aktive edilirler (Boşgelmez-Tınaz, 2003).

Gr(-) bakterilerde bulunan QS sistemleri ve bu sistemler tarafından kodlanan özellikler Çizelge 1.4.'de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Gr(-) bakteriler'de bulunan QS sistemleri ve bu sistemler tarafından kodlanan özellikler (Juhas vd., 2005)

<i>las</i> sistemi tarafından kontrol edilen özellikler	<i>rhl</i> sistemi tarafından kontrol edilen özellikler
<i>PQS</i> sentezi	<i>PQS</i> sentezi
<i>rhl</i> sistemi	Ramnlipit üretimi
Biyofilm oluşumu	
Alkalın proteaz üretimi	
Elastaz üretimi	Elastaz üretimi
	Piyosiyanın üretimi
	Lipaz üretimi
Lipaz üretimi	Lektin A ve B üretimi
Hidrojen siyanid üretimi	Hidrojen siyanid üretimi
<i>Xcp</i> salgılanması	<i>Xcp</i> salgılanması
	Kitinaz üretimi
	<i>RpoS</i>
Ekzotoksin A üretimi	
Nöraminidaz	
Katalaz üretimi	
Süperoksit dismutaz üretimi	
Aminopeptitaz	
Yüzme hareketi	
	Ekzoenzim S üretimi
Kayma hareketi	Kayma hareketi
Titreme hareketi	Titreme hareketi

AHL molekülleri yan açıl zincirine amid bağıyla bağlanmış homoserin lakton molekülü olup farklı bakteri türleri arasında çeşitlilikler gösterir. Bu çeşitlilikler

Çizelge 1.5.'de sunulmuştur. Açıl zincirinin uzunluğu 4-16C arasında değişebilir (Fuqua ve Greenberg, 2002).

Çizelge 1.5. QS sistemini kullanan bazı bakteriler ve bunların QS sisteminde rol alan homoserin lakton molekülleri (Vipin, 2013)

İzolatlar	QS sinyal molekülleri	Fenotip
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136	C6HSL, C14HSL	β -galaktosidaz aktivitesi, Ti plazmit konjugasyonu
<i>A. tumefaciens</i> suşu NT1	3-oxo-, 3-hydroxy-	β -galaktosidaz aktivitesi, Ti plazmit konjugasyonu
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026-CviR alıcısı	Konak hücre AHL molekülleri	Violasin pigmenti üretimi,
<i>Escherichia coli</i> plazmiti (pSBS36)	C4HSL	Biyoluminesans
<i>E. coli</i> plazmiti (pSB403)	Konak hücre AHL molekülleri	Biyoluminesans
<i>E. coli</i> plazmiti (pSB401)	C6HSL	Biyoluminesans
<i>E. coli</i> JM109 plazmiti (pSB1075)	C12HSL	Biyoluminesans
<i>E. coli</i> JM109 plazmiti	C4HSL	Biyoluminesans
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 30-201	C6HSL	Fenazin antibiyotiği üretimi
<i>Pseudomonas putida</i> 117 (pAS-C8)-CepR alıcısı	C8HSL	Yeşil floresan proteini
<i>P. putida</i> IsoP/gfp	3OC12HSL	Floresan
<i>P. aeruginosa</i>	N-(3-okzododekanoyl)-HSL, N-bütyril-HSL	Hücre dışı enzimler, biyofilm oluşumu, ramnolipit üretimi
<i>S. liquefaciens</i> PL-10-LuxAB	C4HSL	Biyoluminesans
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm41 sinI:lacZ (pJNSinR)	C16-C20HSL	β -galaktosidaz aktivitesi
<i>Vibrio harveyi</i> BB170- LuxP alıcısı	AI-2	Biyoluminesans
<i>V. harveyi</i> BB886- LuxP alıcısı	AI-1	Biyoluminesans
<i>V. fischeri</i>	(3-okzo-C6-HSL) N-(3-okzoheksanoyl)-HSL	Biyoluminesans
<i>V. anguillarum</i>	3-okzo-C10-HSL	Biyoluminesans
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Carotovora</i>	3-okzo-C6-HSL	Ekzoenzimler ve karbapenem antibiyotiğinin üretimi

Çizelge 1.5.^(devam)

Bakteriler	QS sinyal molekülleri	Fenotip
<i>E. chrysanthemi</i>	3-okzo-C6-HSL	Pektat liyaz
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	C6-HSL	RhiABC rizofer geni ekspresyonu, nodül oluşumu
<i>Burkholderia cepacia</i>	C8-HSL	Proteaz ve siderofor üretimi
<i>Aeromonas hydrophila</i>	BHL N-bütanoyil-HSL	Hücre dışı proteaz üretimi
<i>A. xahmonicida</i>	BHL N-bütanoyil-HSL	Hücre dışı proteaz üretimi
<i>Yersinia enterocolitica</i>	C6-HSL	?
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	3-okzo-C6-HSL	Bakteriyal kümeleşme ve hareketliliğin kontrolü

Geçen 10 yıl içerisinde 25'den fazla Gr(-) bakteri türünde çevreyi algılama döngüsünün olduğu tespit edilmiştir. *V. harveyi* ve *M. xanthus*'un QS sistemleri hariç Gr(-) bakterilerdeki tüm QS sistemi, simbiyotik bakteri olan *V. fischeri*'deki döngüye benzer. Bu bakteriyel çevreyi algılama döngüleri en azından *V. fischeri*'nin regülatör proteini olarak bilinen LuxI ve LuxR proteinlerinin homologlarını içerirler. LuxI benzeri proteinler, sinyal molekülü olarak bilinen homoserin lakton sinyal moleküllerinin biyosentezinden sorumludur. Ortamdaki sinyal molekülü konsantrasyonu, çoğalan hücre populasyon yoğunluğuyla artar. LuxR benzeri proteinler aynı kökenli homoserin lakton sinyal moleküllerine, bu moleküllerin yoğunlukları kritik sınır değerine ulaştığında bağlanır ve bu molekül kompleksi hedef genin transkripsiyonunu da aktive ederek, genler tarafından kodlanan özelliklerin gerçekleştirilmesini sağlar (Bassler vd., 1993; Fuqua ve Winans, 1996; McClean vd., 1997; Shaw vd., 1997; Swift S-Karlyshev vd., 1997; Wood vd., 1997; Lindum vd., 1998; Winson vd., 1998; Miller ve Bassler, 2001; Steidle vd., 2001; Llamas vd., 2004; Venturi, 2006).

AHL moleküllerinin spesifik reseptörleri, transkripsiyonel regülatörlerin LuxR ailesinin üyelerindendir. LuxR ailesinin üyeleri DNA'ya bağlanan C-terminal ve AHL'lara bağlanan N-terminal domainleri olmak üzere 2 domainden oluşur. Genellikle R ve I genleri birbirleriyle bağlantılı olarak işlev gösterirler (Parsek ve Greenberg, 2000; Barczak ve Hung, 2009).

Gr(-) bakteriler arasında QS sistemi LuxI/LuxR tip döngüye dayalı olanlardan *V. fischeri*, *P. aeruginosa*, *A. tumefaciens* ve *E. carotovora* en iyi çalışılmış sistemlerdir (Miller ve Bassler, 2001).

V. fischeri, pek çok ökaryotik konakla simbiyotik ilişki içinde yaşar. Canlı, özelleşmiş bir ışık organına sahiptir. Işık organındaki bakteri kültürünün hücre yoğunluğuyla sıkı şekilde ilişkilidir ve bu olay çevreyi algılama sistemi ile kontrol edilir. Işık organında *V. fischeri*'nin yoğunluğu mL'de 10^{11} hücre gibi oldukça yüksek değerlere ulaşır. *V. fischeri* kültürünün yoğunluğu arttıkça ürettiği sinyal molekülü hormonu hücre dışına salar. Bu hormon bakterinin ışık organının içinde tutulur (Andrew vd., 2011; Walter ve Gregory, 2013).

Taşlar üzerinde oluşmuş suyla temas eden biyofilmlerde yapılan araştırmalarda QS sinyal molekülü AHL yanıtı *Agrobacterium tumefaciens* A136'da saptanmıştır. Sözü edilen bu çalışmada AHL canlı biyofilm ve biyofilm örneklerinde saptanmışken biyofilm içermeyen taşlarda bulunmamıştır (McLean vd., 1997).

Vibrio, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Yersinia*, *Comomonas*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* gibi birçok Gr(-) bakteri türü bitkilerde ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara yol açma özelliğini geliştirmek ve konağın birçok hücrelerini işgal etmek için hücreler arası iletişimi sağlayan ve birçok kolonizasyon ve virülans faktörünü düzenleyen QS sistemini geliştirmişlerdir. QS sistemi logaritmik büyüme fazından durağan faza geçişte salgılanan virülans faktörlerinin salınımını artırır (Vuong vd., 2000; Novick, 2003). Bunun örnekleri; kobaylarda abse (Bunce vd., 1992) ve artrit (Abdelnour vd., 1993) gelişimi, yine tavşanlarda endokardit (Cheung vd., 1994) gelişimidir.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Malzeme

2.1.1. Örneklerin toplanması

Örnekler Haziran-Ağustos 2010'da Pakmaya/Kemalpaşa A.Ş. Üretim Tesisi-İzmir ve Köyceğiz Atık Arıtma Tesisi-Muğla'ne ait su sistemlerinin farklı kısımlarındaki su ile temas eden yüzeylerindeki cıvık biyofilm tabakalardan ve sulardan alınmış olup steril kaplar içerisine konulmuştur. Bu alınan örnekler iki saat içinde laboratuvara getirilmiş ve analize alınmıştır. Analiz için farklı alanlardan alınan kazıntılardan çift tekrarlı ekimler yapılmıştır. Çizelge 2.1.'de örneklemelerin yapıldığı tesislere ait kısımlar ve toplanan örnek tipi görülmektedir.

Çizelge 2.1. Çalışmada örneklemelerin yapıldığı tesislere ait kısımlar ve toplanan örnek tipi

Tesise ait kısım	Toplanan örnek tipi
Sirkülasyon havuzu	Su, havuz kenarlarındaki biyofilm yapıları
Yoğunlaştırma çıkışı	Biyofilm
Damlatmalı filtre sistemi	Su, biyofilm
Soğutma ünitesi	Biyofilm

2.1.2. Besiyerleri

Besiyeri 1. Glukoz Maya Kazein Hidrolizatı Agar (GYC Agar) (Sutherland, 1983)

Glukoz	12gr
Maya eksrakıtı	1gr
Kazein hidrolizatı	1gr
Agar	15gr

Distile su 1000mL

pH 6,8

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20dk süre ile steril edilmiş ve 50°C’ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolasyonda kullanılmıştır.

Besiyeri 2. ESP Ortamı (Slime üretimini teşvik edici ortam) (Horan ve ark., 1988)

Glukoz	1.7gr
NH ₄ Cl	0.08gr
Na ₂ HPO ₄	0.02gr
K ₂ SO ₄	0.02gr
NaCl	0.02gr
MgSO ₄	0.012gr

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20dk süre ile steril edilmiş ve 50°C’ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolasyonda, kültürlerin stoklanmasında, biyofilmlerin kalitatif ve kantitatif tayininde modifiye edilerek kullanılmıştır.

Besiyeri 3. Nutrient Agar (NA) (Merck)

Et pepton	5gr
Et eksrakt	3gr
Agar	12gr

NA’dan 23 gr/l alınıp distile suda çözüldükten sonra agarı çözmek için kaynatılmış ve test tüplerine dağıtılarak otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dk süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra yatık halde katılaştırılmıştır (Tamer ve ark., 1989). Bu besiyeri biyokimyasal testlerde kullanılan 24 saatlik kültürlerin hazırlanmasında, stoklanmasında ve kültürel karakteristiklerin saptanmasında, ayrıca NA ve NB besiyerleri (Merck) *Chromobacter violaceum* ATCC 12472 suşunun aktifleştirilmesi ve stoklanmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 4. O/F Besiyeri (Hugh-Leifson Medium)

Trypton	2gr
Sodyum klorür	5gr
Dipotasyum fosfat	0.3gr
Brom timol mavisi	0.03gr
Agar	3gr
Distile su	1000mL

pH 7.1

İçerik suda eritilip tüplere 5'er mL konularak 1.1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 20 dakika süre ile steril edilmiştir. Her bir tüpten iki adet hazırlanmıştır. İğne özeyle daldırılarak ekim yapılmıştır. Her örnekten iki tüpe ekilmiştir. Birine 1 mL sterilsıvı parafin eklenerek oksijen girişi önlenmiştir (fermentasyon). İki hafta içinde sonuç alınmıştır (37°C'de 1-15 gün). Besiyeri izolatların biyokimyasal tanılamalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 5. Trypton Broth

Trypton	10gr
Distile su	1000mL

pH 7.0

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra tüplere dağıtılarak otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 20dk süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri mikroorganizmaların triptofan amino asitini parçalama yeteneğinin tayininde kullanılmıştır.

Besiyeri 6. Metil Red-Voges Proskauer Broth

Soya pepton	7gr
Glukoz	5gr
K ₂ HPO ₄	5gr
Distile su	1000mL

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra tüplere dağıtılarak otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 20dk süre ile steril edilmiştir. Bu besiyeri mikroorganizmaların glukozu okside ederek yüksek konsantrasyonda asit son ürünleri üretilme yeteneğinin ortaya çıkarılması için kullanılmıştır.

Besiyeri 7. Simon Sitrat Agar

MgSO ₄	0.2gr
NaCl	5gr
Amonyum dihidrojen fosfat	1gr
K ₂ HPO ₄	1gr
Sodyum sitrat	5gr
Brom timol mavisi	8mL
(% 1' lik solüsyondan)	
Agar	15gr
Distile su	990mL

pH 7.0

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra tüplere dağıtılarak otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 20dk süre ile steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra tüpler yatırılarak besiyerinin yatık katılaşması sağlanmıştır. Bu besiyeri mikroorganizmaların karbon ve enerji kaynağı olarak sitratı kullanımının araştırılması için kullanılmıştır.

Besiyeri 8. Enterococcus Agar (EA) (Difco)

Triptoz	20gr
Maya ekstraktı	5gr
Dekstroz	2gr
Dipotasyum fosfat	4gr
Sodyum azid	0.4gr
Agar	10gr
2.3.5-trifenil tetrazolium klorid	0.1gr

Enterococcus Agar'dan 42gr/l alınıp distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15dk süre ile steril edilmiş ve 50°C'ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolatların biyokimyasal tanılamalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 9. Eosin Metilen Mavisi Agar (EMB) (Merck)

Pepton	10gr
K ₂ HPO ₄	2gr
Laktoz	5gr
Sükroz	5gr
Eozin Y sarısı	0.4gr
Metilen mavisi	0.07gr
Agar	13.5gr

EMB Agar'dan 36 gr/l alınıp distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15dk süre ile steril edilmiş ve 50°C'ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolatların biyokimyasal tanılamalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 10. Salmonella Shigella Agar (SSA) (Difco)

Et eksrakt	5gr
Pankreatik kazein	2.5gr
Laktoz	10gr
Bile tuz	8.5gr
Sodyum sitrat	8.5gr
Sodyum tiyosülfat	8.5gr
Ferrik sitrat	1gr
Nötral kırmızı	0.025gr
Agar	13.5gr
Brillant yeşili	0.330gr

SSA besiyerinden 60gr/l alınıp distile suda çözüldükten sonra 2-3 dk kaynatılması ile steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların biyokimyasal tanılamalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 11. Mannitol Salt Fenol Kırmızı Agar (MSA) (Fluka)

D-mannitol	10gr
Et eksrakt	1gr
Pepton	10gr
Fenol kırmızısı	0.025gr
Sodyum klorid	75gr
Agar	15gr

MSA besiyerinden 111 gr/l alınıp distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15dk süre ile steril edilmiş ve 50°C’ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolatların biyokimyasal tanılamalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 12. Pseudomonas Agar Base (Oxoid)

Jelatin pepton	16gr
Kazein hidrolizat	10gr
Potasyum sülfat	10gr
Magnezyum klorid	1.4gr
Agar	11gr

Pseudomonas Agar’dan 24.2 gr/500 mL alınıp distile suda çözüldükten sonra 5 ml/500 mL gliserol eklenmiştir ve otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dk süre ile steril edilmiştir. Steril edilen besiyerine Pseudomonas C-F-C Supplement ilave edilmiş daha sonra 50°C’ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolatların biyokimyasal tanılamalarında kullanılmıştır.

Besiyeri 13. Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Merck)

Kazein pepton	15gr
Et pepton	5gr

Et eksrakt	3gr
Maya eksraktı	3gr
NaCl	5gr
Laktoz	10gr
Sükroz	10gr
D(+) glucose	1gr
Amonyum demir (III) sitrat	0.5gr
Sodyum tiyosülfat	0.5gr
Fenol kırmızısı	0.024gr
Agar	12gr

TSI Agar'dan 64 gr/l alınıp distile suda çözüldükten sonra tüplere dağıtılmış, otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 20 dk süre ile steril edilmiştir. Otoklavdan sonra tüplerdeki besiyeri yatırılarak katılaştırılmıştır. Bu besiyeri H₂S üretimi ve glikoz, laktoz, sakkarozun kullanımının incelenmesi için kullanılmıştır.

Besiyeri 14. Nitrat Broth

Meat Extract	3gr
Peptone	5gr
Potasyum nitrate	1gr
Distile su	1000mL

pH 7.0

Maddeler ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C' de 20 dk süre ile Durham tüplü tüplerde steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların nitratı indirgemelerini tayin etmek için kullanılmıştır.

Besiyeri 15. Üre Broth (Merck)

Maya eksraktı	0.1gr
KH ₂ PO ₄	9.1gr
Na ₂ HPO ₄	9.5gr

Üre	20gr
Fenol kırmızısı	0.01gr

Üre Broth'dan 38.5 gr/l distile suda çözündükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C' de 15 dk süre ile tüplerde steril edilmiştir. 50°C'ye kadar soğuyan besiyerine üre milipor filtreden steril edilerek ilave edilmiştir. Bu besiyeri mikroorganizmaların üreyi hidrolize edip etmediğini saptamak amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri 16. Nutrient Jelatin Besiyeri

Nutrient Broth (Merck) içine %4 oranında jelatin ilavesiyle hazırlanmıştır. Bu besiyeri izolatların jelatini kullanıp kullanmamalarını test etmek için kullanılmıştır.

Besiyeri 17. Yarı Katı Nutrient Agar

Nutrient Broth (Merck) içine 8 gr/l agar ilave edilerek hazırlanmıştır. Bu besiyeri mikroorganizmaların hareketliliklerinin tespiti için kullanılmıştır.

Besiyeri 18. Lisin Dekarboksilaz Broth (LD Broth) (Fluka)

L-Lizin	5gr
Laktoz	7.5gr
Sükroz	7.5gr
Sodyum klorür	5gr
Maya ekstraktı	3gr
Fenol kırmızısı	0.08gr
Sodyum desoksikolat	2.5gr
Sodyum tiyosülfat	6.8gr
Ferrik amonyum sitrat	0.8gr
Agar	13.5gr

LD Broth'dan 14 gr/l distile suda çözündükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 20 dk süre ile ince tüplerde steril edilmiştir. Her birinde ayrı ayrı %1 oranında L-lisin'li 4-5 ml miktarında birer tüp ve bir adet de kontrol (amino asitsiz) besiyeri hazırlanmıştır. Tüplerin üzerine 5'er mm kalınlığında steril parafin

konulmuştur. Bu besiyeri izolatların lisini dekarboksile edip etmediğini test etmek için kullanılmıştır.

Besiyeri 19. Tryptik Soy Broth (TSB) (Oxoid)

Kazein pepton	17gr
Soya pepton	3gr
D(+) Glucose	2.5gr
NaCl	5gr
K ₂ HPO ₄	2.5gr

TSB besiyerinden 30 gr/l distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dk süre ile tüplerde steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların oluşturduğu biyofilmlerin kalitatif tayininde kullanılmıştır. Ayrıca TSA (%2 agar ilaveli) ve TSB besiyerleri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35920 suşunun aktifleştirilmesi ve stoklanması için kullanılmıştır.

Besiyeri 20. Rizobium Medium (RZB)

Maya ekstraktı	1gr
Toprak ekstraktı	200mL
Mannitol	10gr
Agar	15gr
Distile su	800mL

pH 7.2

Toprak ekstraktı:

Kuru bahçe toprağı	10gr
Na ₂ CO ₃	0.2gr
Distile su	200mL

Toprak solüsyonu otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dk süre ile steril edilmiştir. Santrifüj ile elde edilen partikülsüz berrak kısımdan alınmıştır. Bu besiyeri *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 19358 suşunun aktifleştirilmesinde ve stoklanmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 21. Luria-Bertani Medium (LB)

Trypton	10gr
Maya eksraktı	5gr
NaCl	10gr
Distile su	1000 mL
pH 7.0	

Maddeler ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dk süre tüplerde steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların mikrolaka cihazı ile kantitatif biyofilm üretimlerinin incelenmesinde kullanılmıştır.

Besiyeri 22. M9-Glutamat Minimal Medium Agar

Na ₂ HPO ₄	48mM
K ₂ HPO ₄	22mM
NaCl	8.5mM
NH ₄ Cl	18.7mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	2mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1mM
Agar	15gr
Glukoz	% 0.2
Glutamat	% 0.005
Metilen Mavisi	%0.0005
CTAB	% 0.2

Maddeler ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dk süre steril edilmiş ve 50°C’ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri ramnolipit üretimi testi için kullanılmıştır.

Besiyeri 23. Skim Milk Agar (SMA) (Oxoid)

Kazein pepton	5gr
Maya ekstraktı	2.5gr

Süt tozu	1gr
Glukoz	1gr
Agar	10.5gr

SMA besiyerinden %10 oranında hazırlanıp distile suda çözüldükten sonra tüplere dağıtılmış, otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 5 dk süre ile steril edilmiştir. Proteaz doğrulama testinde ise SMA besiyerinden %10 oranında hazırlanıp distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 5 dk süre ile steril edilmiş ve 50°C’ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri proteaz testi için kullanılmıştır.

Besiyeri 24. Tween 80 Agar

Pepton	10.0gr
Sodyum klorür	5.0gr
Kalsiyum korür	0.1gr
Agar	15gr
Tween 80	5mL

pH 6.8

Maddeler ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat tamponu ile pH’sı 6.8 ile ayarlanmış ve otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dk süre steril edilmiş ve 50°C’ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır Bu besiyeri esteraz testi için kullanılmıştır.

Besiyeri 25. Kayma Test Agar

Nutrient Agar	8gr
Agar	5gr
Glukoz	5gr

Maddeler ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra tüplere dağıtılmış, otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dk süre steril edilmiştir. Bu besiyeri kayma testi için kullanılmıştır.

Besiyeri 26. Yüzme Test Agar

Trypton	10gr
Agar	3gr
NaCl	5gr

Maddeler ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra tüplere dağıtılmış, otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dk süre tüplerde steril edilmiştir. Bu besiyeri yüzme testi için kullanılmıştır.

Besiyeri 27. Titreme Testi

Trypton	10gr
Maya Ekstrakt	5gr
NaCl	5gr
Agar	10gr

Maddeler ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra tüplere dağıtılmış, otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’ de 20 dk süre steril edilmiştir. Bu besiyeri titreme testi için kullanılmıştır.

Besiyeri 28. Slime Faktör Agar (Kongo Red Agar) (CRA)

Glukoz	80gr
Kongo kırmızısı	0.8gr

Luria Bertania Agar

Maddeler ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra tüplere dağıtılmış, otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dk süre steril edilmiştir. Bu besiyeri slime faktör testi için kullanılmıştır.

Besiyeri 29. DNaz Agar (Fluka)

Triptoz	20g/l
Deoksiribonükleik asit	2g/l
Sodyum klorit	5g/l
Metil yeşili	3g/l
Agar	12g/l

pH 7.3±0.2

DNaz Agar'dan 42gr/l alınıp distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dk süre ile steril edilmiş ve 50°C'ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri DNaz testi için kullanılmıştır.

Besiyeri 30. Egg Yolk Agar (Merck)

Egg Yolk Emülsiyonu	10mL
NaCl	1gr
Maya ekstrakt agar/Nutrient agar	100mL

Maddeler ayrı ayrı distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C' de 20 dk süre tüplerde steril edilmiştir. Bu besiyeri fosfolipit hidrolizi için kullanılmıştır.

Besiyeri 31. Brain Heart Infusion Broth (BHB) (Merck)

Beyin ekstraktı	27.5gr
D(+) Glukoz	2gr
NaCl	5gr
Na ₂ HPO ₄	2.5gr

BHB besiyerinden 37 gr/l alınıp distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15dk süre ile steril edilmiş ve 50°C'ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolatların taze kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 32. Bizmut Sülfid Agar (BSA) (Merck)

Et ekstraktı	5gr
Pepton	10gr
D(+) Glukoz	5gr
Di-sodyum hidrojen fosfat	4gr
Demir (III) sülfat	0.3gr
Bizmut sülfid indikatör	8gr
Brilliant yeşili	0.025gr

Agar

15gr

pH 7.6 ± 0.2 (sterilizasyondan önce)

Bizmut Sülfid Agar'dan 30 gr/1000 mL alınıp distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C'de 20 dk süre ile steril edilmiştir. Steril edilen besiyeri 50°C'ye soğutularak petrilere dağıtılmıştır. Bu besiyeri izolatların biyokimyasal tanılamalarında kullanılmıştır.

2.1.3. Kullanılan çözeltiler ve kimyasal maddeler

Çalışmanın çeşitli aşamalarında kullanılan çözelti ve diğer kimyasallar aşağıda verilmiştir.

Çözelti 1. Gram'ın Kristal viyole boyası. 20 mL etanolde 2 gr kristal viyole ve 80ml distile suda 0.8 gr amonyum oksalat çözülmüş ve bu çözelti alkolde çözülmüş olan kristal viyolete ilave edilmiştir. Boya, izolatların gram boyamalarında kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

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

Çözelti 3. Gram'ın Safranin boyası. 0.25 gr safranin %95'lik etanolde (10ml) çözülüp, 1000 mL distile su ilave edilerek iyice karıştırılmış ve sonra filtre kağıdından süzümüştür. Boya, izolatların gram boyamalarında kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

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

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

Çözelti 6. %3'lük H₂O₂ çözeltisi, izolatların katalaz aktivitesinin tayininde kullanılmıştır.

Çözelti 7. 1 Molar HCl çözeltisi. %37'lik HCl'den 8.4 mL alınarak distile suyla 100 mL hacme tamamlanarak hazırlanmıştır. pH'nın ayarlanmasında kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Çözelti 8. 1 Normal NaOH çözeltisi. 4 gr NaOH 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır. pH'nın ayarlanmasında kullanılmıştır (Tamer ve ark., 1989).

Çözelti 9. Kovaks çözeltisi. 5 gr paradimetil aminobenzaldehit; 75 mL amil veya bütül alkolde çözülmüş ve solüsyon hafif ısıtılmıştır. 25 mL % 37' lik HCl dikkatlice eklenmiş ve karıştırılmıştır. IMVIC testinde kontrol çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Çözelti 10. Metil red çözeltisi. 0.1 gr metil red etanolde çözülüp üzerine 250 mL distile su ilave edilmiştir. İyice karıştırılmış ve sonra filtre kâğıdından süzülerek hazırlanmıştır. IMVIC testinde kontrol çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Çözelti 11. α -Naftol çözeltisi. 5 gr α -Naftol 100 mL etanolde (% 95 lik) çözdürülerek hazırlanmıştır. IMVIC testinde kontrol çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Çözelti 12. %40'luk KOH çözeltisi. 40 gr KOH 75 mL distile suda çözülmüş, oda sıcaklığında bir süre bekletilmiştir. Sonra 0.3 gr kreatin ilave edilerek iyice çözülmüş ve 25 mL distile su daha ilave edilerek hazırlanmıştır. IMVIC testinde kontrol çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Çözelti 13. Mc Farland'ın 1 numaralı standart çözeltisi. 9 mL 0.18 M H_2SO_4 (sülfürik asit) çözeltisine 0.5 mL 0.048 M $BaCl_2$ (baryum klorür) çözeltisi ilave edilip iyice karıştırılmasıyla hazırlanmıştır (Gürgün ve Halkman, 1990). Bakterilerin başlangıç inokulumunun ayarlanmasında kullanılmıştır.

Çözelti 14. Sitrik asit-disodyum fosfat tampon çözeltisi.

a) $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 21.01 gr / 1000 mL distile su (0.1 M)

b) $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 35.6 gr / 1000 mL distile su (0.2 M)

a ve b çözeltileri uygun miktarda karıştırılarak pH 6.8 olan tampon çözelti hazırlanmıştır.

Çözelti 15. Tris-EDTA (TE) tampon çözeltisi

(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8)

1 M Tris-HCl, pH 8 10gr

0.5 M EDTA, pH 8 2gr

Steril distile su 988gr

Genomik DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

Çözelti 16. %1 oranında agaroz içeren jel, genomik DNA'ların yürütülmesinde matriks olarak kullanılmıştır.

Çözelti 17. 0.2 µg/mL etidyum bromür çözeltisi, (Sigma Chem. Co., USA) agaroz jeldeki bantların UV altında 366 nm'de görünür hale getirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

2.1.5. Kullanılan Başlıca Cihazlar

- İnkübatörler (Stuart Scientific ve Nüve EN500)
- Mikroskop (Olympus CH 20)
- Otoklav (Hirayama)
- Manyetik karıştırıcı (IKAMAG RH)
- pH metre (Thermo Electron)
- Spektrofotometre (Perkin Elmer-Lambda 25)
- Hassas terazi (Sartorius, GC 803)
- Mikroplaka okuyucu fotometre (Thermo Scientific-Multiskan FC)
- Su banyosu (GFL 1002. GFL GmbH., Germany)
- GeneAmp9700 Thermocycler (Applied BioSystems, USA)
- Jel görüntüleme sistemi (UVP Basic Jel, Biosan)
- PZR termal cycler (Eppendorf Netheler-Hinz GmbH 22331-Hamburg)

2.2. Yöntem

2.2.1. EPS üretici bakterilerin izolasyonu

EPS üretici bakterileri izole etmek için örneklerden 1 mL alınarak steril Ringer solüsyonu ile 10^{-4} ve 10^{-5} son konsantrasyonları verecek şekilde on katlı

seyreltmeleri hazırlanmıştır. Daha sonra “Yayma Plaka Yöntemi”ne (Brock ve Madigan, 1994) göre her bir seyreltmeden 0.1 mL ESP Agar ve GYC Agar üzerine dökülerek steril bir L-bağet yardımıyla homojen olarak dağıtılmış, “Dökme Plaka Yöntemi”ne göre her seyreltmeden 1 mL alınarak yine aynı ortamlara ekimleri sağlanmış ve tüm ekim yapılan petriler 30°C’de 72 saat inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonunda farklı kolonilerin saf kültürlerini elde etmek amacıyla NA’lı ve ESP besiyerli petrilere çizgi ekimler yapılarak 30°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, elde edilen saf kolonilerin hepsi yatık olarak NA’lı ve ESP besiyerli tüplere çekilip 30°C’de 72 saat inkübe edilerek stok kültür olarak +4°C’de muhafaza edilmiştir. Daha uzun süreli stoklamalar için her bakteri suşu, -80°C’de derin dondurucuda %15’lik steril gliserolde muhafaza edilmiştir.

2.2.2. İzolatların tanılamaları

2.2.2.1. Kültürel özellikler

İzolatlar NA’ya ekilerek 30°C’de 24 saatlik inkübasyonlarından sonra oluşan koloniler morfoloji ve pigmentasyon bakımından incelenmişlerdir.

2.2.2.2. Mikroskopik özellikler

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

2.2.2.3. Biyokimyasal özellikler

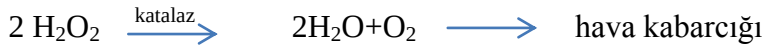
İzolatların biyokimyasal tanılamalarında Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (Vol 1-4, 1920-1989) esas alınmıştır.

KOH testi. Gram boyama testini desteklemek amacıyla yapılan bu denemede, temiz bir lamın üzerine 1 damla %3’lük KOH çözeltisi damlatılarak üzerine 30°C’de 24 saat NA’da büyütülmüş izolatlardan bir öze dolusu konulmuş ve bir cam çubukla

karıştırılmıştır. Süspansiyondan cam çubuğu çekince bir uzama söz konusu ise, izolatin Gr(-) olduğu kabul edilmiştir (DSM, 1991).

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

Katalaz testi. Yatık NA'da 30°C'de 72 saat büyütülmüş kültürlerin üzerine %3'lük 1 mL H₂O₂ çözeltisi damlatılarak gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığına bakılmıştır. Gaz kabarcıklarının çıkışı pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Gerhardt et al., 1981; Tamer ve ark. 1989; Temiz, 1994; Tao vd., 2011).



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

Sadece aerobik tüpte asitleşme var ise organizma oksidasyon yolu ile glukozu katabolize etmiş oksidasyon yapma kabiliyetinde ve "O" reaksiyon oluşturmuştur. Hem aerobik hem de anaerobik türlerde asitleşme var ise organizma fermentasyon yapma kabiliyetinde ve "F" reaksiyon oluşturmuştur. Eğer iki tüpte de asitleşme yok ise organizma glukozu fermente edememiştir (Gerhardt vd., 1981; Çotuk, 2003).

IMVIC testleri

- **İndol testi:** Bu test mikroorganizmaların triptofan amino asitini parçalama yeteneğinin tayininde kullanılmıştır. Tüplerde hazırlanan tripton brotha mikroorganizmalar inoküle edilmiş, inokülesiz 1 tüp kontrol için konulmuştur.

37°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Kovaks çözeltisinden bir iki damla damlatılarak eller arasında iyice karıştırılmıştır. Kırmızı halka oluşumu indol üretimi açısından + sonuç kabul edilmiştir.

- **Metil red-voges proskauer testi:** Bu test mikroorganizmaların glukozu okside ederek yüksek konsantrasyonda asit veya nötral son ürünleri üretme yeteneğinin ortaya çıkarılması için kullanılmıştır. Tüplerde hazırlanmış olan Metil Red-Voges Proskauer broth’a mikroorganizmalar inokule edilmiştir. İnokulesiz 1 tüp kontrol için konulmuştur. 37°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültürün yarısı (yaklaşık) boş temiz bir tüpe aktarılmıştır. Birinci tüpe metil red testi için 5 damla kadar metil red çözeltisi damlatılmıştır. Üst kısmında kırmızı renk oluşumu Metil Red testi için + sonuç olarak kaydedilmiştir. Diğer tüpe 0.5 mL kadar α -naftol çözeltisi ve sonra % 40’lık 0.5 mL KOH çözeltisi ilave edilmiş, çalkalanmış ve 5-10 dakika beklenmiştir. Kırmızı renge doğru bir pembeleşme asetil metil karbinolün oluşumuna bağlı olarak Voges Proskauer testi için + sonuç olarak kaydedilmiştir.

- **Sitrat testi:** Bu test karbon ve enerji kaynağı olarak sitrat kullanımını test etmek için kullanılmıştır. Tüplerde yatık olarak hazırlanmış Simon sitrat agardan 1 tanesi inokulesiz bırakılmıştır. Tüm tüpler 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyondan sonra mavi rengin gözlenmesi sitrat testi için + sonuç olarak kaydedilmiştir (Gerhardt ve ark., 1981; Tamer ve ark., 1989).

TSI besiyerinde üreme: Otoklavlanan TSI besiyeri henüz sıvı iken tüpler yatırılarak besiyerinin katılaşması sağlanmıştır. Hazırlanmış besiyeri berrak kırmızı renkli olup besiyerine bir kez dokunulup daha sonra iğne öze agarın derin kısmına batırılarak mikroorganizmalar ekilmiştir. Besiyeri yüzeyi ve dip kısımları renk, gaz çatlağı ve H₂S’le oluşan siyahlaşma açısından incelenmiştir. Tüpün dip kısmında oluşan siyahlaşma H₂S üretimi için (+) sonuç olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, besiyerinin eğri yüzeyin alkali/dip kısmın asit reaksiyon vermesi sadece glikoz fermentasyonunu, eğri yüzeyin asit/dip kısmın asit reaksiyon vermesi glukoz+sükrozun fermentasyonunu, glukoz+laktozun fermentasyonunu, glukoz+laktoz+sükroz fermentasyonunu, besiyerinde kabarcıklar ve çatlakların oluşumu gaz oluşumunu göstermiştir (Demirbağ ve Demir, 2005).

Nitrat indirgeme testi: Bu test, mikroorganizmaların nitratları indirgeme yeteneğini belirlemede kullanılmıştır. Nitrat broth bulunan tüplere ekimler yapıp 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 3 damla sülfanilik asit ve 2 damla α -naftol ilave edilmiştir. Kırmızı renk oluşumu gözlenen tüpler 24-48 saat inkübasyona tekrar bırakılmıştır ve nessler çözeltisi damlatılmıştır. Sarı-turuncu renk oluşumu ortamda amonyak oluşumunu göstermiş ve nitrat kullanımı için (+) sonuç olarak kabul edilmiştir (Demirbağ ve Demir, 2005).

Jelatin hidrolizi testi: Bu test, mikroorganizmaların, jelatini hidrolize eden jelatinaz enzimini sentezlemesini test etmek için kullanılmıştır. Tüpler içerisinde dik olarak dondurulmuş nutrient jelatin besiyerine iğne öze ile her bir izolatın 24 saatlik kültüründen ekim yapılmıştır. 37°C’de 24-48 saat inkübasyondan sonra jelatinin kullanılması ile tüplerde oluşan sıvılaşma (+) sonuç olarak kabul edilmiştir (Tamer vd., 1989; Gustavo vd., 2011; Natrah vd., 2011).

Lisin dekarboksilaz testi: Bu test, mikroorganizmaların, lisin aminoasitindeki karboksil grubunu ayrıştırma (dekarboksilasyon) yeteneğini belirlemek için kullanılmıştır. LD besiyerinin her birine, 24 saatlik kültürlerden ekilip 37°C’de 48 saat-1 hafta süre ile inkübe edilmiştir. Bu arada kültürler her gün kontrol edilmiştir. Besiyerinde, önce glikozun fermentasyonu sonucu azot oluşması nedeniyle sarı bir renk meydana gelmesi, sonra meydana gelen dekarboksilasyondan dolayı mor rengin oluşumu (+) sonuç olarak kabul edilmiştir (Gerhardt ve ark., 1981).

Seçici besiyerlerine ekim: Enterococcus agar, Eosin metil mavisi agar, Salmonella-Shigella agar, Mannitol Salt Fenol Kırmızısı agar, Bizmut Sülfid agar, Pseudomonas agar’a izolatların 24 saatlik aktif kültürlerinden tek koloni eldesi için çizgi ekim yapılmış ve petriler uygun besiyerlerine göre uygun sıcaklıklarda 24-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her besiyerinde üreme olup olmadığı incelenmiş, eğer üreme varsa tipik koloni morfolojileri kaydedilmiştir (Çotuk, 2003; Merck, 2012).

2.2.3. Moleküler tanılama: Genomik DNA izolasyonu, PZR ve 16SrRNA gen dizi analizi çalışmaları

İzolatlar LBA besiyerinde tek koloni ekimi ile üretildikten sonra, kontaminasyon kontrolü yapılmış ve yeterli miktarda koloni kazınarak (20-30 adet) soğuk PBS içerisinde yıkanmıştır. Pelletten genomik DNA izolasyonu, kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Zymo kit).

16SrRNA geni, her bir izolattan elde edilen genomik DNA'dan

- 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ve
- 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

evrensel primerler kullanılarak PZR yardımıyla çoğaltılmıştır (Sambrook, 2006). Reaksiyon dereceleri ve süreleri ise; ilk denatürasyon basamağı 95°C 'de 1 dk bunu takiben 35 döngü olacak şekilde 95°C'de 1 dk denatürasyon, 54°C'de 1 dk bağlanma, 72°C'de 1 dk uzama şeklinde son olarak bir kez 72°C'de 10 dk uzama basamağıyla, 4°C'de bekletilecek şekilde programlanan PZR termal cykler (Eppendorf Netheler-Hinz GmbH 22331-Hamburg) koyulmuştur. Böylece istenilen bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürünlerinden 8 µl alınarak %1'lik agaroz jelde analiz edilmiş ve PZR ürünleri görüntülenmiştir. Daha sonra her bir izolattan üçer adet PZR reaksiyon agaroz jelde koşulmuş ve tam olarak istenilen bölgenin pürifikasyonu için agaroz jelden PZR ürünleri steril jilet yardımıyla kesilmiş ve saflaştırılmıştır (GeneJET Gel Extraction Kit (Fermantas) kullanılmıştır).

PZR amplifikasyon koşulları:

95°C	1 dk	
95°C	1 dk	} 30 döngü
54°C	1 dk	
72°C	1 dk	
72°C	10 dk	
4°C	∞	

16SrRNA geni sekans sonuçları; BioEdit biyoinformatik yazılım paketleriyle analiz edilmiştir. Sekans sonuçları BLASTN programı kullanılarak en yakın diziler bulunmuştur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sonuçlar tablo halinde verilmiştir (Çizelge 3.4.).

2.2.4. Biyofilm oluşumunun tespiti

2.2.4.1. Biyofilm oluşumunun kalitatif tayini

Saf kültür halinde elde edilen izolatların biyofilm yapabilme özellikleri kalitatif olarak araştırılmıştır. Bu amaç için "Standart Tüp Yöntemi" modifiye edilerek kullanılmıştır (Christensen vd., 1982; Christensen vd., 1985; Elena vd., 2008; Marie vd., 2009). İzolatlar 10 mL TSB bulunan tüplere McFarland No 1 yoğunluğunda ekilerek ve 12 saat 37°C'de inkübe edilerek içerikleri yavaşça boşaltılmıştır. Daha sonra 0.01 M fosfat tampon solüsyonu (pH 7.2) ile tüpler yıkanmıştır. Tüplere %1'lik safranin solüsyonu konularak oda ısısında 30 dakika bekletilmiş ve boya solüsyonu boşaltılarak tüpler iki kez fosfat tampon solüsyonu yıkandıktan sonra filtre kağıdı üzerine ters çevrilerek kurumaları için bırakılmıştır. Ertesi gün tüpün çeperlerinde renkli bir film tabakasının oluşumu pozitif ve bu tabakanın yoğunluğuna göre sonuçlar (+), (++) ve (+++) olarak, film tabakası oluşturmeyen tüpler ise (-) olarak değerlendirilmiştir. Sıvı ile hava birleşim yerinde halka oluşumu, biyofilm oluşumu göstergesi olarak kabul edilmemiştir. Tüm bu denemeler ESP besiyeri kullanılarak da gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1. 3.2) (Solano, 2002).

2.2.4.2. Biyofilm oluşumunun kantitatif tayini

İzolatların biyofilm oluşumlarının kantitatif tayini Ye vd. (2008)'da bildirilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Merritt, 2005; Ye vd., 2008; Nagant, 2010). İzolatlar Luria-Bertani ortamında (LB) 16 saat üretilmiştir. İnkübasyondan sonra bakteri yoğunluğu OD₆₀₀'de 0.132'ye (yaklaşık 1x10⁸ CFU/ml) ayarlanmıştır. Bakteri kültürü 1/100'lük steril LB ortamı ile sulandırılmıştır. Sulandırılan kültürlerin tümünden düz tabanlı 96 çukurlu mikropklara 100 µl olarak çukurlara ilave edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonu takiben çukurlar distile su ile yıkanmış ve biyofilmle ilişkili hücre kalıntıları %1'lik kristal viyole ile 15 dk süresince boyanmıştır (Zhu ve Mekalanos, 2003; Anisia vd., 2010). Boya fazlası hafif akan çeşme suyunda dikkatli bir şekilde yıkanmıştır. Ayrıca bakterilerin oluşturduğu 96 çukurlu plakalara tutunmuş biyofilm fotoğraflanmıştır. Biyofilm oluşumunu kantitatif olarak belirlemek için mikrolaka 2x200 µl %95 etanol saf su ile 4 mL'ye tamamlanarak ilave edilmiştir. Mikrolakaların 490 nm'de mikrolaka okuyucu cihazında (Thermo Scientific-FC) optik yoğunlukları ölçülmüştür (Ye vd., 2008). 37°C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben kristal viyole ile boyama sonrasında absorbans ölçümü yapılarak tüm suşların biyofilm üretimi değerlendirilmiştir (-): $OD < 0.500$; (+): $0.500 < OD < 1.500$; (+ +): $OD > 1.500$) (Şekil 3.3.) (Johansson ve Rasmussen, 2013). Her bakteri için sonuçların OD değerleri ortalamaları alınmıştır. Test sırasında LB negatif kontrol, güçlü biyofilm oluşturduğu bilinen *S.epidermidis* ATCC 35920 (Okajima vd., 2006) suşu ise pozitif kontrol olarak çalışılıp değerlendirilmiştir.

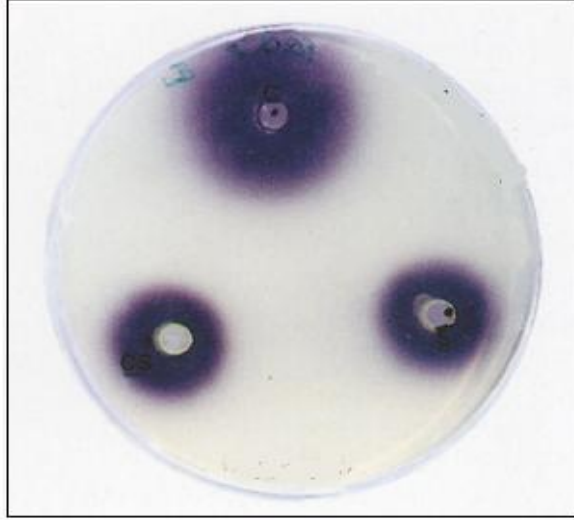
2.2.5. Biyofilm üretici bakterilerin QS yanıtlarının tespiti

2.2.5.1. Test bakterilerinin hazırlanması

Biyofilm oluşturan bakterilerin TSA besiyerinde oluşturdukları kolonilerinden alınarak steril fizyolojik su ile McFarland 0.5'e ayarlanmıştır. Standardize edilmiş her bir bakteri süspansiyonu böylece QS yanıtlarının incelenmesi için hazır hale getirilmiştir.

2.2.5.2. *Chromobacterium violaceum* CV026 ve *Agrobacterium tumefaciens* NT1 referans suşlarının üretim ve depolanması

Şekil 2.1.' de *C. violaceum* CV026 morfolojik görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.1. *Chromobacterium violaceum* CV026 (Reinhard ve Astrid Schenk, 1998).

Deneylerde kullanılan her bakteri suşu uzun süreli saklama amacıyla, -80°C 'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Günlük kullanım için NA besiyerine *C. violaceum* inoküle edilmiş 30°C 'de 24 saat süreyle, TSA besiyerine *S.epidermidis* 37°C 'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. *A. tumefaciens* *Rhizobium* medium besiyerine inoküle edilerek 37°C 'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra günlük kullanım amacıyla maksimum 7 gün süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

2.2.5.3. QS yanıtlarının tespiti

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmış test bakterilerinin QS yanıtları birkaç literatürden derlenmiş ‘‘AHL Yöntemi’’ ile araştırılmıştır (McClean vd., 1997; Shaw vd., 1997; Cha vd., 1998; Ravn vd., 2001).

AHL yönteminde, mikropalakların her kuyucuğuna eşit miktarlarda LBA dağıtılarak oda sıcaklığında 2 saat kurumaya bırakılmıştır. LB'da 30°C 'de 18 saat inkübe edilip McFarland 0.5'e eşit bulanıkta ayarlanan *C. violaceum* ve *A. tumefaciens* referans suşlardan her kuyucuğa 50 µl'şer dağıtılmıştır. Aynı şekilde test bakterileri de standardize edilmiş solüsyonlarından alınarak 50 µl'şer her kuyucuğa dağıtılmıştır.

AHL sinyal moleküllerinin tespiti *C. violaceum* ve *A. tumefaciens* suşu kullanılarak yapılmıştır. Bu suşlar %1.2 agar içeren katılaştırılmış ve *A. tumefaciens* suşu için gentamisin (20 µg/ml); *C. violaceum* suşu için kanamisin (20 µg/ml) LB besiyerinde üretilmiştir.

AHL sinyal moleküllerinin tespiti, *C. violaceum* ve *A. tumefaciens* referans suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Açıl yan zincirinde 4-8 karbona sahip AHL moleküllerinin tespiti için, *C. violaceum* referans suşu kullanılmıştır. Ortamdaki mevcut AHL molekülleri, *C. violaceum* referans suşunda mor bir pigment olan viyolasinin üretimini uyarmaktadır (McClellan vd., 1997; Ulusoy, 2007). Böylece inkübasyon sonucunda mor renk oluşumuna bakılarak çevreyi algılama sisteminin sinyal molekülünden N-bütanol-L-homoserin lakton (BHL)'nin varlığını işaret etmiştir (McClellan vd., 1997).

Diğer bir referans olarak, pZLR4 plazmiti taşıyan *A. tumefaciens* suşu kullanılmıştır. *A. tumefaciens* suşu, ortamda X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid) varlığında, N-açıl yan zincirinde 6-12C'na sahip AHL molekülünün uyarmasıyla mavi-yeşil renk meydana getirmiştir (Bruhn vd., 2005; Ulusoy, 2007). İnkübasyon sonucunda mavi-yeşil renk oluşumu incelenen bakterilerin çevreyi algılama sisteminin sinyal molekülünden N-(3-okzododekanol)-L-homoserin lakton (OdDHL)'nin varlığını işaret etmiştir (Shaw vd., 1997; Cha vd., 1998).

2.2.5.4. İnce tabaka kromatografisi ile BHL sinyal moleküllerinin tespiti

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile referans suş olarak CV026 kullanılarak, incelenen patojenik suşlarda AHL sinyal moleküllerinin varlığı araştırılmıştır. Bunun için bir gece 37°C'de LB besiyerinde üretilmiş bakteri kültürleri diklormetan ile ekstrakte edilmiştir (McClellan vd. 1997; Dourou vd., 2011). Organik faz havalandırma kabiniinde 30°C'de tamamen uçurulmuştur. Kalıntı 100 µL asetonitril içerisinde çözülerek ters faz TLC plakalarına (RP-18 F254; Merck) uygulanmıştır. Örnekler metanol-su (60:40. v/v), karışımında yürütülmüş, ayrımları sağlandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan TLC plakalarının üzerine 50 mL sıcak LB ile karıştırılmış, 10 mL 24 saatlik *C. violaceum* CV026 kültürü yayılarak katılaşıncaya kadar beklenmiştir. Besiyeri katılaştıran TLC plakası 30°C'de 12-18 saat

inkübe edilmiştir. AHL moleküllerinin bulunduğu bölgeler, beyaz zemin üzerinde mor nokta oluşumuyla belirlenmiştir. Test sırasında LB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.2.5.5. *C. violaceum* CV026 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal moleküllerinin üretiminin araştırılması

Test bakterileri TSA besiyerinde 25°C’de 24 saat üretilmiştir. AHL molekül varlığının tespiti için test bakterileri steril eküvyon ile bir koloni olacak şekilde TSA kültüründen alınarak LBA besiyeri içeren petrilerdeki besiyerine üzerine 1.5 cm’lik çizgi şeklinde ekilmiş *C. violaceum* CV026 referans suşu da izolatlarla 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 referans suşunda mor bir pigment olan viyolasinin üretimini uyarmaktadır (McClean vd., 1997; Ulusoy, 2007). Böylece inkübasyon sonucunda mor renk oluşumuna bakılarak QS sisteminin sinyal molekülünden *N*-bütanol-L-homoserin lakton (BHL)’nun varlığı belirlenmiştir (Reinhard ve Astrid, 1998; Lázaro vd., 2003; Kenmegne vd., 2011).

2.2.5.6. *A. tumefaciens* NT1 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal moleküllerinin üretiminin araştırılması

Test bakterileri TSA besiyerinde 25°C’de 24 saat üretilmiştir. AHL molekül varlığının tespiti için izolatlar steril kürdanla bir koloni olacak şekilde TSA kültüründen alınarak 20 µg X-Gal boya maddesi ilave edilmiş LBA besiyeri içeren petrilerdeki besiyeri üzerine 1.5 cm’lik çizgi şeklinde ekilmiş *A. tumefaciens* NT1 referans suşu da izolatlarla arasında birkaç mm aralık olacak şekilde 1.5 cm’lik çizgi şeklinde ekilmiş ve 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. *A. tumefaciens* NT1 referans suşu, ortamda X-Gal varlığında, AHL molekülünün uyarmasıyla renk meydana gelir (Shaw vd., 1997; Cha vd., 1998; Ravn vd., 2001; Ulusoy, 2007). İnkübasyon sonucunda yeşil renk oluşumu incelenen söz konusu bakterilerin çevreyi algılama sisteminin sinyal molekülünden *N*-(3-okzododekanoil)-L-homoserin lakton (OdDHL)’nun varlığı belirlenmiştir (Luo vd., 2003; Allison vd., 2006).

2.2.6. Virölans faktörlerin belirlenmesi

2.2.6.1. Pigment testi

Test edilecek izolatlar 10 mL LB besiyerinde 30°C’de 24 saat üretilmiştir. İnkübe edilen bakteri kültürleri OD₆₀₀’de 0.05’e ayarlanmıştır. Dilüsyonda LB ve LB içinde 5mM’lık L-Tirozin içeren ortam kullanılmış ve hazırlanan kültürler 30°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 mikrolakalara 100 µl olarak her bakterinin süpernatantından 8 çukura ilave edilerek çalışılmıştır. Pigment üretimi; süpernatantın her defasında 405 nm’de mikrolaka okuyucusunda 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).

2.2.6.2. Ramnolipit üretimi testi

Ramnolipit üretimi testi; 0.2 gr cetiltrimetil amonyum bromid (CTAB) ve 5 mg/l-l metilen mavisi içeren M9-glutamat minimal medium agar petrilere kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Siegmund ve Wagner, 1991; Nagant vd., 2010). İzolatlar LBB besiyerinde 30°C’de 24 saat üretilmiştir. Bu suşların bir gecelik LBB kültürlerinden 20’şer µl alınarak M9-glutamat minimal medium agar petrilere damlatılmış ve 30°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon ramnolipit aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Test sırasında LBB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar PAO1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Ulusoy, 2007). Ramnolipit üretim testi üç defa tekrarlanmıştır.

2.2.6.3. *Proteaz testi*

Test suşları TSB besiyerinde 30°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 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların proteolitik aktiviteleri bakteri kültürü ilave edilen bölgedeki berrak zon çapı ölçülerek kaydedilmiştir. Inkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon proteolitik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Ayora ve Götz, 1994; Swift vd., 1994; Arda vd., 1999; Dong vd., 2005; Ulusoy, 2007; Ridgway vd., 2008). Proteaz testi üç defa tekrarlanmıştır. Aynı zamanda proteolitik aktiviteyi görmek için besiyerine çizgi tarzında ekimler de yapılmıştır.

İzolatlarda proteaz oluşumu ayrıca NA’da %1.5 skim milk içerecek şekilde hazırlanan agar besiyerine ekim yapılarak 30°C’de inkübe edilmiştir. 24. ve 48. saatlerinin sonlarında şeffaflaşma zonunun görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schwenteit vd., 2011).

2.2.6.4. *Amilaz testi*

Test suşları TSB besiyerinde 30°C’de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden %2 nişasta içeren TSA besiyerine çizgi tarzında ekim yapılmış ve 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyondan sonra koloniler üzerine lugol solüsyonu dökülmüş, pozitif reaksiyonlar koloni etrafında berrak alan oluşmasıyla tespit edilmiştir (Arda, 1997; Swift vd., 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 vd., 1999). Amilaz testi her bakteri için üç defa tekrarlanmıştır.

2.2.6.5. *Hemoliz testi*

Test suşları TSB besiyerinde 30°C’de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden %5 insan kanı içeren TSA petrilerinin ortasına, 20 µl ilave edilmiş ve 30°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 vd., 1999). Aynı zamanda hemolitik aktiviteyi görmek için besiyerine çizgi tarzında ekimlerde yapılmıştır. Hemoliz testi her bakteri için üç paralel olarak çalışılmıştır (Zhang ve Austin, 2000; Austin vd., 2005; Barbosa vd., 2010; Natrah vd., 2011).

2.2.6.6. Fosfolipit testi

Test suşları TSB besiyerinde 30°C’de 24 saat üretilmiştir ve saat inkübasyon sonrası üreyen test suşlarından steril serum fizyolojik kullanılarak McFarland 0.5 bulanıklığına göre süspansiyonlar hazırlanmıştır. Her bir kültürden yumurta sarısı proteini içeren TSA petrilere inoküle edilmiş ve 30°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Natrah vd., 2011). Fosfolipaz aktivitesi, 30°C’de 24-48 saat inkübasyon sonrasında koloni çevresinde oluşan bulanık zon oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Price vd., 1982). Fosfolipit doğrulama testi ise her bir kültürden egg-yolk içeren TSB tüplerine inoküle edilmiş ve 30°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerin üst yüzeyinde yağ keçelerinin oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Liu vd., 1996; Flieger vd., 2004; Austin ve Austin, 2005; Natrah vd., 2011).

2.2.6.7. DNaz üretimi testi

Bu amaçla DNaz Test Agar besiyeri kullanılmış, bu besiyerine TSA’da üretilen 24 saatlik saf kültürlerden nokta ekim yapılarak, 30°C’de, 18-24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda koloniler üzerine 1 N HCl dökülerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Nükleaz enziminin serbest kalarak, besiyerindeki DNA’yı parçalaması ve bunun sonucunda şeffaf bir zonun oluşması DNaz varlığı olarak değerlendirilmiştir (Hebert vd., 1982; Feltham ve Barrow, 2003).

2.2.6.8. Koagülaz üretimi testi

Bu amaçla steril insan kanı alınmış ve plazması ayrılmıştır. Plazma steril tüplere 1’er mL dağıtılmıştır. TSA’da üretilmiş 24 saatlik saf bakteri kültürlerinden plazmaya

ekim yapılmış ve 30°C’de 1., 2., 3. ve 4. saatlerde kontrolleri yapılarak pıhtılaşma olup olmadığı gözlenmiştir. Süre sonunda plazmayı koagüle etmeyen izolatlar koagülaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Quinn vd., 1994; Arda, 2000; Monzon vd., 2001).

2.2.6.9. Clumping faktör testi

Temiz bir lam üzerine sulandırılmamış bir damla steril insan plazması ile test edilecek izolatların NA’daki 18-24 saatlik kültürlerinden platin öze ile alınan kolonilerinden ilave edilmiş ve dairevi hareketlerle karıştırılmıştır. 10-15 saniye içinde kümeleşmenin görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Schwarzkopf vd., 1993; Baba-Moussa vd., 2008).

2.2.6.10. Esteraz testi

TSB besiyerinde üretilen suşların kolonilerine eküvyon dokundurularak alınmış ve Tween 80 agara 10 mm çapında bir daire şeklinde inoküle edilmiştir. 30°C’de inoküle edilen plaklar her gün arkadan ışık verilerek incelenmiştir. Tween 80 agarda inokülasyon bölgesinin etrafında ışığı geçiren hale oluşumu esteraz pozitifliği olarak kabul edilmiştir. Her suş için test iki kez tekrarlanmıştır (Eren vd., 1999).

2.2.6.11. Üre hidrolizi testi

Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden üreaz enzimini saptamak amacıyla yapılmıştır. İçerisinde üre agar bulunan petrilere öze ile her bir izolatın 24 saatlik kültüründen ekim yapılmıştır. 24-96 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Her gün kontrol edilen kültürlerde kırmızı rengin meydana gelmesi (+) sonuç olarak kabul edilmiştir (Gerhardt vd., 1981; Tamer vd., 1989).

2.2.6.12. Slime faktör testi

İzolatların slime yapma özellikleri glukozlu kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu besiyerlerine tek koloni düşecek şekilde yapılan ekimler 30°C’de 48 saat inkübe edilmiş, koyu kırmızı-siyah koloni oluşturan suşlar

slime pozitif, pembe koloni oluşturanlar ise slime negatif olarak değerlendirilmiştir (Arciola vd., 2001).

2.2.6.13. Kayma testi

Test suşları bir gece LB agar besiyerinde 30°C’de üretilmiştir. İzolatların LB agar kültüründen, kayma besiyeri içeren petrilerin ortasına steril kürdanla inoküle edilmiş ve 30°C’de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır (Rashid ve Kornberg, 2000; Nagant vd., 2010). Kayma hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılmanın çapının ölçülmesiyle test edilmiştir. Test sırasında LB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Kayma testi 3 defa tekrarlanmıştır.

2.2.6.14. Yüzme testi

Yüzme testi için test suşları, 30°C’de bir gece LB besiyerinde üretilmiştir. Her bir koloniden içeren swimming besiyeri içeren petrilere steril kürdanlarla inoküle edilmiş ve 30°C’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır (Deziel vd., 2001; Hossain vd., 2008; Issac vd., 2012). Yüzme hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılan bulanıklığın çapının ölçülmesiyle test edilmiştir. Test sırasında LB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar hareketli olan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.2.6.15. Titreme testi

Test edilecek izolatların her birinden %1 LBA petrilere steril kürdanlarla inoküle edilmiş ve 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Deziel vd., 2001). Titreme hareketi, inokülasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılan zikzakların çapının ölçülmesiyle test edilmiştir (Deziel vd., 2001; Elena vd., 2008; Issac vd., 2012). Test sırasında LB negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Sonuçlar hareketli olan *Bacillus megaterium* ATCC 14581 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2.2.6.16. Antibiyotik dirençliği

Çalışma kapsamında virölans özellikleri incelenen suşların farklı antibiyotiklere duyarlılıkları, ticari disklerin (Oxoid) kullanıldığı Mueller Hinton Agar'da (MHA) (Oxoid) disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Antibiyotik hassasiyetleri test edilen izolatlara kloramfenikol (Oxoid; 30 µg), imipenem (Oxoid; 10 µg), streptomisin (Oxoid; 10 µg), sulbaktam+sefoperazon (Oxoid; 105 µg), amoksillin+klavulanik asit (Oxoid; 30 µg) ve tetrasiklin (Oxoid; 10 µg) antibiyotikleri için disk difüzyon metodu uygulanmıştır. Mc Farland 0.5 bulanıklığında hazırlanan 0.2 mL bakteri süspansiyonu, MHA besiyeri bulunan petrilere yayılmıştır. Sonra antibiyotik diskleri, besiyeri yüzeyine yerleştirilmiştir. Petriler ters çevrilmiş ve 30°C'de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda her bakteri suşu için inhibisyon zon çapı milimetrik cetvel ile ölçölmüştür. Test sonuçları, suşlar için orta dirençli (I), dirençli (R) ve duyarlı (S) olarak CLSI'in kriterlerine göre değerlendirilmiştir (CLSI, 2007).

3. BULGULAR VE İRDELEME

3.1. EPS Üretici Biyofilm Oluşturan Bakterilerin İzolasyonu

Pakmaya/Kemalpaşa A.Ş. Üretim ve Atıksu Arıtma Tesisi-İzmir ve Köyceğiz Dalyan Çevre Koruma Başkanlığı'na bağlı Atıksu Arıtma Tesisi-Muğla'ya ait su sistemlerinin değişik kısımlarındaki biyofilm ve su örneklerinden mukoid koloni oluşturan, potansiyel biyofilm üretici 84 adet izolat elde edilmiştir. İzolatlar petri plaklarına ekilerek ESP besiyerine çizgi ekim yapılmak suretiyle saflaştırılmış ve identifikasyona gidilmiştir. Ön tanılamalara göre farklı olduğu düşünülen toplamda 80 izolattan en iyi biyofilm üreticisi olduğu tespit edilen 20 tanesi seçilmiş, Gr(-) olduğu belirlenen 3 tanesi ile çalışmaya devam edilmiştir. Kolonilerin saflığından emin olmak için hücreler basit boyama ile boyanmış ve bu hücrelerin saf bakteri kolonileri olduğu doğrulanmıştır.

3.2. İzolatların Temel Kültürel ve Mikroskopik Özellikleri

İzolatların hücre morfolojileri, gram reaksiyonu, pigmentasyon, oksijen istekleri, +4°C'de ve +42°C'de üreme durumları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. İzolatların temel kültürel ve mikroskopik özellikleri

İzolat No	Hücre morfolojisi	Gram reaksiyonu	Pigment	O ₂ isteklerine göre	+4°C 'de üreme	42°C 'de üreme
8	Basil	(-)	Yok	Fakültatif	+	-
13	Kokobasil	(-)	Yok	Fakültatif	-	+
40	Basil	(-)	Yok	Fakültatif	+++	+

(-): Gram negatif, +: Zayıf üreme, ++: Orta üreme, +++Kuvvetli üreme, -: Üreme yok

3.3. Biyokimyasal Testler ile Tanılama

İzolatlar biyokimyasal tanılama için uygun ortamlara ekilmiş ve reaksiyon sonuçları kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. İzolatların biyokimyasal özellikleri

İzolat No	8	13	40
Sitrat	-	+	+
VP	-	+	+
Metil Red	-	-	+
İndol	-	-	-
KOH	-	-	-
O/F	-	OF	OF
Üre	-	-	-
Lizin dekarboksilaz	-	+	+
Katalaz	-	+	+
Oksidaz	-	-	-
Hareketlilik	+	+	+
Jelatinaz	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
Gaz oluşumu	-	+	-
Nitrit testi	Kırmızı	Kırmızı	Kırmızı

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç

3.4. Seçici Besiyerlerine Göre Tanılama

İzolatlar temel seçici besiyerlerine ekilerek üreme durumları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Bakterilerin seçici besiyerlerinde üreme durumları

İzolat No	TSI	BSA	MSA	SSA	EMB	PA	EA
8	++ Dip bazık, yatık yüzey bazık	-	-	Kırmızı- Pembe	Pembe	-	-
13	++ Dip asitik, yatık yüzey asitik	++ Metalik kahverengi, siyah koloniler	-	Krem	Pembe	-	-

Çizelge 3.3.^(devam)

İzolat No	TSI	BSA	MSA	SSA	EMB	PA	EA
40	+ Dip asitik, yatık yüzey asitik	+ Metalik, parlak siyah koloniler	-	Krem	Pembe	-	-

-: Üreme yok, +: Üreme var

Çizelge 3.1., 3.2. ve 3.3.'de sunulan bulgular doğrultusunda 20 izolatın kültürel, mikroskopik, biyokimyasal testler ve seçici besiyerleri aracılığıyla yapılan ön tanılamaları sonrasında Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 1-4)'den yararlanılarak *Bacillus sp.*, *Rummeliibacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Microbacterium sp.*, *Kurthia sp.*, *Comamonas sp.* cinslerine ait türler olduğu saptanmıştır.

3.5. Moleküler Yöntemlerle Tanılama

Çizelge 3.4. İzolatların 16SrRNA gen dizilerinin BlastN analiz sonuçları

İzolat No	16SrRNA gen dizisine göre eşleşen tür (% benzerlik)
2	<i>Bacillus methylotrophicus</i> gb KF017585.1 (%99)
7	<i>Microbacterium oxydans</i> (%99)
8	<i>Comamonas aquatica</i> (%99)
12	<i>Kurthia gibsonii</i> (%99)
13 ^b	<i>Enterobacter asburiae</i> isolate (%95)
18	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (%99)
19	<i>Bacillus subtilis</i> (%99)
21	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (%99)
27	<i>Bacillus subtilis</i> (%99)
28 ^a	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (%99)
32	<i>Bacillus methylotrophicus</i> gb KC790289.1 (%99)
33 ^b	<i>Bacillus subtilis</i> (%99)
37	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> gb GQ375222.1 (%99)
40	<i>Enterobacter ludwigii</i> (%99)

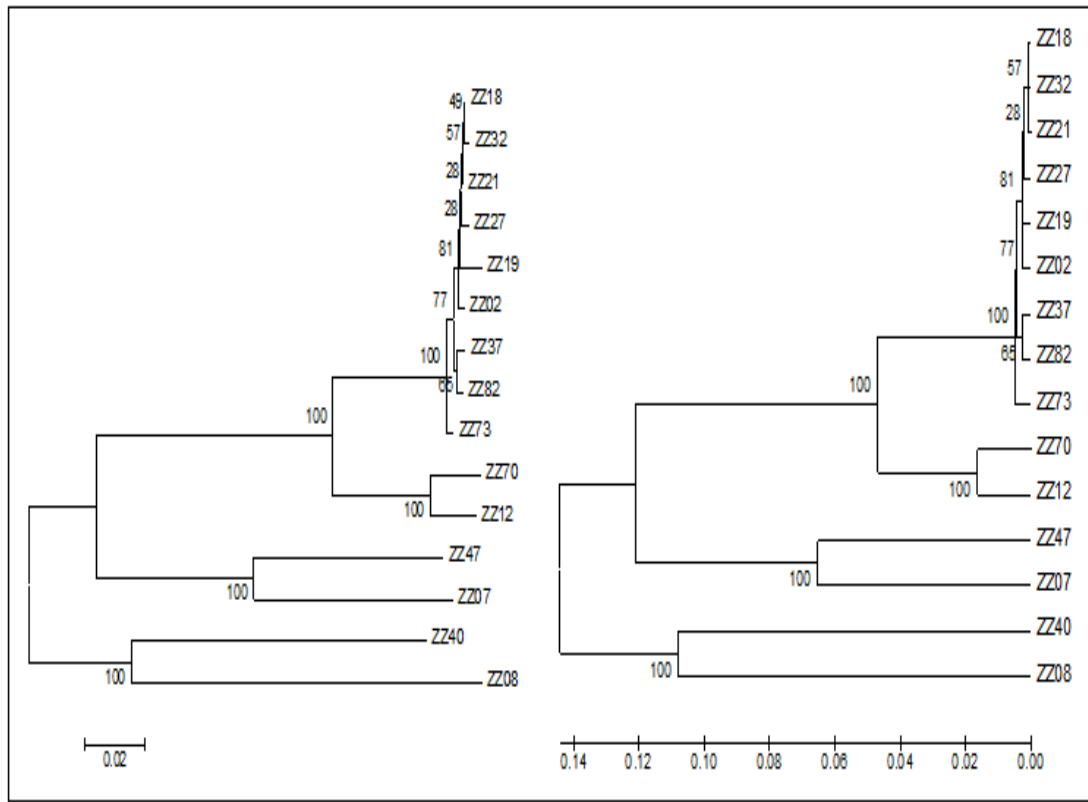
Çizelge 3.4.^(devam)

İzolat No	16SrRNA gen dizisine göre eşleşen tür (% benzerlik)
41 ^a	<i>Bacillus cereus</i> strain L5 (%98)
47	<i>Rhodococcus gordoniae</i> (%99)
62 ^a	<i>Bacillus cereus</i> (%95)
70	<i>Rummeliibacillus stabekisii</i> (%99)
73	<i>Bacillus subtilis</i> (%99)
82	<i>Bacillus tequilensis</i> gb JF411302.1 (%99)

^a Sadece 27F sekansına göre analiz edilmiştir.

^b Sadece 1492R sekansına göre analiz edilmiştir.

Diğer izolatlar full sekanslarına göre analiz edilmiştir.



Şekil 3.1. PZR amplifikasyon sonucu elde edilen verilere göre izolatlar arasındaki genetik benzerlik

İzolatların cins seviyesinde ön tanılamalarının yapılmasından sonra moleküler yöntemler kullanılarak kesin tanılamaları ile bu bulgular desteklenmiştir. Buna göre, incelenen 20 adet izolattan 2 tanesinin (2.32) *Bacillus methylotrophicus*, 1 tanesinin (7) *Microbacterium oxydans*, 1 tanesinin (8) *Comamonas aquatica*, 1 tanesinin (12) *Kurthia gibsonii*, 1 tanesinin (13) *Enterobacter asburiae*, 4 tanesinin (18, 21, 28, 37) *Bacillus amyloliquefaciens*, 4 tanesinin (19, 27, 33, 73) *Bacillus subtilis*, 1 tanesinin (40) *Enterobacter ludwigii*, 2 tanesinin (41, 62) *Bacillus cereus*, 1 tanesinin (47)

Rhodococcus gordoniae, 1 tanesinin (70) *Rummeliibacillus stabekisii*, 1 tanesinin (82) *Bacillus tequilensis* olduğu belirlenmiştir.

3.6. İzolatların Biyofilm Üretim Kapasiteleri

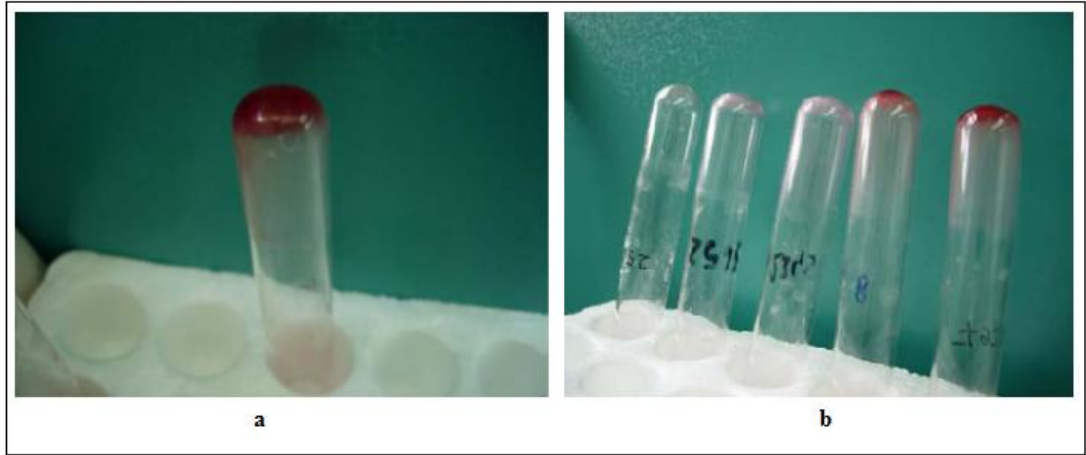
3.6.1. Biyofilm oluşumunun standart tüp yöntemi ile kalitatif tayini

İzolatların biyofilm üretimlerinin kalitatif tayininde literatürlerde sıklıkla kullanılan TSB besiyeri ile CRA besiyeri ve çalışmamızda modifiye edilen ESP besiyeri kullanılmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen standart tüp yöntemine göre elde edilen bulgular Çizelge 3.5. ve Şekil 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. İzolatların TSB, ESP ve CRA besiyerlerinde biyofilm üretimi

Bakteri No	TSB	ESP	CRA
2	+++	-	-
7	++	-	-
8	-	++	-
12	+	-	-
13	+	+++	-
18	-	++	-
19	+++	-	-
21	+++	-	-
27	-	-	-
28	++	+	-
32	-	+	-
33	+++	+	-
37	+	++	-
40	-	+++	-
41	-	+++	-
47	+++	++	-
62	+	-	-
70	-	++	-
73	+	++	+
82	++	+	+

+: Zayıf biyofilm üretimi, ++: Orta biyofilm üretimi, +++: Kuvvetli biyofilm üretimi, -: Biyofilm üretimi yok



Şekil 3.2. Biyofilm tayini a) Kalitatif biyofilm tayini b) Kalitatif biyofilm derecelendirilmesi

Kullanılan TSB ve ESP besiyerlerine göre izolatların biyofilm üretimlerinde çok belirgin bir farklılık bulunmamakla beraber CRA besiyerinde diğer iki besiyerine göre çok daha zayıf biyofilm üretimi gözlenmiştir. TSB besiyerinde daha yoğun biyofilm üretimi (+++) elde edilen izolat sayısının daha fazla olduğu görülmüştür (Çizelge 3.5.). 2, 7, 19 ve 21 no'lu izolatlarda olduğu gibi bazı izolatlarda TSB besiyerinde değişik yoğunluklarda biyofilm üretimi saptanırken, ESP besiyerinde üretim saptanmamıştır. Tam tersine, 8, 18, 32, 40, 41 ve 70 no'lu izolatlarda olduğu gibi bazı izolatlarda ise ESP besiyerinde değişik yoğunluklarda biyofilm üretimi saptanırken, TSB besiyerinde üretim saptanmamıştır (Çizelge 3.5.). CRA besiyerinde 73 ve 82 no'lu izolatlarda zayıf biyofilm üretimi saptanırken, aynı besiyerinde diğer izolatlarda biyofilm üretimi saptanmamıştır (Çizelge 3.5.).

Standart tüp yönteminde biyofilm üretimi ile kullanılan besiyeri tipleri arasındaki ilişki ise Çizelge 3.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Kullanılan besiyeri tipine göre, standart tüp yöntemi kullanılarak biyofilm pozitif ve negatif bakteri sayıları ve yüzdeleri

Biyofilm	Besiyerleri					
	TSB		ESP		CRA	
	n	(%)	N	(%)	N	(%)
Negatif	7	35	6	30	18	90
Pozitif*	8	40	11	55	2	10
Kuvvetli**	5	25	3	15	0	0
Toplam (n=20)	20	100.0	20	100.0	20	100.0

(*): Tüplerde (+) ve (++) olarak elde edilen biyofilm üretimlerini,

(**): Tüplerde (+++) olarak elde edilen biyofilm üretimlerini ifade etmektedir.

Turki vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada TSB besiyerinde CRA besiyerine göre daha yoğun biyofilm üretimi saptanmıştır. Çalışmada, TSB besiyerinde ESP'ye göre daha yoğun biyofilm üretimi (+++) görülen bakteri sayısının ESP besiyerine göre çok daha fazla olması diğer literatür bilgileriyle tutarlılık göstermektedir (Turki vd., 2012; Hiromi vd., 2008). TSB'de yoğun biyofilm üreten izolat sayısı 5 iken, ESP'de yoğun biyofilm üreten bakteri sayısı 3'dür. CRA besiyerinde ise yoğun biyofilm üreten herhangi bir izolata rastlanmamıştır (Çizelge 3.6.). Literatürlerde sıklıkla biyofilm üretim ortamı olarak kullanılan TSB'de biyofilm oluşturmayan/zayıf oluşturan bir bakterinin doğal yaşam ortamlarına benzer besiyerlerinde rahatlıkla biyofilm oluşturabildiği hatta çok yüksek yoğunluklara varabildiği düşünülmektedir. Bunun tayini de ancak farklı içerik ve kombinasyonlardaki üretim besiyerlerinin farklı çalışmalarla taranması ile gerçekleştirilebilir. O nedenle çalışmamızda modifiye ESP ve CRA besiyerleri bu amaçla incelenmiştir.

3.6.2. Biyofilm oluşumunun mikropilaka cihazı ile kantitatif tayini

Biyofilm oluşumunun kantitatif tayininde mikropilaka yöntemi kullanılmıştır. Buna göre; 37°C'de 24-72 saatlik inkübasyonu takiben kristal viyole ile boyama sonrasında absorbans ölçümü yapılarak tüm izolatların biyofilm üretimi değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonrasında 20 örneğin hepsinde zamana bağlı olarak değişmek üzere (%100.0) biyofilm oluşumu pozitif bulunmuştur.

Biyofilm oluşturucu referans suş olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35920 dikkate alındığında; (Okajima vd., 2006; Chusri vd., 2012) *S. epidermidis* ATCC 35920'un altında absorbans verenler "negatif" yani "biyofilm üretmeyenler" olarak ifade edilmiştir. Ayrıca yine referans suş ile elde edilen OD₄₉₀ sonuçlarına göre ≥ 1.50 olan sonuçlar "kuvvetli biyofilm üretimi", $0.50 \leq OD_{490} < 1.50$ olan sonuçlar "orta derecede biyofilm üretimi" ve OD₄₉₀ < 0.50 olan sonuçlar "çok zayıf biyofilm üretimi" olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7. ve Çizelge 3.8.'de verilmiştir.

Mikroplaka yönteminin absorbans ölçümüne dayanmasından dolayı bulanıklılık bakımından daha uygun olan ve bu yöntemde literatürde yaygın kullanılan LB besiyeri çalışmada kullanılmıştır. Ayrıca modifiye ESP besiyeri biyofilm oluşumunun kalitatif ve kantitatif tayininin incelenmesi amacıyla ilk kez farklı bir besiyeri olarak çalışmamızda kullanılarak literatüre katkı sağlamak amaçlanmıştır. Genel olarak, çalışmadaki izolatların, kullanılan iki farklı besiyeri (ESP ve LB) çeşidine göre biyofilm üretimlerinin değişik derecelerde olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.7. İzolatların ESP besiyerinde biyofilm üretiminin mikropilaka cihazı ile kantitatif tayini

Besiyeri Çeşidi	ESP											
	24h						48h					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Izolat No	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm
2	1.343	0.58	0.605	3.248	0.279	0.443	1.138	1.668	2.633			
7	0.085	0.54	0.601	1.083	0.222	0.343	1.234	0.938	1.46			
8	0.039	1.442	1.796	0.285	0.277	0.294	0.887	0.173	0.337			
12	0.139	0.128	0.079	0.391	0.277	0.211	0.082	0.007	0.091			
13	0.237	0.92	0.983	0.8	0.085	0.017	0.26	0.496	0.788			
18	2.065	0.215	0.463	3.632	0.511	0.833	1.161	0.959	1.415			
19	0.17	0.336	0.454	0.651	0.453	0.644	0.611	1.054	1.693			
21	2.273	0.377	0.52	3.535	0.92	1.575	1.055	1.131	2.049			
27	0.146	0.097	0.143	0.911	0.831	1.258	0.852	2.53	3.707			
28	1.719	0.161	0.163	2.541	0.357	0.31	3.627	0.082	0.218			

Çizelge 3.7. (devam)

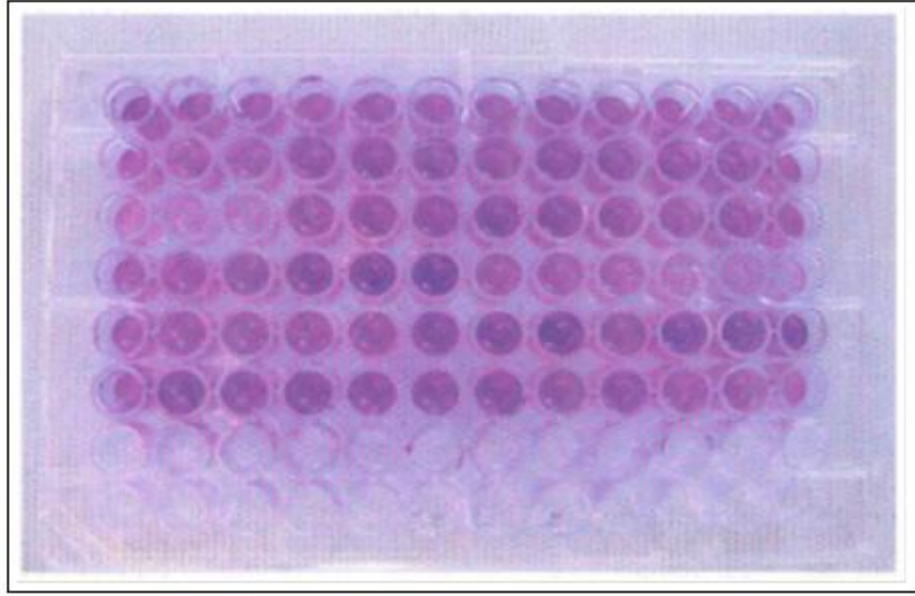
Besiyeri Çeşidi	ESP											
	24h				48h				72h			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
İzolat No	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm
32	1.36	0.214	0.154	2.827	0.478	0.125	1.83	0.361	0.021			
33	0.025	0.175	0.216	0.406	0.162	0.175	0.215	0.017	0.03			
37	0.806	0.372	0.561	0.388	0.083	0.018	1.289	0.602	0.868			
40	0.4	0.655	0.789	1.72	0.073	0.002	0.838	0.559	0.816			
41	0.009	0.023	0.002	0.342	0.151	0.119	0.338	0.165	0.224			
47	1.02	0.491	0.559	0.783	0.291	0.668	0.909	0.309	0.413			
62	1.097	0.112	0.118	2.493	0.315	0.315	0.772	0.253	0.517			
70	0.062	0.502	0.591	0.169	0.102	0.117	0.328	0.1	0.088			
73	0.025	0.144	0.133	0.532	0.358	0.375	0.817	0.099	0.089			
82	0.268	0.034	0.049	0.366	0.262	0.266	0.324	0.066	0.027			
Kör	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

Çizelge 3.8. İzolatların LB besiyerinde biyofilm üretiminin mikropilaka cihazı ile kantitatif tayini

İzolat No	Besiyeri Çeşidi	LB											
		24h			48h			72h					
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
		Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm
2		0.692	1.058	1.443	1.552	1.246	1.35	0.967	2.037	2.628			
7		0.455	0.038	0.143	0.837	3.96	4.016	0.341	0.999	1.199			
8		0.483	1.302	1.969	0.769	1.74	2.167	0.903	0.549	0.675			
12		0.317	0.752	1.196	3.394	0.23	0.418	0.219	0.478	0.561			
13		0.52	0.988	1.563	3.429	0.529	0.585	0.497	0.185	0.145			
18		5.801	4.169	4.74	0.934	2.109	2.2	0.017	2.16	2.586			
19		0.877	1.836	2.2	2.174	1.362	1.891	1.082	1.214	1.742			
21		0.265	2.171	3.078	0.873	1.215	1.723	1.669	1.352	2.082			
27		1.437	1.194	2.145	1.534	1.123	1.309	1.311	1.348	1.953			
28		2.396	1.323	2.067	2.547	0.485	0.604	2.3	2.287	2.913			

Çizelge 3.8. (devam)

Besiyeri Çeşidi	LB											
	24h			48h			72h					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
İzolot No	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm	Ölçüm
32	1.547	0.489	0.322	3.229	0.251	0.156	3.197	0.489	0.354			
33	0.292	0.756	1.289	0.04	2.448	2.782	0.715	0.206	1.207			
37	0.742	0.765	1.338	0.461	0.744	0.755	0.516	1.401	1.75			
40	0.87	0.881	1.704	1.307	0.517	0.568	1.182	1.267	1.613			
41	0.341	0.647	1.201	0.449	0.502	0.512	0.242	0.001	0.01			
47	0.155	3.904	4.031	0.569	0.712	0.734	0.43	4.5	4.507			
62	0.281	0.131	0.03	0.194	0.065	0.028	0.91	0.015	0.009			
70	0.415	2.309	3.002	0.66	1.404	1.86	1.648	0.529	0.645			
73	0.306	0.085	0.019	0.194	1.127	1.365	0.503	1.063	1.203			
82	0.206	0.167	0.452	0.069	0.489	0.693	0.152	0.039	0.026			
Kör	0	0	0	0	0	0	0	0	0			



Şekil 3.3. Biyofilm oluşumunun mikropalakalarda değerlendirilmesi

Mikroplaka yöntemi kullanılarak yapılan absorbans ölçümlerine göre ESP besiyeri kullanıldığında 24. saatte izolatların 13'ünde (%65.0) biyofilm üretimi negatif, 6'sında (%30.0) orta derece biyofilm üretimi ve 1'inde (5.0) kuvvetli biyofilm üretimi belirlenirken, LB besiyeri kullanıldığında izolatların 7'sinde (%35.0) biyofilm üretimi negatif, 7'sinde (%35.0) orta derece biyofilm üretimi ve 6'sında (%30.0) kuvvetli biyofilm üretimi belirlenmiştir (Çizelge 3.9.). 48. ve 72. saatlerde kuvvetli biyofilm üretimleri ise ESP besiyerinde sırasıyla izolatların 3'ünde (%15.0) ve 8'inde (%10.0), LB besiyerinde sırasıyla izolatların 6'sında (%30.0) ve 6'sında (%30.0) elde edilmiştir (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.9. Mikroplaka yöntemi kullanılarak absorbans ölçümlerine göre biyofilm negatif, orta derece ve kuvvetli biyofilm üretiminin saptandığı bakterilerin sayıları ve yüzdeleri

Saat	Biyofilm*							
	Negatif		Orta derecede		Kuvvetli biyofilm		Toplam	
	biyofilm üretimi		biyofilm üretimi		Üretimi		(n=20)	
	n (%)		n (%)		n (%)			
	ESP	LB	ESP	LB	ESP	LB	ESP	LB
24	13(65.0)	7(35.0)	6(30.0)	7(35.0)	1(5.0)	6(30.0)		
48	13(65.0)	4(20.0)	4(20.0)	10(50.0)	3(15.0)	6(30.0)	20(100.0)	20(100.0)
72	10(50.0)	6(30.0)	8(40.0)	8(40.0)	2(10.0)	6(30.0)		

(*): Üç ölçümün ortalamalarına göre değerlendirilmiştir. n= %'yi ifade etmektedir.

Her iki biyofilm saptama yöntemine bakıldığında, kalitatif ve kantitatif tayinin birbirini hemen hemen desteklediği, biyofilm üretiminin tayininde ön tarama amaçlı olarak yaygın şekilde kullanılan standart tüp yöntemi ile kalitatif tayinin ardından doğrulama amacıyla mikrolaka cihazı ile türbidimetrik olarak kantitatif tayinin gerekliliği çalışmada ortaya konulan diğer bir bulgudur (Çizelge 3.10.). Hatta standart tüp yöntemi ile belirlenemeyen negatif biyofilm üretimleri biyofilm pozitif kontrol suşu ile kıyaslanarak türbidimetrik olarak çok daha yüksek yüzdelerde ortaya konulmuştur. Yine saate bağlı olarak incelenen kalitatif tayinde biyofilm pozitif saptanan izolatların yüzdelerinin daha duyarlı olarak ortaya konulduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.10. Biyofilm üretiminin belirlenmesinde kalitatif ve kantitatif tayin arasındaki ilişki

Kalitatif Tayin (Standart tüp yöntemi)	Kantitatif Tayin (Mikrolaka okuyucu)		
	24 saat	48 saat	72 saat
Biyofilm Pozitif*	7(35.0)	10	12
Biyofilm Negatif	13(65.0)	10	8
Toplam (n=20)	20 (100.0)		

(*): Tüplerde (+), (++) ve (+++) olarak elde edilen biyofilm üretimlerinin her iki besiyerinin ortalamalarını ifade etmektedir. Mikrolaka okuyucu cihazında zayıf, orta ve kuvvetli biyofilm üretimi olarak elde edilen biyofilm üretimlerinin her iki besiyerinin ortalamalarını ifade etmektedir.

n= İzolat sayısı

Çalışmada kullanılan standart tüp yöntemi ve mikrolaka yöntemi dışında çeşitli modifiye edilmiş tüp ve agar yöntemleri ile mikrolaka okuyucu kullanılarak yapılan biyofilm üretim yöntemleri mevcuttur. Öyle ki, Nayak ve Satpathy (2000), yapmış oldukları çalışmada biyofilm üretimi için, bakteriyel keratitli ve sağlıklı gözlerden izole edilen 50 izolatı Christensen ve arkadaşları tarafından belirtilen yöntemlerden yararlanarak incelemişlerdir. Bu izolatların 11'i (%22) biyofilm pozitif çıkmıştır. Jones vd. (1992), kandan izole edilen 251 bakteri suşundan Christensen yöntemiyle %46'sının biyofilm üretici olduğunu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada Woznicova vd. (1993), kandan izole edilen 212 izolatın kongo kırmızılı agar yöntemiyle %13'ünü biyofilm pozitif olarak bulmuşlardır. Nourizadeh ve Sultan (1993), kandan izole edilen 32 izolatın % 59'unda, idrardan izole edilen sekiz izolatın % 38'inde, yaradan izole edilen 14 izolatın % 50'sinde Christensen yöntemiyle biyofilm üretimi

saptamışlar; ayrıca, mikroplaka yöntemine göre, sırasıyla, kan, idrar ve yaradan izole edilen izolatların %53, %38 ve %50'sini biyofilm üretici olarak bulmuşlardır. Tüm bu çalışmalardan görüldüğü gibi klinik kökenli bakterilerin slime denilen biyofilm üretimleri oldukça fazla araştırılmıştır. Oysa ki, literatür taramalarında endüstriyel kökenli izolatlarla bu tarz çalışmalara rastlanılmamıştır. Çevre ve insan sağlığı açısından önemli, endüstriyel sistemlerde yayılması ile büyük problemlere neden olan biyofilm üretici bakterilerin bu potansiyellerinin ortaya konulması açısından çalışmanın diğer çalışmalar için temel oluşturacağı düşünülmektedir.

Çalışmadaki en iyi biyofilm üreticisi olduğu belirlenen bu 20 adet izolattan tanılama testleri sonucu Gr(-) olduğu belirlenen 8, 13 ve 40 no'lu izolatlar ile çalışmaya devam edilmiştir.

3.7. İzolatların Virülans Faktörleri Test Bulguları

3.7.1. Pigment tayini (Tirozin saydamlaştırma testi)

İzolatların pigment testinin %0.1'lik tirozinli TSA besiyerinde elde edilen sonuçları Çizelge 3.11.'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Pigment tespiti için agarda tirozin saydamlaştırma sonuçları

İzolat No	TSA+%0.1 tirozin
8	-
13	-
40	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (pozitif kontrol)	+

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç

Çalışmamızda, agarda saydamlaşma yöntemi ile pigment üretimi incelenen izolatlardan hiçbirinde pozitif sonuç elde edilmemiştir (Çizelge 3.11.). Benzer bir çalışmada aynı yöntemle *P. fluorescens*'in bir suşu ve *P. aeruginosa* PAO1'nin tirozini saydamlaştırdığı saptanmıştır (Nurcan, 2010). Testteki saydamlaşma gösteren izolatlarda tirozin aminoasitinin pigment üretimini uyardığı sonucuna varılmıştır.

Diğer çalışmalarda ise Nurcan (2000) ve Croxatto vd. (2002) tarafından yapılan pigment üretiminin tespitinde *Vibrio anguillarum* suşlarında tirozinin pigment üretimini artırdığını optik yoğunluklarla gösterilmiştir.

3.7.2. İzolatların ramnolipit üretimi testi sonuçları

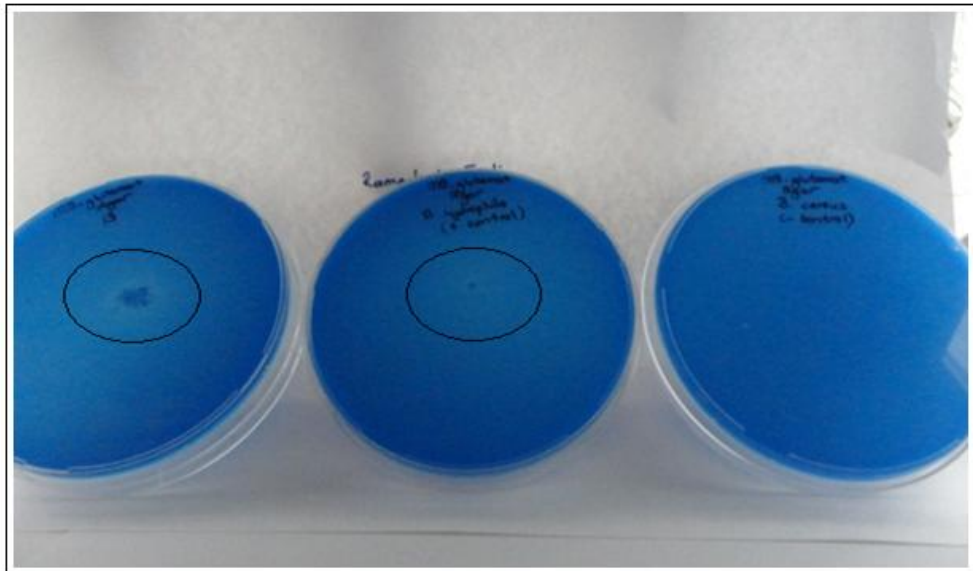
İzolatların ramnolipit üretimi testi ile elde edilen sonuçları Çizelge 3.12.'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Ramnolipit üretimi sonuçları

İzolat No	Ramnolipit üretimi sonuçları
8	-
13	+
40	+
<i>Aeromonas hydrophila</i> (pozitif kontrol)	+
<i>Bacillus cereus</i> (negatif kontrol)	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç

Çizelge 3.12.'den görüldüğü gibi ramnolipit üretimi sadece 13 ve 40 no'lu izolatlarda saptanmıştır.



Şekil 3.4. Pozitif kontrol olarak kullanılan *A. hydrophila* ve 13 no'lu izolatın M9-glutamat minimal agar üzerindeki şeffaf zon oluşumuyla ramnolipit üretimi ve negatif kontrol *B. cereus*

Ulusoy (2007) tarafından yapılan çalışmada 100 adet izolatın ramnolipit üretimleri incelenmiş, sonuçları PAO1 suşuyla karşılaştırdığında 1 suşun PAO1 suşundan daha fazla ramnolipit ürettiği, 8 adet suşun daha az ramnolipit ürettikleri ve 11 adet suşun ise ramnolipit üretmediklerini tespit edilmiştir. Ulusoy (2007)'dan farklı olarak çalışmamızda *A. hydrophila* referans suş olarak kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda incelediğimiz izolatların ikisinde (13,40) ramnolipit üretiminin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *A. hydrophila* ile karşılaştırıldığında ramnolipit üretimi referans suştan daha fazla olduğu, 8 no'lu izolatın ise ramnolipit üretmediği tespit edilmiştir.

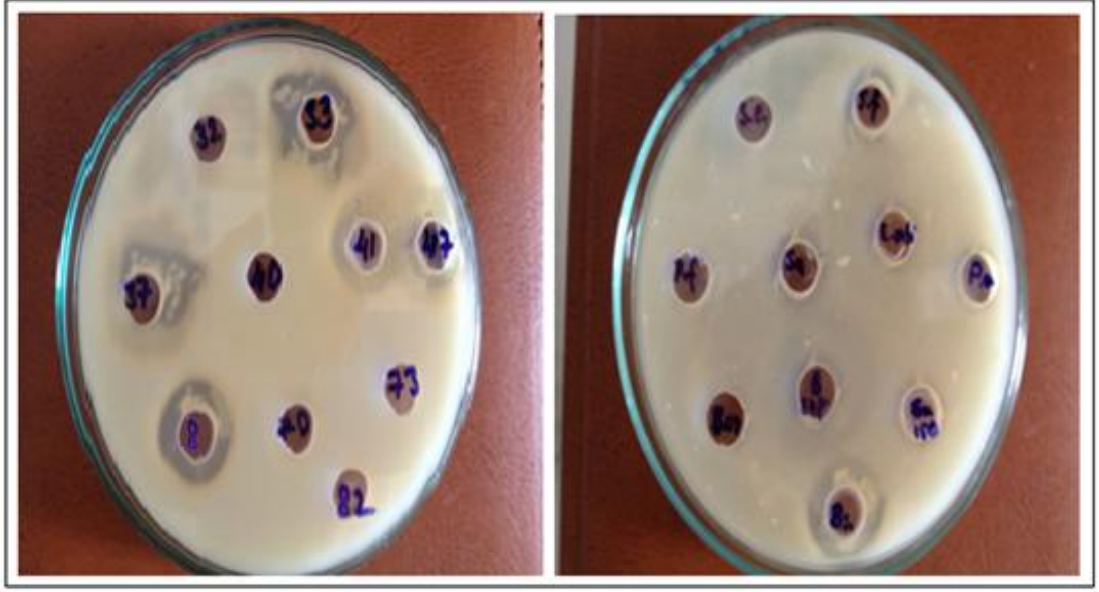
3.7.3. İzolatların proteaz testi bulguları

İzolatların proteaz testi ile %3'lük SMA ve %2'lik SMA besiyerlerinde elde edilen protein hidroliz zon çapları Çizelge 3.13. Şekil 3.5. ve Şekil 3.6.'da verilmiştir.

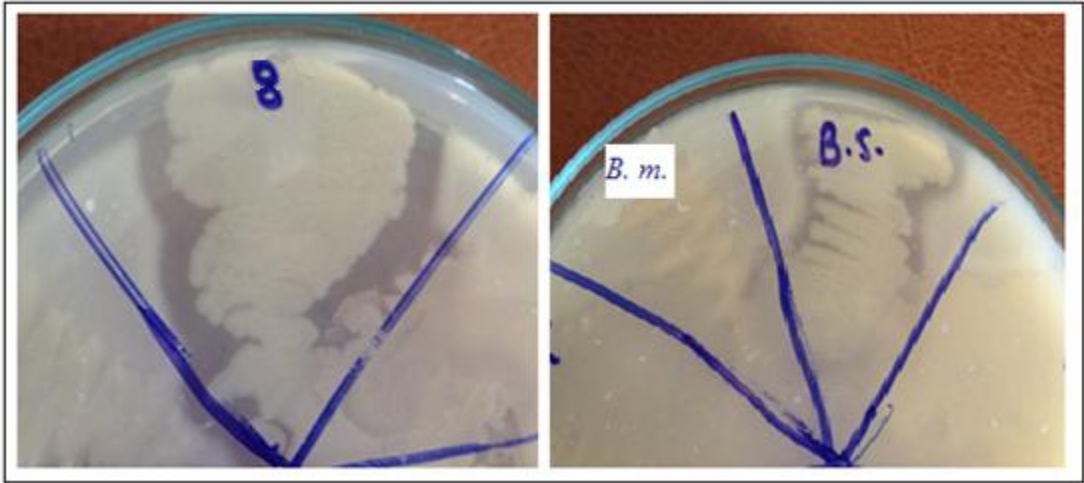
Çizelge 3.13. İzolatların proteaz test bulguları ve zon çapları

Bakteri No	%3 SMA		%2 SMA
	Proteaz Sonuçları	Zon Çapları (mm)	
8	+	15	+
13	-	-	-
40	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> (pozitif kontrol)	+	17	+

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç, mm: milimetre



Şekil 3.5. Pozitif kontrol olarak kullanılan *B. subtilis*'in ve 8 no'lu izolatin %3 SMA üzerindeki şeffaf zon oluşumuyla proteaz üretimi ve negatif kontrol olarak kullanılan *B. megaterium*



Şekil 3.6. Pozitif kontrol olarak kullanılan *B. subtilis* 'in ve 8 no'lu izolatin %2 SMA üzerindeki şeffaf zon oluşumuyla proteaz üretimi ve negatif kontrol olarak kullanılan *B. megaterium*

Matar vd. (2005), hem klinik hem de çevresel izolatların hepsinde (%100) proteaz aktivitesi saptadıklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda proteaz aktivitesi SMA yöntemi ile 13 ve 40 no'lu izolatlarda negatif olarak, 8 no'lu izolatta referans suş olan *Bacillus subtilis*'ten farklı düzeyde olmakla birlikte pozitif olarak saptanmıştır (Şekil 3.5., Şekil 3.6.). *P. aeruginosa* suşlarının proteaz aktivitesinin aynı yöntem ile

test edildiği başka bir çalışmada referans suşla karşılaştırdıklarında %95’inde pozitif sonuç gözlemlenmiştir (Demir vd., 2008).

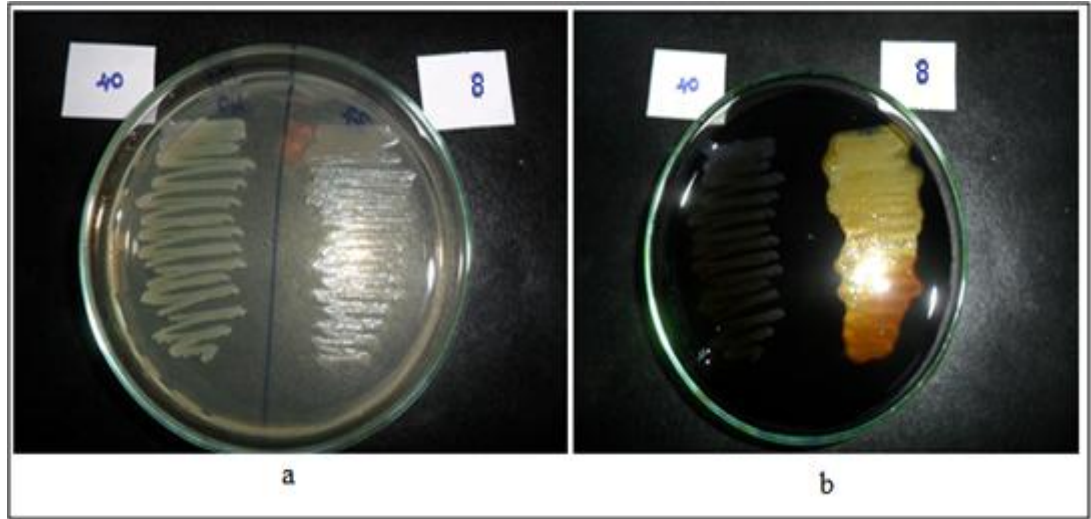
3.7.4. İzolatların amilaz testi bulguları

İzolatlarla elde edilen amilaz testi sonuçları Çizelge 3.14.’de verilmiştir.

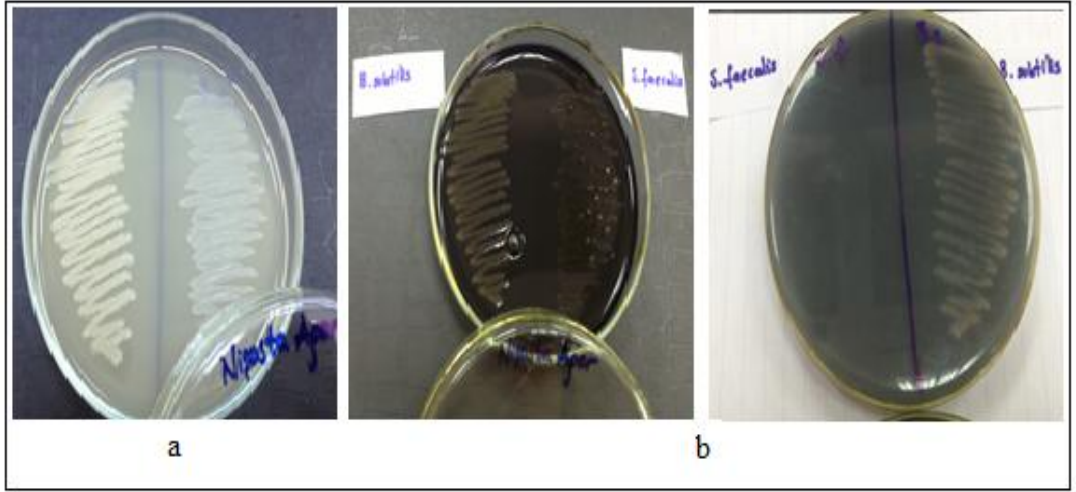
Çizelge 3.14. Amilaz testi sonuçları

İzolat No	Amilaz Testi Sonuçları
8	+
13	-
40	-
<i>Bacillus subtilis</i> (pozitif kontrol)	+
<i>Streptococcus faecalis</i> (negatif kontrol)	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç



Şekil 3.7. 8no’lu ve 40 no’lu izolatların nişasta agar üzerindeki amilaz testi görüntüsü a) Lugol damlatmadan önce b) Lugol damlatmadan sonra



Şekil 3.8. Pozitif kontrol olarak kullanılan *B. subtilis* ve negatif kontrol olarak kullanılan *S. faecalis* a) Lugol damlatmadan önce b) Lugol damlatmadan sonra

Çizelge 3.14.'de görüldüğü gibi incelenen izolatlardan 8 no'lu izolatta amilaz testinin pozitif, 13 ve 40 no'lu izolatların amilaz testinin negatif olduğu tespit edilmiştir.

3.7.5. İzolatların hemoliz testi

İzolatların hemoliz testi sonuçları Çizelge 3.15.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.15. İzolatların hemoliz testi bulguları

İzolat No	Hemoliz Testi Sonuçları
8	-
13	-
40	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç

Çalışmada kanlı besiyerinde, izolatların tamamının γ -hemoliz (8, 13, 40) oluşturdukları, hiçbirinin α -hemoliz, β -hemoliz oluşturamadıkları saptanmıştır. Hatha vd. (2005), izole ettikleri hareketli *Aeromonas* suşlarının kanlı besiyerinde β -hemoliz oluşturduklarını yaptıkları çalışmayla bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, hemoliz testi ile *Vibrio alginolyticus*, *Yersinia ruckeri* suşlarında hemoliz virülans faktörü tespit edilmezken, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* suşlarının tümünde ise hemoliz virülans faktörü tespit edilmiştir.

3.7.6. İzolatların fosfolipit hidrolizi

Egg-Yolk Agar ve Egg-Yolk Broth'da izolatlarla elde edilen fosfolipit hidrolizlerine dair veriler Çizelge 3.16.'da sunulmuştur.

Çizelge 3.16. İzolatların fosfolipit hidrolizi bulguları

İzolat No	Egg-Yolk Agar	Egg-Yolk Broth
8	-	-
13	+	Fosfolipit
40	+	Fosfolipit
<i>Staphylococcus aureus</i> (pozitif kontrol)	+	Lipit
<i>Bacillus subtilis</i> (negatif kontrol)	-	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç

Çalışmada kullanılan fosfolipit hidrolizi testi, mikroorganizmaların salgıladığı fosfolipaz enziminin besiyerindeki fosfolipitleri hidroliz etmesi sonucu açığa çıkan yağ asitlerinin serbest hale gelmesine ve böylece ortamda bulanıklık oluşmasına dayanır (Chen vd., 1997). Bu yöntem ile incelenen izolatlardan 13 ve 40 no'lu fosfolipit hidrolizine rastlanmıştır. 8 no'lu izolatta fosfolipit hidrolizine rastlanmamıştır. Çalışmamızda test tüplerinin alt kısmında keçe görünümü fosfolipit varlığı pozitif, üst kısmında keçe görünümü lipit (+) olarak değerlendirilmiştir.

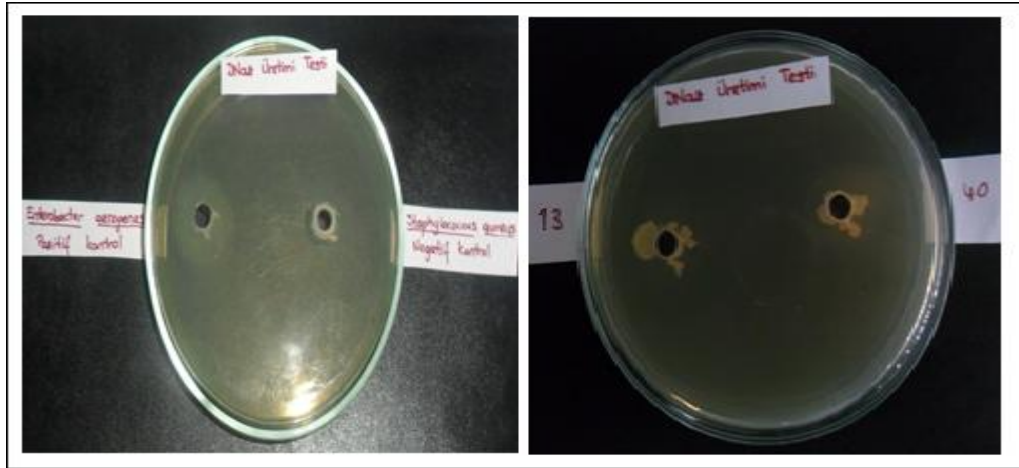
3.7.7. İzolatların DNaz üretimi

İzolatların DNAaz Agar'da DNaz üretimine dair elde edilen sonuçlar Çizelge 3.17. ve Şekil 3.9.'da verilmiştir.

Çizelge 3.17. İzolatların DNaz üretimi bulguları

İzolat No	DNaz Üretimi
8	+
13	-
40	+
<i>Enterococcus aerogenes</i> (pozitif kontrol)	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (negatif kontrol)	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç



Şekil 3.9. Pozitif kontrol olarak kullanılan *E. aerogenes*'in ve 40 no'lu izolatın DNaz test agar üzerindeki şeffaf zon oluşumuyla DNaz hidrolizi ve negatif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ve 13 no'lu izolat

DNA hidroliz testinin esası, mikroorganizmanın salgıladığı DNAaz enziminin besiyerindeki DNA'yı parçalaması sonucu, metil yeşilinin DNA kompleksinden ayrılarak besiyerini renksizleştirmesine dayanır. Çalışmada uygulanan yöntemde ise, mikroorganizmanın parçaladığı DNA, besiyeri üzerine dökülen 1 N HCl asit ile birleşmemekte ve reaksiyon alanı renksiz kalmaktadır. Bu yöntem ile incelenen izolatlardan 8 ve 40 no'lu izolatların DNA hidrolizine neden olduğu belirlenmiştir.

Hebert vd. (1982) tarafından kullanılan yöntem ile çalışmada kullandığımız yöntem karşılaştırıldığında, uyguladığımız yöntemin sonuçlarının daha kesin okunması ve

besiyerinin daha kolay hazırlanması gibi üstünlükleri olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca, Hebert vd. (1982) kendi yöntemlerinde %4.4 oranında şüpheli reaksiyonla karşılaştığını bildirmiştir.

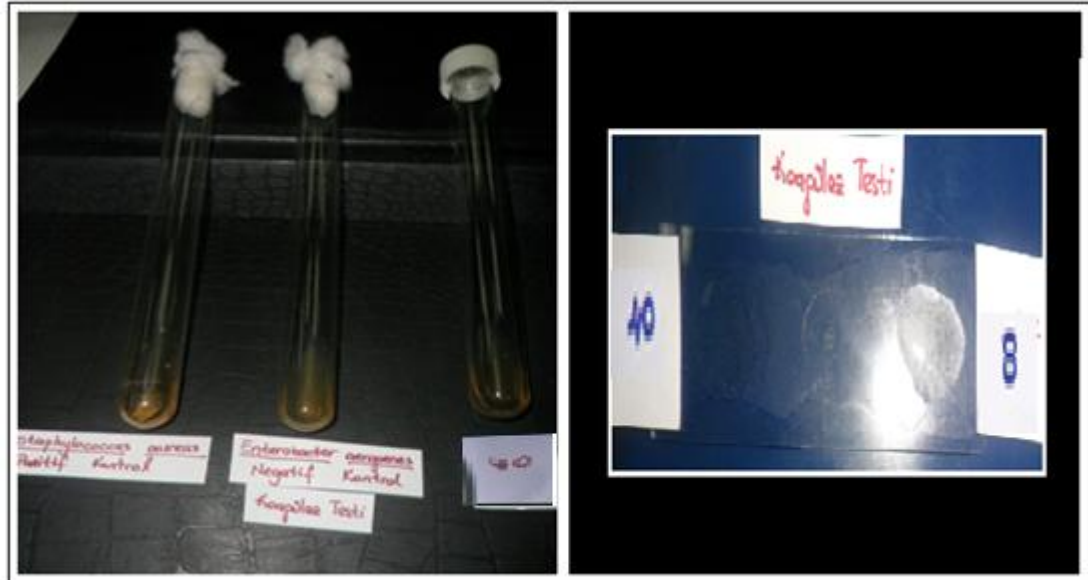
3.7.8. İzolatların koagülaz üretimi ve clumping faktör testi bulguları

İzolatlarla elde edilen koagülaz testi ve clumping faktör testi sonuçları Çizelge 3.18.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.18. Koagülaz testi ve clumping testi bulguları

İzolat No	Clumping Faktör Testi	Koagülaz Üretimi Testi			
		1.saat	2.saat	3.saat	4.saat
8	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (pozitif kontrol)	+	+	+	+	+
<i>Enterogenes aerogenes</i> (negatif kontrol)	-	-	-	-	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç



Şekil 3.10. Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus*'un ve 73 no'lu izolatın seyreltilmiş plazma içerisinde keçe oluşumuyla koagülaz üretimi ve negatif kontrol olarak kullanılan *E. aerogenes*

Sonuçlardan görüldüğü gibi çalışmada 40 no'lu izolat 4. saatte koagülaz pozitif olarak belirlenmiştir. İzolatlardan hiçbiri ise clumping pozitif olarak saptanmamıştır. Aynı yöntemi kullanarak, Akan vd. (2012) inceledikleri enfekteli sütlerden elde edilen 342 izolattan 178 stafilokok suşunun 126 (%70.8)'sı koagülaz, 122 (%68.5)'si clumping faktör pozitif olarak belirlemişlerdir.

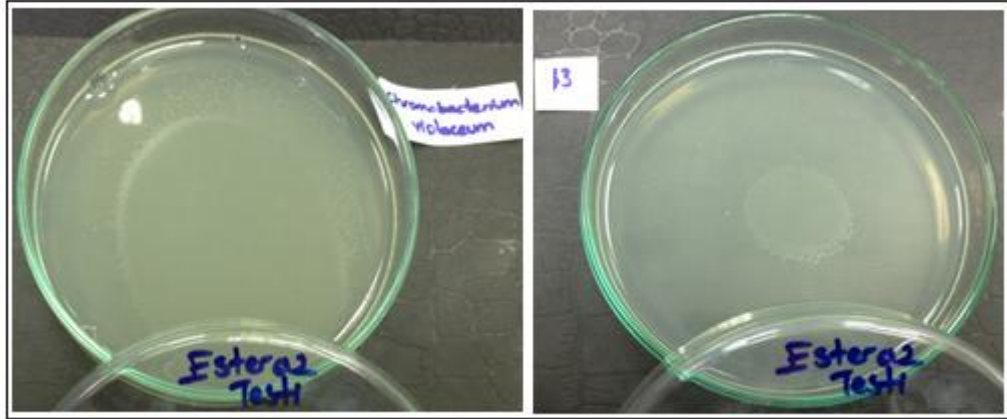
3.7.9. İzolatların esteraz testi bulguları

İzolatlara ait esteraz testi sonuçları Çizelge 3.19.'da ve Şekil 3.11.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.19. İzolatların esteraz testi sonuçları

İzolat No	Esteraz Testi Sonuçları
8	-
13	-
40	-
<i>Chromobacterium violaceum</i> (negatif kontrol)	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç



Şekil 3.11. Negatif kontrol olarak kullanılan *C. violaceum* suşu ve 13 no'lu izolat

Çalışmada kullanılan Tween 80 opasite testi ile esteraz aktivitesinin esası, mikroorganizmanın salgıladığı esteraz enziminin besiyerindeki tweeni hidroliz etmesi sonucu açığa çıkan yağ asitlerinin kalsiyum ile bileşikler oluşturarak inokülasyon bölgesinin etrafında görünür bir hale meydana getirmesine dayanır

(Slifkin ve Cumble, 1996). Bu yöntem ile incelenen izolatların hiçbirinde tween hidrolizine rastlanmamıştır (Şekil 3.11.).

Tween 80 opasite testi esterase aktivitesini saptayan basit ve ucuz bir testtir. Bu nedenle, bu test rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların tanımlanmasında ve virülans faktörlerinin ortaya konmasında ek bir yöntem olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

3.7.10. İzolatların üreaz testi bulguları

İzolatlarla elde edilen üreaz testi sonuçları Çizelge 3.20.'de verilmiştir.

Çizelge 3.20. Üreaz testi sonuçları

İzolat No	Üreaz Testi Sonuçları
8	-
13	-
40	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç

Christensen vd. (1982) tarafından önerilen üreaz testinin temelinde, üreaz enziminin besiyerindeki üreyi parçalaması sonucu, amonyak açığa çıkmakta ve amonyak ortamın pH'sını artırmakta ayrıca indikatör boya içeren ortamda açığa çıkan OH⁻ iyonları ortamda renk değişikliğine neden olmaktadır. Çalışmada uygulanan bu yöntemde, izolatların hiçbirinin üreyi hidrolize edemediği belirlenmiştir (Çizelge 3.20.).

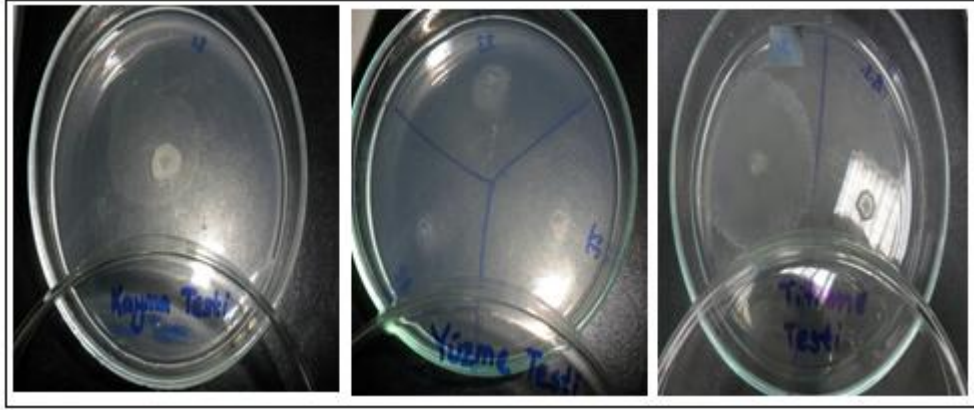
3.7.11. İzolatların kayma, yüzme ve titreme testleri bulguları

İzolatlara ait kayma, yüzme ve titreme testi sonuçları Çizelge 3.21. ve Şekil 3.12.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.21 İzolatların kayma, yüzme, titreme testi bulguları

İzolat No	Kayma Testi Sonuçları (mm)		Yüzme Testi Sonuçları (mm)		Titreme Testi Sonuçları (mm)	
8	+	21	+	+	+	7
13	+	75	+	+	+	70
40	+	45	+	72	+	63

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç



Şekil 3.12. İzolatlara uygulanan kayma testi, yüzme testi, titreme testi pozitif sonuçları

Yapılan bir çalışmada klinik kökenli *Pseudomonas* izolatlarının on iki adetinde kayma hareketi gözlenirken diğer izolatlarda değerlerin PAO1 suşuyla karşılaştırıldığı zaman %4-26 arasında değiştiği belirlenmiştir (Ulusoy, 2007). Aynı çalışmada, yüzme hareketi yedi izolatta gözlenmezken, titreme hareketi iki izolat haricinde %11-67 arasında bulunmuştur. Lee vd. (2005) ise 8 adet kistik fibrozis hastasından izole ettikleri 20 adet mukoid olmayan klinik izolat ile çalışmışlardır. Bu izolatlara yüzme, kayma ve titreme hareketlerinin varlığı, piyosiyenin ve proteaz üretimi, ayrıca sinyal moleküllerinin varlığı açısından test etmişlerdir. Ayrıca bu izolatların biyofilm oluşturma yeteneklerini test etmişlerdir. Sonuçta analiz ettikleri suşların %70'inde yüzme hareketinin, %50'sinde kayma ve titreme hareketinin ve %35'inde ise tüm hareket tiplerinin bulunmadığını tespit etmişlerdir. Sinyal molekülü üretimi açısından ise suşların %45'inin OddHL sinyal molekülünü, %80'inin ise BHL sinyal molekülünü ümediğini tespit etmişlerdir. Yine sekiz hastadan beşinde piyosiyenin üretimi ve proteaz aktivitesinin olmadığını tespit

etmişlerdir. Ayrıca analiz ettikleri izolatlarda biyofilm oluşturma yeteneklerinin farklı olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlara göre izolatların tamamında (%100) kayma hareketi gözlemlenmiştir. Çalışmamızda üç izolatta da (%100) *B. subtilis* ile kıyaslanabilecek seviyede kayma hareketi belirlenmiştir. Yüzme hareketi tüm izolatlarda pozitif olarak tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra 40 no'lu izolatta *B. subtilis* ile kıyaslanabilecek seviyede yüzme hareketini bulunmuştur. İzolatların tamamında (%100) titreme hareketi görülmüştür. Ayrıca 13 ve 40 no'lu izolatlarda *B. megaterium* ile kıyaslanabilecek seviyede titreme hareketi tespit edilmiştir (Şekil 3.12.).

3.7.12. Antibiyotik dirençliği bulguları

İzolatlara ait antibiyotik duyarlılık bulguları ve antibiyotik dirençlilik düzeyleri Çizelge 3.22., Çizelge 3.23., Çizelge 3.24.'de verilmiştir.

Çizelge 3.22. Antibiyotik duyarlılık bulguları

İzolat No	İnhibisyon zon çapları (mm)					
	C	Ipm	S	SCF	AMC	TE
8	30	41	24	25	32	22
13	19	19	15	18	16	8
40	21	21	13	23	11	16

C: Kloramfenikol, SCF: Sulbaktam/sefoperazon, Ipm: İmipenem, AMC: Amoksillin/klavulanik asit, S: Streptomisin, TE: Tetrasiklin

Çizelge 3.23. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları

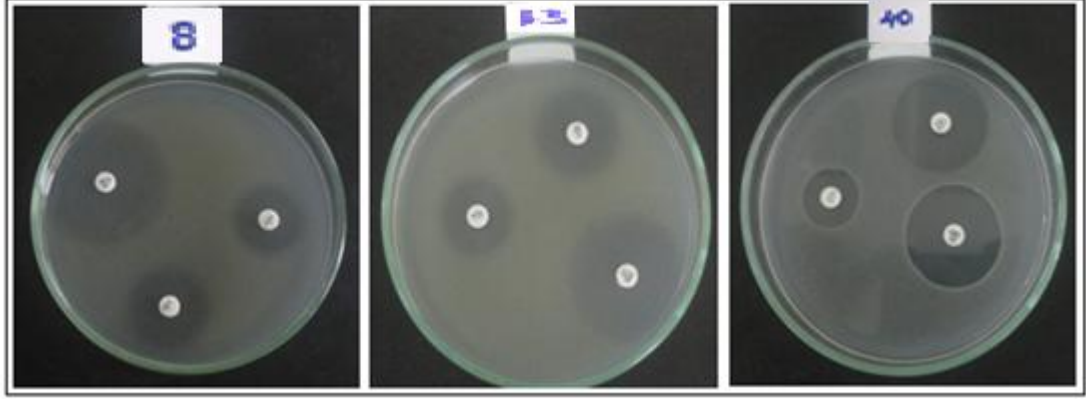
İzolat No	Antibiyotikler (µg/mL)					
	C	Ipm	S	SCF	AMC	TE
8	S	S	S	S	S	S
13	S	S	S	S	I	I
40	S	S	I	S	R	R

C: Kloramfenikol, SCF: Sulbaktam/sefoperazon, Ipm: İmipenem, AMC: Amoksillin/klavulanik asit, S: Streptomisin, TE: Tetrasiklin, S: Duyarlı, I: Orta dirençli, R: Dirençli

Çizelge 3.24. İzolatların antibiyotik dirençlilik düzeyleri

İzolat No	Antibiyotikler (µg/mL)					
	C	Ipm	S	SCF	AMC	TE
8	S (>18)	S (>16)	S (>15)	S (>15)	S (>20)	S (>19)
13	S (>18)	S (>16)	S (>15)	S (>15)	I (<19)	I (<18)
40	S (>18)	S (>16)	I (<14)	S (>15)	R (<14)	R (<14)

C: Kloramfenikol, SCF: Sulbaktam/sefoperazon, Ipm: İmipenem, AMC: Amoksisilin/klavulanik asit, S: Streptomisin, TE: Tetrasiklin, S: Duyarlı, I: Orta dirençli, R: Dirençli



Şekil 3.13. İzolatların MHA üzerindeki şeffaf zon oluşumuyla antibiyotik duyarlılık testi

Farsak-Orak (2005) çalışmasında Gr(-) bakterilerden *Klebsiella sp.* ve *E. coli* suşlarının dokuz değişik antibiyotiğe karşı dirençlerini araştırmıştır. *Klebsiella sp.* suşları için en yüksek direnci; % 85.10 oranı ile trimetoprim/sülfometaksazole karşı, bunu sırasıyla seftriakson (% 65.95), sefotaksim (%61.7), aztreonam (%59.57), seftazidim (%53.19), amoksisilin/klavulanat, piperasilin/tazobaktam, amikasin % 23.4 ve imipenem (%4.25) direncinin izlediğini bulmuştur. *E. coli* suşlarında ise en yüksek direnci % 80.88 oranı ile trimetoprim/sülfometaksazole karşı bulmuştur. Bunu sırasıyla seftriakson (%61.76), aztreonam (%58.82), sefotaksim (%57.35), seftazidim (%51.47), amoksisilin/klavulanik asit (%38,23), piperasilin/tazobaktam (%8.82), amikasin (%7.35) ve imipenemin (%0) izlediğini bulmuştur. *Klebsiella sp.* ve *E. coli* suşlarının en duyarlı oldukları antibiyotik ise sırasıyla % 95.74 ve % 100.0 ile imipenem olarak bulmuştur. Çalışmada kullanılan disk difüzyon metoduyla ise izolatların tümünün imipenem, kloramfenikol ve sulbaktam/sefoperazon antibiyotiklerine karşı duyarlı oldukları saptanmıştır. Ayrıca, 8 ve 13 no'lu izolatların streptomisine, 8 no'lu izolatın amoksisilin/klavulanik asite ve tetrasikline karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan 40 no'lu izolat ise amoksisilin/klavulanik asit ve streptomisin antibiyotiklerine karşı dirençli bulunmuştur.

3.8. İzolatların QS Test Sonuçları

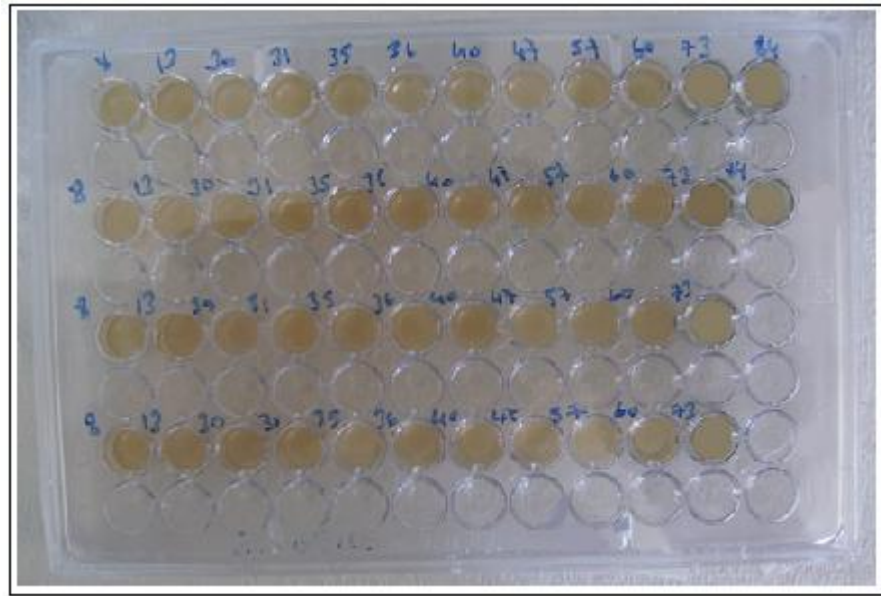
3.8.1. QS yanıtları

İzolatlarla elde edilen AHL sinyal molekülünün üretimi sonucu QS yanıtı sonuçları Çizelge 3.25.'de verilmiştir.

Çizelge 3.25. QS yanıtı sonuçları

İzolat No	QS Yanıtı Sonuçları
8	-
13	-
40	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç



Şekil 3.14. İzolatların QS yanıtları

Ortam bileşenlerinin, çevre koşullarının ve durağan sisteme karşı su içeren akışkan sistemlerin bir çok mikroorganizmada QS düzenlenmesini ve biyofilm gelişimini etkilediği görünmektedir (De Kievit vd., 2001). Laboratuvarda gelişen biyofilmlerde *P. aeruginosa*, normal biyofilm oluşumu için lasR-lasI sistemine gereksinim duyar (Davies vd., 1998). lasI gen ürünü, bilinen iki *P. aeruginosa* “otoinducer” ından biri olan N-(3-oxododekanoil)-L-homoserin lakton oluşturur. Her ne kadar lasI mutanları cam yüzeye tutunup çoğalsa da, mutant biyofilm doğal tipe göre daha ince oluşur.

Bundan başka, doğal tip biyofilmde, su kanalları ile ayrılmış hücre grupları karakteristik iken, mutant biyofilmde bu tipik mimari eksiktir. Mutant biyofilm içeren ortama N-(3-oxododekanoil)-L-homoserin lakton eklendiği zaman biyofilm daha kalın bir hal alır ve hücre yoğunluğu doğal tip biyofilm ile benzer form kazanır. Bu da N-(3-oxododekanoil)-L-homoserin lakton'un *P.aeruginosa*'daki olgun biyofilm mimarisinden sorumlu olduğunu düşündürür (Kiersek-Pearson ve Karatan, 2005). *P.aeruginosa* kistik fibroz hastalarında akciğerlerde sıklıkla *Burkholderia cepacia* ile birlikte biyofilm formunda bulunur. *B.cepacia* K56-2'nin quorum sensing sistemi; AHL sentaz, N-oktanoilhomoserin lakton sentezleyen CepI ve N-oktanoil homoserin lakton'a bağlandıktan sonra farklı genlerin transkripsiyonunu aktive eden ya da baskılayan CepR'yi içerir (Lewenza vd., 1999). "Cep" sistemindeki defektif mutantlar cam yüzeyde doğal suşlarla benzer şekilde mikrokoloniler oluştururlar, ancak bu mikrokoloniler matür biyofilm geliştirmede yetersiz kalırlar (Huber vd., 2001). Patojenite geliştiren biyofilm oluşturucu Gr(-) bakterilerde QS 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 ve Meighen, 1989). Bruhn vd. (2005) çalışmasında *Enterobacteriaceae* ailesi kapsayan patojenlerin çoğunda AHL molekülü üretildiği görülmüştür. Çalışmada mikropilaka yöntemiyle yapılan QS yanıtı testinde izolatların tümü negatif olarak bulunmuştur.

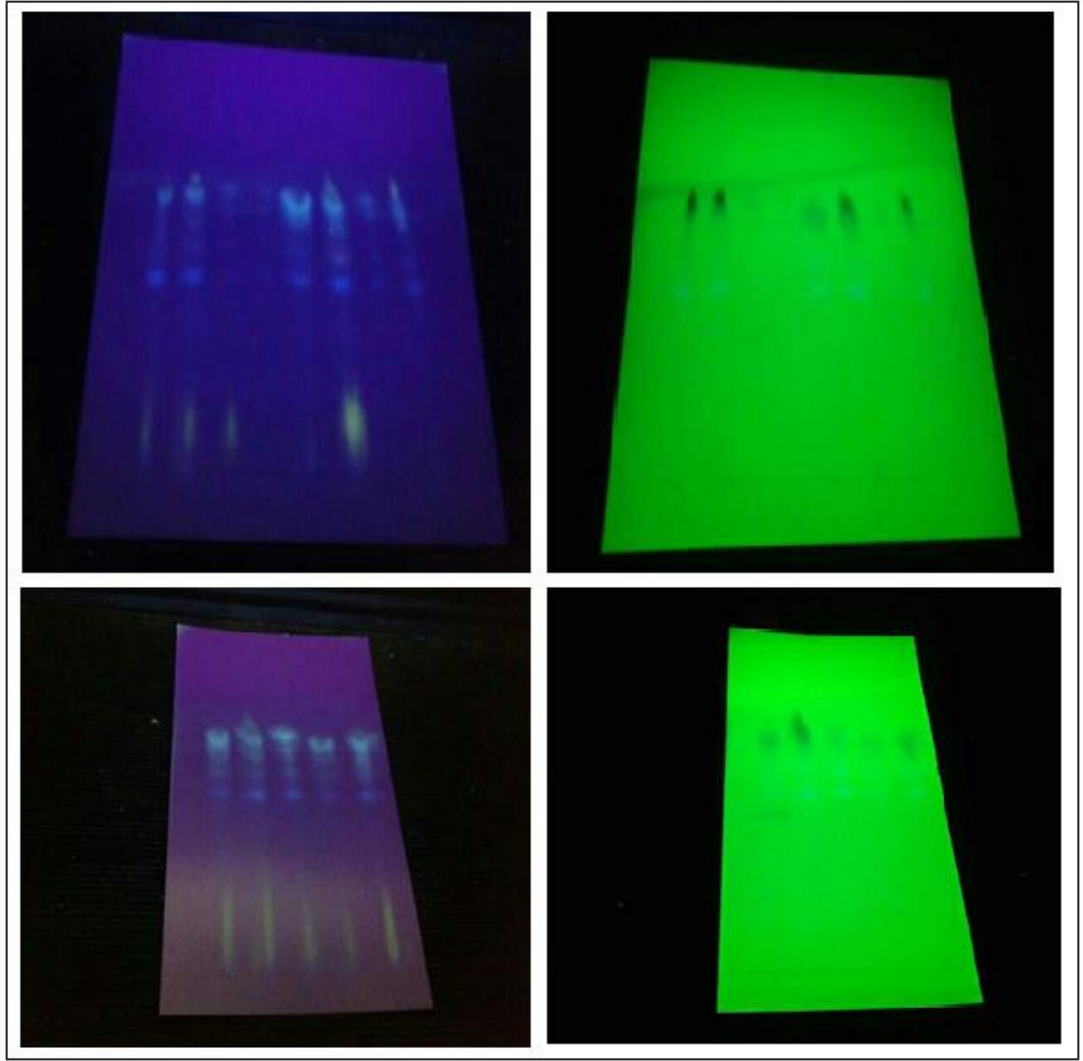
3.8.2. İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile BHL sinyal moleküllerinin tespiti

İzolatların ince tabaka kromatografisi (TLC) ile BHL sinyal moleküllerinin tespiti sonuçları Çizelge 3.26.'de verilmiştir.

Çizelge 3.26. İnce tabaka kromatografisi ile BHL sinyal moleküllerinin tespiti sonuçları

İzolat No	<i>C. violaceum</i> CV026 ile BHL Sinyal Molekülünün Üretimi Sonuçları
8	-
13	-
40	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç



Şekil 3.15. İzolatların TLC plaka üzerinde BHL sinyal molekülü tespiti

Sonuçlarda görüldüğü gibi *C. violaceum* CV026 referans suşu kullanılarak incelenen 3 izolatın hiçbirinin (%100.0) BHL sinyal molekülünü üretmediği belirlenmiştir. Başka benzer bir çalışmada, kistik fibrozisli hastalardan izole edilen farklı biyofilm oluşturma yeteneklerine sahip olduğu belirlenen 20 izolattan, sinyal molekülü açısından %45'inin OddHL sinyal molekülünü, %80'nin ise BHL sinyal molekülünü üretmediği tespit edilmiştir (Lee vd., 2005). Ulusoy (2007), incelediği izolatlardan yirmi adetinin OddHL sinyal molekülü ürettiğini, çalışmamıza benzer bir şekilde incelediği izolatların hiçbirinin BHL sinyal molekülü üretmediğini tespit etmiştir. Her iki çalışmada bakteriler tarafından çok düşük oranda BHL-türevi sinyal moleküllerinin üretiminin, sinyal moleküllerinin çok geniş çeşitlilikte olması, Gr(-) bakterilerdeki HSL-türevi moleküllerinin farklı türlere, cinslere göre değişkenlik göstermesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu büyük çeşitliliğin daha

sağlıklı taranarak ortaya konulması için yeni QS araştırma metotlarının geliştirilmesi ve yeni referans suşların izolasyonuna gereksinim vardır.

3.8.3. *C. violaceum* CV026 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal molekülünün üretimi

C. violaceum CV026 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal molekülünün üretimi sonuçları Çizelge 3.27.'de verilmiştir.

Çizelge 3.27. *C. violaceum* CV026 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal molekülünün üretimi

İzolat No	AHL Sinyal Molekülünün Üretimi
8	-
13	-
40	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç

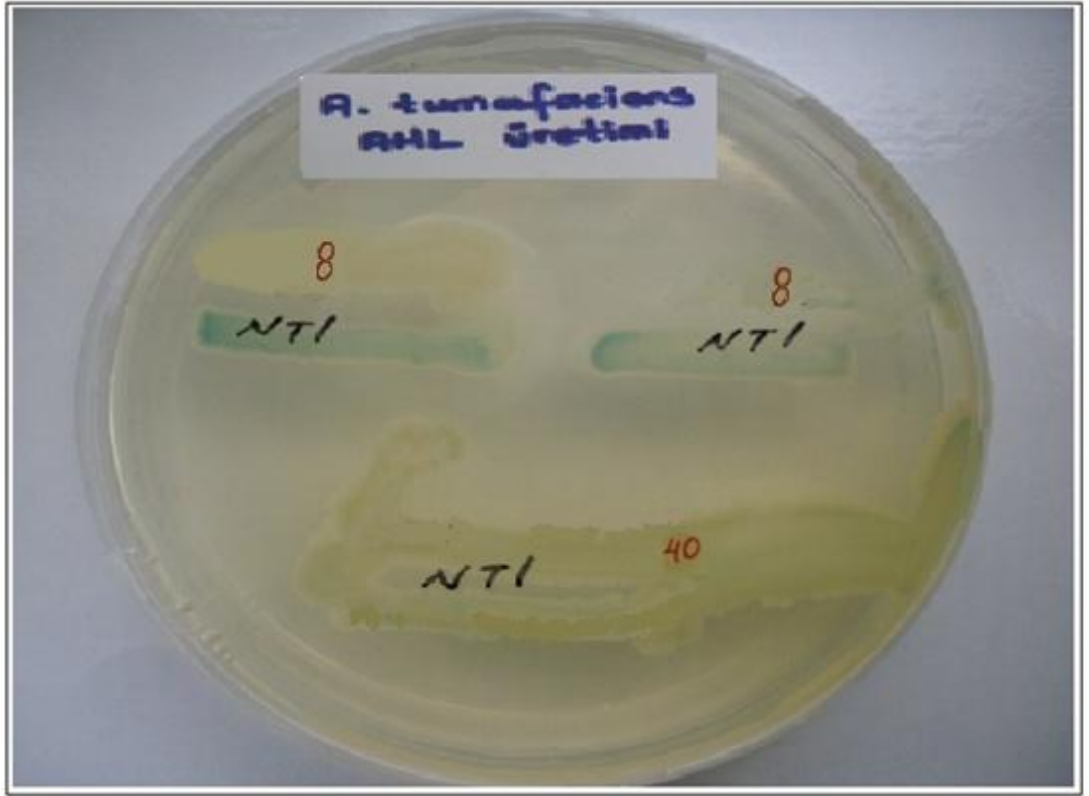
3.8.4. *A. tumefaciens* NT1 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal molekülünün üretimi

A. tumefaciens NT1 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal molekülünün üretimi sonuçları Çizelge 3.28.'de verilmiştir.

Çizelge 3.28. *A. tumefaciens* NT1 referans suşu kullanılarak izolatlarda AHL sinyal molekülünün üretimi

İzolat No	AHL Sinyal Molekülünün Üretimi
8	+
13	-
40	-

-: Test açısından negatif sonuç, +: Test açısından pozitif sonuç



Şekil 3.16. *A. tumefaciens* NT1 referans suşu kullanılarak 8 no'lu izolatta pozitif AHL sinyal molekülünün üretimi ve 40 no'lu izolatta negatif AHL sinyal molekülü üretimi

Çizelge 3.28.'de görüldüğü gibi *A. tumefaciens* NT1 referans suşu kullanılarak sadece 8 no'lu izolat tarafından AHL molekülü üretimi belirlenmiştir. Oysa ki, aynı izolat ile *C. violaceum* CV026 referans suşu kullanılarak AHL üretimi (Çizelge 3.27.) ve BHL üretimi (Çizelge 3.26.) saptanmamıştır. Yapılan diğer bir çalışmada, benzer olarak *C. violaceum* CV026 suşu kullanılarak yapılan testlerde *A. hydrophila* ve *Y. ruckeri* izolatlarında BHL sinyal molekülünü ürettiği tespit edilirken, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens* izolatlarında ise üretmediği tespit edilmiştir (Ulusoy, 1997). Gerek bizim çalışmamızda gerekse diğer bazı çalışmalara göre kullanılan referans suşun AHL ve türevlerinin ortaya konulmasında farklı sonuçlar verebildiği belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, endüstriyel sistemlere ait farklı kısımlarda su ile temas eden yüzeylerdeki cıvık biyofilm tabakalardan elde edilen 84 izolattan en iyi biyofilm üreticisi olduğu belirlenen 20 tanesi seçilmiştir. Klasik kültürel, mikroskopik ve biyokimyasal testlerle ön tanılamaları yapılan izolatların moleküler olarak ileri tanılamaları yapılmıştır. İzolatların *Enterobacter*, *Comamonas*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Kurthia* ve *Rummeliibacillus* cinslerine ait türler olduğu saptanmıştır. Ayrıca oluşturulan filogenetik dendogramlar ile aralarındaki yakınlıklar belirlenmiştir. Moleküler tanılamayla Gr(-) olduğu saptanan 3 adet izolatla çalışmaya devam edilmiştir.

Çalışmada, tanılanan bu izolatların, başlıca virülans faktörlerden piyasiyanin, ramnolipit, proteaz, amilaz, hemoliz, fosfolipit, DNaz, koagülaz, clumping faktör, esteraz, kayma, yüzme, titreme testleri, biyofilm üretimleri, antibiyotik dirençlikleri ve QS yanıtı oluşturmaları araştırılmıştır. Virülans faktörlerden pigment tespiti için agarda tirozin saydamlaştırma aktivitesi incelendiğinde izolatların tamamında negatif sonuç gözlenmiştir. Ramnolipit üretimleri incelendiğinde, izolatların *A. hydrophila* referans suşu ile karşılaştırıldığında 13 ve 40 no'lu izolatların ramnolipit ürettiği ve bu üretimin referans suştan daha fazla olduğu, 8 no'lu izolatın ise ramnolipit üretmediği tespit edilmiştir. 8 no'lu izolatta referans suş olan *B. subtilis*'ten farklı düzeyde olmakla birlikte pozitif olarak proteaz aktivitesine sahip olduğu ve 13 ve 40 no'lu izolatların proteaz aktivitesine sahip olmadıkları saptanmıştır. Amilaz aktivitesi gene 8 no'lu izolatta saptanırken, 13 ve 40 no'lu izolatlarda belirlenmemiştir. Kanlı agar besiyerinde izolatların hiçbirinin α -hemolitik ve β -hemolitik aktiviteye sahip olmadıkları tespit edilmiştir. Fosfolipit aktivitesi incelendiğinde, 13 ve 40 no'lu izolatların fosfolipit hidrolizi saptanmış, 8 no'lu izolatın fosfolipit hidrolizine rastlanmamıştır. Ayrıca fosfolipit hidrolizinde test tüplerinin alt kısmında keçe görünümü fosfolipit varlığı pozitif, üst kısmında keçe görünümü lipit pozitif olarak değerlendirilmiştir. 8 ve 40 no'lu izolatlarla DNaz testi pozitif olarak saptanırken, 13 no'lu izolatta negatif olarak saptanmıştır. Üreaz testi incelendiğinde izolatların hiçbirinin üreyi hidrolize edemediği tespit edilmiştir. Serbest koagülaz aktivitesi tüp yöntemi ile incelendiğinde, 40 no'lu izolatta koagülaz testi pozitif, 8 ve 13 no'lu

izolatta koagülaz testi negatif olarak tespit edilmiştir. Bağlı koagülaz aktivitesi lam yöntemi ile incelendiğinde, tüm izolatlarda clumping faktör negatif bulunmuştur. İzolatların hiçbirinde tween 80 hidrolizi görülmediğinden esteraz aktivitesi saptanmamıştır. Kayma, yüzme, titreme hareketleri incelendiğinde, izolatların hareketlilikleri birbirlerine göre farklı seviyelerde olmak üzere pozitif olarak saptanmıştır. 8 no'lu izolatin tüm antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu saptanırken; 13 no'lu izolatin amoksillin/klavulanik asit ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı orta dirençli, 40 no'lu izolatin amoksillin/klavulanik asit ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı dirençli ve streptomisin antibiyotiğine karşı ise orta dirençli olduğu saptanmıştır.

Çalışma sonuçları irdelendiğinde, biyofilm üretiminin yüksek olmasının bununla beraber proteaz ve fosfolipit aktivitesinin yüksek oranda saptanmasının, patojen bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda önemli virülans faktörler olabileceği şüphesizdir. Biyofilm üretimi yüksek olarak tespit edilen izolatlarda ramnolipit üretiminin de yüksek olarak tespit edilmesi, bu iki virülans faktörün birbirleriyle doğrudan ilişkili olduğunu düşündürmüştür; endüstriyel ve çevreyle ilgili pek çok alanda kirleticilerin uzaklaştırılması ve biyodegradasyonunda kullanılabilecekleri kanısına varılmıştır. Proteaz ve amilaz virülans faktörleri incelendiğinde, aynı izolatların pozitif ve negatif sonuçlar vermesiyle bu virülans faktörlerin aynı genler tarafından kontrol edilebileceği düşünülmüştür. İncelenen izolatlardan 1 tane izolatin (40 no'lu izolat) amoksillin/klavulanik asit ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı dirençli, bir tanesinin (13 no'lu izolat) de orta dirençli tespit edilmesi enterekokların bu antibiyotiklere karşı direnç kazandıklarını göstermiştir. Aynı zamanda 40 no'lu izolatin streptomisine karşı orta dirençli olarak saptanması bu antibiyotiğe karşı da direnç geliştirebileceğini göstermiştir. İncelenen üç adet endüstriyel kökenli biyofilm bakterisinden, *A. tumefaciens* NT1 referans suşu kullanılarak yapılan QS denemelerinde bir tane izolatin (8 no'lu izolatin) AHL sinyal molekülünü ürettiği tespit edilirken, *C. violaceum* CV026 referans suşu kullanılarak yapılan testlerle herhangi bir AHL molekülüne rastlanılmamıştır. AHL sinyal molekülü üretmediği tespit edilen izolatlar için, ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılarak sonuçlar teyit edilmiştir. Çalışmada elde edilen bu sonuçlar, sinyal molekülü üretiminin virülansı kontrol etmede etkili olan tek mekanizma olmadığını göstermiştir. Eğer virülans faktörlerinin üretimi tamamen sinyal moleküllerinin üretimiyle kontrol

edilmiş olsaydı, yapılan virölans faktör testlerinin pozitif sonuçlar vermesinin mümkün olmayacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, çalışmada kullanılan izolatlar tarafından, BHL-türevi ve HSL-türevi sinyal molekülleri üretiminin tespit edilememesi, sinyal moleküllerinin çok geniş çeşitlilikte olmasından ve farklı türlere, cinslere göre değişkenlik göstermesinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. QS sistemlerindeki bu geniş çeşitliliğin daha verimli bir şekilde taranarak ortaya konulabilmesi için farklı QS araştırma metodlarının geliştirilmesine ve yeni referans suşların izolasyonlarına gereksinim duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasının, endüstriyel sistemlerden izole edilen bakterilerin biyofilm oluşturma ve virölans faktörlerinin ortaya konulması bakımından, gelecekteki çalışmalar için yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Zira, yapılan kaynak taramasında endüstriyel kökenli sorun oluşturan biyofilm bakterilerinin virölans faktörlerinin incelenmesine dair herhangi bir veriye rastlanılamamıştır. Oysa ki, bu bakterilerin virölans özelliklerinin aydınlatılması ile ilgili çalışmaların arttırılmasıyla endüstriyel sistem ve ekipmanlarından kaynaklanan yayılma ve bulaşmaların önlenmesi, böylece çevre ve halk sağlığının güven altına alınması söz konusu olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abdelnour, A., Arvidson, S., Bremell, T., Ryden, C. ve Tarkowski, A. (1993) The accessory gene regulator (agr) controls *Staphylococcus aureus* virulence in a murine arthritis model, *Infect Immun*, 61: 3879-3885.
- Adonizio, A.L., Kong, K.F. ve Mathee, K. (2008) Inhibition of Quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by south Florid a plant extracts, *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 198-203.
- Akan, M., İzgü, M., Cantekin, Z., Tosun, G. ve Çetin, S. (2012) *Mastitisli Sütlerden İzole Edilen Bakterilerin Virulens Faktörlerinin Konvansiyel ve Moleküler Yöntemlerle Saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 126s.
- Akşit, F., Akgün, Y. Ve Kiraz, N. (2007) *Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji*, Anadolu Üniversitesi Yayın No: 857, Açıköğretim Fakültesi Yayın No: 453. Eskişehir, 286s.
- Albrecht, A., Felk, A. ve Pichova, I. (2006) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions, *J Biol Chem*, 281(2): 688-694.
- Alen, S., Koneman, E., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn, W., Woods, G. ve Procop, G. (2006) Staphylococci and related organism, 539-576, *The gram-positive cocci*, 5. Baskı, Philadelphia, 782s.
- Allen-Vercoe, E., Sayers, A.R. ve Woodward, M.J. (1999) Virulence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model, *Epidemiol Infect*, 122: 395–402.
- Allison, C., Coleman, N., Jones, P.L. ve Hughes, C. (1992) Ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation, *Infect Immun*, 60: 4740–4746.

- Allison, D.G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A. ve Gilbert, P. (1998) Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms, *FEMS Microbiol Lett*, 167: 179-120.
- Allison, L. Adonizio, K.D., Bradley, C. ve Bennett, K.M. (2006) Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida, *J Ethnopharm*, 105: 427–435.
- Altun, H.U. ve Şener, B. (2008) Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci, *Hacettepe Tıp Derg*, 39: 82-88.
- Alvin, W.H.L., Moonens, K. ve Remaut, H. (2013) Chemical attenuation of pilus function and assembly in Gram-negative bacteria, *Curr Opin Microbiol*, 16: 85–92.
- Anderl, J.N., Zahller, J., Roe, F. ve Stewart, P.S. (2003) Role of nutrient limitation and stationaryphase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 1251-1256.
- Andrea, G., Oscar, C., Maria, S.D.P., Alessandra, M.P., Marcello, M.D.E. ve Giorgio, S., (2000) Combination studies between polycationic peptides and clinically used antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Peptides*, 21: 1155–1160.
- Andrew T., Fenley, S., Banik, K., Rahul V.K. (2011) Computational modeling of differences in the quorum sensing induced luminescence phenotypes of *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*, *J Theo Biol*, 274: 145–153.
- Andrutis, K.A., Fox, J.G., Schauer, D.B., Marini, R.P., Li, X., Yan, L., Josenhans, C. ve Suerbaum, S. (1997) Infection of the ferret stomach by isogenic flagellar mutant strains of *Helicobacter mustelae*, *Infect Immun*, 65: 1962–1966.
- Anisia J.S., Jorge A.B. ve Jian-He, W. (2010) Attenuation of bacterial virulence by quorum sensing-regulated lysis, *J Biotechnol*, 150: 22–30.
- Anonim, *Patogenez*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 18.05.2013. 15s.

- Anwar, H., Strap, J.L. ve Costerton, J.W. (1992) Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy, *Antimicrob Agents and Chemother*, 36: 1347–1351.
- Anwar, H, van Biesen, T., Dasgupta, M., Lam, K. ve Costerton, J.W. (1989) Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system, *Antimicrob Agents and Chemother*, 33: 1824-1826.
- Aoki, S., Ito-Kuwa, S., Nakamura, K., Kato, J., Ninomiya, K. ve Vidotto, V. (1994) Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*, *Mycopathol*, 128: 143-150.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Borrelli, A.M., Donati, M.E. ve Montanaro, L. (2001) Congo red agar plate method: improved accuracy and new extended application to *Staphylococcus aureus*, *New Microbiol*, 24: 355-363.
- Arda, M. (1997) *Temel Mikrobiyoloji*, Medisan Yayınevi, Medisan Yayın Serisi No: 25. Ankara, 490s.
- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Kahraman, M., Akay, Ö., Ilgaz, A., İzgür, M. ve Diker, K.S. (1999) *Özel Mikrobiyoloji*, 45-50. 5. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, 252s.
- Arda M. (2000) *Temel Mikrobiyoloji*. Medisan Yayınları, Ankara, 321s.
- Arslan, U. ve Fındık, D. (2003) Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virülans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in vitro araştırılması, *İnfek Derg*, 17(4) : 471-481.
- Arslan A. (2007) *Candida türlerindesubinhibitör konsantrasyonda antifungal ilaç uygulamalarının slime faktör oluşumuna etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon, 78s.
- Aştı, R.N., Kurtde, N. ve Ergün, L. (1993) Kangal köpeklerinin perifer kan T-Ienfositleri üzerinde ışık ve elektron mikroskobik çalışmalar, *A Ü Vet Fak Derg*, 40 (4): 563-576.

- Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F. ve Swings, J. (2005) Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*, *Environ Microbiol*, 7: 1488–1495.
- Aydın, M. (2000) Endodontik mikrobiyoloji, 313. Alaçam, T. (editör). *Endodonti*, Barış yayın evi, Ankara, 457s.
- Aydın M. (2004) Bakteri identifikasyonunda kullanılan standart biyokimyasal ve fizyolojik testler, 91-110. Aydın, M. (editör). *Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel Mikrobiyoloji*, Güneş yayınevi, 4. Baskı, Ankara, 564s.
- Ayora, S. ve Götz, F. (1994) Genetic and biochemical properties of an extracellular neutral metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*, *Mol Gen Genet*, 242: 421-430.
- Baba-Moussa, L., Anani, L., Scheftel, J.M., Couturier, M., Riegel, P., Haikou, N., F., Hounsou, H., Monteil, A. ve Sanni, G.P. (2008) Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections, *J Hos Infect*, 68: 32-38.
- Barbosa, J., Gibbs, P.A. ve Teixeira, P. (2010) Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal, *Food Control*, 21: 651–656.
- Barczak, A.K. ve Hung, D.T. (2009) Productive steps toward an antimicrobial targeting virulence, *Curr Opin Microbiol*, 12: 490–496.
- Baskın, H. (2005) Mikroorganizmanın Çevreye Uyumu ve Biyofilm: "Quorum Sensing" (Çoğunluğu Algılama), *Klinik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, 9-10 Ekim 2005. İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 350s.
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E. ve Silverman, M.R. (1993) Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol*, 9: 773–786.
- Basso, G., Cocito, M.G., Semenzato, G., Pezzutto, A. ve ZanESCO, L. (1980) Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes, *Br J Haematol*, 44: 577-582.

- Bentley, S.D., Corton, C., Brown, S.E., Barron, A., Clark, L., Dogget, J., Harris, B., Ormond, M.A., Quail, M.A. ve May, G. (2008) Genome of the actinomycete plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* suggests recent niche adaptation, *J Bacteriol*, 190: 2150-2160.
- Bergagne E. (2004) *Pseudomonas* and *Miscelaneus gram negative bacilli*, 1733-1748, Colman J., Powerdyly G.W. (editörler). Infectious Diseases, 2. Baskı, Toronto, 2541s.
- Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 1 (1920) Krieg, N.R. ve Holt, J.G. (editörler). Williams & Wilkins Press, Baltimore, London.
- Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 2 (1986) Krieg, N.R. ve Holt, J.G. (editörler). Williams & Wilkins Press, Baltimore, London.
- Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 3 (1989) Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. ve Holt, J.G. (editörler). Williams & Wilkins Press, Baltimore, London.
- Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume 4 (1989) Williams, S.T., Sharpe, M.E. ve Holt, J.G. (editörler). Williams & Wilkins Press, Baltimore, London.
- Berzeg, D. (2005) *Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnci, Yüksek Düzey Aminoglikozit Direnci ve E Test İle Vankomisin MİK Değerlerinin Değerlendirilmesi*. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 96s.
- Biçer-Turaç, A. (2009) *Hastane izolatu Staphylococcus aureus ve koagülaz negatif Staphylococcus suşlarında metilisin direncinin farklı yöntemlerle araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 70s.
- Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A. ve Blanco, J. (1997) Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicaemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity, *J Clin Microbiol*, 35: 2953–2957.

- Blindar, V.N., Lebedeva, N.B., Zubrikhina, G.N. ve Soloveva, E.A. (1993) Alpha-naphthyl acetate esterase-a cytochemical marker of the T-helpers, *Clin Lab Diagn*, 6: 38-40.
- Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R. ve Haesebrouck, F. (2009) Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives, *Vet Microbiol*, 135: 187-195.
- Boşgelmez-Tınaz, G. (2003) Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria, *Turk J Biol*, 27: 85-93.
- Brint, J.M. ve Ohman, D.E. (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer cer-responsive LuxR-LuxI family, *J Bacteriol*, 177: 7155-7163.
- Brock, T.D. ve Madigan, M.T. (1994) *Biology of Microorganisms*, 7. Baskı, Prentice-Hall International Inc., 899s.
- Bruhn, J.B, Dalsgaard, I., Nielsen, K.F., Buchholtz, C., Larsen J.L. ve Gram L. (2005) Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in Gram negative fish pathogenic bacteria, *Dis Aqua Org*, 65: 43-52.
- Buchanan, K.L. (1998) What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?, *Emerging Infect Dis*, 4: 16-22.
- Bunce, C., Wheeler, L., Reed, G., Musser, J. ve Barg, N. (1992) Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci, *Infect Immun*, 60: 2636-2640.
- Cao, J.G. ve Meighen, E.A. (1989) Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*, *J Biol Chem*, 264: 21670-21676.
- Carpentier, B. ve Cerf, O. (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry, *J Appl Bacteriol*, 75: 499-511.
- Carter G.R., Chengappa M.M., Claus G.W. ve Rikihisa, Y. (1991) Nonspore-forming Anaerobic Bacteria, *Essentials Vet Bacteriol Myco*, 4: 145-149.

- Cheung, A.L., Eberhardt, K.J. ve Chung, E. (1994) Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis, *J Clin Invest*, 94: 1815-1822.
- Culter, J.E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*, *Annu. Rev. Microbiol*, 45: 187.
- Cengiz, A.T. (1999) Staphylococcus, 339-346, Ustaçelebi, Ş. (editör). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, Ankara, 458s.
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D. ve Buret, A. (1999) The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms, *J Clin Microbiol*, 37: 1771-6.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.C., Shaw, P.D. ve Farrand, S.K. (1998) Production of acylhomoserine lactone signals by gram-negative plant-associated bacteria, *Mol Plant-Microbe Interact*, 11: 1119-1129.
- Chari, N., Chairman, A. ve Shunmugiah, K.P. (2010) *Bacillus pumilus* of Palk Bayorig inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria, *Res Microbiol*, 161: 293-304.
- Chen, S.C.A., Muller, M., Zhou, J.Z., Wright, L.C. ve Sorrell, T.C. (1997) Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor?, *J Infect Dis*, 175: 414-420.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L. ve Beachey, E.H. (1982) Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surface, *Infect Immun*, 37: 318-326.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barret, F.F., Melton, D.M. ve Beachey, E.H. (1985) Adherence of Coagulase- Negative *Staphylococci* to Plastic Tissue Culture Plates: A Quantitative Model for the Adherence of *Staphylococci* to Medical Devices, *J Clin Microbiol*, 22: 996-1006.

Chusri, S., Sompetch, K., Mukdee, S., Jansrisewangwong, S., Srichai, T., Maneenoon, K., Limsuwan, S., Voravuthikunchai, S.P. (2012) Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation by Traditional Thai Herbal Recipes Used for Wound Treatment, *Evid-Based Complement Alternative Med*, Volume 2012. Article ID 159797, 8p.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2007) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, *Approved Standard M100-S17*, Wayne, PA.

Correa, N.E., Lauriano, C.M., McGee, R. ve Klose, K.E. (2000) Phosphorylation of the flagellar regulatory protein FlrC is necessary for *Vibrio cholerae* motility and enhanced colonization, *Mol Microbiol*, 35: 743–755.

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

Costerton, J.W., Stewart, P.S. ve Greenberg, E.P. (1999) Bacterial Biofilms: A common Cause of Persistent Infections, *Sci*, 220: 1318-1322.

Costerton, J.W., Geesey, G.G. ve Cheng, K.J. (1978) How bacteria stick, *Sci Am*, 238: 86-95.

Costerton, J.W. (1999) Introduction to biofilm, *J Antimicrob Agents*, 11: 217-221.

Croxatto, A., Chalker, V.J., Lauritz, J., Jass, J., Hardman, A., Williams, P., Camara, M. ve Milton D.L. (2002) VanT, a Homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, Regulates Serine, Metalloprotease, Pigment and Biofilm Production in *Vibrio anguillarum*, *J Bacteriol*, 120(6): 1617-1629.

Çelik, I., Aştı, R.N. ve Ergene, N. (1991) İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz ve sitokimyası ve yüzey immünoglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi, *S.Ü. Tıp Fak. Derg*, 7(4): 497-503.

Çepni, E. ve Gürel, F. (2011) Bitkilerden Elde Edilen Anti Quorum Sensing Bileşikleri ve Yeni İlaç Geliştirmedeki Potansiyelleri, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 41(4):131-138.

Çerikçioğlu, N. (2012) *Mantarlarda virülans faktörleri*, 2. Baskı, *Ankem Derg*, Ankara, 269s.

- Çerikçioğlu, N. (2008) Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi-Etkenlere Göre Enfeksiyonlar, 2411-2426, Willke Topçu, A., Söyletir, G., Doğanay, M. (editörler). Candida türleri, Cilt 2. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 3265s.
- Çotuk, A. (2003) *Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri*, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 210s.
- Davey, M.E. ve O'toole, G.A. (2000) Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics, *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(4): 847-867.
- Davey M.E., Caiazza, N.C. ve O'Toole G.A. (2003) Rhamnolipit surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 185: 1027-1036.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. ve Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm, *Sci*, 280: 295-298.
- Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. ve Verstraete, W. (2004) Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture, *Aquaculture*, 240: 69–88.
- De Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C. ve Iglewski, B.H. (2001) Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns, *Appl Environ Microbiol*, 67: 1865-1873.
- Demir, M., Cevahir, N., Kaleli, İ., Yıldırım, U., Şahin, R. ve Tepeli Çevik, E. (2008) Alt solunum yolu örnekleri ve solunum yolu dışı örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında siderofor, total matriks proteaz ve elastaz aktivitesinin araştırılması, *Mikrobiyol Bül* , 42: 197-208.
- Demirbağ, Z. ve Demir, İ. (2005) *Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı*, 2. Baskı, Karadeniz Teknik Üni, Trabzon, 158s.
- Demirkan, E. (2009) *Bacillus subtilis* α -amilaz enziminin nişasta granülerine etkisinin taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi, *U Ü Ziraat Fak Derg*, 23(1): 13-19.

- Denning, G.M., Railsback, M.A., Rasmussen, G.T., Cox, C.D. ve Britigan, B.E. (1998) *Pseudomonas pyocyanin* alters calcium signalling in human airway epithelial cells, *Am J Physiol*, 274: 893-900.
- Deziel, E., Comeau, Y. ve Villemur, R. (2001) Initiation of biofilm formation by *P. aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities, *J Bacteriol*, 183: 1195–1204.
- Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. ve Villemur, R. (2003) rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *P. aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids, *Microbiol*, 149: 2005–2013.
- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B.C., Hacker, J. ve Steinert, M. (2001) Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells, *Infect Immun*, 69: 2116–2122.
- Diker, K.S., Haşcelik, G. ve Akan, M. (1992) Reversible expression of flagella in *Campylobacter* spp., *FEMS Microbiol Lett*, 99: 261–264.
- Diker, K.S., Haşcelik, G. ve Diker, S. (1992) Colonization of infant mice with flagellar variants of *Campylobacter jejuni*, *Acta Microbiol Hung*, 39: 133–136.
- Dixon, R.J. ve Moriarty, K.M. (1983) Alpha-naphthyl acetate esterase activity is not a specific marker for ovine T lymphocytes, *Vet Immunol Immunopathol*, 4 (4): 505-512.
- Dong, Y., Zhang, X., Soo, H.L., Greenberg, P. ve Zhang, L. (2005) The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *P. aeruginosa*, *Mol Microbiol*, 56: 1287-1301.
- Donlan, R.M. (2001) Biofilms and Device Associated Infections, *Emerg Infect Dis.*, 7: 277-281.
- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerg Infect Dis*, 8: 881-890.

- Donlan, R.M. ve Costerton, J.W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Cli Microbiol Rev*, 15: 167-193.
- Dourou, D., Ammor, M.S., Skandamis, P.N., Nychas ve G.J.E. (2011) Growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the presence of quorum sensing signalling compounds produced by spoilage and pathogenic bacteria, *Food Microbiol*, 28: 1011-1018.
- DSM. (1991) Scientific Services of Culture Collection, The DSM-Experience, Campinas, Sao Paulo, Brasil.
- Eaton, K.A., Morgan, D.R. ve Krakowka, S. (1989) *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets, *Infect and Immun*, 57(4): 1119-1125.
- Eaton, K.A. ve Krakowka, S. (1994) Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*, *Infect Immun*, 62: 3604-3607.
- Eaton, K. A., Suerbaum, S., Josenhans, C., Krakowka, S. (1996) Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes, *Infect Immun*, 64: 2445–2448.
- Elena, V.K., Vsevolod, L.P., Jian, S., Sheri, M.F., Tatiana, E.E., Stacy, L.A., Amy, J.H. ve Ashok, K.C. (2008) Mutation in the S-ribosylhomocysteinase (luxS) gene involved in quorum sensing affects biofilm formation and virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*, *Microbial Path*, 45: 343–354.
- El-Omar, E.M, Oien, K ve El-Nujumi, A. (1997) *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion, *Gastroenterol*, 113: 15-19.
- Ener, B. (2002) *Candida* İnfeksiyonlarının Patogenezi: Etkenin Rolü, *Candida mikrobiyolojisi ve infeksiyonları sempozyumu*, Türk Mikrobiyol. Cem., Bildiriler Kitabı 1. Cilt: 65-70.
- Erdem, B. (1999) *Pseudomonaslar*, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 558s.
- Eren, Ü., Aştı, R.N., Kurtde, N., Sandıkçı, M. ve Sur, E. 1999 İnek uterusunda mast hücrelerinin histolojik ve histokimyasal özellikleri ve mast hücre heterojenitesi. *Turk J Vet Animal Sci*, 23(1): 193-201.

- Farber, B.F., Kaplan, M.H. ve Clogston, A.G. (1990) *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics, *J Infect Dis*, 161: 37-40.
- Federle, M.J. ve Bassler, B.L. (2003) Interspecies communication in bacteria, *J Clin Invest*, 112: 1291-1299.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. ve Prince, A. (1998) Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection, *Infect Immun*, 66: 43–51.
- Feltham, R.K.A. ve Barrow, G.I. (2003) *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom, 542s.
- Flieger, A., Rydzewski, K., Banerji, S., Broich, M. ve Heuner, K. (2004) Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, plaB, exhibiting hemolytic activity, *Infect Immun*, 72: 2648–2658.
- Foyne, S., Dorrell, N., Ward, S.J., Stabler, R.A., McColm, A.A., Rycroft, A.N. ve Wren, B.W. (2000) *Helicobacter pylori* possesses two CheY response regulators and a histidine kinase sensor, CheA, which are essential for chemotaxis and colonization of the gastric mucosa, *Infect Immun*, 68: 2016–2023.
- Fozard, J.A., Lees, M., King, J.R. ve Logan B.S. (2012) Inhibition of quorum sensing in a computational biofilm simulation, *Bio Systems*, 109: 105–114.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. ve Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, *J Bacteriol*, 176: 269-275.
- Fuqua, C., Winans, S.C. ve Greenberg, E.P. (1996a) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators, *Annu Rev Microbiol*, 50: 727-751.
- Fuqua, C. ve Winans, S.C. (1996b) Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes, *J Bacteriol*, 178: 435–440.

- Fuqua, C., Parsek, M. R. ve Greenberg, E.P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing, *Annu Rev Genet*, 35: 439–468.
- Fuqua, C. ve Greenberg E.P. (2002) Listening in on bacteria: acylhomoserine lactone signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 685-695.
- Fux, C.A., Costerton, J.W, Stewart, P.S. ve Stoodley, P. (2005) Survival strategies of infectious biofilms, *Trends Microbiol*, 13:34-40.
- Gaddy, J.A. ve Actis, L. (2009) Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation, *Future Microbiol*, 4(3): 273-278.
- Gambello, M.J., Kaye, S. ve Iglewski B.H. (1993) LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression, *Infect Immun*, 61: 1180-1120.
- Gawande, B.N. ve 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.
- Gerhardt, P., vd. (1981) *Manual of Methods for General Bacteriology*, Gerhardt, P., vd., (editörler). *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 791s.
- Geske, G.D., Mattmann, M.E. ve Blackwell, H.E. (2008) Evaluation of a focused library of N-aryl L-homoserine lactones reveals a new set of potent quorum sensing modulators, *Bioorg Med Chem Lett*, 18: 5978-5981.
- Ghannoum, M.A. (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis, *Clin Microbiol Rev*, 13(1): 122-143.
- Gibbons, R.J. (1989) Bacterial adhesion to oral tissues: A model for infectious diseases, *J Dent Res*, 68(5) : 750-761.
- Givaudan, A. ve Lanois, A. (2000) *flhDC*, the flagellar master operon of *Xenorhabdus nematophilus*: requirement for motility, lipolysis, extracellular hemolysis, and full virulence in insects, *J Bacteriol*, 182: 107–115.

- Graham, D.Y. (1994) Benefits from elimination of *Helicobacter pylori* infection include major reduction in the incidence of peptic ulcer disease, gastric cancer, and primary gastric lymphoma, *Prev Med*, 23: 712-6.
- Graham, D.Y. (1997) *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: A model. *Gastroenterol*, 113: 1983-1986.
- Greenberg, E.P. (1997) Quorum sensing in gram-negative bacteria, *ASM News*, 63: 371-377.
- Griffith, O.W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis, *Free Radic Biol Med*, 27: 922-935.
- Gustavo, O.Z., Eliezer, M.P., Ricardo, P.S., Lu'cia, M.T., Jose', F., Siqueira, Jr. ve Ka'tia, R.N. (2011) Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals, *Res Microbiol*, 162: 151-158.
- Gülay, Z. (2010) Solunum Sistemi İnfeksiyonları, *İnfeksiyon Patogenezi*, Ankara, 11-47.
- Gürgün, V. ve Halkman, A.K. (1990) *Mikrobiyolojide sayım yöntemleri*, 146s.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T. ve Fogarty, W.M. (1999) Purification and properties of the raw starch degradin amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Biotechnol Lett*, 21: 111-115.
- Hammer, B.K. ve Bassler, B.L. (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*, *Mol Microbiol*, 50: 101-104.
- Hassett, D.J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, S.V., Rowe, J.J., Yoon, S.S., Hilliard, G.M., Parvatiyar, K., Kamani, M.C., Wozniak, D.J., Hwang, S.H., McDermott, T.R. ve Ochsner, U.A. (2002) Anaerobic metabolism and quorum sensing by *P. aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets, *Adv Drug Deliv Rev*, 54: 1425-1443.

- Hatha, M., Vivekanandhan, A.A., Julie, J. ve Christol, G. (2005) Antibiotic resistance pattern of motile *aeromonas* from farm raised fresh water fish, *Inter J Food Microbiol*, 98(2): 131-134.
- Hebert, G.A., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Lambert, M.A., Blaser, M.J. ve Moss, C.W. (1982) 30 years of *campylobacters*: biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*, *J Clin Microbiol*, 15: 1065-1073.
- Hentzer, M., Givskov, M. ve Parsek, M.R. (2002) Targeting quorum sensing for treatment of chronic bacterial biofilm infections, *Lab Med*, 33: 295–306.
- Hiromi, K., Shouko, S., Nobuhiko, N., Hajime, T. Ve Hiroo, U. (2008) Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress, *J. Biosci Bioeng*, 106(4): 381–386.
- Hoeprich, P.D. ve Ricaldi, M.G. (1994) Candidosis, 365-377, Hoeprich, P.D., Jordan, M., Ronald, A.R. (editörler). *Infectious Diseases*, 5. Baskı, Philadelphia, 498s.
- Hossain, M.M., Tani, C., Suzuki, T., Taguchi, F., Ezawa, T. ve Ichinose, Y. (2008) Polyphosphate kinase is essential for swarming motility, tolerance to environmental stresses, and virulence in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 6605. *Physiol Mol Plant Pathol*, 72: 122–127.
- Howe, T.R. ve Iglewski, B.H. (1920) Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model, *Infect Immun*, 43: 1058-1063.
- Hoyle, B.D. ve Costerton, J.W. (1991) Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms, *Prog Drug Res*, 37: 91-105.
- Hsing, J.W., Andrew, H., Wang, J. ve Jennings, M.P. (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria, *Curr Opin in Chem Biol*, 12: 93–101.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> Erişim Tarihi: 01.11.2013.
- Hube, B., Naglik, J. (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family, *Microbiol*, 147: 1997-2005.

- Huber, B., Riedel, K. ve Hentzer, M. (2001) The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility, *Microbiol*, 147: 2517-2528.
- Huffnagle, G.B., Herring, A.C. ve Traynor T.R. (2000) Role of fungal virulence factors in evasion of host defences, *Ann Rev Sci*, 2: 77-90.
- Ibrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.C., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E., Nozawa, Y. ve Ghannoum, M.A. (1995) Evid Implicating Phospholipase as a Virulence Factor of *Candida albicans*, *Infect Immun*, 63(5): 1993-1998.
- Issac, A., Sybiya, V.P., Palani, A., Khadar, S.M., Shunmugiah, K.P. ve Arumugam, V.R. (2012) Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens, *Food Res Internat*, 45: 85–92.
- Jangid, K., Kong, R., Patole, M.S. ve Shouche, Y.S. (2007) *luxRI* homologs are universally present in the genus *Aeromonas*, *BMC Microbiol*, 7(93): 1-11.
- Johansson, D. ve Rasmussen, M. (2013) Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora, *Microbial Pathogenesis*, 55: 28-31.
- Jones, H.C., Roth, I.L. ve Saunders, W.M. (1969) III. Electron microscopic study of a slime layer, *J Bacteriol*, 99: 316-25.
- Jones, S.J.W., Scott, R.J.D., Morgan, J. ve Jether, J.V.S. (1992) A study of coagulase negative *staphylococci* with reference to “slime” adherence, antibiotic resistance patterns and clinical significance, *J Hosp Infect*, 22: 217-27.
- Josenhans, C., Ferrero, R.L., Labigne, A. ve Suerbaum, S. (1999) Cloning and allelic exchange mutagenesis of two flagellin genes from *Helicobacter felis*, *Mol Microbiol*, 33: 350–362.
- Juhas, M., Eberl, L. ve Tumbler, B. (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*, *Env Microbiol*, 7: 459-471.

- Jurecska, L., Barkács, K., Kiss, É., Gyulai, G., Felföldi, T., Törő, B., Kovács, R. ve Záray, G. (2013) Intensification of wastewater treatment with polymer fiber-based biofilm carriers, *Microchem Jour*, 107: 108–114.
- Kajikawa, O., Koyama, H., Yashikawa, T., Tsubaki, S. ve Saito, H. (1983) Use of alpha-naphthyl acetale esterase staining to identify T lymphocytes in cattle, *Am J Vet Res*, 44(8): 1549-1552.
- Karatuna, O. ve 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.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M. ve Kozik, A. (2009) Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*, *Acta Biochi-mica Polonica*, 56(2): 211-224.
- Karlyshev, A.V., Fish, L., Durant, E.L, Winson, M.K. ve Chhabra, S.R. (1997) Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules, *J Bacteriol*, 179: 5271–5281.
- Kenmegne, M.M., Natrah, F.M.I., Wiyoto, W., Sorgeloos, P., Bossier, P. ve Defoirdt, T. (2011) Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing, *Aquaculture*, 317: 53–57.
- Khan, M.J.A., Ahmad, I., Aqil, F., Owais, M., Shahid, M. ve Musarrat, J. (2000) Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*, 21-45. Ahmad, I., Shahid, M., Ovais, M., Akil, F. (editörler). *Combating Fungal Infections Problems and Remedy*, 2. Baskı, New York, 524s.
- Kierek-Pearson, K. ve Karatan, E. (2005) Biofilm development in bacteria, *Adv Appl Microbiol*, 57: 79-111.
- Kipnis, E., Guery, B.P. ve Tournoy, A. (2004) Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*–induced acute lung injury, *Shock*, 21(5): 444–451.

- Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P. ve Vos, V.M. (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in gram-positive bacteria, *Mol Microbiol*, 24: 895-904.
- Knowles, D.M. ve Holck, S. (1978) Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase, *Lab Invest*, 35: 112-123.
- Knowles, D.M. ve Halper, J.P. (1980) Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid α -naphthyl acetate esterase (ANAE) activity, *J. Immunol*, 125(6): 2823-2825.
- Kohler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C. ve Peche`Re J.C., (2000) Swarming of *P. aeruginosa* Is Dependent On Cell-To-Cell Signaling and Requires Flagella And Pili, *Jour of Bacteriol*, 182: 5990–5996.
- Kotilainen, P.(1990) Association of coagulase negative staphylococcal slime production and adherence with the development and outcome of adult septicemias, *J Clin Microbiol*, 28: 2779-2785.
- Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M. ve Kjelleberg, S. (2004) Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*, 186: 692-698.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. ve Gorvel, J.P. (2005) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor, *Curr Opin Microbiol*, 8: 60–66.
- La Ragione, R.M., Cooley, W.A., Woodward, M.J. (2000a) The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants, *J Med Microbiol*, 49: 327–338.
- La Ragione, R.M., Sayers, A.R., Woodward, M.J. (2000b) The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old- chick model, *Epidemiol Infect*, 124: 351–363.

- Latifi, A., Winson, M.K., Foglino, M., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Lazdunski, A. ve Williams, P. (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol*, 17: 333-343.
- Lawrence, N., Diebel, MD, David, M., Liberati, M.S., Alfred, E., Baylor, M.D., William, J., Brown, P.D ve John D. (2004) Immunoglobulin A protease is a virulence factor for gram-negative pneumonia, *Pharm*, 136: 937-943.
- Lázaro, M., Florica, C., Laurent, M., Cornelia, R., Brion, D. ve Geneviève, D. (2003) Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism, *FEMS Microbiol Eco*, 45: 71-81.
- Lazazzera, B.A. ve Grossman, A.D. (1998) The ins and outs of peptide signaling, *Trends Microbiol*, 6: 288-294.
- Lee, B., Haagensen, J.A., Ciofu, O., Andersen, J.B., Hoiby, N. ve Molin, S. (2005) Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *P. aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis, *J Clin Microbiol*, 43: 5247-5255.
- Leid, J.G., Shirtliff, M.E., Costerton, J.W. ve Stoodley, A.P. (2002) Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms, *Infect Immun*, 70: 6339-6345.
- Lequette Y. ve Greenberg E.P. (2005) Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *J Bacteriol*, 187: 37-44.
- Levinsone, W. (2008) *Review of Medical Microbiology and Immunology*, 10. Baskı, Hill, M.G. (editör). Appleton & Lange, Boston, 40s.
- Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P. ve Sokol, P.A. (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI, *J Bacteriol*, 181: 748-756.
- Lindsay, D. ve Von Holy, A. (2006) Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know?, *J Hosp Infect*, 64: 313-25.

- Lindum, P.W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S. ve Givskov, M. (1998) N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*, 180: 6320–6388.
- Liu, P.C., Lee, K.K. ve Chen, S.N. (1996) Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn *Penaeus monodon*, *Lett Appl Microbiol*, 22: 413–416.
- Llamas, I., Keshavan, N. ve Gonzalez, J.E. (2004) Use of *Sinorhizobium meliloti* as an indicator for specific detection of long-chain N-acyl homoserine lactones, *Appl Environ Microbiol*, 70: 3715–3723.
- Luo, Z.Q., Su, S. ve Farrand, S.K. (2003) In situ activation of the quorum sensing transcription factor TraR by cognate and noncognate acylhomoserine lactone ligands: kinetics and consequences, *J Bacteriol*, 185: 5665–5672.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E. ve Williams, P. (2002) The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*, *Environ Microbiol*, 4: 18-28.
- Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S. ve O'Toole, G.A. (2003) A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance, *Nat*, 426: 306-310.
- Maier, R.M., Soberon-Chavez, G., (2000) *P. aeruginosa* rhamnolipids: Biosynthesis and potential applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 54: 625-633.
- Marie, T.H., Camille, M., Naïma, E.M., Francis, V., Hamidou, T. ve Michel, J.D. (2009) Effect of antibiotic co-administration on young and mature biofilms of cystic fibrosis clinical isolates: the importance of the biofilm model, *Int J Antimicrobial Agents*, 33: 40–45.
- Matar, G.M., Chaar, M.H., Araj, G.F., Srour, Z., Jamaledine, G. ve Hadi, U. (2005) Detection of a highly prevalent and potentially virulent strain of *Pseudomonas aeruginosa* from nosocomial infections in a medical center, *BMC Microbiol*, 5: 29.

- McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Cámara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B. ve Williams, P. (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones, *Microbiol*, 143: 3703–3711.
- McLean, R.J., Whiteley, M., Stickler, D.J. ve Fuqua, W.C. (1997) Evid of autoinducer activity in naturally occurring biofilms, *FEMS Microbiol Lett*, 154: 259-263.
- Merck, mikrobiyolojik besiyerleri kataloğu, 2012.
- Merritt, J.H., Kadouri, D.E. ve O'Toole, G.A. (2005) Growing and analyzing static biofilms. Curr protocols in microbiology (PP.1B.1.1-1B.1.17): John Wiley ve Sons, Inc. Copyright C 2005 by, Malcova, M., Hradecka, H., Karpiskova, R. ve Rychlik, I. (2008), Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*: Identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation, *Vet Microbiol*, 129: 360–366.
- Meyer, B. (2003) Approaches to Prevention, Removal and Killing of Biofilms, *Int Biodeter Biodegr*, 51: 249-253.
- Michael, J.J. ve Abbott, S.L. (2002) Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough?, *J Clin Microbiol.*, 40: 1887-1891.
- Miller, M.B. ve Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria, *Annu Rev Microbiol*, 55: 165-199.
- Milton, D.L., O'Toole, R., Horstedt, P. ve Wolf W.H. (1996) Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*, *J Bacteriol*, 178: 1310–1319.
- Miyoshi N. ve Shinoda S. (1997) Bacterial metalloprotease as the toxic factor in infection, *J Toxicol Toxin Rev*, 16: 177–94.
- Mobley, H.L.T, Belas, R., Lockett, V., Chippendale, G., Trifillis, A.L., Johnson, D.E. ve Warren, J.W. (1996) Construction of a flagellum-negative mutant of *Proteus mirabilis*: effect on internalization by human renal epithelial cells and virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection, *Infect Immun*, 64: 5332–5340.

- Mobley, H.L.T. (1997) Structure and function of *H. pylori* urease, Ernst, P.B., Michetti, P., Smith, P.D. (editörler). *Immunobiology of H. pylori*, Lipincott-Raven, Philadelphia, 234s.
- Montie, T.C., Doyle-Huntzinger, D., Craven, R.C., Holder, I.A. (1982) Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model, *Infect Immun*, 38: 1296–1298.
- Monzon, M., Oteiza, C., Leiva, J. ve Amorena, B. (2001) Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*, *J Antimicrob Chemother*, 48: 793.
- Morohoshi, T., Shiono, T., Takidouchi, K., Kato, M., Kato, N., Kato, J. ve Ikeda, T. (2007) Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-acylhomoserine lactone, *Appl Environ Microbiol*, 73: 6339-6344.
- Morton, L.H.G., Greenway, D.L.A., Gaylarde, C.C. ve Surman, S.B.(1998) Consideration of Some Implications of The Resistance of Biofilms to Biocides, *Inter Bio Bio*, 41: 247-259.
- Mueller, J., Brundel, R.G., Buerki H., Keller. H.U., Hess, M.W. ve Cottier, H. (1975) Nonspecific acid esterase activity; a criterion for T and B lymphocytes in Mouse lymph nodes, *Eur J Immunol*, 5: 270-274.
- Nachamkin, I., Yang, X.H. ve Stern, N.J. (1993) Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-dayoldchicks: analysis with flagellar mutants, *Appl EnvironMicrobiol*, 59: 1269–1273.
- Nagant, C., Tré-Hardy, M., Devleeschouwer, M. ve Dehaye,J.P. (2010) Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach, *J Microbiol Met*, 82: 243–248.
- Natrah, F.M.I., Ruwandeepika, H.A.D., Pawar, S., Karunasagar, I., Sorgeloos, P., Bossier, P. ve Defoirdt, T. (2011) Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*, *Vet Microbiol*, 154: 124–129.

- Nayak, N. ve Satpathy, G. (2000) Slime production as a virulence factor in *Staphylococcus epidermidis* isolated from bacterial keratitis, *Indian J Med Res*, 111: 6-9.
- Nick, H. (1995) The immun response to bacterial biofilms, 233-250. Lappin-Scott, H.M., Costerton J.W. (editörler). *Microbial biofilms*, Cambridge University Press, Cambridge, 342s.
- Nichols, W.W., Dorrington, S.M., Slack, M.P.E. ve Walmsley, H.L. (1988) Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate, *Antimicrob Agents Chem*, 32: 518–523.
- Nithya, C., Chairman, A. ve Shunmugiah, K.P., *Bacillus pumilus* of Palk Bayorig in inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria, *Res Microbiol*, 161: 293-304.
- Nourizadeh E ve Sultan N.(1993)Koagülaz-negatif stafilokoklarda slaym (slime) faktör yapımının çeşitli yöntemlerle gösterilmesi, *İnfek Derg*, 7: 31.
- Novick, R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of *staphylococcal* virulence, *Mol Microbiol*, 48: 1429-1449.
- Nurcan, N. (2010) Bazı Gr(-) bakteriyel balık patojenlerinde çevreyi algılama sisteminin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 76s.
- Ochsner, U.A. ve Reiser, J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipit biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Nati Acad Sci*, 92: 6424-6428.
- Okajima, Y., Kobayakawa, S., Tsuji, A., Tochikubo, T. (2006) Biofilm Formation *Staphylococcus epidermidis* on Intraocular Lens Material, *Inves Ophthal Vis Sci*, 47(7): 2971-2975.
- Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R. ve Milton, D. L. (2000) Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*, *J Bacteriol*, 182: 2326–2328.

- Orskov, I. ve Orskov, F. (1985) *Escherichia coli* in extra-intestinal infections, *J Hyg Camb* 95: 551–575.
- Otlu, S. ve Aydın, F. (2002) Evcil Hayvanlarda *Fusobacterium necrophorum* infeksiyonları, *Kafkas Üni Vet Fak Derg*, 8 (2): 171-175.
- O'Toole, R., Milton, D. L. ve Wolf W.H. (1996) Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*, *Mol Microbiol*, 19: 625–637.
- O'Toole, G.A. ve Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis, *Mol Microbiol*, 28: 449-461.
- Öztuna, V. (2005) Osteomiyelit Patofizyolojisi ve Tedavi Prensipleri, *TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi*, Cilt: 4. Sayı: 1-2. 68s.
- Parsek, M.R. ve Greenberg, E.P. (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 8789-8793.
- Parsek, M.R. ve Greenberg, E.P. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms, *Trends Microbiol*, 13: 27-33.
- Pearson, J.P., Pesci, E.C. ve Iglewski, B.H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes, *J Bacteriol*, 179: 5756-5767.
- Perie', L., Aru, J., Kourilsky, P. ve Slotine, J.J. (2013) Does a quorum sensing mechanism direct the behavior of immune cells?, *C R Biol*, 336: 13–16.
- Pier G.B. ve Ramphal R. (2005) *Pseudomonas aeruginosa*, 2587-2614. Mandell G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (editörler). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6. Baskı, Philadelphia, Churchill Livingstone, 3548s.
- Price, M.F., Wilkinson, I.D. ve Gentry, L.O. (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*, *Sabouraudia*, 20: 7-14.

- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. ve Lejeune, P. (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 181:5 993-6002.
- Pruthi, A.K., Gupta, R.K.P. ve Sadana, J.R. (1987) Acid alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes and monocytes of chickens, *J Vet Med A*, 34: 390-392.
- Polaina, J. ve MacCabe, A.P. (2007) Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications, *Biol*, 23: 215-219.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K. ve Cartey, G.E. (1994) Clinical Veterinary Microbiology, 118-126, *Section 2. Bacteriology*, 8. Staphylococcus species. Mosby-Year Book Europe Limited, Lynton House, London, England, 365s.
- Raad, I.(1998)Intravascular Catheter-related Infections, *The Lancet*, 351: 893-898.
- Rajamani, S., Sayre, R.T. (2011) A sensitive fluorescence reporter for monitoring quorum sensing regulated protease production in *Vibrio harveyi*, *J Microbiol*, 20: 189–193.
- Rashid, M.H. ve Kornberg A. (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming and twitching motilities of *P. aeruginosa*, *Pro Nat Academ Sci USA*, 97: 4885–4890.
- Ravn, L., Christensen, A.B., Molin, S., Givskov, M. ve Gram, L. (2001) Methods for acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics, *J Microbiol Met*, 44: 239-251.
- Reingold, J., Starr, N., Maurer, J. ve Lee, M.D. (1999) Identification of a new *Escherichia coli*, haemolysin homolog in avian *E. coli*, *Vet Microbiol*, 66: 125–134.
- Reinhard, B. ve Astrid, S. (1998) Quorum sensing autoinducers: Do they play a role in natural microbial habitats?, *Microbiol Res*, 153: 61-63.

- Rezusta, A., Alejandre, M.C., Gill, J., Rubio, M.C. ve Salvo, M.S. (1989) Phospholipase activity in *Candida albicans*, *Candida* spp and other yeasts, *Candida and Candidamycosis Symposium*, 24-28 April, Antalya, Turkey, 149- 153.
- Ridgway, I.D., Small, H.J., Atkinson, R.J.A., Birkbeck, H.T., Taylor, A.C. ve Neil, D.M. (2008) Extracellular proteases and possible disease related virulence mechanisms of two marine bacteria implicated in an opportunistic bacterial infection of *Nephrops norvegicus*, *J Invertebrate Pathol*, 99: 14–19.
- Ruwandeeepika, H.A.D., Defoirdt, T., Bhowmick, P.P., Karunasagar, I., Karanusagar, I., Bossier, P. (2011) In vitro and in vivo of virulence genes in vibrio isolates belonging to the *harveyiclade* in relation to their virulence towards gnotobiotic brine shrimp (*Artemia franciscana*), *Environ Microbiol*, 13: 506–517.
- Sakarya, S., Öncü, S., Öztürk, B., Tuncer, G. ve Sarı, C. (2004) Neuraminidase produces dosedependent decrease of slime production and adherence of slime-forming, coagulase-negative staphylococci, *Arch Med Res*, 35: 275-278.
- Salyers, A.A. ve Whitt, D.D. (1994) *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*, 260-268, ASM Basımevi, 1. Baskı, Washington D.C, USA, 354s.
- Sambrook, J. (2006) *Molecular cloning a laboratory manual*, 3. Baskı, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Boston, 143s.
- Saraçlı, M.A. (2006) "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?, *Gülhane Tıp Derg*, 48(4): 244-250.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C. ve Hube, B. (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*, *Mycoses*, 48: 365-377.
- Schunder, E., Adam, P., Higa, F., Remer, K.A., Lorenz, U., Bender, J., Schulz, T., Antje, F., Steinert, M. ve Heuner, K. (2010) Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*, *Internat J Med Microbiol*, 300: 313–323.

- Schwarzkopf, A., Karch, H., Schmidt, H., Lenz, W. ve Heesemann, J. (1993) Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacilli-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol*, 31: 2281-2285.
- Schwenteit, J., Gram, L., Nielsen, K.F., Fridjonsson, O.H., Bornscheuer, U.T., Givskov, M. ve Gudmundsdottir, B.K. (2011) Quorum sensing in *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* and the effect of the autoinducer synthase AsaI on bacterial virulence, *Vet Microbiol*, 147: 389–397.
- Shao, Y. ve Bassler, B.L. (2012) Quorum-sensing non-coding small RNAs use unique pairing regions to differentially control mRNA targets, *Mol Microbiol*, 83(3): 599–611.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.J. ve Rinehart, K.L. (1997) Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin layer chromatography, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 6036–6041.
- Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H. ve Usui, T. (1997) Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method, *Chem*, 43: 340-345.
- Slifkin, M. ve Cumble, R. (1996) Evaluation of the tween opacity test for the identification of dermatophytes, *Med Microbiol Lett*, 5: 401-407.
- Siddiqui, M.F., Sakinah, M., Singh, L. ve Zularisam A.W. (2012) Targeting N-acyl-homoserine-lactones to mitigate membrane biofouling based on quorum sensing using a biofouling reducer, *J Biotechnol*, 161: 190–197.
- Siegmund, I. ve Wagner, F. (1991) New methods for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth in mineral agar, *Bio Techniques*, 5: 265-268.
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M. ve Gamazo, C. (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: Critical role of cellulose, *Mol Microbiol*, 43: 793–808.
- Soydan, S. (2005) *Değişik klinik örneklerden soyutlanan Candida türlerinde virülans faktörlerinden proteinaz, fosfolipaz ve esteraz aktivitelerinin araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 56s.

- Sönmez, E. (1998) Damar İçi Kateter Sepsisi, *Hastane İnf Derg*, 2: 193-199.
- Spoering, A.L. ve Gilmore, M.S. (2006) Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms, *Curr Opin Microbiol*, 9: 133-137.
- Stanley, N.R. ve Lazazzera, B.A. (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biyofilm formation, *Mol Microbiol*, 52: 917-924.
- Stehr, F., Felk, A., Kretschmar, M., Schaller, M., Schafer, W. ve Hube, B. (2000) Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections, *Myco*, 43: 17- 21.
- Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Ihring, A., Schmid, M. ve Gantner, S. (2001) Visualization of N-acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria) colonizing the tomato rhizosphere, *Appl Environ Microbiol*, 67: 5761-5770.
- Stewart, P.S. (1998) A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms, *Biotechnol Bioeng*, 59: 261-272.
- Stewart, P.S. ve Costerton, J.W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet*, 358: 135-138.
- Stickler, D.J., Morris, N.S., McLean, R.J. ve Fuqua, C. (1998) Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro, *Appl Environ Microbiol*, 64: 3486-3490.
- Swift, M.J., Seward, P.D., Frost, P.G.H., Qureshi, J.N. ve Muchena, F.N. (1994) Long-term experiments in Africa: Developing a database for sustainable land use under global change, 229-251. Leigh, R.A. ve Johnson, A.E. (editörler). *Long-term Experiments n Agricultural and Ecological Sciences*, 2. Baskı, Pergamon, New York, 564s.
- Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomas, J.M., Stewart, G.S.A.B. ve Williams, P. (1999) Quorum Sensing-Dependent Regulation and Blockade of Exoprotease Production in *Aeromonas hydrophila*, *Infect Immun*, 67(10): 5192-5199.

- Tack, K.J. ve Sabath, L.D. (1985) Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamicin, and amikacin, compared to latamoxef, piperacillin, kloramfenikol, and clindamycin, *Chemotherapy*, 31: 204-210.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R. (1989) *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, 3. Baskı, Ege Üniv. Fen Fak. Tekirler Serisi No:55. İzmir, 260s.
- Tao, W., Zhanqin, Z., Lin, Z., Hongwei, M., Ka, L., Wen, R., Zhengya, L., Haitao, C., Weicheng, B., Yinsheng, Q. ve Huanchun, C. (2011) Trigger factor of *Streptococcus suis* is involved in stress tolerance and virulence, *Microb Path*, 51: 69-76.
- Temiz, A. (1994) *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, Hacettepe Üniv., Ankara, 266s.
- Topçu, A.W., Söyletir, G. ve Doğanay, M. (2008) *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 215s.
- Tsuboi, R., Komatsuzaki, H. ve Ogawa, H. (1996) Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties, *Infect Immun*, 64: 2936-2940.
- Turki, Y., Ouzari, H., Mehri, I., Aissa, R.B. ve Hassen, A. (2012) Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia, *Food Res Inter*, 45: 940–946.
- Ulusoy, S. (2007) *Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton üretiminin araştırılması*. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 100s.
- Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J. ve Stewart, P.S. (2003) Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin, *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 317-323.
- Walter, M.B. ve Gregory, J.D. (2013) The *Vibrio harveyi* bioassay used routinely to detect AI-2 quorum sensing inhibition is confounded by inconsistent normalization across marine matrices, *J Microbiol Met*, 92: 250–252.

- Wassenaar, T.M., Bleumink-Pluym, N.M. ve van der Zeijst, B.A. (1991) Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion, *EMBO J*, 10: 2055–2061.
- Watnick, P. ve Kolter, R. (2000) Biofilm City of Microbes, *J Bacteriol*, 182: 2675–2679.
- Whiteley, M., Lee, K.M. ve Greenberg, E.P. (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 13904–13909.
- Williams, I., Venables, W.A., Lloyd, D., Paul, F. ve Critchley, I. (1997) The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*, *Microbiol*, 143(7): 2407–2413.
- Williams P. (2008) Quorum sensing, *J Med Microbiol*, 296: 57–59.
- Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jorgensen, F. ve Chhabra, S.R. (1998) Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing, *FEMS Microbiol Lett*, 163: 185–192.
- Wood, D.W., Gong, F., Daykin, M.M., Williams, P. ve Pierson, L.S. (1997) N-acyl-homoserine-lactone mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30–20 in wheat rhizosphere, *J Bacteriol*, 179: 7663–7670.
- Woznicová, V., Votava, M. ve Skalka, B. (1993) A comparison of two methods for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci, *Čs Epidem Praha*, 42: 51–3.
- Varnika, R., Bryn, L.A. ve William, E.B. (2011) Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing, *Enzyme Microb Technol*, 49: 113–123.
- Van Asten, F.J., Hendriks, H.G., Koninkx, J.F., van der Zeijst, B. A. ve Gaastra, W. (2000) Inactivation of the flagellin gene of *Salmonella enterica* serotype enteritidis strongly reduces invasion into differentiated Caco–2 cells, *FEMS Microbiol Lett*, 185: 175–179.

- Van Delden, C. ve Iglewski, B.H. (1998) Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections, *Emerg Infect Dis*, 4(4): 551-560.
- Vrany, J.D., Stewart, P.S. ve Suci, P.A. (1997) Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms displaying rapid-transport characteristics, *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 1352-1358.
- Venturi, V. (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*, *FEMS Microbiol Rev*, 30: 274–291.
- Veronica, L. (2011) Quorum sensing in biofilms: How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?, *Anaerobe*, 17: 280-285.
- Vipin, C.K. (2013) Quorum sensing inhibitors: An overview, *Biotechnol Adv*, 31: 224–245.
- Vuong, C., Gotz, F. ve Otto, M. (2003) Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*, *Infect Immun*, 68:1048-53.
- Yamamoto, K., Zhang, Z.Z. ve Kobayashi, S. (2000) Cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase degrades intact granules of potato raw starch, *J Agric Food Chem*, 48: 962-966.
- Yao, R., Burr, D.H. ve Guerry, P. (1997) CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence, *Mol Microbiol*, 23: 1021–1031.
- Ye, J., Ma, Y., Liu, Q., Zhao, D.L., Wang, Q.Y. ve Zhang, Y.X. (2008) Regulation of *Vibriobalginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system, *J Fish Diseases*, 31: 161-169.
- Young, G.M., Badger, J.L. ve Miller, V.L. (2000) Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*, *Infect Immun*, 68: 4323–4326.
- Yörük, M., Aştı, R.N., Kurtdede, N., Ağaoğlu, Z. ve Altunay, H. (1998) Light and electron microscopic studies on alpha-naphthyl acetate esterase activity of the peripheral blood T-lymphocytes in Van cat, *Anat Histol Embryol*, 27(5): 289-292.

- Yula, E. ve Köksal, F. (2009) *Bölgemizden izole edilen Helicobacter pylori suşlarının moleküler epidemiyolojik özelliklerinin tespiti*. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 24s.
- Yücel, A. ve Kantarcıoğlu, A.S. (2000) Pathogenicity determinants of Candida, *J Med*, 31(3): 172-86.
- Yücesoy Dede, B. (2006) *Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olan Pseudomonas aeruginosa suşlarının Beta-Laktamaz Yapımı Ve Çeşitli Antimikrobiyalere Duyarlılıkları*. Uzmanlık Tezi, İstanbul, 10s.
- Yücesoy, M. ve Yuluğ, N. (1999) Candida türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması, *İnfek Derg*, 13(4): 569-574.
- Zabinski, R.A., Walker, K.J., Larsson, A.J., Moody, J.A., Kaatz, G.W. ve Rotschafer, J.C. (1995) Effect of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones, *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 507-512.
- Zhang, X.H. ve Austin, B. (2000) Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids, *J Fish Dis*, 23: 93–102.
- Zhang, A., Mu, X., Chen, B., Han, L., Chen, H. ve Jin, M. (2011) IgA1 protease contributes to the virulence of *Streptococcus suis*, *Vet Microbiol*, 148: 436–439.
- Zhu, J. ve Mekalanos, J.J. (2003) Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*, *Dev Cell*, 5: 647-656.
- Zicca, A. Zeprini, A., Cadoni, A., Faranzi, A.T., Ferrarini, M. ve Grossi, C.E. (1981) Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acetate esterase in human Tm lymphocytes, *J Pathol*, 105(1): 40-46.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Zühal ZORLU
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : MİLAS - 18/09/1986
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 0 553 496 20 80
E-posta : zorluzuh@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Milas Lisesi (YDA)	2004
Lisans	Dicle Ünivesitesi	2006-2009
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2011
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	Devam ediyor.

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2013	Ağaçlıhöyük Ertuğrul Menteşe OrtaOkulu	İngilizce Öğretmeni
2013	Esan Eczacıbaşı	C Sınıfı İş Sağlığı ve Güvenliği Uzmanı

Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce, vs)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma			X
Konuşma		X	
Anlama			X
Okuma			X

Bilimsel Faaliyetler

1. 21. Uluslararası Biyoloji Kongresi, İzmir, Bornova, 3-8 Eylül 2012. Yerel Komite Üyesi
2. 1. Uluslararası Biyoloji Kongresi, Kırgızistan, Bışkek, 24-26 Eylül 2012. Yerel Komite Üyesi

Bilimsel Yayınlar

1. N. Ceyhan, D. Keskin, Z. Zorlu, A. Ugur. “In-Vitro Antimicrobial Activities of Different Extracts of Grapevine Leaves (*Vitis vinifera* L.) from West Anatolia Against Some Pathogenic Microorganisms”. *Journal of Pure&Applied Microbiology*, 6(3), 1303-1308 (2012) (Science Citation Index Expanded-ISSN NO: 0973-7510).
2. N. Ceyhan, D. Keskin, Z. Zorlu. “Chemical Constituents and Antimicrobial Activity of the Leaves of Eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.), An Endemic Plant from West Anatolia”. *Journal of Pure&Applied Microbiology*, 6(3), 1447-1453(2012) (Science Citation Index Expanded-ISSN NO: 0973-7510).
3. D. Keskin, N. Ceyhan, Z. Zorlu, A. Ugur. “Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of Different Extracts of Fig Leaves (*Ficus carica* L.) from West Anatolia Against Some Pathogenic Microorganisms”. *Journal of Pure&Applied Microbiology*, 6(3), 1105-1110 (2012) (Science Citation Index Expanded-ISSN NO: 0973-7510).