



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**BALIKLARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA İZOLATLARININ QUORUM SENSİNG
YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Veli ÖZ

**Samsun
Haziran-2019**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**BALIKLARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA İZOLATLARININ QUORUM SENSİNG
YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Veli ÖZ

**Danışman
Prof. Dr. Belgin SIRIKEN**

**Samsun
Haziran-2019**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Veteriner Hekim Veli ÖZ tarafından Prof. Dr. Belgin SIRIKEN Danışmanlığında hazırlanan “Balıklardan İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Quorum Sensing Yönünden Değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 28 /06 / 2019 tarihinde yapılan sınav ile Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Belgin SIRIKEN Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Naim Deniz AYZ Kırıkkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Metin ÇENESİZ Ondokuz Mayıs Üniversitesi

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /2019

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu Yüksek Lisans eğitiminin ders aşamasında benimle değerli bilgilerini paylaşan Sayın Anabilimdalı hocalarıma teker teker teşekkür etmek isterim, ayrıca tez aşamasında katkılarından dolayı Yrd. Doç.Dr. Ceren BAŞKAN'a da teşekkürü bir borç bilirim. Özellikle tüm eğitim sürecinde kendisinden çok şey öğrendiğim bilakis tez aşamasında bana bir danışman hocadan ziyade bir abla gibi davranan sayın Prof. Dr. Belgin SIRIKEN'e ayrıca yürekler dolusu teşekkürlerimi sunarım.

Bu süre zarfında Beni fedakârca destekleyip yüreklendiren sevgili eşim Hümeýra ve kızım Maide'ye de sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) tarafından PYO.VET.1904.18.001 numarası ile desteklenmiştir.

Rahmetli Babam Suat ÖZ'e itafen

ÖZET

BALIKLARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARININ QUORUM SENSİNG YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Bu çalışma; Samsun ilinde satışı sunulan 70 balık örneğinden *Pseudomonas aeruginosa* izolasyonu, etkenin Quorum Sensing (QS) Sistemi ve homoserin lakton (HSL) özellikleri ile QS ile ilişkili bazı virulans faktörlerin, hareketlilik ile biyofilm oluşturma özellikleri ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metot: Şubat-Eylül 2018 tarihleri arasında, etken klasik kültür tekniği ile izole ve identifiye edildi. Elde edilen izolatlar PZR tekniği (*oprL* ve/veya PA-SS 16S rDNA) uygulandı ve etken moleküler düzeyde doğrulandı. İzolatarda QS varlığı için; intakt (4 gen) ve internal (4 gen) genleri PZR yöntemiyle araştırıldı. İzolatların titreme (twitching), kayma (swarming) ve yüzme (swimming) hareket tipleri belirlendi. Tüpte, Congo Red Agar (CRA)'da ve mikrotitrasyon plak yöntemiyle biyofilm oluşturma özellikleri saptandı. Elastaz, proteaz, piyosiyanın ve HSL varlıkları fenotipik yöntemle, antibiyotik dirençlilikleri ise disk difüzyon yöntemiyle belirlendi.

Bulgular: Sonuçta elde edilen 100 *Pseudomonas* izolatınının 30'u *P. aeruginosa* olarak moleküler düzeyde belirlendi. Hiçbir izolatta intakt *lasI* ve *lasR* saptanamazken, *rhII* geni 7 ve *rhIR* geni ise 11 izolatta saptandı. İnternal genlerden *lasII* geni 22, *lasIR* geni 15, *rhII* geni 30, *rhIR* geni ise 28 izolatta saptandı. Analiz edilen 4 internal gen bölgesinin 4'ü de 10 izolatta saptandı. İzolatların 12'si, 14'ü ve 29'u sırasıyla CRA'da, mikrotitrasyon plaklarında ve tüpte biyofilm oluşturdu. 30 izolat titreme ve kayma ve 25 izolat da yüzme hareketi gösterdiği belirlendi. Sırasıyla 22, 27, 18 ve 13 izolatın piyosiyanın, proteaz, elastaz ve HSL üretebildiği saptandı. İzolatlar levofloksasin (n=4), meropenem ve piperasilin/tazobactam (n=3) ile imipenem, kolistin ve seftazidim (n=2) antibiyotiklerine karşı dirençlilik gösterdi. Çoklu direnç ise 1 izolatta saptandı.

Sonuç: Balık orjinli bazı *P. aeruginosa* izolatlarında; QS varlığı ve QS ilişkili virulanslık, biyofilm ve hareket yetenekleri arasında korelasyonun mevcudiyeti saptandı. İzolatlar düşük antibiyotik dirençlilik profili gösterdi. Sonuç olarak bu izolatlar hastalık yapabilme potansiyeline sahip olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: *P. aeruginosa*; balık; QS; biyofilm; virulans faktörler; antibiyotik dirençlilik

Veli ÖZ, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Haziran-2019

ABSTRACT
EVALUATED OF QUORUM SENSING IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
ISOLATES ISOLATED FROM FISH

Aim: The aim of the study was to carry out; in order to isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* from 70 fish samples consumed in Samsun province, determination of the Quorum Sensing (QS) System and homoserine lactone (HSL) properties, and correlation between QS and some virulence factors, biofilm and mobility capability as well as determination of antibiotic resistance properties in the isolates.

Material and Method: From February to September 2018, the fish samples were analyzed using classical culture technique and obtained 100 *P. aeruginosa* isolates were confirmed by PCR method (*oprL* and PA-SS 16S rDNA). For the presence of QS, intact and internal genes were investigated in the isolates by PCR. The twitching, swarming and swimming movement types and biofilm formation properties (in Congo Red Agar, tube and microtitration plate) and elastase, protease, pyocyanin and HSL were determined by phenotypic method. Antibiotic resistance profile of the isolates was determined using disc diffusion technique.

Results: While intact *lasI* ve *lasR* were not detected in any of the isolates, internal *lasII*, *lasIR*, *rhII* and *rhIR* genes were detected in 22, 15, 30 and 28 isolates, respectively. All of internal genes were present in 10 isolates. Biofilm formation in CRA, tupe and microtitration plate were determined in 12, 14 and 29 isolates, respectively. While twitching and swarming types of motility were determined in all isolates, swimming motility was determined in 25 isolates. Pyocyanin, protease, elastase and HSL production were determined in 22, 27, 18 and 13 isolates, respectively. Multidrug resistance was found only one isolates, and some of the isolates were resistance to levofloxacin (n=4), meropenem and piperacillin/tazobactam (n=3), imipenem, colistin and ceftazidime (n=2).

Conclusion: There was QS systeme in the *P. aeruginosa* isolates. It was positive correlation between QS and some virulence properties, biofilm formation and motility of the isolates. It was found low level of antibiotic resistance in them. These isolates were able to diseases.

Keywords: *P. aeruginosa*; fish; QS; Biofilm; Virulans factors; Antibiyotic resistance

Veli ÖZ, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, June-2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrad derece.
µg	Mikrogram.
µl	Mikrolitre.
16S	Gen Bölgesi.
AHL	<i>N</i> -acyl homoserin lakton
AI	Auto inducer.
algS ve algT	Alginattan sorumlu Gen.
AlgU	Sigma -22.
AMP	Amplikon.
anti- σ^{PvdS}	Sinyal yolağı.
Apr A	Virülans faktörü
AraC	Transkripsiyonel düzenleme kontrol süreci.
asiolaGM1	Membran komponenti.
ATCC	American Type Culture Collection.
BHI	Brain-Heart Infusion.
bp	Base Pair (Amplikon Byüklüğü).
C/N	Karbon/nitrojen oranı.
CatR	Katekol katabolizm.
cetrimid veya CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide.
CFTR	Hücre zarı regülatörü.
CFU	Colony Forming Unit.
ClO_3^-	Klorat.
CRA	Congo Red Agar.
dk	Dakika.
DmpR, XylR; TouR ve HbpR	σ^{54} regülatörü kontrolü altındaki katabolik yolaklar.
DMSO	Dimetil Sülfoksit.
DNA	Deoksiribonükleik asit.
ECF	Ekstrasitoplazmik fonksiyon.
eDNA	Ekstraselüler DNA.
ekzoA	Ekzotoksin A.
EPS	Hücre dışı polimerik madde.
ERC	Elastin Kongo kırmızısı tamponu.
Fe^{2+}	Demir +2 yüklü.
Fe^{3+}	Demir +3 yüklü.
FleS/FleR çifti	Musnlere yapışma ve hareketlilik düzenlemesinde sorumlu Gen çifti.
FliA	Sigma-27.
FpvA	Piyoverdin için dış membrane reseptörü.
FpvR	σ^{PvdS} 'nin baskısından salınan, <i>toxA</i> ve <i>prpL</i> Genlerinin transkripsiyonunun başlatır.
GacS	Virulans regülasyonunu içeren sensör.

HSL	Homoserine lactone.
IL-8	Interleukin 8.
K ₃ PO ₄	Potasyumfosfat.
LPS	Lipopolisakkarit.
LPSN	List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.
Mbp	Milyon baz çifti.
MDR	Multidrug resistance.
MgSO ₄	Magnesyumsülfat.
ml	Mililitre.
NO ₃	Nitrat.
OdDHL	N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lacton.
ORFs	Open Reading Frames.
PCR	Polimeraze Chain Reaktion.
pH	Potansiyel hidrojen.
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyon.
QS	Quorum sensing.
RNA	Ribonükleikasit.
sn	Saniye.
spp.	species
TCA	Trikarboksilik asit.
TSB	Triptik Soy Broth.
WHO	World Health Organization.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL ÖZELLİKLERİ	3
2.1. Etkenin İzolasyonu.....	7
2.2. Fizyolojisi.....	8
2.2.1. Metabolizma ve Metabolik Yolakları.....	8
2.2.2. Genetik Özellikleri	9
2.3. Virulans Faktörleri	14
2.3.1. Bakteriyel Hücre Yüzey Virulans Faktörleri.....	15
2.3.2. Salgılanan Virulans Faktörleri.....	16
2.4. Quorum Sensing ve <i>P. aeruginosa</i> 'nın Patojenezindeki Rolü.....	20
2.4.1. Quorum Sensing Sistemi	20
2.4.2. <i>Pseudomonas</i> 'larda QS Sistemi	23
2.4.3. <i>P. aeruginosa</i> QS Sisteminin özellikleri	27
2.4.4. QS Sistem Mekanizması ve Biyofilm Şekillenmesi.....	30
2.5. Balıklarda <i>Pseudomonas</i> 'ın Önemi.....	31
2.6. Antibiyotik Dirençlilik ve Hayvan Yetiştiriciliğinde Kullanımı	34
2.6.1. Gıda-amaçlı Yetiştirilen Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımı	35
2.6.2. Antimikrobiyallerin Kültür Balıkçılığında Kullanımı	36
2.6.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'da Antibiyotik Dirençlilik	38
3. MATERYAL VE METOT	42
3.1. Materyal	42
3.2. Metot	42
3.2.1. <i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu	42
3.2.2. <i>P. aeruginosa</i> 'nın Polimeraz Zincir Reasyonu ile Doğrulanması.....	43
3.2.3. Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi.....	45
3.2.4. Biyofilm Oluşumunun Gözlenmesi.....	46
3.2.5. Hareketlilik Testleri	48

3.2.6. <i>P.aeruginosa</i> izolatlarının Bazı Virulans Özelliklerinin Belirlenmesi	49
3.2.7. İzolatlarda Quorum Sensing (QS) Genlerinin PZR ile Saptanması	51
4. BULGULAR	55
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	104



1. GİRİŞ

Pseudomonas spp., Pseudomonaceae familyası içerisinde yer alan, büyük ve kompleks heterojen organizma grubu olup, 255'in üzerinde türden oluşur. Başta *P. aeruginosa* olmak üzere *P. fluorescens*, *P. anguilliseptica*, *P. aeruginosa* ve *P. putida* bu cins içinde yer alan türlerden olup, hem insanlar hem de hayvanlar için fırsatçı mikroorganizma grubu içinde yer alırlar, ayrıca konakçı savunma mekanizmalarına bağlı olarak patojen türler arasında da yer almaktadır (LPSN, 2017). *P. aeruginosa* normal insan florasında yer alabilen, sağlıklı kişilerde nadiren hastalık yapan, konak savunmasının zayıflaması halinde ise ciddi enfeksiyonlara neden olabilen bir bakteri olup, olumsuz çevresel koşullara çabuk adapte olabilen ve besin maddelerine bağımlı olmayan bir bakteridir (Mulet ve ark., 2009). *P. fluorescens*, *P. anguilliseptica*, *P. aeruginosa* ve *P. putida* gibi *Pseudomonas* türleri ise akuatik ortamda yaygın olarak bulunan ve balıklarda bakteriyel hemorajik septisemi, bakteriyel yüzgeç hastalığı, bakteriyel solungaç hastalığı, bakteriyel kızıl hastalığı, turna balıklarında kızılıyara (leke) hastalığı, sazanlarda asites, alabalıklarda kızıl ağız ile enfeksiyöz abdominal damla gibi hastalıklara neden olan türlerdir (Paniagua ve ark., 1990; Maston, 2013; Thomas ve ark., 2014).

Demir alınımları, aljinat biyosentezi, virulans faktör sentezi, pek çok stres faktörüne karşı dayanıklılık, dış membran porinlerin (protein) salınımı gibi olayları kontrol eden sigma faktörü (σ^{70} sistemi) *Pseudomonas* spp. de iyi karakterize edilmiştir. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patojenezinde hücre ile ilişkili olan ve hücre dışına salınan virulans faktörleri önemli rol oynarlar (Brinkman ve ark., 1999; Domínguez-Cuevas ve Marquéz, 2004).

Bakteriler biyofilm oluşturabilmek ve komşu bakteri hücrelerini de biyofilm oluşturması yönünde uyarabilmek için, ortama küçük, diffuze olabilen kimyasal moleküller yayarlar. Bu kimyasal maddeler Auto inducer (AI) olarak adlandırılır. Hücreler arasındaki bu iletişim, "Quorum Sensing" (QS) adı verilen sistemler ile gerçekleştirilmektedir. QS iki şekilde gerçekleşir; türler arası ve tür içi sinyal molekülleriyle iletişim. Gram negatif bakterilerde türden türe QS mekanizmasında AI molekül olarak N-acyl homoserin lakton (AHL, AHLs, acyl-HSL veya HSL) üretilir. QS sistemi birçok bakteri tarafından kullanılan, virulans faktör üretimi, hareketlilik ve biyofilm şekillenmesini koordine eden diffuze olabilir sinyal moleküllerini üretimi ve

algılanmasıyla bakteri topluluklarının yoğunluklarını saptamak için kullanılan bir hücre-hücre iletişim şeklidir (Novick ve Muir, 1999; Girard ve Bloemberg, 2008; Khalifa ve ark., 2011).

P.aeruginosa'da biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahip olup, bu oluşum "Quorum Sensing" sistemler ile gerçekleştirilmektedir (Novick ve Muir, 1999). *P. aeruginosa*'da bulunan QS sistemi hiyerarşik bir QS sistem döngüsü (LasI-LasR, RhII-RhIR ve PQS-MvfR) tarafından kontrol edilir. Sonuç olarak, başta *P.aeruginosa* olmak üzere diğer *Pseudomonas* türleri hem insan hem de hayvanlar için önemli olan bakteri grubunu oluşturmaktadır (Wong, 1998).

Bakteriyal enfeksiyonlar vahşi ve kültür balıkları için en büyük tehditlerden biridir. *P. aeruginosa* etkeni de toprak ve aquakültür ortamlarında bulunabilen bakterilerden biri olup, balıklarda yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlar ile balık ve balık ürünlerinde bozulmadan sorumlu en önemli patojenler arasında yer almaktadır (Thomas ve ark., 2014). Bu nedenle *P. aeruginosa*'nın teşhisi, özelliklerinin belirlenmesi, virulans faktörleri, tedavi de antibiyotik dirençlilik profilleri gibi özelliklerinin aydınlatılması; etken ile mücadelede önemli rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, Samsun'da balıkçılarda ve süpermarketlerde satışı sunulan 70 balık örneği satın alındı ve örnekler klasik kültür yöntemi ile moleküler teknik uygulanarak *P. aeruginosa* yönünden analiz edildi. Sonuçta; klasik kültür tekniği ile 100 *P. aeruginosa* izolatı izole ve identifiye edildi. Elde edilen 100 izolatın moleküler düzeyde doğrulanması için tek hedefli PZR tekniği uygulandı. Bu kapsamda izolatlarda tür spesifik *oprL* ve PA-SS (16S rDNA) gen varlıkları belirlendi. Sonuçta 100 *P. aeruginosa* izolatından 30'u *P. aeruginosa* izolatı olarak moleküler düzeyde doğrulandı. Daha sonra bu izolatlarda QS varlığı ve HSL varlığı ile QS kontrolü altındaki bazı virulans özellikleri, hareketlilik, biyofilm oluşumu ve QS ile korelasyonları belirlendi. Çalışmada ayrıca, izolatların antibiyotik dirençlilik özellikleri ile antibiyotik dirençliliğin QS mekanizması ile ilişki de saptandı.

2. GENEL ÖZELLİKLERİ

Pseudomonas (*P*) genusu büyük ve kompleks heterojen organizma grubu olup, Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alır. Bu familya; 255'in üzerinde tür (LPSN, 2017) ile 5 cinsten oluşur. Bu familyadaki cinsler;

- 1) *Azotobacter* group
- 2) *Mesophilobacter*
- 3) *Oblitimonas*
- 4) *Permianibacter*
- 5) *Pseudomonas*'dır.

P. aeruginosa türü ise *Pseudomonas* cinsi içinde yer alıp, 13 farklı alt türü içerir. Bu alt türler;

- 1) *Pseudomonas* (*P.*) *aeruginosa*
- 2) *P. alcaligenes*
- 3) *P. anguilliseptica*
- 4) *P. caeni*
- 5) *P. citronellolis*
- 6) *P. flavescens*
- 7) *P. jinjuensis*
- 8) *P. mendocina*
- 9) *P. nitroreducens/multiresinivorans* group
- 10) *P. oleovorans/pseudoalcaligenes* group
- 11) *P. cf. pseudoalcaligenes*
- 12) *P. resinovorans*
- 13) *P. straminea* 'dır.

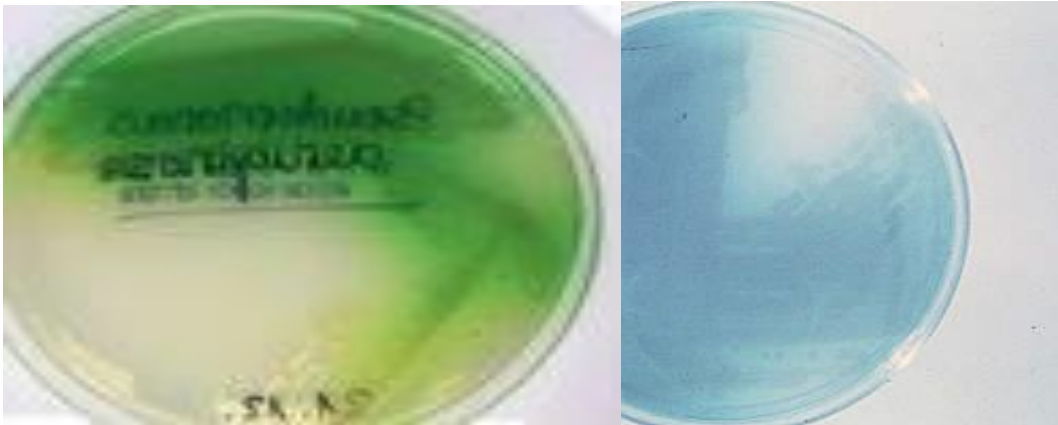
Bu türler metabolik ve besinsel açıdan aşırı derecede heterojendir. Bu genusun bazı türleri bitkiler için yararlı olup, biyolojik iyileştirme ve biyokontrol ajanı olarak kullanılırken, diğer üyeleri ise bitki ve hayvanlar için patojendir. İnsanlarda ise fırsatçı mikroorganizmalardır (Mulet ve ark., 2009).

Pseudomonas; Gram negatif, sporsuz ve obligat aerob bir bakteri olup, terminal elektron alıcısı olarak oksijenli solunum tipine sıkı bir şekilde bağlıdır; ancak bazı durumlarda nitratı alternatif elektron alıcısı olarakta kullanılabilir ve bu durum bu bakteri türlerinin anaerobik koşullarda üremesine izin verir (Palleroni, 2015). *P. luteola*

ve *P. oryzae* türleri dışındaki diğer *Pseudomonas* türleri oksidaz pozitifdir (James ve ark., 2010). Sahip oldukları bir veya birçok polar flagellaları sayesinde hareketli, çubuk veya hafif kıvrımlı formlarda, 1,5-5,0 µm uzunluğunda ve 0,5-1,0 µm genişliğinde, uygun koşullarda pigment üretebilen bakterilerdir. *Pseudomonas* türlerine göre değişmekle beraber; piyoverdin (fluoresans özellikte sarı-yeşil siderofor pigmenti), etken tarafından demirin sınırlı olduğu durumlarda salgılanır (Meyer ve ark., 2002). Belli *Pseudomonas* türleri de *P. aeruginosa*'nın ürettiği piyosiyanın ve *P. fluorescens*'in ürettiği thioquinolobaktin gibi diğer siderofor tiplerini de üretebilirlerken (Lau ve ark., 2004), xanthomonadin (sarı pigment) pigmentini üretmezler. Piyoverdin, suda eriyebilirken, kloroformda eriyememesi özelliği ile piyosiyaninden ayrılır ve UV ışınları ile yeşilimsi floresan verir. Bazı suşlar ayrıca piyorubin (koyu kırmızı) ve piyomelanin (kahverengi-siyah) gibi pigmentleri de üretebilirler (Bilgehan, 2000; Singh ve ark., 2002).

P. aeruginosa suşları ise temelde 2 çeşit pigment üretirler: Piyosiyanın (mavi) ve piyoverdin (veya fluorescein-sarı-yeşil). Piyosiyanın bir fenazin boyası olup, suda ve özellikle kloroformda erir. Bu pigment alkali pH'da mavi veya yeşilimsi renk oluşturduğu için "aeruginosa" adı verilmiştir (King ve Philips, 1978; Bilgehan, 2000).

Piyosiyanın sadece *P.aeruginosa* tarafından meydana getirilir. Bu pigment oluşumu üreme ortamıyla sıkı sıkıya bağlıdır. Pigment üretimi için ortamda MgSO₄, K₃PO₄ ve demir bulunmalıdır. Piyosiyanın varlığı *P.aeruginosa* için özgün ayırıcı bir özelliktir (Bilgehan, 2000).



Şekil 1. *P. aeruginosa*'da piyoverdin (sarı-yeşil) ve piyosiyanın (mavi) pigmentleri (Maçin'den 2014;

Todar'dan 2019)

P. aeruginosa'nın ürettiği piyoverdin pigmenti ile piyosiyanin pigmentinin birleşmesi sonucu karakteristik parlak yeşil renk ortaya çıkar (Bilgehan, 2000). *P. aeruginosa* bazı suşları piyorubin ve kahverengi-siyah bir pigment olan piyomelanin de üretebilirler (Töreci, 1981).

Pseudomonas'ların çeşitli türleri tarafından oluşturulan bakteriyosinlere "piyosin" ve "aeuginosin" olarak da adlandırılır. *P. aeruginosa*'da 35-40 kadar stabil piyosiyanin tipi belirlenmiştir (Erdem, 1999).

Pseudomonas'lar fermentasyon ve fotosentez yapamazlar. Ancak, çok çeşitli organik madde varlıklarında büyüyebilme yeteneğine sahiptirler. *P. aeruginosa*, benzoat ve çok sayıda diğer organik maddeleri katabolize edebilir. Bu özelliği nedeniyle bakteri; toprak, su ayrıca insan, hayvan, bitki, atıklarından ve hastanelerden izole edilir. Bu özellik, etkene ubiquiter özellik kazandırır (Lederbeng, 2000). *Pseudomonas*'lar Enterobacteriaceae familyasından polar flagellaları ve fermentatif metabolizma yerine oksidatif metabolizmaları kullanmasıyla kolaylıkla ayırt edilir. Bu organizma 100'den fazla şekeri, amino asidi ve yağ asitlerini, ayrıca aromatik bileşikleri ve hidrokarbonları yıkıma uğratabilirler veya enerji kaynağı olarak kullanabilir. Yine birçok türleri organik büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaz (Maçın, 2014).

Bu cins, ubiquiter özellikte olup, 4-42 °C'ler ile pH 4-8 arasında yaşayabilme özelliğine sahiptir. Pek çok türü pH 4,5'in altındaki asit ortamlarda üreyemezler. Etken aerob, mezofilik ve nötral pH koşullarındaki toprak ve su çevrelerinde yaşarlar. Doğada *Pseudomonas* türleri saprofit ve paraziter olarak bulunur. Genellikle, bu bakteriler anaerobik, aşırı termofilik veya asidofilik ortamlarda varlıklarını sürdüremezler (Maçın, 2014).

P. aeruginosa, yukarıda belirtildiği gibi hem solunumları hem de biyofilm oluşturabilmek için demire ihtiyaç duyar (Singh ve ark., 2002; O'May ve ark., 2009). Konakçı ile rekabeti sonucu etken demir elde etmek için farklı stratejiler geliştirir. *P.aeruginosa* redoks-aktif fenazın bileşiklerini üretir ve bu bileşikler erimeyen Fe³⁺ ü daha eriyebilir Fe²⁺'ye dönüştürür. Demir-sidofor kompleksinin kavranıp alınması için demir ve reseptörleri uzaklaştıran sideroforlar, konakçı demire bağlı proteinleri degrade etmek için proteazları ve yarışmacıların eliminasyonu için bakteriyosinleri üretirler (Vasil ve Ochsner, 1999). Dahası, demirin mevcudiyeti piyosiyanin, Apr A ve

ekzotoksin A gibi virulans faktörlerin üretiminin düzenlenmesi için gereklidir (Kim ve ark., 2005).

Tablo 1’de *P. aeruginosa* ait bazı biyokimyasal testler ve sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 1. *Pseudomonas aeruginosa* ’nın Biyokimyasal Testler ve Sonuçları (Aryal, 2018)

Özellikler	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gram boyama	Negatif
Şekli (Kok/Diplokok/Çubuk)	Çubuk
Hareketlilik(Motile / Non-Motile)	Hareketli (Tek polar)
Kapsül (Kapsüllü/Kapsülsüz)	Kapsülsüz
Spor (Sporlu/Sporsuz)	Sporsuz
Flagella (Flagellalı/Flagellasız)	Tek flegellalı
Katalaz	Pozitif (+)
Oksidaz	Pozitif (+)
Metil Red	Negatif (-)
Voges Prauskouer	Negatif (-)
OF (Oxidative/Fermentative)	Oksidatif
Indole	Negatif (-)
Sitrat	Pozitif (+) (+)
Urease	Negatif (-)
Nitrat İndirgeme	Positif (+)
H ₂ S Üretimi	Negatif (-)
Gaz oluşturma	Pozitif (+)Nitrat’tan
PYR	–
CAMP	–
Jelatin Hidrolisi	Pozitif (+)
Niasin	–
Koagulaz	Negatif (-)
Hemoliz (Alfa/Beta/Gamma)	–
Nagler	–
String Test	–
Pigment	Pozitif (+)
Safrada çözünebilme (Bile Solubility)	–
Cetrimide Test	Pozitif (+)
Fermentasyon Özelliği	
Arabinoz	–
DNase	–
Fruktoz	–
Glukoz	Negatif (-)
Hippurat	–
Inositol	–
Inulin	Negatif (-)
Laktoz	Negatif (-)
Maltoz	Negatif (-)
Mannoz	–
Myoİnositol	–

Tablo 1. (devam) *Pseudomonas aeruginosa* 'nın Biyokimyasal Testler ve Sonuçları

Raffinoz	–
Riboz	–
Sorbitol	Negatif (-)
Sukroz	Negatif (-)
Enzimatik Reaksiyonlar	
Asetat Kullanımı	–
Aseton Üretimi	–
Asid Posfataz	–
Alkalın Posfataz	–
Amidaz	–
Arjinin dehidrolaz	Pozitif (+)
Arilsulfataz	–
Beta Laktamaz	–
Hyalurodinaz	–
Lesitinaz	–
Lipaz	Pozitif (+)
Lizin	Pozitif (+)
Neuraminidaz	–
ONPG Test	–
Ornitin dekarboksilaz	Negatif (-)
Penilalanin deaminaz	–
Peroksidaz	–
Tellurit	–
Tributirin	–

2.1. Etkenin İzolasyonu

Pseudomonas 'lar standart sıvı ve kanlı agar, chocolate agar, McConkey Agar, *Pseudomonas* agar base, Cetrimide agar Base gibi katı besiyerlerinde iyi ürerler ve adı geçen besiyerleri gıda ve klinik *Pseudomonas* türlerinin izolasyonunda tavsiye edilir. Setrimid (cetrimide), fusidin (fucidin), sefalosporin (cephalosporin) ve sodium nalidiksate (sodium nalidixate) (Oxoid, Difco, 2017) gibi inhibitor içeren selektif besiyerleri izolasyon ve identifikasyonda kullanılır. *Pseudomonas* kolonileri hemen hemen renksiz olmakla beraber, bazen beyaz, beyazımsı, krem veya sarı pigmentli koloniler de üretirler (PHE, 2015). *Pseudomonas* türlerinin floresans özelliğini sağlanması amacıyla selektif zenginleştirmesinde kullanılan kültürasyon ortamlarına demir ilave edilmez (Moore ve ark., 2006). Floresan; ortamdaki yani besiyerinde bulunan siderofor pigmentlerinin üretiminden kaynaklanır. Başka bir deyişle, siderofor pigmenti floresan özelliğe neden olur. Ortama katılan pensilin G, novobiyosin ve sikloheksimid ise *Pseudomonas* türlerinin floresans özelliğini inhibe etmez (Sands ve Rovira, 1970). Bunların yanı sıra besiyerlerine etkenin piyosiyanın ve piyoverdin

pigment üretimini artırmak amacıyla potasyum ve magnezyum tuzları ilave edilir. Yine ortamda Gram pozitif bakterilerinin üremesini engellemek amacıyla sodyum lauroyl sarcosine katılır. Floresan özelliği olmayan türlerinin inhibisyonunu sağlamak amacıyla ortama trimethoprim da katılabilir (Fromin ve ark., 2001). Yukarıda belirtilen besiyerleri dışında ortama katıldıklarında etkenin üremesini baskılamasına rağmen, cetyltrimethylammonium bromide (cetrimid veya CTAB), 2,4,4-trichloro-2-hydroxydiphenyl ether (Irgasan) veya benzer bileşikler içeren Pseudosel agar medium, Cetrimide agar medium, *Pseudomonas* agar medium, *Pseudomonas* izolasyon agar medium ve *Pseudomonas* agar F medium gibi besiyerlerine etkenin seçiciliğini artırmak amacıyla katılırlar. Cetrimide kullanımı *Pseudomonas* 'ların üremesine eşlik eden mikrobiyal floranın üremesini baskılamak ve *P. aeruginosa*'nın büyümesini sınırlandıracak florayı minimize etmek amacıyla katılır. *P. aeruginosa*'nın pigment üretimi bu ortamda üredikleri zaman inhibe olmaz. Ayrıca nalidixic acid ilavesi ortamda bulunan diğer mikrobiyal floranın inhibisyonuna yardımcı olmak amacıyla katılır (Goto ve Enomoto, 1970).

2.2.Fizyolojisi

2.2.1.Metabolizma ve Metabolik Yolakları

Pseudomonas çoğunlukla oksijenli solunum sistemini kullanır. Ancak, bazı türleri “arjinin fermentasyon” olarak adlandırılan arjinin deaminaz enerji üretim yolağını ve bazı türleride depiruvat fermentasyon sistemini de kullanabilir. Bütün türler oksidatif fosforilasyon için terminal elektron alıcısı olarak oksijeni kullanır. Bazı türleri ise aerobik yolak ile eş zamanlı çalışarak, anaerobik solunum sistemine de destekleyici olarak sahiptir. Bazı *Pseudomonas* türleri için karakteristik olan bu destekleyici yolakda, son elektron alıcısı olarak nitrat (NO₃) kullanılır. Bu durum “nitrat solunumu” olarak adlandırılır. Nitrat solunumu yoluyla denitrifikasyon enerji-üretimi için katobolik bir süreçtir ve bu olay nitratın denitrifikasyon asimilasyonu sonucu amonyağa indirgenmesiyle gerçekleşir (Moore ve ark., 2006).

Bazı *Pseudomonas* türlerinin elektron transport zincirinde mevcut olan ve en çok *a*-, *b*- ve *c*-tip sitokrom içerdikleri saptanan sitokromla karakterize edilmiştir (Stanier ve ark., 1966).

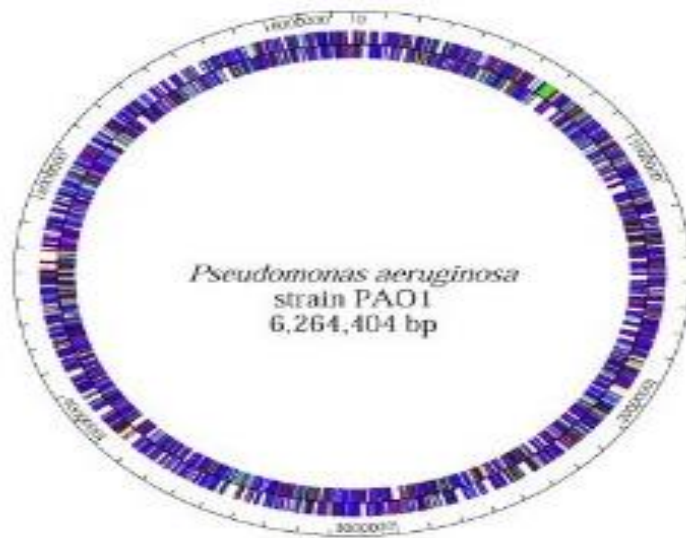
P. chloritidismutans türü ise oksijeni yanısıra, klorat (ClO₃⁻), alternatif enerji üretimi için elektron alıcısı olarak kullanabilir (Wolterink ve ark., 2002). Bütün türlerde

hücre katabolik mekanizmasının düzenlenmesinde trikarboksilik asit (TCA) siklusu kullanılır. Hemen hemen bütün *Pseudomonas* türleri glikolitik yolağı 6-fosfofruktokinaz yokluğu nedeniyle tamamlayamazlar. *Pseudomonas* türleri karbon ve nitrojen kaynakları olarak aminoasidi kullanabilir. Aminoasit varlığında, hücre- spesifik membran permeaz aktive olur, bu da aminoasitleri sitoplazmik boşluğa geçişi için transport mekanizmasını sağlar. Gıda kaynağı olarak aminoasit kullanımı hücre enerjisini güvende tutar. Çünkü aminoasitler hemen kullanılabilir ve çok az veya hiç modifiye olmadan hücrede meydana gelecek olaylarda direk olarak kullanılabilirler (Moore ve ark., 2006).

Pseudomonas genusundaki bütün türlerin fizyolojik özellikleri test edilmemiş ve bu nedenle istisnai türler bulunabilir. Bundan dolayı, nitrojen fikzasyon etkenleri olan *P. stutzeri* ve *P. aeruginosa* arjinin ve az miktarda yeast ekstraktı ile anaerobik ortamda yavaş da olsa büyüyebilmesi sağlanabilir (Moore ve ark., 2006).

2.2.2. Genetik Özellikleri

P. aeruginosa genomu %65 Guanin ve Sitozin içeren 5,2-7 milyon baz çifti (Mbp) büyüklüğündedir (Şekil 2). Çeşitli aksesör genomları ise bir dizi genomik adalar tarafından şekillendirilir ve bunlar ilkel tRNA-müdahaleleli adacık tipleridir. Ana veya merkez genom, %0,5 oranında düşük düzeyli nükleotid farklılığından oluşur ve sıralanmış genleri muhafaza eder (Wiehlmann ve ark., 2007).



Şekil 2. *P. aeruginosa* genomu (https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_aeruginosa)

P. aeruginosa sitoplazmasında tek veya aşırı sargılı sirküler kromozoma sahiptir (Fick, 1993). Bu bakteri ayrıca patojen olarak organizmanın yaşam döngüsünde çok önemli rol oynayan pek çok hareketli-kromozom plazmidleri de stoplazmalarında taşırlar. Bu plazmitler antibiyotik dirençlilikte önemli rol oynayan (örneğin TEM, OXA ve PSE) beta laktamaz üretimi için kodlanır. Bu özelliklere sahip olan *P. aeruginosa*, zorlu bir patojen olarak adlandırılır (Craig ve Ebert, 1994).

P. aeruginosa, *P. putida*, *P. syringae* ve *P. fluorescens* genomlarının %10'unun genetik özelliklerini, gen düzenlemelerini kapsayan ürünleri kodlar (Moore ve ark., 2006). Bunlar;

a) *Pseudomonas*'da Sigma Faktörü:

Pseudomonas genusunda merkezi (core) RNA polimerazı, bu genusta yer alan türlerin sahip olduğu çok sayıda ve çeşitlilikteki genlerin transkripti için birden fazla değişik sigma faktörleri arasından seçilebilir. *Pseudomonas* housekeeping gen ekspirasyon kontrolünü başlatıcı olarak tanımlanan, büyük bir sigma faktörüne yani " σ^{70} "'e sahiptir (Domínguez-Cuevas ve Marquéz, 2004). *Pseudomonas* promotorlarına bağlı olan ve deneysel olarak transkripsiyonel başlatıcı nokta olarak belirlenmiş 149 σ^{70} derlemiştir. σ^{70} familyası içinde filogenetik ve fonksiyonel olarak belirli alt gruplarından oluşan ekstrasitoplazmik fonksiyon (ECF) sigma faktörleri için kodlayan açık okuma çerçevesi (multiple open reading frames –ORFs) *Pseudomonas* genusu içinde bulunmuştur (Martínez-Bueno ve ark., 2002). Bu sigma faktörlerinin başlıcaları, RpoS (sigma-38), RpoH (sigma-32), FliA (sigma-27), AlgU (sigma -22, *E.coli*'de RPOE'nin homoloğu) ve PvdS vb. dir. Bu sistem, yolaklarda demir alınımı, aljinat biyosentezini, virulans faktör sentezini, pek çok stres faktörüne karşı dayanıklılık ile dış membran porinlerin (protein) salınımı gibi olayları kontrol eder. Oldukça önemli olan bu sistem, *P. aeruginosa*'da iyi karakterize olmuştur (Brinkman ve ark., 1999; Beare ve ark., 2003). İki ECF bulunur. Bunlar;

1) AlgU: Aljinat biyosentezini, mukoit fenotipi danışma (Govan ve Deretic, 1996) ve büyük ısı şok sigma faktör σ 'yı (bu nedenle, olasılıkla global gen düzenlemesinde rol oynar) kodlayan bir genin ekspresyonu ile gerçekleşir (Govan ve Deretic, 1996).

2) σ^{PvdS} : Bu da bir sigma faktörü olup, piyoverdin siderofor biyosentezinin düzenlenmesinden sorumludur (Moore ve ark., 2006).

P. aeruginosa 'nın " σ^E ECS" faktörü *algU* geni tarafından kodlanır ve *algU-mucA-muchB-mucC* gen kümelerinin bir parçasıdır. σ^E aktivitesi, membrana lokalize olmuş MucA proteini tarafından kontrol edilir ve bu periplazmik protein mucB tarafından stabilize edildiği görülmektedir. MucC'nin fonksiyonu ise henüz bilinmemektedir (Boucher ve ark., 2000). *P. aeruginosa*'da aljinat biyosentez genlerine ek olarak, σ^E 'ya bağlı ekspresyonlarının transkripsiyonal mikro array profilleri σ^E çemberinin parçası olarak ortaya çıkmıştır (Moore ve ark., 2006). Bunlar:

- 1) *pfpI*: putative proteazı kodlar.
- 2) *osmE*: ozmotik olarak uyarılabilir bir lipoproteini kodlar.
- 3) Birçok membran proteinleri kodlayan genlerdir.
- 4) Metabolik proteinleri kodlayan genlerdir.
- 5) Adezyon ve ilaç dirençliliğini (effluks pompası gibi) kapsayan proteinleri kodlayan genlerdir (Moore ve ark., 2006).

Pek çok ECS sigma faktörü bütün *Pseudomonas* 'ların ekolojik uyumunda önemli rol oynayan demir alımını kapsar (Venturi ve ark., 1995). Demir alımı sigma faktörünün en iyi karakterize edilmiş olanı " σ^{PvdS} " olup, piyoverdin biyosentezi için ihtiyaç duyulan genlerin transkripsiyonel genleri başlatır (Beare ve ark., 2003). σ^{PvdS} aktivasyonuna uzanan sinyal yolağı, ferri-piyoverdine dış membrane reseptörünü ve FpvA'yı kapsar ve ferrik-piyoverdin ile etkileşim halinde olup, anti- σ^{PvdS} faktörüne bir sinyal gönderir. FpvR, σ^{PvdS} 'nin baskısıyla salınır. Bu sayede *Pseudomonas*' da piyoverdinin sentezlenmesinin yanısıra *toxA* ve *prpL* genlerinin transkripsiyonunda başlar (Lamont ve ark., 2002). *P. aeruginosa* PvdS protein IS box (G/C G/C TA AAT T/A C/G) dizayn edilmiş -35 bölgede bir DNA sequensinde birçok pvd aktifleştiricisine bağlandığı görülmüştür. Bu sigma faktörü tarafından spesifik tanımlanması uygun promotor fonksiyonu için önemlidir (Wilson ve ark., 2001).

Bütün *Pseudomonas* genomları; özellikleri σ^{70} ailesinden farklı σ^{54} faktörü kodlayan *rpoN* genine sahiptir (Valls ve ark., 2004). σ^{54} sisteminin en ayırt edici özelliği "-12/24 motifleri" olarak da adlandırılan, σ^{54} içeren RNAP'ın bağlanması için karakterize edilen sequens varlığına sahiptir. σ^{54} gen üretiminin fonksiyonları farklı *Pseudomonas* türlerinde farklılıklar gösterir. *P. aeruginosa* ve *P. putida*'ın *rpoN*

mutanslarının en yaygın özellikleri glutamin sentetaz enziminden yoksun olup, üreaz üretimi bu nedenle negatiftir. *P. syringae* ve *P. aeruginosa* rpoN mutantları vahşi suşlara kıyasla daha az virulanstır (Hendrickson ve ark., 2001). rpoN'e flagellumun şekillenmesi ve üremesi için ihtiyaç duyulur (Moore ve ark., 2006).

b) Regülatör Ailesi: *LysR* transkripsiyonel regülatör ailesi *Pseudomonas* genomlarında en geniş paraloji (aynı organizmada çok sayıda genin farklı kromozal lokasyonda yer alması) grubunu içerir. LysR-tip regülatör çok farklı fonksiyonların düzenlenmesinden sorumludur ve protokatekolat (PcaQ) ve katekol katabolizm (CatR) ve diğer toprak ve bitki ilişkili fonksiyonlar gibi aromatik metabolizmaları kapsayan protein ve enzimlerin ekspresyon aktivitelerinde rol oynar. Karbon metabolizması, stres cevabı ve patojenezis gibi AraC transkripsiyonel düzenleme kontrol süreçleri *Pseudomonas* genomlarında oldukça yaygın (30'dan fazla üyede) olarak bulunmaktadır. σ^{54} familyası ile birlikte çalışan NtrC ailesi bütün *Pseudomonas*'larda yaygın olarak bulunur ve farklı düzenleme döngülerinde çalışır. (Valls ve ark., 2004). *P. aeruginosa*'da, fenilalanin metabolizması için PhhR düzenlenmesi (Song ve Jensen 1996) ve güçlü bir lipaz kodlayan *lipA* genin düzenlenmesi bu düzenleme döngüsüne dahildir (Jaeger ve ark., 1996). *Pseudomonas* genusunda farklı türler, fenol, toluene/m-ksilen, *o*-ksien ve 2-hidroksibifenil gibi aromatic birleşiklerin metabolizması için çok sayıda katobolik yollar DmpR, XylR; TouR ve HbpR gibi σ^{54} regülatörü kontrolü altındadır (Arengi ve ark., 2001; Valls ve ark., 2004).

Pseudomonas genomları antibiyotik, deterjan ve solventlere dirençliliklerin gelişmesinden sorumlu genler olan TetR ve IclR familyasının baskılayıcıları gibi çok çeşitli diğer düzenleyici genleri de içerir. Bütün *Pseudomonas* genomlarında *asnC*, *gntR*, *lacI*, *luxR*, *Cro/cI*, *merR* ve *fis* gibi familya üyelerini içerir (Moore ve ark., 2006).

c) Açlık ve Besinsel Duyarlılıkta iki-Bileşikli Fosforilaz Sistemi: Bütün *Pseudomonas* türleri iki-komponentli fosforilaz sistemini (TCSs) içerir. Bu sistemler histidine-kinaz sensör ve yanıt düzenlenmesinden (response regülatör –RR) oluşur. Kısaca açıklanacak olursa, çevresel uyarılara yanıtta sensör auto-fosforilazlar ve sonra regülatör yanıt için sinyal uyumunu sağlar. Yukarıda bahsedilen familyalardan birine ait olup, buda sırasıyla fosforilazasyonla aktive olur. TCSs örneğinde, FleS/FleR çifti

dâhildir. Bu çift *P. aeruginosa*'da musinlere yapışma ve hareketlilik düzenlemesinden sorumludur (Richtings ve ark., 1995) ve PilS ve onun RR PilR pilinin transkripsiyonunun düzenlemesinden sorumlu *pilA* genini düzenler. (Hobbs ve ark., 1993). CrbA CrbB ile birlikte çeşitli spesifik metabolik yolları kontrol eder ve farklı karbon-nitrojen (C/N) oranlarına yanıtta çeşitli doğal substratlarının katabolizmasını değiştirir. Nitrojen besini yokluğunda da TCS sistem NtrB-NtrC'yi kapsarken, PhoR-PhoB fosfat asimilasyonunu kapsar. *P. aeruginosa*'da demir kazanımındaki TCSs'in önemli rol oynadığı saptanmıştır. PfeS-PfeR çiftine, demirin, enterobaktin reseptör PfeA'nın enterobaktin-indüklenmesi için ihtiyaç duyulur (Dean ve Poole,1993). PirR-PirS sistemi ise ikinci düşük-affiniteli ferri-enterobaktin alım sistemi olarak görev görür (Vasil ve Ochsner, 1999). GacS sensörü *P. aeruginosa*'da virulans regülasyonunu içerir ve RR GacA ile birlikte çalışır (Reimann ve ark., 1997).

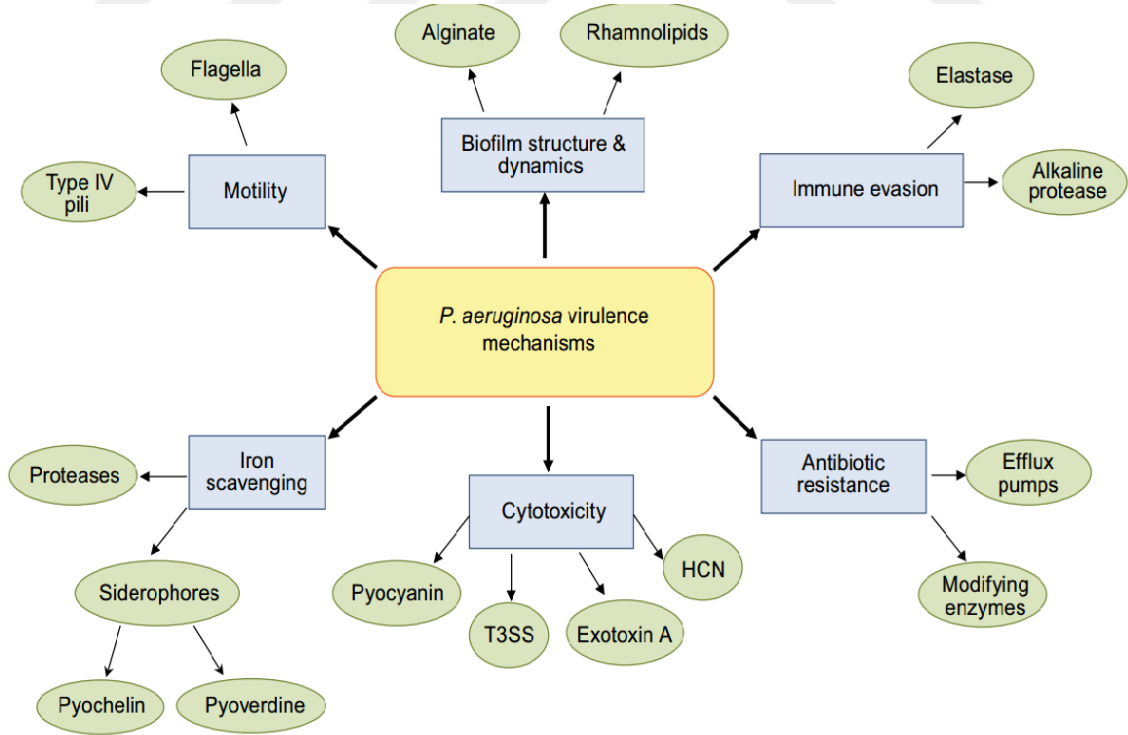
d) *Pseudomonas*'da Katabolik Baskı: *Pseudomonas* türleri potansiyel karbon kaynakları karışımına maruz kaldıklarında, etken bir düzen dahilinde bu kaynakları parçalar. Gerçekte, bir çok *Pseudomonas* türleri, pek çok organik asitleri veya amino asitleri şekerlere tercih ederek metabolize ederler. *Pseudomonas*'lar süksinat veya glukoz ile karşılaştıklarında, glukoz metabolizması için enzimler; süksinat tamamen tükeninceye kadar indüklenmezler (Collier ve ark., 1996). Fakat glukoz, mannitol ve histidin metabolizmasını baskıladığı bilinmektedir. Diğer bakterilerin aksine, katabolik baskıcı AMP tarafından yapılmamakla beraber, pekçok sinyal integrasyonu tarafından tercih edilir (Rojo ve Dinamarca, 2004). Katabolik baskı için moleküler temeli şimdiye kadar çok iyi anlaşılmamıştır. Bununla birlikte toplanan veriler ışığı altında, Crc protein *P. aeruginosa* ve *P. putida*'da nitrojelendirilmiş bileşikler ve şeker, amino asit metabolizmalarını kapsayan genlerin baskılanmasını kapsayan baskıcı genleri de ihtiva eder. Crc dallanmış-zincirli amino asitlerle alkanların metabolizmasını kontrol eder (Yuste ve Rojo, 2001). Bu protein *Pseudomonas*'da biyofilm gelişimini de kapsadığı söylenir (O'Toole ve ark., 2000).

2.3. Virulans Faktörleri

Virulans faktörlerinin salınımı mikroorganizmanın ürettiği logaritmik fazda gerçekleşir. Bu faktörlerinin salınım ve düzenlenmesi karmaşık bir sistemdir. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının patojenezinde de konağa ve bakteriye ait çeşitli virulans faktörleri rol oynar. Genel olarak bu bakterinin virulans faktörleri; i) hücre ile ilişkili olan virulans faktörler ve ii) hücre dışına salınan virulans faktörler olmak üzere iki grup altında toplanır (Woods, 2004).

P. aeruginosa enfeksiyonunun oluşumunda ilk aşama, etkenin adezyonu ve kolonizasyonudur. Daha sonraki aşamalarda bakteri lokal olarak invaze olur ve takiben yaygın sistemik enfeksiyonu oluşturur (Maçın, 2014).

P. aeruginosa hücre yüzey komponentleri, ekstraselüler enzimler ve toksinleri içeren çeşitli virulans faktörleri sahiptir. Aşağıda yer alan virulans faktörlerinin büyük çoğunluğu iki farklı regülasyon sistemi tarafından kontrol edilir (Şekil 3). Bu sistemler; iki-bileşenli (komponentli) transkripsiyonal regülatör sistemi ile Quorum Sensing Sistemidir. Bu iki mekanizma mikroorganizmanın konakçıda canlı kalması ve üremesi için gereklidir (Khalifa ve ark., 2011).



Şekil 3. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında virulans mekanizması (Lee ve Zhang'dan 2015)

2.3.1. Bakteriyel Hücre Yüzeyi Virulans Faktörleri

Kirpik (Flagella): Patojenezde kritik bir role sahip olan kirpik, *P.aeruginosa*'nın yüzeyinde kutupsal yerleşimli filamantöz bir uzantısıdır ve bakterinin yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapıdır. Kirpik sayesinde bakteri, asiolaGM1 gibi yaygın membran komponentleri aracılığıyla epitel hücrelerine bağlanarak adezyonu sağlar. Kirpik, *P.aeruginosa*'nın kolonizasyon başarısından sorumludur ve oldukça immünojeniktir (Singh ve ark., 2002).

Pilus (Fimbriae): Pilus veya fimbriae, *P.aeruginosa*'nın kısa, filamantöz yüzey uzantılarıdır. Çoğunlukla çoklu pilus mevcuttur ve piluslar *P.aeruginosa*'da seğirme (twitching) şeklindeki hareketinden sorumludur. Bakterinin hücre yüzeyine tutunmasında adezinler (protein yapısında) büyük rol oynar. Bu yapı, etkenin hava yollarına hızla yayılmasına ve kolonize olmasına yardımcı olur. Piluslar bu nedenle adezin proteinleridir. *P. aeruginosa*'da pilus dışında ikinci bir adezin yapısı daha vardır. Bu adezin yapısı ise pilus dışı adezinlerdir (tutunucu hücre yüzeyi yapıları). Bu yapılar etkenin enfeksiyon oluşturacağı bölgede yer alan epitel hücre yüzeyinde siyalik asitsiz gangliozid reseptör (asialoGM1) yapılarına bağlanarak, kolonizasyonun adezyon fazında önemli rol alırlar (O'May ve ark., 2009). Bu amaçla, önce nöromidaz üretilir. Oluşan nöromidaz gangliozitlerdeki siyalik asit kalıntılarını yok eder. Daha sonra etken adezinler sayesinde asialoGM1 reseptörlerine bağlanır (Baron ve ark., 1986; Erdem, 1999).

P. aeruginosa sahip oldukları pilusları ile epitel hücrelerine tutunmakla beraber, musine tutunamazlar. Bu yapıya pilus dışı adezinleri kullanarak tutunurlar. Yani pilus dışı adezinler etkenin hem epitel hücresine, hem de musin yapısına tutunmasını sağlar (Baron ve ark., 1986; Erdem 1999).

Lipopolisakkaritler: *P. aeruginosa*'da dış membranın iç yüzü, tipik çift katlı fosfolipid tabakaya benzemekle beraber, dış membranın dış yüzü ise başlıca lipopolisakkarit (LPS) tabakadan oluşmaktadır. LPS tabakası fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-spesifik polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. Farklı O-spesifik polisakkarit zincirleri, esas olarak *P.aeruginosa* serotiplerinin tanımlanmasında kullanılır. Lipid A komponenti ise pek çok pro-inflamatuar yolakta aktiftir (Vasil ve Ochsner, 1999). LPS tabakası adezyonda rol alan önemli bir virulans faktörlerden biri olup, etkenin TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2

reseptörlerini tanınmasında ve asialoGM1 veya CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) reseptörlerine bağlanmasında önemli rol oynar (Kim ve ark., 2005).

Aljinat: Aljinat, *P.aeruginosa* tarafından üretilen ekzopolisakkarit mukoid bir yapı olup, tekrarlanan mannuronik asit ve glukronik asit polimerlerinden meydana gelir. Aljinat, LPS gibi adezin fonksiyonu gösterir ve solunum epiteline *P. aeruginosa*'nın tutunarak kolonize olmasını sağlar (Salyers ve Whitt, 1994). Aljinatın aşırı üretimi, *P. aeruginosa*'yı fagositozdan, dehidratasyondan, antibiyotiklerden ve hatta kazanılmış konak yanıtından korur (Wozniak ve ark., 2003). Örneğin; aljinat, *P. aeruginosa*'yı aminoglikozid antibiyotiğinin bakterisid etkisinden korur (Baron ve ark., 1986). Aljinat da bakterinin adezyonunda rol oynar. Aljinat sayesinde kolonize olmuş olan etkeni solunum yolu epiteli üzerine sabitler. Aljinat biyosentezinde görev alan genler kromozomun bir bölgesinde kümelenmiş ve operon olarak organize olmuşlardır. Ortamda nitrojen miktarının azalması ve yüksek ozmolarite aljinat üretimini tetikleyen faktörlerdir. Mukoid fenotipten, mukoid olmayan fenotipe dönüşümü *algS* ve *algT* genleri yardımıyla gerçekleşmektedir (Salyers ve Whitt, 1994).

2.3.2. Salgılanan Virulans Faktörleri

Piyosiyanın: *P. aeruginosa*'nın mavi pigment metaboliti olan piyosiyanın, nötrofillerde apoptozisi uyarması, konak yanıtını baskılaması ve IL-8 artışı gibi etkilerle patojenezde rol alır. Bu pigment ayrıca silyalı solunum yolu epitelinin fonksiyonlarını bozar ve toksik serbest radikallerin salgılanmasına neden olarak, daha önceden meydana gelmiş olan doku hasarını artırır. Piyosiyanın $\alpha 1$ -antitripsini inaktive eder, bu nedenle kistik fibrozisde bulunan proteaz-antiproteaz dengesizliğine katkıda bulunurken (Britigan ve ark., 1999), *P. aeruginosa* ilave olarak elastazı ile kollojen, fibrinojen ve elastin dahil ekstraselüler matriksin pek çok proteinine bağlanır: Böylece akciğer paranzimi içine bakteri invazyonuna katkıda bulunur (Wilson ve ark., 1987; Britigan ve ark., 1999). Ayrıca, piyosiyanın, çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Norman ve ark., 2004).

Piyoverdin: Piyoverdin bir siderofordur ve *P. aeruginosa* metabolizmasında kullanım için çevreden demir bağlayan küçük bir moleküldür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda piyoverdinin *P. aeruginosa*'nın ekzotoksin A (ekzoA) ve endoproteaz gibi

diğer virulans faktörlerinin sekresyonunun düzenlenmesinde ve kendi sekresyonunda rol alan önemli bir virulans faktörü olduğu bildirilmiştir (Song ve ark., 2010).

Alkali Proteaz: Alkali proteaz *P. aeruginosa*'nın LasB elastaz ve LasA gibi ürettiği birçok proteazlardan biridir. Alkali proteaz, *P. aeruginosa*'nın tip I sekresyon sistemi (TISS) tarafından salgılanan, fibrini parçalayıcı bir proteazdır. *P. aeruginosa* proteazlarının çoğu gibi yalnızca korneal enfeksiyonların patojenezinde rolü açıklığa kavuşturulmuştur. Alkali proteaz akut akciğer hasarına da neden olabilir (Alcorn ve ark., 2004).

Proteaz IV: Proteaz IV, *P. aeruginosa* tarafından salgılanan diğer proteazlar gibi patojenezde rol oynar. *P. aeruginosa*'nın sahip olduğu Proteaz IV özellikle keratinin patojenezine katıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda sürfaktan proteinleri A, D ve B'nin yıkımı aracılığıyla akciğer enfeksiyonlarının patojenezinde de etkili olduğu gösterilmiştir (Malloy ve ark., 2005).

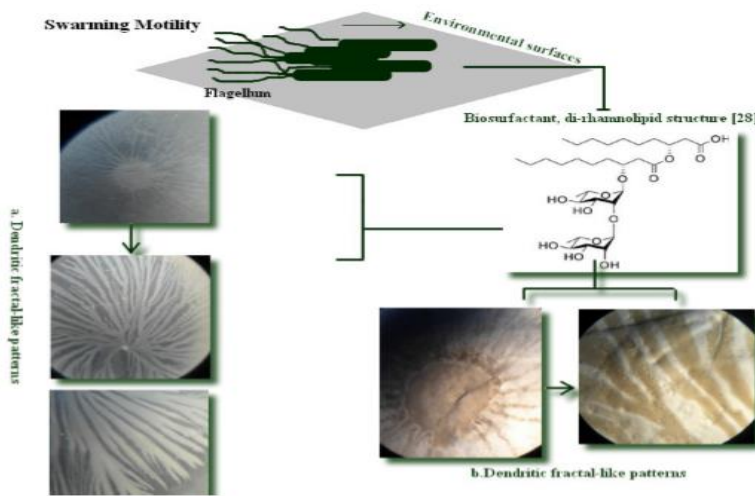
Elastaz: Elastin akciğerlerin genişleyip, daralmasına olanak sağlayan bir proteindir ve akciğerlerde bulunan proteinin yaklaşık %30'unu oluşturur. *P. aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur. LasB bir çinko metalloproteinazdır. Bu enzim hücre dışı çinko proteaz olup, kollojen ve elastin gibi ökaryotik proteinlere saldırır ve hücrenin yapısal proteinlerini parçalar (Lederbeng, 2000). LasA proteaz ve LasB elastaz enzimleri sinerjistik etki göstermek suretiyle elastini parçalar. Yalnız LasA proteaz ise elastini yıpratmakla beraber elastini parçalayamaz. LasB ise elastazın elastolitik aktivitesini güçlendirir. LasB'nin proteolitik özelliği alkali proteazın on katıdır (Salyers ve Whitt, 1994). Etken örneğin solunum yolu epitelinde sürfaktan proteinleri A ve D'nin parçalanması ve proteaz aktive edici reseptörün inaktivasyonu ile konak hücre immün yanıtını azaltır (Salyers ve Whitt, 1994; Song ve ark., 2010). Kan damarlarındaki elastik tabakayı tahrip edici etkiye sahiptir. Elastaz, dissemine *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında görülen ektima gangrenosum adlı karakteristik lezyonlardan sorumludur (Bayrakal, 2008).

Fosfolipaz C: Fosfolipaz C, özellikle de hemolitik fosfolipaz C, *P. aeruginosa* tarafından Tip II Sekresyon Sistemi aracılığıyla ekstrasellüler boşluğa salgılanan bir fosfolipazdır. Ökaryotik hücre membran bileşeni olan fosfolipitleri hedef alarak akut akciğer hasar patjenezinde rol oynar (Wiener-Kronish ve ark., 1993). *P. aeruginosa*'nın akut akciğer hasarı ve inflamasyonunun patojenezinde rol aldığı gösterilmiştir.

Patojenik etkilerinin bir kısmı (elastaz gibi) sürfaktan inaktivasyonu ile olmakta olup, konak nötrofil oksidatif patlama yanıtını baskılar (Romero ve ark., 1998).

Ekzotoksin A (Ekzo A): *P. aeruginosa*'nın en önemli virulans faktörlerinden biridir. Bu toksinin çok küçük bir dozu bile deney hayvanlarının ölümüne yol açmaktadır. Ekzo A, bir ADP-ribozil transferaz özelliğindedir. Tip II sekresyon sistemi aracılığıyla ekstrasellüler boşluğa salgılanan ekzotoksin (ekzo) A, elangasyon faktör-2 (EF-2)'yi dolayısıyla protein sentezini inhibe ederek hücre ölümüne yol açar. Enfeksiyon sırasında Ekzo A'nın konak yanıtını baskıladığı bildirilmiştir (Wick ve ark., 1990; Lederbeng 2000; El-Naggar ve ark., 2009). Ekzo A özellikle yanık yarası ve kronik akciğer enfeksiyonları sırasında doku hasarının oluşmasında önemli role sahiptir. Ayrıca, ekzo A, T ve B lenfositleri için immüsupresyon oluşturucu etkiye sahiptir.

Ramnlipid: *P. aeruginosa*'da ramnlipid varlığı ilk olarak 1949'da Jarvis ve Johnson tarafından gösterilmiştir (Jarvis ve Johnson, 1949). Ramnlipit bir glikolipid biyosürfaktan olup (Abdel-Mawgoud ve ark., 2010), biyosürfaktan özelliği yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde gösterir (Lang ve Wullbrant, 1999). Deterjan benzeri etkisiyle akciğer sürfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirir ve fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca, mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder. Ramnlipid aynı zamanda bir hemolizindir (Karatuna ve Yağcı, 2008). Ramnlipitler *P. aeruginosa* tarafından logaritmik üremenin stationary (durağan) fazında ve özellikle demir ve nitrojen konsantrasyon sınırlı olduğu durumlarda üretilir (Guerra-Santos ve ark., 1986).

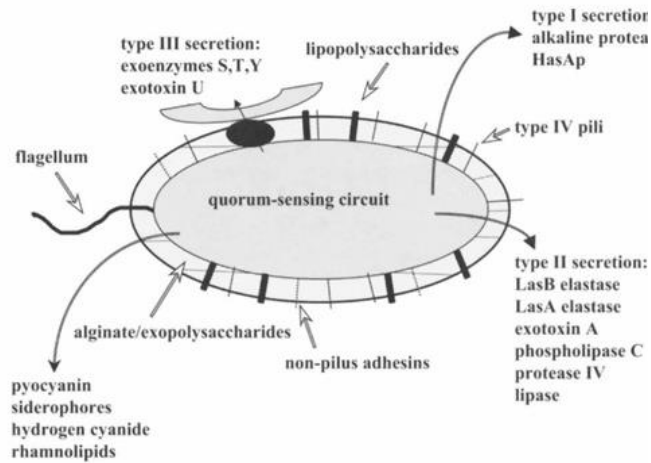


Şekil 4: Swarming hareketi ve ramnlipit ilişkisi (Meliani ve Bensoltane'dan, 2015).

Sitotoksin: Önceleri lökositin olarak bilinen sitotoksin, 25,000 mol ağırlığında toksik bir protein olup, nötrofil fonksiyonlarını inhibe eder. *P. aeruginosa*'da bulunan bu toksin “yetişkin solunum stresi sendromu” adı verilen akciğer hasarına yol açar (Vasil ve Ochsner, 1999; Kim ve ark., 2005; O'May ve ark., 2009).

Slime faktör: *P. aeruginosa*'nın bazı koşullarda oluşturduğu polisakkarit kapsül yapısına “slime tabakası” denir. Bu tabaka, konakçının bağışıklık sistemini etkileyerek, etkeni konak savunmasından korur (Lagournintzis ve ark., 2003).

Tip III Sekresyon Sistemi (T3SS): Bu sistem, hedef hücre üzerinde por açmak suretiyle, pilus benzeri bir oluşum oluşturur. Bu oluşum sayesinde iki hücre arasında köprü oluşur ve bu köprü yardımıyla da *P. aeruginosa*'nın efektör proteinleri ökaryot hücre stoplazmasına iletilir. Bu proteinler, aktin hücre iskeletini ve protein sentezini inhibe ederek hücreli alışverişi bozar. T3SS, *P. aeruginosa* dışında diğer patojen bakterilerde de bulunur (Kipnis ve ark., 2006). T3SS sayesinde, ekzoenzim (ekzo) S, T, Y ve U toksinleri salınır (Hauser, 2009). Ekzo S ve T, birden fazla enzimatik ve kimyasal role sahiptir. Ekzo S ve A'nın birlikte bulunduğu enfekte hastalarda, mortalite oranı daha yüksektir. Ekzo S ise hücreli apoptozis için gereklidir. Akciğer enfeksiyonlarında doğrudan doku hasarına yol açarak etkenin invazyonunda rol oynar (Nicas ve ark., 1985). Ekzo T, *P. aeruginosa*'nın makrofajlar tarafından alınmasını engeller. Ekzo T'nin yara iyileşmesini inhibe edici özelliği de vardır (Shaver ve Hauser, 2004). Ekzo U, fosfolipaz A2 benzeri aktiviteye sahip olan güçlü bir sitotoksindir (Mitov ve ark., 2010).



Şekil 5: *P. aeruginosa*'da QS döngüsü ve bu döngünün düzenlediği virulans faktörler (van Delden'den, 2004).

2.4. Quorum Sensing ve *P. aeruginosa*'nın Patojenezindeki Rolü

Biyofilm; mikroorganizmaların birbirleriyle, buldukları yüzeylerle veya buldukları yüzeylerden daha alt tabakalara yani ara yüzeylere geri dönüşümsüz olarak tutunmalarını ve yapışmalarını sağlayan, aynı zamanda büyüme oranı ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotipik özellikler kazanarak salgıladıkları “ekstraselüler polimerik substans (EPS) (hücre dışı polimerik madde) matriksine verilen addır (Shunmugaperumal, 2010). Biyofilm oluştuğunda, mikro çevredeki değişiklikler gen ekspresyonlarında da değişiklikler oluşturarak biyofilmin oluşumunu hızlandırmaktadır. Biyofilm oluşturan genetik materyal plazmidler aracılığı ile de kolaylıkla aktarılmaktadır. Biyofilm oluşumu beş evrede gerçekleşir (Post ve ark., 2004). Bu aşamalar;

- 1) Yüzeyin uygun duruma getirilmesi (Surface conditioning),
- 2) Geri dönüşümlü tutunma (reversible attachment),
- 3) Geri dönüşümsüz tutunma (irreversible attachment)
- 4) Kolonizasyon ve
- 5) Kopma

Biyofilm sayesinde EPS içerisine gömülü olarak yaşamlarını sürdüren mikroorganizmalar immün sistem elamanlarından, antibiyotiklerden, patojenlerin üretmiş olduğu antimikrobiyal ürünlerden, fiziksel, kimyasal ve biyolojik streslerden korunurlar (Nouraldin ve ark., 2016). Hatta son çalışmalar biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı 1000 kat daha dirençli olduğunu ortaya koymuştur. Böylece biyofilm içindeki mikroorganizmalar yaşadıkları çevrede planktonik formlarına göre daha fazla hayatta kalma ve büyüme şansına sahip olurlar (Hassan ve ark., 2011).

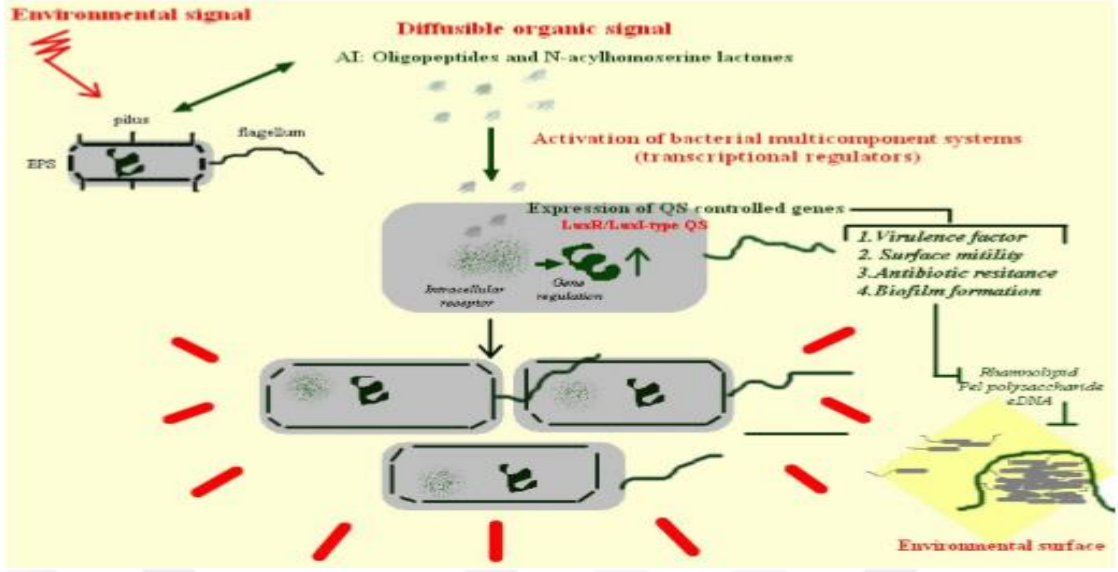
2.4.1. Quorum Sensing Sistemi

Bakteriler biyofilm oluşturabilmek amacıyla bitişinde yer alan bakteri hücrelerinin de biyofilm oluşturması yönünde uyarabilmek için ortama küçük, diffuze olabilen moleküller yayarlar. Hücreler arasındaki bu iletişim, “**Quorum Sensing**” (QS) adı verilen sistemler ile gerçekleştirilmektedir. Ancak, hücre-hücre işaretlenmesi ile ilişkili olan bu tip kimyasallar, yapıları oldukça farklı olan ve sürekli genişleyen moleküllerin toplanmasını temsil ederler. QS sistemindeki mekanizma, kendiliğinden sinyal üretebilen Autoinducer (AI) moleküllerinden oluşur. Bu ifadenin nedeni,

üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermeleridir (Novick ve Muir, 1999). Bazı mikroorganizmalar ise birden fazla farklı QS molekülü kullanmaktadır. QS sistemi iki şekilde gerçekleşir; türler arası ve tür içi sinyal molekülleriyle iletişim. Gram negatif bakterilerde türden türe QS mekanizmasında AI molekül olarak *N*-acyl homoserin lakton (AHL, AHLs, acyl-HSL veya HSL), Gram pozitif bakterilerde çoğunlukla oligopeptidler (AI peptitler) (Wong, 1998), hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler ortak olarak AI-2 'leri de kullanmaktadır (Rafa ve ark., 2005).



Şekil 6: Çeşitli basamaklarda görülen biyofilm yaşam döngüsü. Başlangıç aşaması: Brown hareketi ile bakterinin tutunması, İkinci aşama: Flagella yoluyla hareket ve fizikokimyasal çekicilik (van der Waals etkileşimi). İkinci ve Üçüncü aşamalar: Bu aşamalarda geri dönüşümlü ve geri dönüşsüz ataçmant, flagella ve fimbriya ile yüzeye bağlanma. Dördüncü aşama: Hücre bölünmesi ile biyofilm olgunlaşması ve özellikle polisakaritlerin hakim olduğu ekstraselüler matriks ile biyofilmin bir arada tutulması. Beşinci aşama: Biyofilm matriksinin kısmen parçalanması ve planktonik faza geri dönülmesi. Bazı bakterilerin diğer yüzeye kolonize olmak için kaçması (Meliani ve Bensoltane'dan, 2015).



Şekil 7: *P. aeruginosa* başta olmak üzere *Pseudomonas* spp. oto-indüktör (AI) molekülü (N-acyl homoserin lakton) laktonların (AHL) üretimi (Meliani ve Bensoltane'dan 2015).

QS sistemi, birçok bakteri tarafından kullanılan, virulans faktör üretimi, hareketlilik ve biyofilm şekillenmesini koordine eden, diffüze olabilir sinyal moleküllerini üretimi ve algılanmasıyla bakteri topluluklarının yoğunluklarını saptamak için kullanılan bir hücre-hücre iletişim şeklidir (Jimenez ve ark., 2012). *P. aeruginosa* iki ana QS sistemine sahiptir. Bunlar, AI sinyal moleküllerinin üretimini (LasI ve RhII sentezi yoluyla) ve algılanmasını (LasR ve RhIR transkripsiyonu) yönlendiren *las* and *rhl*' dir. *Las*' in AI sinyal molekülü N-(3-oxododecanoyl)- L-homoserine lactone (HSL) (3-oxo-C₁₂-HSL), *rhl*' nin AI sinyal molekülü ise N-butanoyl L-homoserine lactone (C₄-HSL)'dur (Jimenez ve ark., 2012). Üçüncü QS sistemi ise Quinolon sinyal (PQS) temeline dayanır. Bu QS sistemi ise acyl homoserine lactones (AHLs) sistemi olup, kapsamlı bir yoldur.

QS sistemi, yoğun bakteriyel topluluğun tanınmasında oldukça önemlidir. Bu tip bir düzenleme topluluk seviyelerinde bakterilerin davranışlarını kontrol eder (Davies, 2003). Bu aşamada tutunma, kimyasal bağlanmadan ziyade elektrostatik bir etkileşimle olduğu için geri dönüşümlüdür. Ancak, hücrelerin bazıları daha sıkı bağ kurmak amacıyla yapılar şekillendirir, bu da biyofilmin ikinci basamağı olan geri dönüşümsüz (irreversibl) bağlanma için avantaj sağlar (Costerton ve ark., 2004). Bakteri hücrelerinin yüzeye EPS üretimi için geri dönüşümsüz bağlanması, bakteri hücrelerinin membrana bağlı uyarıcı proteinlerin uyarımı sonucu şekillenir (Boyd ve

Chakrabarty,1995). Bu uyarım, bakteri hücreleri arasında köprüler kurulması ve sonrasında yüzeyde bakteri kümelerinin oluşumuna izin verir (Donlan, 2002; Hall-Stoodley ve ark., 2004). Biyofilim bileşiminde yer alan “Birleşmiş Protein Yapısı” (Biofilm associated protein-BAP) sayesinde organizmalar yüzeye kolonize olabilir ve burada sürekli kalabilir. Bu nedenle BAP oldukça önemlidir (Tormo ve ark., 2005). Örneğin, aljinatın *P. aeruginosa*'nın yüzeye yapışmasında ve biyofilm geliştirilmesinde tamamlayıcı olduğu bilinmektedir (Davies ve Geesey, 1995; Hall-Stoodley ve ark., 2004).

Tutunma işleminden sonra, biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, QS sisteminden gelen haberleşme sistemindeki yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama mesaj veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün (AI) konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler hücrelerarası ve düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlarlar (Şahin, 2007).

Yapılan çalışmalar ile tek hücreli bakterilerin birbirleri ile iletişim kurabildiği ve değişen bir ortama yanıt verebildikleri gösterilmiştir. Bu tür bir hücreden hücreye iletişim dizgesinin (çoğunluğu algılama), bakteri topluluklarında gen sunumunun uyumu ve işlevsel yönetiminde temel roller oynadığı bilinmektedir. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak QS sistemi; bakteriler küçük işaret moleküllerinin birikimine yanıt verirler, ortamı tararlar ve salınımda bulunurlar. Bu tür etkileşimlerin sonucunda da bir grup hedef genin düzenlenmesi sağlanır (Dong ve Zhang, 2005). Bu mekanizma, belli bir işaret yoğunluğuna ulaşıldığında, bazı genlerin açılmasını garantiler.

2.4.2. *Pseudomonas* 'larda QS Sistemi

P. aeruginosa ve diğer Gram negatif bakteriler tarafından üretilen ve tür içinde kullanılan AI'lerinin ana sınıfın “N-Açıl homoserin laktonlar (AHLs-N-acylated homoserine lactone)” oluştururlar. AHL'ler 4 ile 18 karbon (C) uzunluğunda acyl zincirlerini taşıyan homoserin lakton (HL) halkalarından oluşmaktadır. Bu yan zincirlerde C₃ pozisyonunda ya da doymamış çift bağlarda nadiren modifikasyonlar görülür (Fuqua ve ark., 2001).

P. aeruginosa'da bulunan QS sistemi hiyerarşik bir QS döngüsü tarafından kontrol edilir. *P. aeruginosa*'da üç ana QS sistemi bulunur. Bu sistemler;

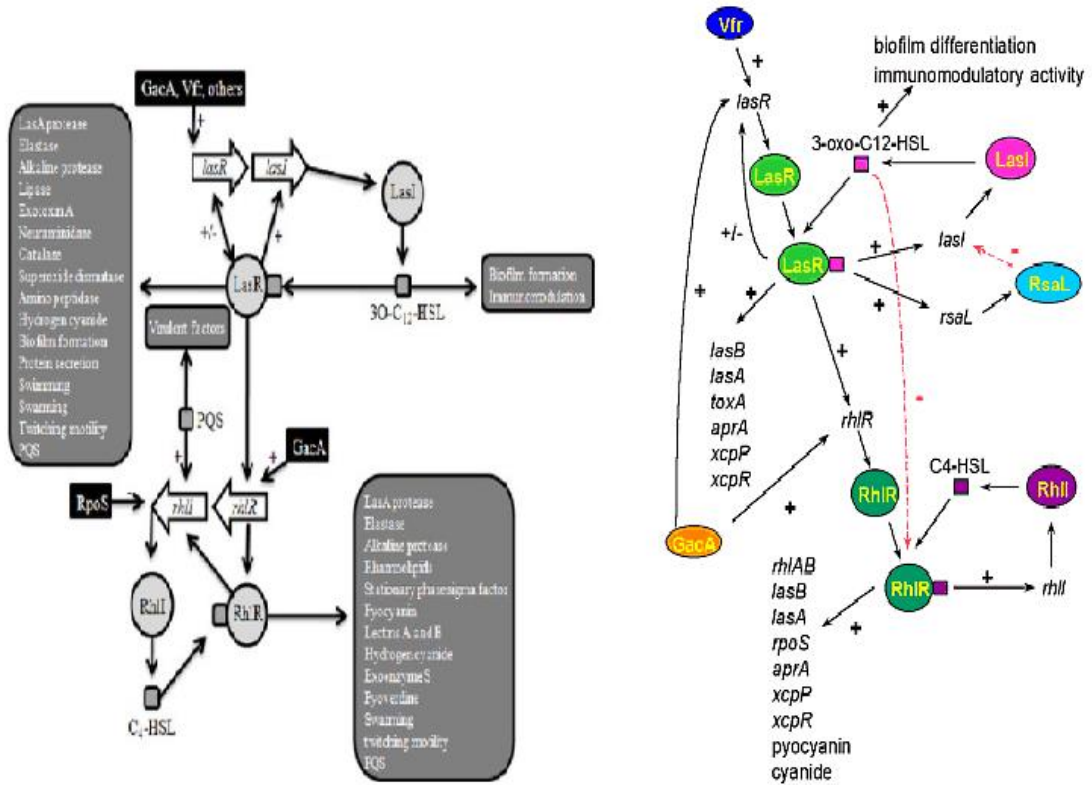
- 1) LasI-LasR,
- 2) RhlI-RhlR
- 3) PQS-MvfR.

Bu sistemler, biyofilm formasyonu ve virulans faktör üretimi için gen ekspresyonunu kontrol eder. *P. aeruginosa*'nın QS sistem genlerinin fonksiyonları tek başlarına çalışmayıp birlikte fonksiyon gösterirler. Başka bir ifadeyle, *rhl* genlerinin ekspresyonu *las* genlerinin regülasyonu altında gerçekleşmektedir (Girard ve Bloemberg, 2008). Kısaca açıklanırsa; AI sentaz geni LasRI sisteminden oluşur. Bu sistemlerden *lasI* ekstraselüler diffuze olabilen AHL sinyal moleküllerini ve N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactonu (OdDHL) üretir. OdDHL transkripsiyonel regülatör olan *lasR* tarafından tanınır. *lasR* daha sonra *RhlI-RhlR* sistemini etkileyen çeşitli gen ekspresyonunu yönetir. Nitekim *rhlI* N-butyryl-L-homoserine lactone (BHL) sinyal molekülünü üretir (Şekil 8). Bu molekül onun akrabası olan transkripsiyonel regülatör Rh1R'yi bağlayabilir. LasR ve Rh1R transkripsiyonel regülatörler yüksek yoğunluktaki *P. aeruginosa*'ların varlığında şekillenen yeterli düzeyde OdDHL ve BHL olduğu zaman aktive olur (Pesci ve ark., 1997; Venturi ve ark., 2006). Hücre yoğunluğundaki artış ile AI intraselüler konsantrasyon düzeyi üç katına ulaşınca kadar birikir. Bu kritik konsantrasyonda, onlar uygun düzenleyici proteini bağlarlar (Fuqua ve ark., 1996). Regülatör-protein AI kompleksleri onların artan hedef genlerin yukarı yöndeki spesifik DNA dizilimini bağlarlar. Bu sistemler, bu yüzden bakterilerin birbirleriyle iletişimine (hücre-hücre sinyalleşmesi), kendi yoğunluklarının algılamasına ve koordineli bir şekilde davranmalarına, bireysel hücreden daha ziyade bir topluluk olarak spesifik genlerin ekspresyonuna izin verir (Van Delden ve Iglewski, 1998). LasRI sistemi LasB ekspresyonunu düzenler ve LasA proteaz ve ekzoA gibi diğer ekstra-selüler virulans faktörlerin optimal üretimi için ihtiyaç duyulur. Bu sistem *P. aeruginosa* sekresyon yolağında proteinleri kodlayan *xcpP* ve *xcpR* genlerinin transkripsiyonunu başlattığı da gösterilmiştir (Gambello ve ark., 1993)

PQS-MvfR sisteminde, 2-heptil-3-hidroksi-4 (1H) kinolon ve onun prekürsörleri transkripsiyonel regülatör MvfR'yi bağlar ve sonrakileri kontrol eder

(Kennedy ve ark., 2010). Bu molekül (2-heptil-3-hidroksi-4 (1H) kinolon) homoserin lakton ailesine ait değildir. *lasB* geni, Las ve Rhl sistemi ekspresyonunu kontrol eden *P. quinolone* sinyali tarafından dizayn edilmiştir. PQS ekspresyonu LasR'ye bağlıdır ve RhlR geni ekspresyonunu artırır. Bundan dolayı PQS Las ve Rhl sistemleri arasında bir bağ olarak rol oynar (Pesci ve ark., 1999).

LasI-LasR ve *RhlI-RhlR* QS sistemi *P. aeruginosa*'nın virulansını kontrol etmede ardışık olarak fonksiyon gösterir. Yapılan çalışmalarda QS ile ilgili olarak, *P. aeruginosa*'nın kromozomal genlerinin % 6-10'u AHL'ler tarafından düzenlendiği ve diğer *Pseudomonas* spp.'nin de aynı sistemi kullandığı bildirilmiştir (Arevalo-Ferro ve ark., 2003).



Şekil 8. *P. aeruginosa*'da QS sistemi (Alipour ve ark.'dan 2008; van Delden'den 1998)

Bunların dışında *P. aeruginosa* ve diğer Gram negatif bakterilerde LuxL/LuxR düzenleyici sistem de bulunmaktadır. LuxL/LuxR düzenleyici sistem, bakterilerdeki QS aracılığıyla yapılan gen ekspresyonunun kontrolü için gereken sistemdir. LuxL ve LuxR homologları çok sayıda bakteriyel genomda tanımlanmıştır. LuxIR tipi QS sistemler gen ekspresyonuna göre hücre yoğunluğunu kontrol ederler (Case ve ark., 2008). Pozitif

feedback (geri-besleme) mekanizması genel olarak AHL QS sistemleri bağı olan LuxI tipi gen ekspresyonlarını aktive eden LuxR tipi proteinleri içerirler. AHL AI molekülleri spesifiktir ve belirli bir AHL molekülü sadece onu üreten türler tarafından tespit edilir. Böylelikle AHL tipi QS sistemleri çoğunlukla türler içi hücre iletişimini teşvik eder (Schuster ve ark., 2004). QS sinyal (N-3-oxooctanoyl-L-homoserine lactone) (3OC₈HSL) eksikliğinde TarR tamamlanamaz ve hızlıca yok olurlar (Zhu ve Winans, 2001). *P. aeruginosa*'da bulunan QS sistemi hiyerarşik bir QS döngüsü tarafından kontrol edilir.

QS sistemi biraz daha açıklanacak olursa; *lasI* ve *rhII* genleri Als olarak adlandırılmaktadır. *Las* geninin fonksiyonu ilk olarak *LasB* elastaz enzim aktivitesinin bulunmasıyla ortaya çıkmıştır. Bundan dolayı *P. aeruginosa* QS sisteminde *las* geni olarak adlandırılmıştır. *Rhl* geni adlandırılmasının nedeni ise ramnolipid üretimindeki büyük rolüdür. *Rhl*, ramnolipid üretiminde gerekli olan ramnosil tranferaz enzimi kodlayan *rhlAB* olarak adlandırılan bir operonun ekspresyonunu düzenler. *LasI*; QS'de AI sentaz olan N-(3-oxododecanoyl)-homoserin laktonu (3-oxo-C₁₂-HSL) kodlar (Pesci ve ark. 1997; Van Delden ve Iglewski, 1998). Bu QS signal serbest olarak *P. aeruginosa* hücrelerine diffuze olabilir. AI'ler belli bir kritik alt sınır konsantrasyonuna ulaştığı zaman, AI'ler LasR proteine bağlanır ve daha sonra LasR-AI kompleks şekillenir. Bu kompleks daha sonra pek çok virulans faktörleri kodlayan genlerle birlikte bir seri hedef genleri tetikler. Örneğin; *toxA* (toksin A), *lasA* (elastaz), *lasB*, *aprA* ve *xcpR* ve *xcpP* gibi. Bu genlerin yanısıra, LasR-AI kompleksler *lasI* genlerin salımına neden olur (Şekil 8). İkinci gen olan *RhII*; N-butyryl-homoserin lakton'u (C₄-HSL) kodlar. Bu *RhII* geni ramnolipid, elastaz, piyosiyenin, siyanid gibi faktörlerin üretimini kontrol eder. Bu moleküller *LasR* ve *RhIR* olarak adlandırılan transkripsiyonal regülatörleri aktive eder (Smith, 2003) (Şekil 8). Böylece, biyofilm içerisindeki bakteriler virulans faktörlerin salımını artırarak patojenezde rol oynamaktadır. Bakterinin virulans faktörleri hücrelerdeki sıkı bağlantıları parçalayarak epitel geçirgenliğini artırır ve enfeksiyon bölgesinde nötrofil sayısının çoğalmasına yol açar. Bu durum interlökinlerin üretimini uyararak pro-inflamatuvar etki gösterir (Salyers, 1994). 3-oxo-C₁₂-HSL ve C₄-HSL moleküllerinin epitelyal hücrelerin membran bütünlüğünü bozduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu 3-oxo-C₁₂-HSL sinyal molekülünün bir hücre ile etkileşime girmesi; o hücrede inflamasyonu ve apoptozisi

uyarır (Wu, 2005). Özellikle pro-inflamatuar sitokinlerden Cox-2, IL-6, IL-8 ve daha birçoğunun artışına da neden olmaktadır (Alcorn, 2004).

QS sistemleri genlerin ekspresyonunda AI veya haberci moleküller ile büyük bir role sahiptirler. C₁₂-HSL AI fibroblast ve bronşiyal epitel gibi insan akciğer yapısal hücrelerinde IL-8 üretimine neden olurlar. AI aynı zamanda inflamasyonda büyük rol oynayan akciğer fibroblast hücrelerinde prostoglandin E2 ve siklooksigenaz-2 üretimini stimüle eder. Bunların ötesinde, molekül nötrofil ve makrofajlarda apoptozisi artırır. Bundan dolayı yukarıda bahsedilen gen üreten virulans faktörlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde AI'ler aynı zamanda konak immun sistem fonksiyonu içinde modülatör bir faktördür (Smith ve ark., 2002).

2.4.3. *P. aeruginosa* QS sisteminin özellikleri

a) Sistem yarışmacı nitelik taşımamaktadır. Bunun anlamı iki sistemin ürünleri arasında herhangi bir ilişkinin bulunmamasıdır.

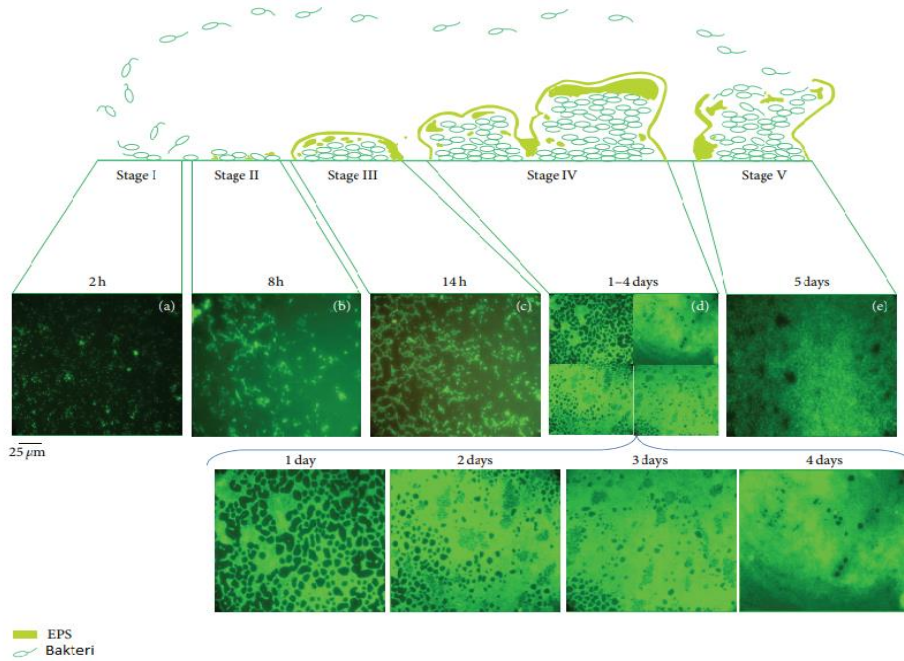
b) Bazı bakteriyel genler iki çift gen tarafından kontrol edilirken, bazıları ise tek gen tarafından kontrol edilirler. Bu genler kendi kontrolleri altındadırlar. Buna göre LasR proteini/C₁₂-HSL, *lasI* geninin kontrolü altındadır. Bunlar *rhIR* geninin ekspresyonunu regüle ederler. RhIR proteini/C₄-HSL de *rhII* gen transkripsiyonunu regüle eder.

c) C terminali, ATG başlangıç kodonunun 40 bp akışında LAS-Box'a bağlanan helix sarmalını motife eder. Las-Box 20 baz çifti bölgesinden oluşur. C-terminalindeki amino asitler polimerizasyona katılırlar.

d) RhI sistemin R proteini C₄-HSL varlığında ya da yokluğunda bir dimer oluşturur ve DNA'ya bağlanırlar. AI'e bağlanması durumunda hedef genin ekspresyonunu etkileyebilir (Pesci ve ark., 1999).

***P. aeruginosa*'nın Biyofilm Yaşam Döngüsü:** Biyofilm şekillenmesi sonsuz bir döngüdür. Biyofilmde organize edilmiş bakteriler, bir yüzeyde bakteri hücrelerini birlikte tutan ekstraselüler polimerik substant (EPS) matriksi içine gömülüdürler; bunlar bütün mikrobiyal enfeksiyonların %65-80'inini temsil eder. Bu mikroskobik dünyada, biyofilm mecazi anlamda "mikrop şehri" olarak adlandırılır ve EPS ile birlikte total biyofilm kitlesinin %85'ini oluşturur ve "biyofilm hücreleri evi" olarak adlandırılır. EPS esas olarak biyomoleküller, ekzopolisakkaritler, ekstraselüler DNA (eDNA) ve

biyofilmin mimarisini ve tüm yapısal iskeletinine katkı sağlayan yüksek hidratlanmış (su ile birleşmiş) polar bir karışım olan polipeptidlerden oluşur (Sutherland, 2001; Flemming ve Wingender, 2010). *P. aeruginosa* suşlarına ve/ veya besinsel durumlara bağlı olarak, farklı biyofilm fenotipleri oluşabilir (Shrout ve ark., 2006). Örneğin, glukoz minimal besiyerinde, *P. aeruginosa* PAO1'in biyofilm yaşam siklusu 5 büyük fenotipik aşamasına ayrılabilir (Şekil 9). Planktonik bakteri, çoğalmak için uygun bir yüzeyin üzerine geri dönüşümlü olarak adeze olmasıyla başlar (Şekil 9a, Aşama 1), bunu geri dönüşümsüz bakteri ataçmanı takip eder ki daha sonra EPS matriksinde mikrokoloniler şekillenir (Şekil 9 (b), Aşama II). İlerleyen bir şekilde, bakteriyel mikrokolonileri genişler ve onların birleşmesi kolonize olmayan boşluklar ile daha fazla yapısal fenotiplere yol açar (Şekil 9 (c), Aşama III). Daha sonra, kolonize olmayan boşluk bakteri ile dolarak sonunda tüm yüzey kaplanır (Şekil 9 (d), Aşama IV) (Rasamiravaka ve ark., 2015).



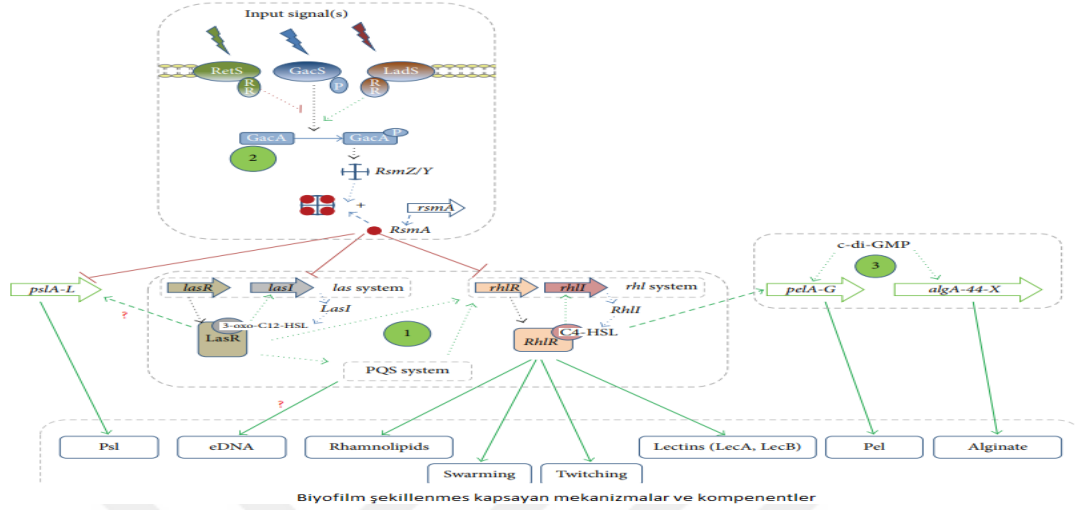
Şekil 9. Glukoz minimal besiyerinde çoğalan *P. aeruginosa* PAO1'in biyofilm yaşam siklusu. Birinci aşama (2 saat), planktonik bakteri abiotik bir yüzeye tutunmayı başlatır ki bu II. Aşamada (8 saat) geri dönüşümsüz olur. III. Aşamada (14 saat) mikrokoloni şekillendirmek için haberleşme. IV. Aşamada (1 ila 4 gün) biyofm olgunlaşması ve üç açılı topluluk için çoğalma haberleşmesi. V. Aşamada (5 gün) ayrılma görülür ve biyofilmden salınan planktonik bakteri diğer bir alanda kolonize olur (Rasamiravaka ve ark.'dan, 2015).

Bu arada, 3-açılı topluluk gözlenir (Şekil 9, Aşama II ve IV). Sonunda, bakteri sesil yapıdan kopar ve yayılmak ve diğer yüzeylere kolonize olmak için planktonik duruma geçer (Davey ve ark., 2003) (Şekil 9e, Aşama V). *P. aeruginosa* biyofilmin yapısını stabilize edebilmek için en az 3 polisakkarit (aljinat, Pel ve Psl) ürettiği saptanmıştır (Ghafoor ve ark., 2011). Mukoid ve mukoid olmayan suşlar biyofilm içindeki polisakkaritlerinin kalitatif kompozisyonları farklıdır. Mukoid olanlarda aljinat, mukoid olmayanlarda ise Psl/Pel'den oluşur (Ma ve ark., 2009). D-mannuranik Asit ve L-guluronik asitten oluşan aljinat (Ertesvag ve Valla, 1998) biyofilmin yapısal stabilitesi ve korunmasına katkıda bulunduğu gibi su ve besin elementlerinin muhafaza etmesine de katkı sağlar (Sutherland, 2001). Pel polisakkarit esas olarak glukozca zengin matriks materyali olup, bileşimi hala bilinmemektedir (Friedman ve Kolter, 2004). Psl D-mannoz, L-ramnoz ve D-glukozdan oluşan tekrar eden pentasakkaritten oluşur (Byrd ve ark., 2009). Pel ve Psl biyofilm gelişmesi için ana yapısal iskelet olarak hizmet eder ve biyofilm oluşumunun erken aşamasını kapsar (Vasseur ve ark., 2005). eDNA *P. aeruginosa* biyofilm matriksinin önemli fonksiyonel bileşimini oluşturur; dahası (i) *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu DNase I'e maruz kalınmasıyla önlenir (Swartjes ve ark., 2013); (ii) eDNA'dan yetersiz olan biyofilmler deterjan sodyum dodesil sülfata daha hassas olduğu gözlenmiştir (Yang ve ark., 2007); (iii) eDNA titreme (twitching) hareket-aracılı biyofilm genişlemesine olanak sağlar (Gloag ve ark., 2013); (iv) eDNA *P. aeruginosa*'nın hücre-hücre bağlantı bileşikleri olarak biyofilmin başlangıç ve erken gelişmesinde önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Flemming ve Wingender, 2010); ve (v) son olarak, eDNA açlık sırasında bakterinin besin kaynağını oluşturur (Mulcahy ve ark., 2010).

Bakteriyal hareketlerinin arkasında (Kohler ve ark., 2000), *P. aeruginosa*'nın ekstraselüler yapıları (flagella, tip IV pili ve fimbriyalar) biyofilmde hücre-hücre etkileşimiyle geri dönüşümsüz tutunmada adesiv rol oynadığı gibi mikrokolini şekillenmesinde de rol oynar. Bu hareket organelleri olmaksızın mikrokoloniler gelişemez (O'Toole ve Kolter, 1998).

***P. aeruginosa* Biyofilm Şekillenmesini Kapsayan Regülatör Sistemi:**
Biyofilm şekillenmesinin kompleks düzenlenmesi esas olarak EPS üretimi ile ilişkili QS

sistemi ile iki-bileşimli regülatör sistemi dahil çoklu bakteriyel makineleri kapsar (Rasamiravaka ve ark., 2015). Bu oluşumlar Şekil 10’de özetlenmiştir.



Şekil 10. *P. aeruginosa* biyofilm şekillenmesinin düzenlenmesinde rol oynayan ilgili bakteriyel sistem ve faktörler (1) Quorum sensing sistem ; (2) İki-bileşimli regülatör sistemi GacS/GacA ve RetS/LadS (RR:cevap düzenleyici hüküm süren alıcılar; P: fosforilasyon) yolağı; (3) Ekzopolisakarit üretimi ve c-di-GMP birleştiren düzenlemeler (Rasamiravaka ve ark.’dan 2015).

2.4.4. QS Sistem Mekanizması ve Biyofilm Şekillenmesi

QS sistemi birçok bakteri tarafından kullanılan, virulans faktör üretimi, hareketlilik ve biyofilm şekillenmesini koordine eden diffuze olabilir sinyal moleküllerini üretimi ve algılanmasıyla bakteri topluluklarının yoğunluklarını saptamak için kullanılan bir hücre-hücre iletişim şeklidir (Jimenez ve ark., 2012). *P. aeruginosa* iki ana QS sistemine sahiptir. Bunlar, Autoinducer (AI) sinyal moleküllerinin üretimini (LasI ve RhlI sentezi yoluyla) ve algılamasını (LasR ve RhlR transkripsiyonu) yönlendiren *las* and *rhl* ‘dir. *Las*’ın AI sinyal molekülü N-(3-oxododecanoyl)- L-homoserine lactone (HSL) (3-oxo-C₁₂-HSL)’nu, *rhl* ‘nin AI sinyal molekülü ise N-butanoyl L-homoserine lactone (C₄-HSL)’dur (Jimenez ve ark., 2012). Üçüncü QS sistemi ise Quinolon sinyal (PQS) temeline dayanır. Bu QS sistemi ise acyl homoserine lactones (AHLs) sistemi olup, kapsamlı bir yoldur.

Biyosümfaktan ve virulans faktörün ötesinde (van Gennip ve ark., 2009), *rhl* sisteminin kontrol altında olan ramnolipitler (Dusane ve ark., 2010), *P. aeruginosa* tarafından biyofilm şekillenmesinde birçok role sahiptir. Bunlar (i) mikrokoloni şekillenmesi, (ii) hücre-hücre ve hücre-yüzey etkileşimini bozarak bakteriyel kolonizasyonu önleyen yapısal kanalların açılmasının sürdürülmesi (Davey ve ark., 2003), (iii) *P. aeruginosa* biyofilmde üç-açılı mantar-şekilli yapısal şekillenmesini kurmaktır (Pamp ve Tolker-Nielsen, 2007).

2.5. Balıklarda *Pseudomonas*'ın Önemi

Pseudomonas'lar etyolojik ajan olarak akuatik çevrede yaygın olarak bulunan ve balıklarda bakteriyel hemorajik septisemi, bakteriyel yüzgeç hastalığı, bakteriyel solungaç hastalığı, bakteriyel kızıl hastalığı, turna balıklarında kızılıyara (leke) hastalığı, sazanlarda asites, alabalıklarda kızıl ağız ile enfeksiyöz abdominal damla gibi hastalıklara neden olurlar. *Pseudomonas* enfeksiyonu özellikle kültür balıkçılığı yetiştiriciliğinde stres ile ilişkili tatlısu balık hastalığı olarak da karşımıza çıkmaktadır (Thomas ve ark., 2014). Balıklarda *Pseudomonas* enfeksiyonu "Kırmızı Deri" (Red Skin) olarak adlandırılan ve tüm yıl boyunca görülen hastalığın gelişmesine neden olmaktadır (Mastan, 2013). Ayrıca bu etken, *Aeromonas* ile birlikte balık hastalıklarının etyolojik etkenleri arasında en önemli iki balık patojeni olarak düşünülmektedir. Bu mikroorganizmalar balıklarda ülseratif sendroma, bakteriyel hemorajik septisemiye, ülser tipi hastalıklara, kuyruk (özellikle kaudal bölgede) ve yüzgeçlerde erozyon ve kopmalara (tail and fin rot), bakteriyel solungaç kopmalarına ve ödeme neden olurlar (Paniagua ve ark., 1990).

Bu cins içinde yer alan *P. anguilliseptica*, *P. fluorescens* ve *P. chlororaphis* türleri balıklarda görülen hastalıkların en yaygın türleridir. Ancak, pek çok *Pseudomonas* türleri non-patojenik veya sadece stres ya da zedelenmiş hastalık direnci ile ilişkili sekonder enfeksiyonlara neden olur. *Pseudomonas anguilliseptica* kalkan balığı dahil, kültüre edilmiş balıklar için en önemli etkenlerden biri olarak düşünülmektedir (Toranzo ve ark., 2005). Ancak bu cinsin diğer türleri, örneğin ayı balığında *P. plecoglossicida*, bazı somon balığı türlerinde (*Oncorhynchus masou macrostomus*) *P. chlororaphis*, Güney-Amerika yayın balığında *P. aeruginosa*, ayı balığı, gökkuşacağı balığı ve sarıkuyruk balıklarında *P. putida*, alabalık, mercan balığı ve

tatlısu çipurasında *P. fluorescens* ciddi balık patojenleridir (Austin ve Austin, 2007). *P. baetica* sp. nov. ise dil balığından (*Dicologlossa cuneata* –Moreau-) izole edilen yeni balık patojenlerindedir (López ve ark., 2012).

P. fluorescens, *P. anguilliseptica*, *P. aeruginosa* ve *P. putida* çeşitli balık türlerinde *Pseudomonas* septisemisinin başlıca etkeni olarak tanımlanmıştır (Altınok ve ark., 2006). Hastalık belirtileri arasında peteşiyal hemoraji, deri renginde koyulaşma, pul dökülmesi, abdominal asides ve ekzoftalmus görülür (Austin, 2007). Bazı *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. sobria* ve *A. caviae*) ve bazı *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida* ve *P. aeruginosa*) türleri balıkçılıkla uğraşan kişilerde, çiftlik balıkları arasında ise Nil çipurasında (*Oreochromis niloticus*) çok ciddi salgınlara da neden olmuştur (Ahmed ve Shoreit, 2001).

***P. fluorescens*:** Tatlısu ekosistemnin dominat florasını oluşturan *P. fluorescens*, balıklarda septisemi ve ülseratif durumlarla ilişkili bulunmuştur (Darak ve Barde, 2015). *P. fluorescens*, sazan balığı dahil birçok kültüre edilen balıkların da patojen etkenidir (Khalil ve ark., 2010). Bu etken, çevre koşullarının uygun olmadığı ve stres faktörlerinin fazla olduğu durumlarda ortaya çıkarak balıklarda inaktivasyona, yavaş yüzmeye, renkte koyulaşmaya, ekzoftalmusa, yüzgeç tabanında, çene altında ve vücudun yan taraflarında kanamalara, anüste prolapsusa, hiperemiye, solungaçlarda şişkinlik ve hemorajiye ve yüzgeçlerde dejenerasyona neden olur. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, bu etken alabalıklarda % 5,3 ve sazanlarda % 12 oranında saptanmıştır. Mortalite oranı, kış sonu Mayıs-Haziran döneminde günlük popülasyonun %5'ine ulaşabilir. Hasta balıklarda akut veya kronik karakterde hemorajik septisemiye neden olabilir. Deri lezyonları en çok görülen belirtidir. Bunu hematopoetik doku lezyonları izler. Ayrıca kuyruk ve yüzgeç lezyonları, asides, iç organlarda kanama ve ülserlere de sıkça rastlanır (Arda ve ark., 2002).

***P. anguilliseptica*:** Bu etkenin neden olduğu enfeksiyonlar daha çok yılan balıklarında rastlanmakla birlikte, kuluçkahanelerdeki yavru balıklarda sık görülmekte ve “sekiten-byo sendrom” veya “red spot disease” olarak adlandırılmakta ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca, hastalık, hafif tuzlu ve denizlerdeki balık türleri için de önemli bir patojen olarak bildirilmiştir. Mezgıt balık yetiştiriciliği yapan

çiftliklerde örneğin mortalite oranı %2 gibi düşük oranda bildirilirken, salmonidlerde [somon alabalığı, gölgebalığı (*Thymallus thymallus*) ve beyazbalık (whitefish)] mortalite oranı %50'ye kadar yükseldiği bildirilmiştir (Wiklund ve Bylund, 1990; Ferguson, ve ark., 2004).

Yılan balık vücudun ventral bölgelerinde, operkulumda, ağız bölgesinde ve deride peteşiyel kanamalar dikkati çeker (Şekil 11). Hastalık daha çok Japonya, Tayvan, İskoçya, Finlandya ve Fransa gibi ülkelerden bildirilmiştir (Wakabayashi ve ark., 1972; Stewart ve ark. 1983; Wiklund and Bylund, 1990). Bu etkenin izolasyonunda mevsimin önemi büyük olup, Finlandiya'daki salmonidlerde görülen salgınlar daha çok su sıcaklığının 15 °C'nin üzerinde olduğu yaz aylarında görülürken (Wiklund ve Bylund, 1990), İspanya'da bu hastalık sıcaklığın 12 °C'nin altında olduğu kış aylarında salgınlar halinde görülmüştür (Domenech ve ark., 1999).



Şekil 11. *P. anguilliseptica* ile enfekte Gökkuşai alabalığı: ventral yöndeki deride ödem ve peteşiyel kanamalar (Vennerström'den 2015).

***P. aeruginosa*:** Etken fırsatçı bir mikroorganizma olmasına rağmen, su ürünleri yetiştiriciliğinde probiyotik olarak da kullanılmıştır (Song ve ark., 2010). Sivakami ve ark. (1996), *P. aeruginosa*'yı *E. coli* ile beraber çeşitli sazan balıklarının (common carp) -Indian sazan balığı (*Catla catla*), Rohu (*Labeo rohita*- Cyprinidae familyası) sazan balığı, beyaz sazan balığı (*Cirrhinus mrigala*) ve sazan balığının (*Cyprinus carpio* L.) dominant bakterisi olduğunu bildirmişlerdir.

P. aeruginosa; polisiklik aromatik hidrokarbanlar (PAHs) ve ham petrolle yüksek derecede kirletilmiş çevrelerde gelişebilirler (Romero ve ark., 1998; El-Naggar ve ark., 2009). Örneğin, PAH grubundan biri olan Benzo [a] pyren, *Pseudomonas* genusunun da dahil olduğu bazı bakteriler tarafından degrade edilebilmektedir. Bu konu ile yapılan bir çalışmada (Juhász ve ark., 1996), *P. cepacia* 'nın temel tuzlu besi yerinde BaP konsantrasyonunu 63 günlük süreci sonunda %20-30 oranında azaltabildiğini bildirmişlerdir.

Bakteriyel balık hastalıkları su ürünleri yetiştiriciliği endüstrisi ve balık çiftlikleri alanlarında meydana gelen büyük bir problemdir. *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan balık hastalıkları Mozambik çipurasının (*Tilapia - Oreochromis mossambicus*) ticari yetiştiriciliğinde de büyük oranda ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Thomas ve ark., 2014).

2.6. Antibiyotik Dirençlilik ve Hayvan Yetiştiriciliğinde Kullanımı

Antibiyotik direnci; bir bakterinin antimikrobiyal maddeler tarafından üremesini veya gelişmesini engelleyici (bakteriyostatik) veya direk bakteriyi öldürücü (bakterisit) etkilerinden korunabilme kapasitesi olarak tanımlanır. Dirençlilik; doğal (intrinsik) ve kazanılmış dirençlilik (ekstrinsik) olmak üzere iki türdür. Doğal dirençlilik, bir bakterinin genetik özelliği nedeniyle bazı antibiyotiklere karşı dirençli olmasıdır. Kazanılmış dirençlilik ise bir bakteriye transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon gibi fiziksel yollarla veya plazmidler, transpozonlar, gen kasetleri ve integronlar gibi hareketli genetik elementler aracılığıyla DNA transferi gerçekleşmesi başka bir deyişle DNA eklenmesi sonucu doğal genetik özelliklerinde değişimler meydana gelerek direnç kazanmasıdır (Kerr ve Snelling, 2009).

Antimikrobiyal maddelerin kullanımındaki artışa paralel olarak, patojen bakterilerde de direnç mekanizmaları çok artmış ve karmaşık bir hal almıştır. Günümüzde yeni antibakteriyel maddelerin geliştirilmesinde yaşanan güçlükler nedeniyle bu konuda yapılan çalışmalar giderek azalmasına karşın, bakterilerin direnç geliştirme aktiviteleri ise devam etmektedir (Mauldin ve ark., 2010). Günümüzde de her geçen gün yeni grup antibiyotikler üretilmektedir.

2.6.1.Gıda-amaçlı Yetiştirilen Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımı

Antibiyotik dirençliliği günümüzde Avrupa Birliği Ülkeleri ile tüm dünyada çok ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation-WHO, 2014) dünyanın bazı kısımlarında antibiyotik dirençliliğinin alarm seviyesine ulaştığını bildirmiştir. Dirençli bakteriler enfeksiyonlardan sorumlu olup, diğer bakterilerle kıyaslandığında tedavileri çok daha güçtür. Tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar daha az ihtiyaç duyulan, daha pahalı ve daha toksiktir. Hatta dirençli bakterilerin bütün bilinen antibiyotiklere dirençli olduğu görülmektedir (ECDC, 2017).

Hayvancılıkta ve kültür balıkçılığında antimikrobiyallerin aşırı kullanımı tarımsal çevrede antimikrobiyal-dirençli zoonotik patojenlerin ortaya çıkmasını desteklemektedir (Cabello ve ark., 2016). Son çalışmalar ve klinik veriler antimikrobiyal dirençli genlerin ve antimikrobiyal dirençli bakterilerin endüstriyel olarak yetiştirilen hayvanlardan ve balıklardan insanlara nakledebileceğini göstermiştir (O'Neill, 2015).

Gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda kullanılan antimikrobiyal miktarlarını saptamak güç olmakla beraber, 2014 yılında 28 Avrupa Üyesi ülkesinde, insanlar için 3,821 ton, gıda-üretim amaçlı yetiştirilen hayvanlarda ise 8,927 ton aktif antimikrobiyal madde satılmıştır (ECDC, 2017a). Bu problem özellikle hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan hemen hemen bütün antimikrobiyal maddelerin yapısının insan hekimliğinde kullanılanlarla ilişkili olup, bu durum çapraz-direnç veya ortak dirençliliğini destekler (EMA/AMEG, 2014). İnsanlarda enfeksiyonların tedavisinde kullanılan en son basamak antibiyotikler (örneğin kolistin) hayvanlarda aşırı miktarda kullanılmaktadır (Santos ve Ramos, 2018).

WHO tarafından insan hekimliği için önemli kritik antibiyotik listesinde yer alan altı grup antibiyotik -aminoglikosidler, makrolidler, pensilinler, kinolonlar, sulfonamidler ve tetrasiklin- tarım ve kültür balıkçılığında yaygın olarak kullanılmaktadır. Hayvancılık ve kültür balıkçılığı yapan büyük üretici ülkeler 51 antibiyotik bu alanlarda kullandıklarını bildiren raporları bulunmakta olup, bu antibiyotiklerin 39'u WHO listesinde yer almaktadır. Bu 39 antibiyotikten 37'si ya kritik olarak önemli veya oldukça yüksek öneme sahip antibiyotik listesinde (Done ve ark., 2015). Polimiksin örneğinde, özellikle çoklu antibiyotik dirençli Gram negatif bakterilere (*Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii* gibi) iyi bir örnektir.

Son yıllarda karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella*) hastane salgınlarında ve çoklu antibiyotik dirençli *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde son basamak antibiyotik tedavisi olarak kullanılan kolistin antibiyotiğine karşı dirençlilik söz konusudur. 2014 yılında, gıda-üretimi için yetiştirilen hayvanlarda polimiksin tüketimi insanlar tarafından tüketilen miktardan çok daha fazladır (ECDC, 2017).

Uzun zamandır, kolistin dirençliliğinin yalnızca kromozomal mutasyonlardan kaynaklanan vertikal naklinin varlığını bildiren raporlar mevcut olmakla birlikte, hareketli genetik elementlerle ilişkili raporlar mevcut değildi. Ancak 2015 yılında (Liu ve ark., 2016) hareketli genetik elementlerden biri olan plazmid-aracılı belirli bir plazmitin üzerine yerleşmiş olan *mcr-1* geni tanımlanmış ve bu genin kolistin dirençliliği ile ilişkisi ortaya konulmuştur. Liu ve ark. (2016) ayrıca, Çin’de, bir bölgede test ettikleri hayvanların %20’sinde ve insanların %1’inde bu genin varlığını saptamışlar ve hayvanlarda kolistin kullanımı nedeniyle dirençliliğin geliştiği ve dirençlilikten sorumlu genin insanlara geçebileceğine işaret etmişlerdir.

2.6.2. Antimikrobiyallerin Kültür Balıkçılığında Kullanımı

Su ürünleri yetiştiriciliğinde yetiştirilen balıklar, strese karşı çok duyarlı olup, bakteriyel kolonizasyon ve enfeksiyonun baskılanması için balık immun sisteminin etkinliğinde uzlaşmıştır (Cabello ve Fundacion, 2003). Enfeksiyonların ortaya çıkışı ve hızlı yayılımını önlemek için, koruyucu amaçlı antibiyotik kullanımı oldukça yaygın bir uygulama olup, bu durum özellikle önleyici başka hiçbir önlem almayan ülkeler için geçerlidir. Kültür balıkçılığında antimikrobiyaller metaflaksi olarak tanımlanan ve genellikle hasta, sağlıklı ve bireysel taşıyıcıları içeren bütün balık topluluğunda kullanılır. Bu nedenle, kültür balıkçılığında antibiyotik dozları proporsiyon olarak diğer hayvanlarda kullanılanlardan çok daha fazladır (Romero ve ark., 2012). Balık yemlerinin içerdiği ilaçlar akuatik çevrede uzun süre varlığını sürdürebilmesi ve su sistemi yoluyla hızlı bir şekilde yayılması, birçok ekosistemde uygulanan seçici baskı nedenleriyle son derece kaygı vericidir (O’Neill, 2015). Çünkü balıklar etkili bir şekilde antibiyotikleri metabolize edemezler ve aktif maddeleri feçes ile çevreye aktarırlar (Romero ve ark., 2012). Bazı çalışmalar kültür balıkçılığında uygulanan antibiyotiklerin yaklaşık %70-80’inin su sistemi içine dağıldığını göstermiştir (Burrige ve ark., 2010).

Balık ürünlerinde antimikrobiyal kalıntıların saptanması kültür balıkçılığında kullanılan bu ilaçların miktarı ve tipi gibi ilgili belgelerle sağlanabilir. Çünkü balık dokusunda kalan antibiyotik kalıntıları moleküler stabilitesine bağlı olarak uzun süre kalır. Ayrıca, balıkta antimikrobiyal kalıntı varlığı dirençli bakteriler için seçici ve zenginleştirici mekanizmalar sağlar (Done ve ark., 2015).

Pekçok Avrupa ülkelerinde, kültür balıkçılığında oksitetrasiklin, florfenikol, sarafloksasin, eritromisin ve sülfanamid (trimethoprim veya ormetoprim ile birlikte) gibi antibiyotiklerin kullanımı önerilmektedir (Kümmerer, 2009). Amerika’da ise bu amaçla oksitetrasiklin, florfenikol ve sulfadimetoksim/trimetoprim önerilmektedir (Romero ve ark., 2012).

Kültür balık yetiştiriciliği ile ilgili veya balık yemlerinde antibiyotik kullanımı ile ilgili yasalar bazı bölgelerde çok katı kurallar uygulanmasına rağmen, bazı bölgelerde de ya hiç yok ya da son derece sınırlıdır. Kültür balıkçılığı yetiştiriciliğinde dünyada ikinci sırada yer alan Hindistan, dünyada toplam kültür balık üretiminin %8’inden sorumlu olup, bu konu ile ilgili herhangi bir yasal düzenlemeye sahip değildir. Balık ve balık ürünlerini en büyük ihracatçılarından olan Çin, dünya toplam kültür balıkçılığının %67’sine sahip olup, hayvanlarda antibiyotik kullanımı ile ilgili Veteriner Hekim uygulamasına ilişkin bir yasaya sahip değildir (FAO, 2017). Şili, Norveç’ten sonra somon balığı yetiştiriciliğinde ikinci sırada yer alır. Şili ve Norveç, 2007 ve 2008 yıllarında, somon balığı yetiştiriciliğinde sırasıyla 385 ve 325 ton antimikrobiyal madde kullanmış, kinolon kullanımı ise aynı ülkelerde ve aynı yıllarda 149 ve 57 ton olarak bildirilmiştir. Florfenikol tüketimi ise 2000 yılında 400 kg’dan 2007 yılında 233 000 kg’a yükselmiştir. Şili’de 1 ton somon üretimi için kullanılan antibiyotik miktarı 279 g iken, Norveç’te ise aynı miktar somon üretimi için 4,8 g olarak bildirilmiştir (Cabello ve ark., 2016). Norveç’te daha sonra uygulanan katı yasal düzenlemeler ve beraberinde kullanılan hassas ölçümler, test metotları, probiyotik ve aşı kullanımı gibi nedenlerle kullanılan antibiyotik miktarı ciddi şekilde düşmüş ve gözardı edilebilecek düzeye indirildiği bildirilmektedir (Midtlyng ve ark., 2011).

Antibiyotikler balık gruplarına yemlerinde formüle edilerek tank ve kafeslerde ağız yoluyla, nadiren kapalı konteynerlerde immersiyon yoluyla uygulanır. Gruplar hasta, sağlıklı ve taşıyıcı breyler olabilirler (Cabello ve ark., 2013). Sudan yenmeyen yemlerin uzaklaştırmasını sağlayan toplayıcıların yokluğunda, uygulanan bölge ile

yakınlarındaki suda ve sedimentte, kullanılan ilacın yaklaşık %80'inin kaldığı tahmin edilmektedir (Cabello ve ark., 2016). Birçok çalışma pekçok akuatik bakterinin plazmid, integron ve trasposanlar gibi kolaylıkla hareket edebilen hareketli genetik elementleri, rekombine veya hareketli, yeni hareketli antibiyotik dirençli genlerin ortaya çıkışını desteklediği, bu genler sayesinde akuatik bakteriler antibiyotiklerin mevcut olduğu yeni çevreye kolaylıkla uyum sağladığını göstermiştir (Cabello ve ark., 2013).

2.6.3. *Pseudomonas aeruginosa*'da Antibiyotik Dirençlilik

P. aeruginosa biyofilm oluşturabilme özelliğine sahip bir bakteridir. Biyofilm matriksinde bulunan ve enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların antibiyotik dirençlilik problemi, tıp dünyasının yüz yüze kaldığı büyük problemlerden birisidir. Hastane kökenli enfeksiyonlarla ilişkili bakterilerin yaklaşık %70'i, onların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlardan en az birine dirençlidir. Biyofilm içinde bakteri genetik materyalinin konjugasyon yoluyla aktarımı veya değişimi sonucu kazanılan dirençlilik, bakterinin planktonik formuna kıyasla 1000 kat daha yüksek olduğu bilinmektedir. Biyofilm içinde bulunan bakteri, antibiyotik kullanımı gibi strese maruz kaldığı zaman da yüksek mutasyona (hypermutation) uğrar (Marshal, 1976; Dunne, 2002). Yapılan literatür çalışmaları bilinçsiz antibiyotik kullanımının ve bakterilerde direnç genlerinin aktarımının üst kuşak antibiyotiklerin çıkmasına neden olduğunu ve direnç kazanan bu bakterilerle mücadelenin her geçen gün giderek zorlaştığını göstermektedir. Üstelik biyofilm oluşumunun antibiyotik penetrasyonunu önlediği, ayrıca biyofilm oluşumunun bariyer olarak görev yapan epitelyal hücrelerde yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olduğu görülmüştür.

Pseudomonas bakterilerinin neden olduğu hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklerin sıklıkla kullanılması çoklu direnç göstermesine sebep olur. Bu yüzden tedavileri zordur. *Pseudomonas* türleri; penisilinlere (azlosilin, karbenisilin, mezlosilin, piperasilin ve tikarsilin) ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin çoğuna (sefoperazon, sefotaksim, seftazidim) duyarlıdır. Ayrıca aminoglikozidlere (gentamisin, tobramisin, amikasin), kinolonlara (oflaksasin, siproflaksasin), monobaktamlara (aztreonam) ve karbapenemlere (imipenem, meropenem) duyarlıdır. Hastalıklara ve enfeksiyon bölgesine göre, antibiyotik tedavisi değişmekle birlikte tedavinin, *Pseudomonas* türlerinin virulans faktörlerinden etkilendiği belirtilmiştir (Erdem, 1999).

Pseudomonas bakterileri; bazı antibiyotiklere doğal olarak dirençlidir. Ayrıca *Pseudomonas* bakterilerinin tedavisi sırasında, çoklu dirençli izolatlar görülebilmektedir. *Pseudomonas*’larda görülen bu direnç mekanizmaları bazı faktörlere bağlıdır:

1. Kromozomal ve plazmid kökenli beta laktamazların varlığına göre direnç gelişebilir.

2. Antibiyotiklerin etki bölgelerindeki değişiklikler nedeni ile direnç gelişebilir.

Beta laktamaz üretmeyen *Pseudomonas* bakterilerinde, penisilin direncine, düşük afiniteli penisilin bağlayan proteinler (PBP) sebep olmaktadır. Gram negatif bakterilerde yaygın olmayan bu direnç şekli, PBP’lerin yapısal değişikliğinden kaynaklanır.

3. Porin proteinlerinde oluşan değişimler; dış membran geçirgenliğinin azalmasına ve direnç gelişimine sebep olmaktadır.

4. Aktif pompalama sistemi ile antibiyotiklerin dışarı atılmasına bağlı olarak direnç gelişebilir (Dede, 2006).

P.aeruginosa, en önemli fırsatçı mikroorganizmalardan biri olup, özellikle de insanlarda hayvanların yanı sıra dünyada öldürücü nasokomiyal ile kronik enfeksiyonların en büyük nedenlerinin başında gelmektedir (Cabot ve ark., 2016; Serrano ve ark., 2017). Etkene karşı tedavi seçeneği antimikrobiyal dirençlilik ve bu mikroorganizmanın çeşitli büyük genomları nedeniyle önemli ölçüde azalmaktadır (Serrano ve ark., 2017). Etkenin dirençlilik kazanımı, AmpC’nin aşırı salınımına (sefdazidim) neden olan çoklu mutasyon, kinolon dirençli-saptanan bölge (QRDR) mutasyonu (siprofloksasin), oprD inaktivasyonu (meropenem) ve effluks pompalama aşırı salınımı (siprofloksasin ve meropenem) gibi nedenlerden ileri gelmektedir. Bu özellikler etkenin kolay dirençlik kazanmasına neden olmaktadır. Çığır aşan bulgular sonucu da, AmpC’nin yapısal modifikasyonuna neden olan fonksiyon kazanım mutasyonu (seftazidim), güncel DNA giraz (GyrA) modifikasyonu (siprofloksasin) ve Penisilin Bağlayan Protein 3 (PBP3)’ün –laktam bağlayan kısmının modifikasyonu (meropenem) sonucu antibiyotik dirençlilik geliştirdiği şekilde direnç mekanizmaları aydınlatılmıştır (Cabot ve ark., 2016).

Biyofilm sayesinde EPS içerisine gömülü olarak yaşamlarını sürdüren mikroorganizmalar immün sistem elamanlarından, antibiyotiklerden, patojenlerin

üretmiş olduğu antimikrobiyal ürünlerden, fiziksel, kimyasal ve biyolojik streslerden korunurlar (Nouraldin ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda, biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençlilik gücünün 1000 kat arttığını ortaya koymuştur. Bu durum, biyofilm içindeki bakterilere yaşadıkları çevrede planktonik formlarına göre daha fazla hayatta kalma ve büyüme şansına sahip olurlar (Hassan ve ark., 2011). *P. aeruginosa*'nın gerek biyofilm oluşturma özelliği, gerekse çok hızlı direnç kazanma özelliğinden dolayı son yıllarda insidansı yüksek mikroorganizma olarak karşımıza çıkmaktadır (Rasamiravaka ve ark., 2015).

P. aeruginosa hastane enfeksiyonu etkenleri içinde ilk sıralarda yer almakta, çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirebilmekte ve oluşturduğu enfeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbidite sebebiyle oldukça önemli bakterilerdendir (Pollack, 1995). Hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden *P. aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır (Çetin ve ark., 1999). *P. aeruginosa* genellikle çoklu antibiyotik direnci gösterebildiğinden tedavilerde de sorunlara neden olmaktadır. Bu nedenle kullanımda olan antibiyotiklere karşı duyarlılığın izlenmesi gerekmektedir.

Pseudomonas (P.) aeruginosa çoğunlukla nosokomiyal ve immun sistemi baskılanmış konakçılarda da enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir mikroorganizmadır. Gıdalara ve gıda ile temas eden yüzeylerde tutunup, biyofilm oluşturabilme kabiliyetine sahip mikroorganizmaların başında gelmektedir. Yapılan literatür çalışmaları bilinçsiz antibiyotik kullanımının ve bakterilerde direnç genlerinin aktarımının üst kuşak antibiyotiklerin çıkmasına neden olduğunu ve direnç kazanan bu bakterilerle mücadelenin her geçen gün giderek zorlaştığını göstermektedir. Üstelik biyofilm oluşumunun antibiyotik penetrasyonunu önlediği, ayrıca biyofilm oluşumunun bariyer olarak görev yapan epitelyal hücrelerde yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olduğu görülmüştür. Yapılan bu çalışma ile Samsun'da satışı sunulan balıklardan *P. aeruginosa* izolatlarının izolasyonu ve identifikasyonu, izolatların moleküler olarak doğrulanması; titreme (twitching), yüzme ve kayma (swarming) yöntemleri ile 3 farklı hareket özelliklerinin saptanması; tüpte, katı agarda ve mikrotitrasyon plakları olmak üzere 3 farklı yöntemle biyofilm oluşturma özelliklerinin belirlenmesi; etkenin virulans faktörlerinden proteaz, piyosiyenin ve elastaz aktiviteleri, Homoserin Lacton (HSL) üretebilme özellikleri ile QS sisteminin belirlenmesi ve son olarakta antibiyotik dirençlilik profillerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu kapsamda; *P. aeruginosa*'nın

izolasyonu klasik kültür tekniği kullanılarak ve bazı fenotipik testler uygulanarak yapıldı. Şüpheli izolatların tür düzeyinde identifikasyonu için moleküler düzeyde iki gen (*oprL* ve PA-SS 16SrDNA) bölgesinin varlığı tek hedefli PZR tekniği uygulanarak belirlendi. Sonuçta 30 *P.aeruginosa* izolatu elde edildi. Yukarıda belirtilen testler dışında izolatların QS sistem varlığının saptanması kapsamında; intakt *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* ile internal *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* gen bölgeleri tek hedefli PZR ile belirlendi. Antibiyotik duyarlılık özellikleri için ise disk diffüzyon tekniği uygulandı.



3. MATERYAL VE METOT

Çalışmada balık örneklerinden izole edilen toplam 30 *P. aeruginosa* izolatu materyal olarak kullanıldı. Çalışmada referans suş grubu olarak *P. aeruginosa* (ATCC-15692) ve HSL sinyali molekülü tespitinde ise *Agrobacterium tumefaciens* (Rhizobium, ATCC-51350) kullanıldı.

3.1. Materyal

Bu amaçla, Samsun ilinde süpermarket ve balıkçılardan satın alınan 70 balık (çiğ form) örneği (büyük balıklarda bütün balık, küçük balıklarda 300-400 g) termoslu kaplar içerisinde soğuk zincir altında laboratuvara getirildi ve *P. aeruginosa* varlığı yönünden analiz edildi.



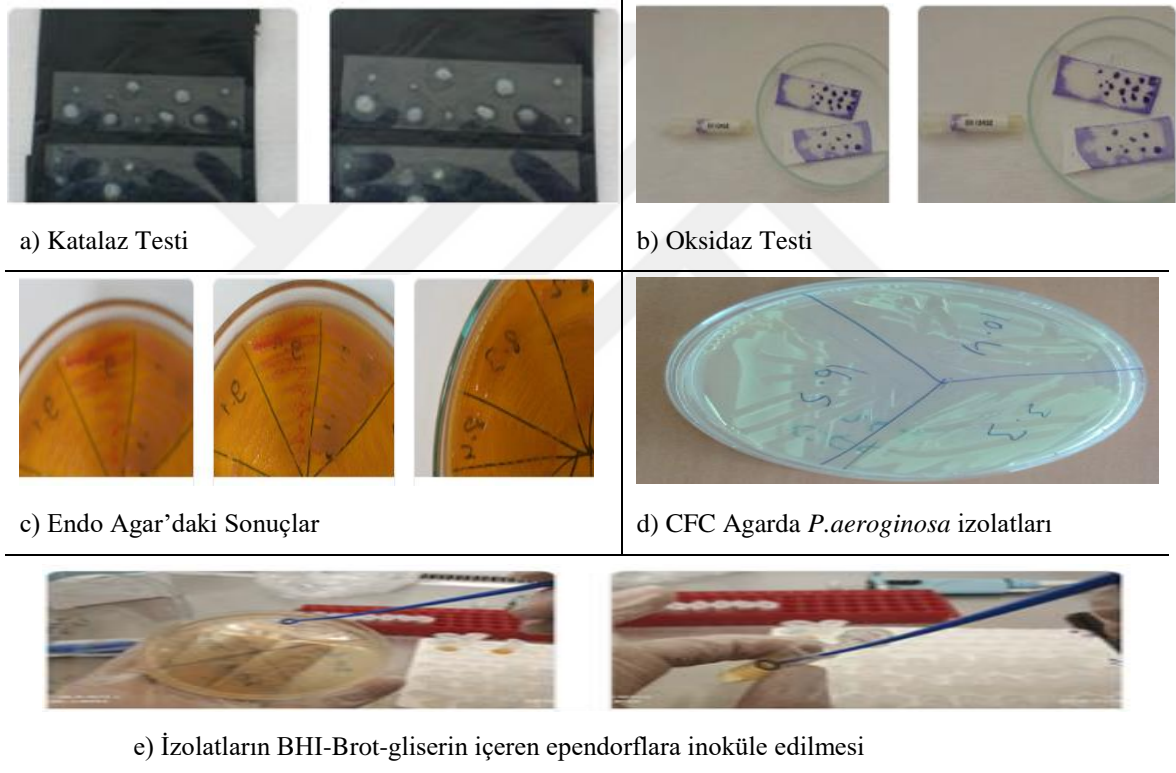
Şekil 12. Balıkların *P. aeruginosa*'nın izolasyonu

3.2. Metot

3.2.1. *P. aeruginosa* İzolatlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Çalışmada balık örneklerinden *P. aeruginosa* izolasyonunda klasik kültür tekniği uygulandı. Bu amaçla, steril polietilen poşet içerisine aseptik şartlarda 10'ar gram alınan örnekler konulup, üzerine 90'ar ml peptonlu su (Oxoid, CM00099) ilave edildi. Daha sonra karışım homojenizatörde 2-3 dakika süreyle homojenizasyonu takiben, %0,1 peptonlu su ile 10^{-6} 'ya kadar desimal dilüsyonları yapıldı ve takiben

Pseudomonas CN Selective Agar supplementi (Oxoid SR 102E) ilave edilmiş Pseudomonas Agar base (Oxoid CM 0559) (EN ISO 13720) agar plaklarına yayma plak yöntemiyle ekimleri yapıldı. Plaklar 30 °C’de 24-48 saat süreyle aerop ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben plaklarda üreyen koloniler daha sonra Endo Agar Base (Oxoid, CM0479, suppl. BR0050) plaklarına öze ile geçildi ve 30 °C’de 24-48 saat süreyle aerop ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda renksiz koloniler (laktöz negatif) seçildi. Daha sonra bu koloniler oksidasyon-fermentasyon testi (Bactiden-Oxidase, Merck 1.13300.001) ile katalaz testleri yapıldı. Oksidaz ve katalaz testleri pozitif koloniler değerlendirmeye alındı (Mickova ve ark., 1989).



Şekil 13. *P. aeruginosa* izolatların doğrulanması amacıyla yapılan bazı testler

3.2.2. *P. aeruginosa* 'nın Polimeraz Zincir Reasyonu ile Doğrulanması

Plaklarda üreyen ve yukarıda belirtilen testleri takiben, her bir plaktan *P. aeruginosa* yönünden şüpheli beş koloniye kadar koloni seçildi ve bu koloniler tryptone soya agar (Oxoid, CM 0131) veya nutrient agarda subkültüre edildi. Daha sonra bu şüpheli izolatlar *P. aeruginosa* türü yönünden aşağıda detayları verilen Polimeraz Zincir Reasyonu tekniği uygulanarak *oprL* gen bölgesi (de Vos ve ark., 1997) ve 16 S rDNA

için PA-SS bölgesi Spilker ve ark. (2004)'ının bildirdiği primerler kullanılarak Lavenir ve ark. (2007)'nin bildirdiği yöntemle göre identifiye edildi.

Tüm PZR malzemeleri Thermo Scientific, primerler ise Invitrojen firmalarından temin edildi.

Tablo 2. PZR ile *P. aeruginosa* izolatlarının doğrulanmasında kullanılacak gen bölgeleri

Primer Dizilimi	Hedef gen bölgesi	Amplikon Byüklüğü	Kaynak
F-ATGGAAATGCTGAAATTCGGC- R CTTCTTCAGCTCGA CGCGACG	<i>oprL</i> gene	504 bp	de Vos ve ark., 1997
PA-SS-F GGGGGATCTTCGGACCTCA PA-SS-R TCCTTAGAGTGCCACCCG	16 S rDNA (PA-SS)	956 bp	Spilker ve ark., 2004

PZR ile *oprL* gen bölgesinin saptanması:

Etken	Miktar
Steril Distile su	14,30 µl
10X PZR buffer	2,50 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,50 µl
dNTP (25 mM)	0,50 µl
<i>oprL</i> primer (20 pmol) F	0,50 µl
R	0,50 µl
Taq polimeraz (5U/µl)	0,20 µl
Template DNA	5,00 µl
<u>Toplam hacim</u>	<u>25,00 µl</u>

Tablo 3. *oprL* gen bölgesinin saptanması için amplikasyon programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	40 sn	} 30
Bağlanma	58	40 sn	
Uzaman	57	50 sn	
Son uzama	72	10 dk	1

Elektroforez işlemi: Amplikonlar % 1,5 ethidium bromide içeren agaroz jelde yürütüldü. 504 bp amplikon büyüklüğü pozitif olarak değerlendirildi.

16S rDNA (PA-SS)'nın belirlenmesi

Etken		Miktar
Steril Distile su		11,77 µl
10X PZR buffer		5,00 µl
MgCl ₂ (25 mM)		2,00 µl
dNTP (25 mM)		0,63 µl
<i>oprL</i> primer(20 pmol)	F	0,20 µl
	R	0,20 µl
Taq polimeraz (5 U/µl)		0,20 µl
Template DNA		5,00 µl
<u>Toplam hacim</u>		<u>25,00 µl</u>

Tablo 4. PA-SS gen bölgesi için amplikasyon programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	2 dk	1
Denatürasyon	94	20 sn	} 30
Bağlanma	58	20 sn	
Uzaman	72	40 sn	
Son uzama	72	5 dk	1

Elektroforez işlemi: Amplikonlar %2 ethidium bromide içeren agaroz jelde yürütüldü. 956 bp amplikon büyüklüğü pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.3. Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılık testleri ile tüm izolatların in vitro duyarlılıkları CLSI (2013) kriterleri doğrultusunda değerlendirildi. Yöntem olarak disk difüzyon yöntemi uygulandı. Bu amaçla, izolatların seftazidim (30 µg), kolistin (10 µg), florokinolon (levofloksasin) (5 µg), tobramisin (10 µg), gentamisin (10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg) ve piperasillin-tazobaktam (100/10 µg) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları belirlendi. Bu kapsamda izolatların 18-24 saatlik kültürlerinde üreyen kolonilerden inokülüm yoğunluğu 0,5 McFarland bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde hazırlandı, steril bir eküvyonla Müller Hinton Agar (MHA, Oxoid, CM 0337) besiyerinin tüm yüzeyine homojen bir şekilde inoküle edildi. Referans suş olarak *P. aeruginosa* (ATCC-27853) suşu kontrol amacıyla kullanıldı. MHA içeren plakların 18-24 saatlik inkübasyondan sonra disklerin

inhibisyon zon çapları ölçülerek CLSI (2013) sınır değerlerine göre yorumlandı. Tüm diskler OXOID firmasından temin edildi.

Tablo 5. Disk difüzyon için test edilen antibiyotikler ve sınır değerleri

Test Grupları	Antimikrobiyal Ajan	Disk İçeriği	Zon Çapları		
			S	İ	R
GrupA	Gentamisin (Amoninoglikozit)	10 µg	≥15	13-14	≤12
GrupA	Tobramisin (Amoninoglikozit)	10 µg	≥15	13-14	≤12
GrupB	Levofloksasin (Florokinolon)	5 µg	≥17	14-16	≤13
GrupA	Seftazidim (Sefalosporin)	30 µg	≥18	15-17	≤14
GrupB	Piperasilin-Tazobaktam (β-Laktam/β-Laktamaz inhibitör konsantrasyonu)	100/10 µg	≥21	15-20	≤14
GrupB	İmipenem (Karbapenemler)	10 µg	≥19	16-18	≤15
GrupB	Meropenem (Karbapenemler)	10 µg	≥19	16-18	≤15
GrupO	Kolistin (Lipopeptit)	10 µg	≥11	-	≤10

S: Duyarlı, İ: Orta derecede duyarlı, R: Dirençli grup, A: Spesifik organizma grupları için rutin kullanılan ajanlardır. Grup B: Öncelikli olarak dirençli organizmalar için kullanılan ajanlardır. Grup O: Organizma grupları için klinik belirteçlere sahip antimikrobiyal ajanlardır.

3.2.4. Biyofilm Oluşumunun Gözlenmesi

Bu kapsamda izolatların biyofilm oluşturabilme özellikleri

- Tüpte biyofilm,
- Mikrotitrasyon yöntemi ve
- CRA’da slime faktörü saptanması şeklinde 3 ayrı yöntem uygulananark belirlendi.

Çalışmada negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922, pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşları kullanıldı.

a) Tüpte Biyofilm tespiti: Christensen (1985) tüpte biyofilm yöntemi modifiye edilerek belirlendi. *P. aeruginosa* izolatlarının nutrient agarda 24 saatlik kültürlerinde üreyen kolonilerinden %0,1 steril tuz solüsyonunda inokülüm yoğunluğu 0,5 McFarland (~10⁸ CFU/mL) bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra tüplere 5 ml %0,25 glukoz içeren Triptik Soy Broth (TSB) besiyeri ilave edildi ve sonrada bu tüplere 100 µl hazırlanan bakteri süspansiyonundan inoküle edildi

ve 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben tüp içeriği boşaltıldı ve distile suyla 3 kez yıkandı ve takiben tüpler kurutuldu. Daha sonra, bu tüplere %0,25'lik safranin çözeltisinden 5'er ml eklenip, 30 dk bekletildi. Bekleme sonrası tüplerin içindeki boya solüsyonu boşaltılıp, distile suyla 3 kez yıkandı ve tüpler kurutuldu. Değerlendirmede, tüp yüzeyinde pembe-kırmızı renkli film tabakasının görülmesi pozitif, boya tabakasının bulunmaması ise negatif olarak değerlendirildi (Christensen ve ark.,1985; Davey ve ark., 2003; Kirisits ve ark., 2005).

b) Mikrotitrasyon plağı: Bu amaçla her bir izolatın nutrient agarda üreyen 24 saatlik kültürlerinden %0,1 steril tuz solüsyonunda inokülüm yoğunluğu 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde ayarlandı. %0,25 glukoz içeren Triptic Soy Broth (TSB) besiyeri polistren tüplere (12X75 mm) 5 ml olacak şekilde ilave edildi. Daha sonra, bu tüplere 0,5 McFarland hazırlanan bakteri süspansiyonları 1/50 oranında dilüe edildi. Bu şekilde hazırlanan dilüsyondan 150 µl alınıp, 96 kuyucuklu düztabanlı polistren mikrotitrasyon plak kuyucuklarına her bir örnek için 3 kuyucuk olacak şekilde ilave edildi ve plakalar 37 °C' de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben, sıvı besiyeri dökülüp, 3 kez nazıkçe steril fosfat tamponu (PBS, pH 7,2) ile yıkanarak kurutma kağıdı üzerine ters çevrilip kurutuldu. Böylece yüzeye yapışmayan bakterilerin uzaklaştırılması sağlandı. Kuyucuklardaki biyofilm tabakasının fizyasyonunu sağlamak amacıyla %99'luk metanol ilave edildi ve 15 dk süreyle mikrotitrasyon plakları bekletildi. Kuyucuklardaki metanol boşaltılarak kuruması sağlandıktan sonra, %0,1 kristal viyole solüsyonundan 150 µL ilave edilerek 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben, kuyucuklardaki kristal viole solüsyonu boşaltıldı ve 3 kez dH₂O ile yıkanıp, kurutma kâğıdına ters çevrilerek kurutuldu. Daha sonra, kuyucuklara 150 µL etanol/aseton (80:20) ilave edilip, 15 dakika bekletilerek boyanan biyofilm tabakasının çözülmesi sağlandı ve plaklar dalga boyu 570 nm olan mikroplaka okuyucuda okutuldu. Sonuçlar negatif ve pozitif kontrol olarak kullanılan suşların absorbans değerleriyle karşılaştırılarak yorumlandı. OD değerlerine göre biyofilm oluşumu değerlendirildi (Stepavonic ve ark., 2000; Silva ve ark., 2014).

c) CRA (Kongo kırmızısı agar) yöntemi ile slime faktör üretiminin belirlenmesi: Bu amaçla izolatların nutrient agardaki 24 saatlik taze kültürlerinden

CRA plaklarına çizme yöntemiyle ekimleri yapıldı ve plaklar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben 24 saat oda sıcaklığında bırakıldı. Bu süre sonunda sonuçlar biyofilm oluşumu yönünden değerlendirildi. Bu teste de negatif ve pozitif kontrol olarak sırasıyla *E. coli* ATCC 25922 ile suşu pozitif kontrol olarak ise biyofilm oluşturan *P. aeruginosa* ATCC 15692 suşu kullanıldı (Freeman ve ark., 1989).

3.2.5. Hareketlilik Testleri

P. aeruginosa izolatlarında

a)Titreme,

b)Kayma ve

c)Yüzme olmak üzere 3 farklı hareket yapabilme özelliği araştırıldı.

a) Titreme (twitch) hareketi testi: Titreme testi 3 mm kalınlığında %1'lik Luria-Bertani (LB) agar içeren plaklar çalışmada kullanıldı. Test için izolatların 24 saatlik nutrient agardaki taze kültürleri kullanıldı. İzolatlar daha sonra hazırlanan LB agar plaklarına iğne uçlu öze ile plakların zeminine kadar inoküle edildikten sonra 30 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben, plaklar ters çevrildi ve agar öze yardımı ile çıkarıldı. Plakların yüzeyi distile su ile yıkanıp, yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. Daha sonra plak zemini %1'lik kristal viyole ile kaplanarak 15-20 dk süre boyunca bekletildi. Bekleme süresi tamamlandıktan sonra, boya uzaklaştırıldı ve plaklar distile su ile yıkandı. Daha sonra, plaklar ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde bir süre kuruması sağlandı. Plaklarda bakterilerin oluşturduğu boyanmış alanın çapı ölçülerek titreme hareketi belirlenmiş oldu (Deziel ve ark., 2003).

b) Kayma (swarm) hareketi testi: Kayma testi için yarı katı besiyeri hazırlandı. Bu besiyerinin bileşimi %0,5 agar, 8 g/L nutrient broth ve 5 g/L glukozdan oluşmaktadır. Hazırlanmış olan yarı katı besiyerleri birkaç saat oda sıcaklığında kurutuldu. İzolatların 24 saatlik taze kültürlerinden hazırlanan kolonilerden iğne uçlu öze ile besiyerine inoküle edildi ve plaklar 30 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu yarı katı besiyerinde *P. aeruginosa* için tipik olan düzensiz dallanmalar gösteren kolonilerin 3 farklı bölgedeki çapları ölçülerek ortalaması alındı ve bu şekilde kayma hareketinin çapı belirlenmiş oldu (Boles ve ark., 2005).

c) Yüzme (swimming) hareketi testi: Yüzme hareketi için %1'lik tripton, %0,5 NaCl ve %0,3 agar içeren besiyeri hazırlandı. Her bir izolatın 24 saatlik taze kültürleri iğne uçlu öze ile alınarak plaklardaki besiyerine inoküle edildi. Plaklar, 30 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnoküle edilen bölgede bakteri üremesi gözlemlendikten sonra, inokülasyon bölgesinden dışarıya doğru oluşan bulanık zon ölçülerek yüzme hareketi miktarı değerlendirildi (Deziel ve ark., 2003).

Sonuçların yorumlanması: Kayma (swarming) ve yüzme (swimming) hareketlerinin değerlendirilmesi Murray ve ark. (2010)'ının belirttiği yöntemle değerlendirildi. Bu kapsamda, pozitif kontrol *P. aeruginosa* ATCC 15692'susunun yaptığı kayma hareketinin ölçümünün >%10'un üzerinde olanlar pozitif olarak değerlendirildi. Titreme ve yüzme hareketlilik testleri ise plaklarda gözle görülebilir zonların tespiti pozitif olarak değerlendirildi (Murray ve ark., 2010).

Bakteri süspansiyonunun hazırlanması: Elde edilen *P. aeruginosa* izolatları nutrient agarda 37°C'de 18-24 saat üretilen ve daha sonra %0,1 steril tuz solüsyonunda 0,5 McFarland (~10⁸ CFU/mL) bulanıklık derecesine eşdeğer olarak ayarlandı. Daha sonra ayarlanmış bu bakteri süspansiyonları aşağıda yer alan piyosiyonun ve elastaz testleri için kullanıldı.

3.2.6. *P.aeruginosa* izolatlarının Bazı Virulans Özelliklerinin Belirlenmesi

1. Piyosiyanın Testi: Bu amaçla, yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanmış olan izolat solüsyonundan 100 µL alınarak piyosiyanın broth (PB) besiyerine inoküle edildi ve tüpler 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda soğutmalı santrifüjde 3000 x g'de 20 dk santrifüj sonrası süpernatantın 5 ml'si 3 ml kloroform ile 3 saat ekstrakte edildi ve bu şekilde organik faz ayrıldı. Ayrılan faza 1 ml 0,2 N HCl ilave edilerek piyosiyanın zengin organik faz ayrıldı. Her bir klinik izolat için tüpün üst kısmında kalan HCl tabakasından mikropalakaların 2'ser kuyucuğuna 200 µL koyularak dalga boyu 520 nm olan mikropalaka okuyucuda okutuldu (Schaber ve ark., 2004; Carlsson ve ark., 2011).

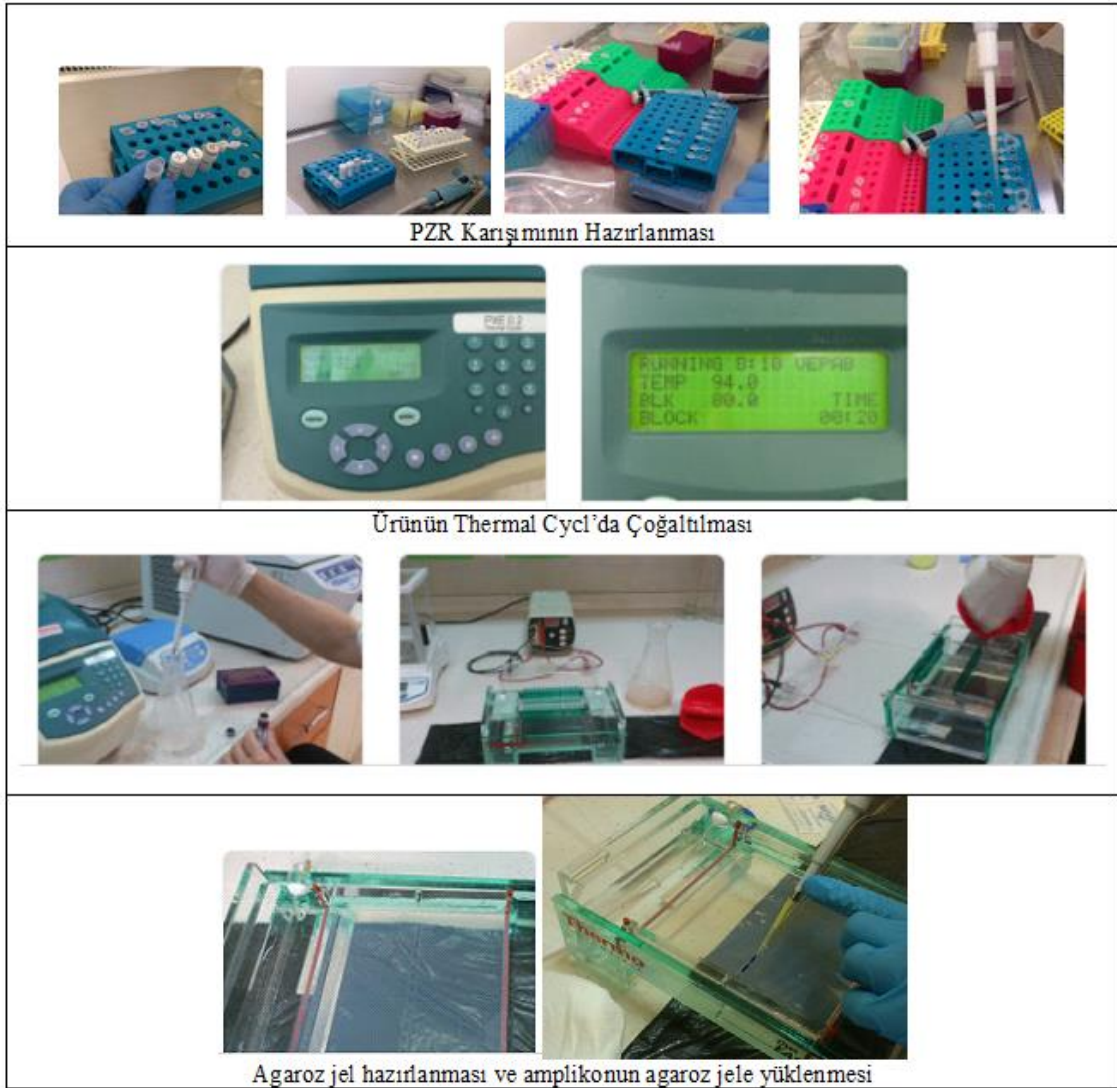
2. Elastaz Testi: *P. aeruginosa* izolatlarının elastaz üretim miktarlarını belirlemek için elastaz testi yapıldı. Bu amaçla, izolatların %0,1'lik steril tuz solüsyonundaki ayarlanmış kültürleri LB sıvı besiyerine 100 µL inoküle edilerek, tüpler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra suşlar 3000 x g'de 10 dk santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantdan 500 µl'sine 1000 µL Elastin Kongo kırmızısı tamponu (ERC) ilave edildi ve tüpler 37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben çözülmemiş olan ECR'ler 3000 x g'de 10 dk süreyle santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Süpernatant kısmından 200 µL alınarak mikropalakaların 2'şer kuyucuğuna koyuldu ve plakalar mikropalaka okuyucuda (Mikropalaka okuyucu, Thermo, Multiskan GO) 495 nm dalga boyunda okutuldu (Ohman ve ark. 1980; Rust ve ark., 1994).

3. Proteaz Testi: Bu amaçla %2 yağsız süt tozu içeren LB agar kullanıldı. Test edilecek izolatlar bir gece öncesi BHI Broth takiben nutrient agarda subkültüre edildi. Subkültüre edilen koloniler %0,1 steril tuz solüsyonunda 0,5 McFarland (~10⁸ CFU/mL) bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra, hazırlanan bakteri süsasyonu %2 yağsız süt tozu içeren LB agar plakalarına 2 µL inoküle edildi ve plaklar 37 °C'de 16-18 saat inkübasyona bırakıldı. İzolatların proteolitik aktiviteleri, bakteri kültürlerinin inoküle edilen bölgedeki berrak zon çapı mm cinsinden ölçülerek hesaplandı (Dong ve ark., 2005).

4. Homoserin lakton oluşumu için cross-feeding testi: HSL moleküllerinin varlığını belirlemek için cross-feeding testi yapıldı. Bu test için öncelikle 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) hazırlandı. Bu amaçla, X-Gal 1 ml Dimetil Sülfoksit (DMSO) içine 20 mg X-Gal konulup, eritildi. Hazırlanmış olan X-Gal'den 40 µL alınıp, LB agar üzerine ilave edildi ve cam drigalski ile besiyerinin tüm yüzeye yayılıp 37 °C'de 1-2 saat kurutuldu. Kuruyan besiyeri üzerine HSL için belirteç olan *A. tumefaciens* ATCC-51350 suşu çizgi ekim şeklinde ekildikten sonra klinik izolat olan *P. aeruginosa* (n:100) izolatları da 1'er cm aralıklarla çizme tekniği kullanılarak ekimleri yapıldı ve plaklar 37 °C'de 48-72 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra oluşan yeşil pigmentasyon rengi pozitif olarak değerlendirildi (Shaw ve ark., 1997; Cha ve ark., 1998; Rawn ve ark., 2001).

3.2.7. İzolatlarda Quorum Sensing (QS) Genlerinin PZR ile Saptanması

Bu amaçla, PZR yöntemiyle 4 intakt (*LasI*, *lasR*, *RhlI* ve *RhlR* genleri) ve 4 internal (*LasI*, *lasR*, *RhlI* ve *RhlR* genleri) olmak üzere toplam 8 farklı gen bölgesinin varlığı Schaber ve ark. (2004)'nın kullandıkları primer dizilimi (Tablo 6) kullanılarak tek hedefli PZR yöntemiyle belirlendi. İzolatların template DNA'sı kaynatma yöntemiyle elde edildi.



Şekil 14. PZR Süreçleri

Tablo 6. İntakt ve internal primer dizileri

Primerin adı	5'→3'	Kaynaklar	Amplikon Uzunluğu (bp)
QS İntakt genleri			
<i>lasI</i> F	ATGATCGTACAAATTGGTCGGC	Schaber ve ark.(2004)	605
<i>lasI</i> R	GTCATGAAACCGCCAGTCG	Schaber ve ark.(2004)	
<i>lasR</i> F	ATGGCCTTGGTTGACGGTT	Schaber ve ark.(2004)	725
<i>lasR</i> R	GCAAGATCAGAGAGTAATAAGACCCA	Schaber ve ark.(2004)	
<i>rhlI</i> F	CTTGGTCATGATCGAATTGCTC	Schaber ve ark.(2004)	625
<i>rhlI</i> R	ACGGCTGACGACCTCACAC	Schaber ve ark.(2004)	
<i>rhlR</i> F	CAATGAGGAATGACGGAGGC	Schaber ve ark.(2004)	730
<i>rhlR</i> R	CTTCAGATGAGGCCAGC	Schaber ve ark.(2004)	
QS İnternal genleri			
<i>lasI</i> F	TCGACGAGATGGAAATCGATG	Schaber ve ark.(2004)	363
<i>lasI</i> R	GCTCGATGCCGATCTTCAG	Schaber ve ark.(2004)	
<i>lasR</i> F	TGCCGATTTTCTGGGAACC	Schaber ve ark.(2004)	362
<i>lasR</i> R	CCGCCGAATATTTCCCATATG	Schaber ve ark.(2004)	
<i>rhlI</i> F	CGAATTGCTCTCTGAATCGCT	Schaber ve ark.(2004)	143
<i>rhlI</i> R	GGCTCATGGCGACGATGTA	Schaber ve ark.(2004)	
<i>rhlR</i> F	TCGATTACTACGCCTATGGCG	Schaber ve ark.(2004)	207
<i>rhlR</i> R	TTCCAGAGCATCCGGCTCT	Schaber ve ark.(2004)	

QS intakt gen profillerinin belirlenmesi: Schaber ve ark. (2004)'larının yapmış oldukları PZR amplifikasyon programı modifiye edilerek PZR karışımı hazırlandı. İntakt genler için PZR reaksiyon bileşenleri ile amplifikasyon programları sırasıyla Tablo 7 ve Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 7. İntakt *LasI*, *lasR*, *RhlI* ve *RhlR* genleri için PZR karışım miktarları

Bileşenin adı	Miktarı µl	Son konsantrasyonu
Amplifikasyon Tamponu (10X)	2,50	1X/µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,50	1,5 mM/µl
dNTP mix (2 mM)	1,00	0,08 mM/µl
Primer Forward (10 pmol/µl)	0,50	0,2 pmol/µl
Primer Reverse (10 pmol/µl)	0,50	0,2 pmol/µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0,25	0,05 U/µl
Kalıp DNA	1,00	1,2 ng/µl
dH ₂ O	17,75	-
TOPLAM	25,00	-

Tablo 8. İntakt *LasI*, *lasR*, *RhlI* ve *RhlR* genlerinin amplifikasyon koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	}
Bağlanma	60	30 sn	
Uzaman	72	2 dk	
Son uzama	72	10 dk	1

Elektroforez işlemi: Bu amaçla amplikonlar ethidium bromide içeren %1'lik (w/v) agaroz jele yüklenip, 100 volt'ta 90 dakika süreyle yürütüldü ve görüntüleme cihazında da görüntülendi (BioRad).

b) QS internal gen profillerinin belirlenmesi: Schaber ve ark. (2004)'nın PZR amplifikasyon programı modifiye edilerek PZR karışımı hazırlandı. İntakt genler için PZR reaksiyon bileşenleri ile amplikon elde etme koşulları Tablo 9 ve Tablo10'da gösterilmiştir.

Tablo 9. İnternal *LasI*, *lasR*, *RhlI* ve *RhlR* genleri için PZR karışım miktarları

Bileşenin adı	Miktarı µl	Son konsantrasyonu
Amplifikasyon Tamponu (10X)	2,50	1 X /µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,50	2,5 mM/µl
dNTP mix (2 mM)	1,00	0,08 mM/µl
Primer Forward (10 pmol/µl)	0,50	0,2 pmol/µl
Primer Reverse (10 pmol/µl)	0,50	0,2 pmol/µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0,25	0,05 U/µl
Kalıp DNA	1,00	1,2 ng/µl
dH ₂ O	16,75	-
TOPLAM	25,00	-

Tablo 10. İnternal *LasI*, *lasR*, *RhlI* ve *RhlR* genlerinin amplifikasyon koşulları

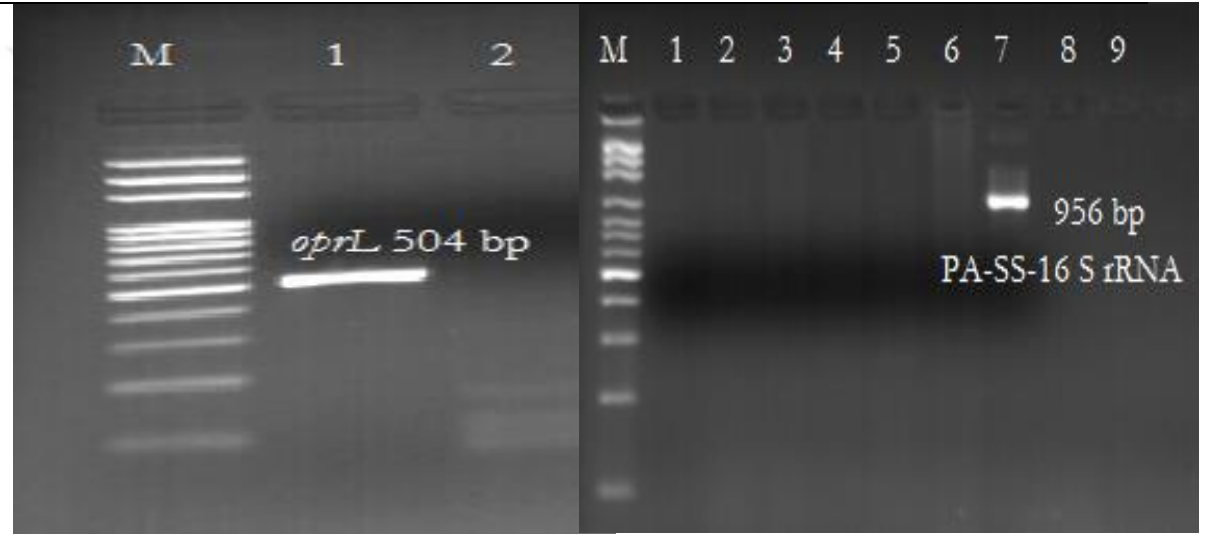
Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	}
Bağlanma	59	30 sn	
Uzaman	72	2 dk	
Son uzama	72	10 dk	1

Elektroforez işlemi: Bu amaçla amplikonlar ethidium bromide içeren %1'lik (w/v) agaroz jelde yürütüldü ve görüntüleme cihazında belirlendi.



4. BULGULAR

Çalışmamızda klasik yöntemle izole edilen izolatların moleküler düzeyde doğrulanması için tek hedefli PZR tekniği uygulandı. Bu kapsamda *P. aeruginosa* türüne özgü *oprL* ve 16 S rDNA gen bölgeleri saptandı. Pozitif kontrol olarak kullanılan *P. aeruginosa* ATCC 15692’de her iki gen bölgesi saptanırken (Şekil 15), balıklardan elde edilen izolatlarda 16 S rDNA gen bölgesi saptanamadı. Buna karşın, *oprL* gen bölgesi saptandı. Bu şekilde *oprL* gen bölgesini içeren toplam 30 balık orjinli *P. aeruginosa* izolatu elde edildi.



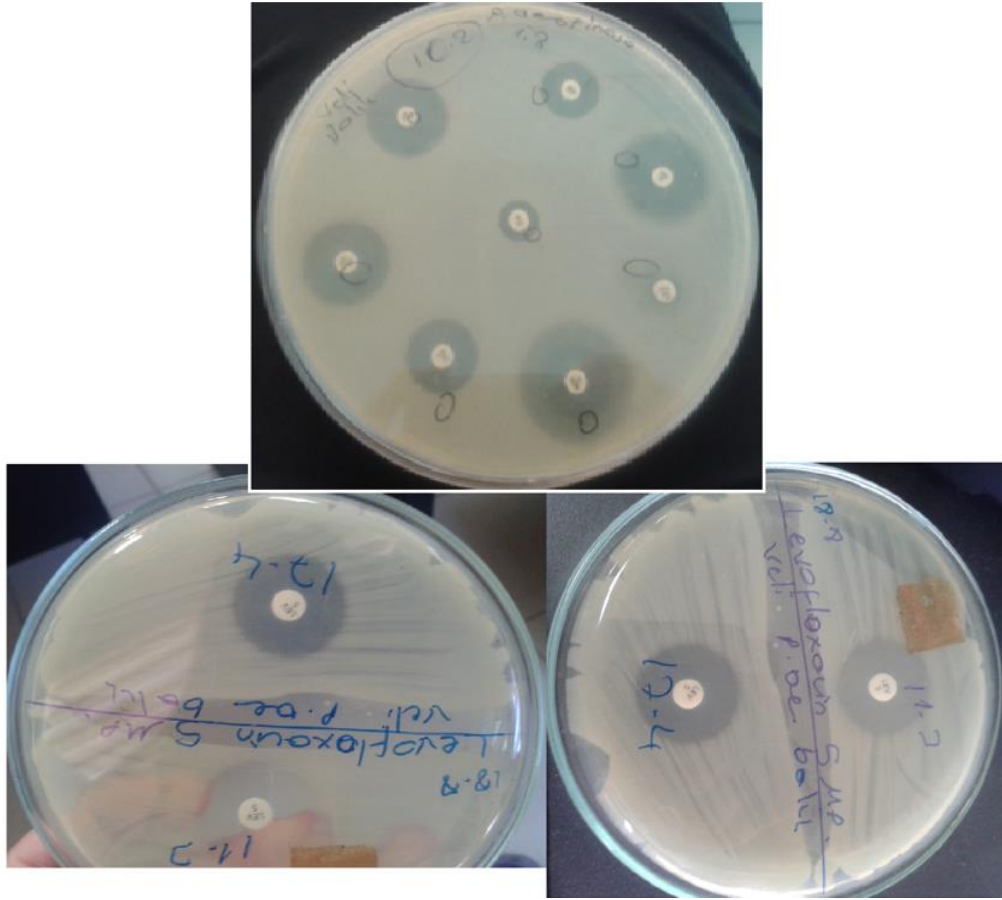
a) *oprL* (504 bp) Gen bölgesi (M: Marker, 1. Sütun: Pozitif kontrol- *P. aeruginosa* ATCC 15692

b) 16 S rDNA gen bölgesi (M: Marker, 1-6 sütunler negatif; 7. Sütun *P. aeruginosa* ATCC 15692 pozitif kontrol)

Şekil 15. *P.aeruginosa*'nın tür düzeyinde tek hedefli PZR ile belirlenmesi

İzolatların antibiyogram sonuçları: İzolatların 8 ayrı grup antibiyotiğe karşı duyarlılıkları belirlendi. Bu kapsamda 1) Karbapenem grup antibiyotiklerden piperasilin/tazobactam (β -laktam/ β -latamaz inhibitör konsantrasyonu-100/10 μ g), 2) Lipopeptit gruptan Meropenem (10 μ g) ve 3) İmipenem (10 μ g), 4) Sefalosporin grubu antibiyotiklerden kolistin (10 μ g), 5) Flokinolon grubu antibiyotiklerden seftazidim (30 μ g), 6) Aminoglikozit grubu antibiyotiklerden levofloksasin (5 μ g) ile 7) Tobramisin (10 μ g) ve 8) Gentamisin (10 μ g) antibiyotik diskleri kullanıldı. İzolatların antibiyogram test sonuçları Tablo 11’de gösterilmiştir. Tablo’da da görüldüğü üzere; 4

(%13,33) izolat levofloksasine karşı, 3 (%10)'er izolat meropenem ve piperasilin/tazobactam karşı, 2 (% 6,66) 'şer izolat ise imipeneme, kolistin ve seftazidim karşı dirençli (orta düzeyde veya dirençli) oldukları saptanırken, tüm izolatlar aminoglikozit grubu antibiyotiklerden tobramisine ve gentamisine karşı duyarlı bulundu. İzolatlar çoklu antibiyotik dirençlilikleri yönünden değerlendirildiğinde ise 1 izolatın 3 ayrı grup antibiyotiğe karşı (1.imipenem, meropenem, 2. piperasilin/tazobactam, 3.seftazidim ve) dirençli (orta düzeyde veya dirençli) bulundu (Şekil 16).



Şekil 16. İzolatların antibiyotik dirençlilik profilleri

Biyofilm Oluşumunun Gözlenmesi: Bu kapsamda izolatların biyofilm oluşturabilme özellikleri; a) Tüpte biyofilm, b) Mikrotitrasyon yöntemi ve c) CRA' da slime faktörü saptanması şeklinde 3 ayrı yöntem uygulanarak belirlendi. Bu kapsamda 12 izolatın (%40) CRA'da, 14 (%46,66) izolatın mikrotitrasyon plaklarında, 29 (%96,66) izolatın da tüpte biyofilm oluşturduğu görüldü. Bu bulgulara ilaveten, 18

(%60,00) izolatın iki ayrı yöntemle ve 3 (%10) izolatın da her üç yöntem ile biyofilm oluşturma özelliğın gösterdiği belirlendi (Tablo 12, Şekil 17).

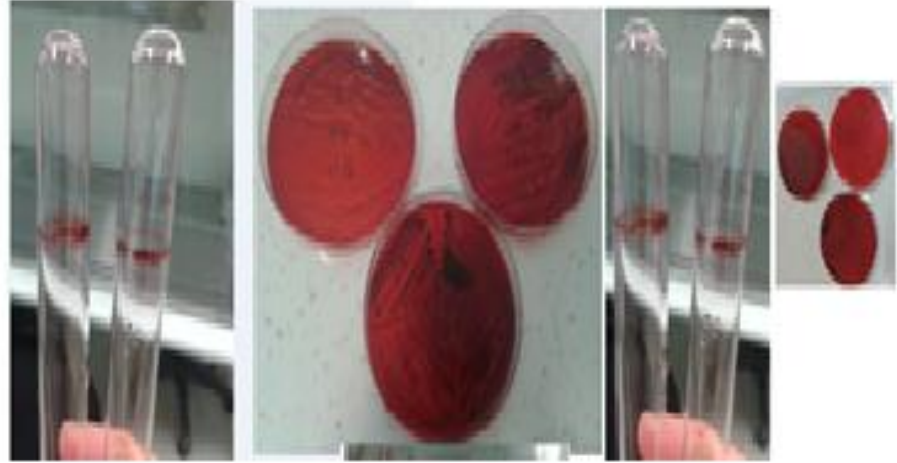
Tablo 11. Balık orjinli *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyogram test sonuçları

No	IPM 10µg	CT 10µg	TPZ 10µg	CAZ 30µg	CN 10µg	TOP 10µg	LEV 5 µg	MEM 10µg	Toplam Dirençli.Sayı
	S	S	S	S	S	S	S	S	
1	S	S	S	S	S	S	S	S	
2	S	S	S	S	S	S	S	S	
3	S	S	S	S	S	S	S	S	
4	S	S	S	S	S	S	R	S	1
5	S	R	S	S	S	S	S	S	1
6	S	S	S	S	S	S	S	S	
7	S	S	S	S	S	S	S	S	
8	S	S	S	S	S	S	S	S	
9	S	S	S	S	S	S	S	S	
10	S	S	S	S	S	S	S	S	
11	S	S	S	S	S	S	S	S	
12	S	S	S	S	S	S	IR	S	1
13	S	S	S	S	S	S	IR	S	1
14	S	S	S	S	S	S	S	S	
15	S	S	S	S	S	S	S	S	
16	S	S	S	S	S	S	S	S	
17	S	S	S	S	S	S	S	S	
18	IR	S	IR	R	S	S	S	R	4
19	S	S	S	S	S	S	S	R	1
20	S	S	S	S	S	S	S	S	
21	S	S	S	S	S	S	S	S	
22	S	S	IR	S	S	S	S	S	1
23	S	S	R	S	S	S	S	S	1
24	S	S	S	S	S	S	S	S	
25	IR	S	S	S	S	S	S	S	1
26	S	S	S	S	S	S	S	S	
27	S	S	S	S	S	S	R	S	1
28	S	R	S	S	S	S	S	S	1
29	S	S	S	S	S	S	S	IR	1
30	S	S	S	IR	S	S	S	S	1
Direnç. İzolat Sayısı	2 %6,66	2 %6,66	3 %10,00	2 %6,66	0 %0,00	0 %0,00	4 %13,33	3 %10,00	

S:Duyarlı; IR:Orta derecede dirençli; R:Dirençli; TPZ:Piperacillin/tazobaktam; MEM:Meropenem; CAZ:Seftazidim; CT:Kolistin; TOB:Tobramisin; LEV:Levofloksasin; IPM:Imipenem; CN:Gentamisin

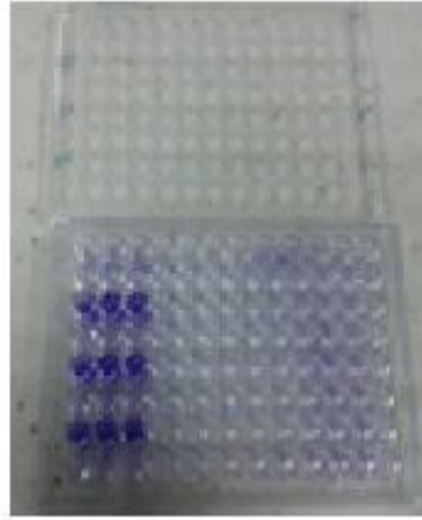
Tablo 12. *P.aeruginosa* izolatlarının Biyofilm oluşturma Özellikleri

İzolat Sayısı	İzolat Kodu	CRA'da biyofilm oluşturma	Tüpte Biyofilm oluşturma	Mikrotitrasyon yöntemi	Toplam pozitif yöntem sayısı
1.	<i>P. aeruginosa</i>	Pozitif	Pozitif	(0.4475 abs.)	
2.		Negatif	Pozitif	Negatif	1
3.		Negatif	Pozitif	Negatif	1
4.		Negatif	Pozitif	Negatif	1
5.		Negatif	Pozitif	Pozitif	2
6.		Negatif	Pozitif	Pozitif	2
7.		Zayıf pozitif	Negatif	Pozitif	2
8.		Pozitif	pozitif	Negatif	2
9.		Zayıf pozitif	Pozitif	Negatif	3
10.		Zayıf pozitif	Pozitif	Negatif	2
11.		Pozitif	Pozitif	Negatif	2
12.		Zayıf pozitif	Pozitif	Pozitif	3
13.		Zayıf pozitif	Pozitif	Pozitif	3
14.		Negatif	Pozitif	Pozitif	2
15.		Negatif	Pozitif	Pozitif	2
16.		Negatif	Pozitif	Pozitif	2
17.		Pozitif	Pozitif	Negatif	2
18.		Zayıf pozitif	Pozitif	Pozitif	2
19.		Pozitif	Pozitif	Negatif	2
20.		Pozitif	Pozitif	Negatif	2
21.		Negatif	Pozitif	Pozitif	2
22.		Pozitif	Pozitif	Negatif	2
23.		Negatif	Pozitif	Negatif	1
24.		Negatif	Pozitif	Negatif	1
25.		Negatif	Pozitif	Pozitif	2
26.		Negatif	Pozitif	Negatif	1
27.		Negatif	Pozitif	Pozitif	2
28.		Negatif	Pozitif	Negatif	1
29.		Negatif	Pozitif	Negatif	1
30.		Negatif	Pozitif	Negatif	1
31.		Negatif	Pozitif	Pozitif	2
Pozitif izolat sayısı		12 (%40,00)	29 (%96,66)	14 (%40,00)	



Tüpte Biyofilm

Congo Red Agar'da Biyofilm



Mikrotitrasyon Yöntemi

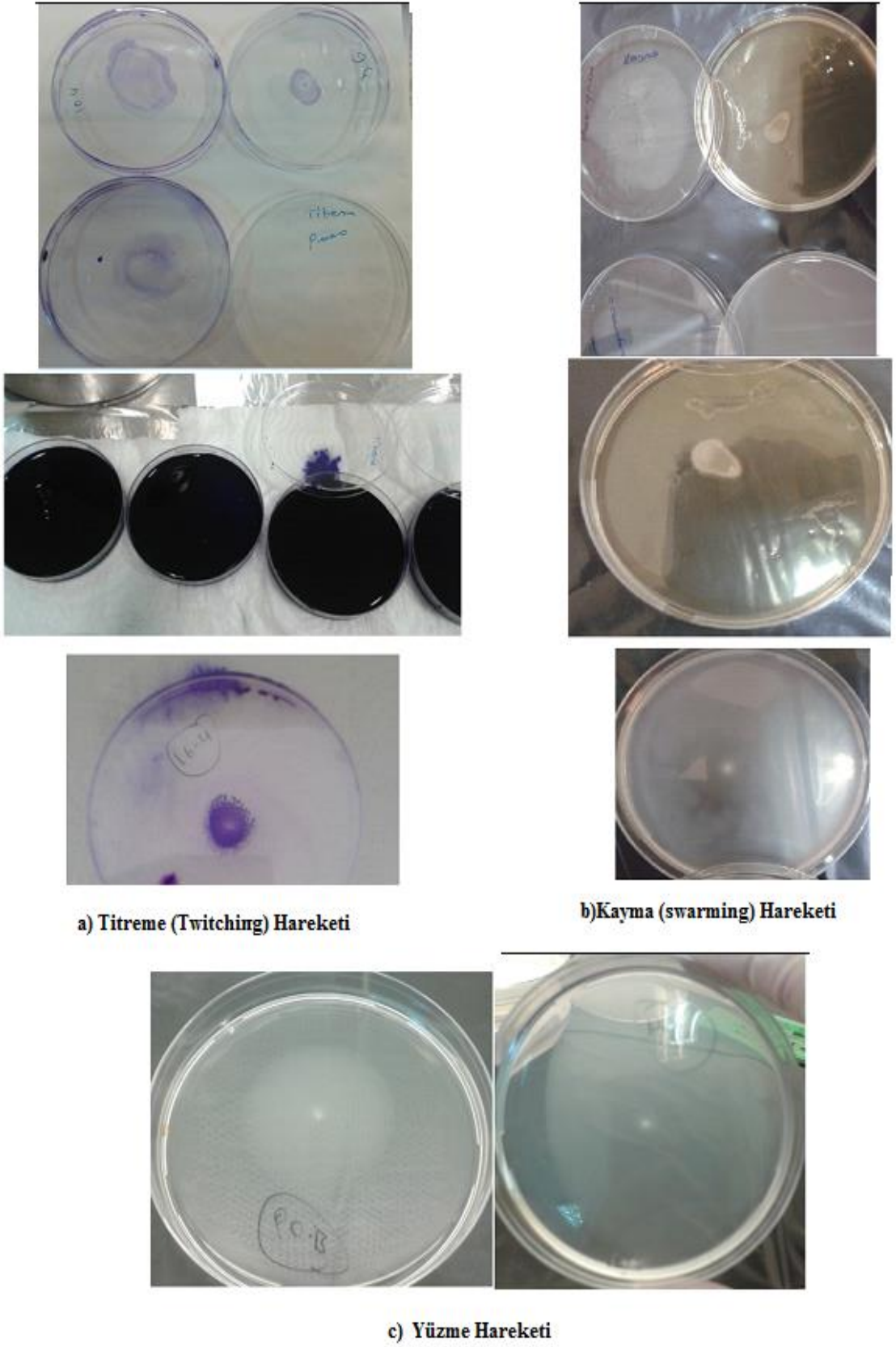
Şekil 17. İzolatların tüp, CRA ve mikrotitrasyon yöntemiyle biyofilm oluşturma özellikleri

Hareketlilik Özellikleri: *P. aeruginosa* izolatlarında hareket testlerini a)Titreme, b)Kayma ve c)Yüzme olmak üzere 3 farklı yöntemle araştırıldı. Bu kapsamda; 30 (%100) izolatın hepsi titreme ve kayma hareketi gösterirken, 25(%83,33) izolat yüzme hareketi yapabilme özelliği gösterdi. İzolatların hareket yetenekleri birlikte değerlendirildiğinde; 25(%83,33) izolat titreme, yüzme ve kayma hareketlerinin

3'ünde sahip iken, 5 (%66,66) izolat ise titreme ve kayma hareketi özelliğine sahip olduğu görüldü (Tablo 13, Şekil 18).

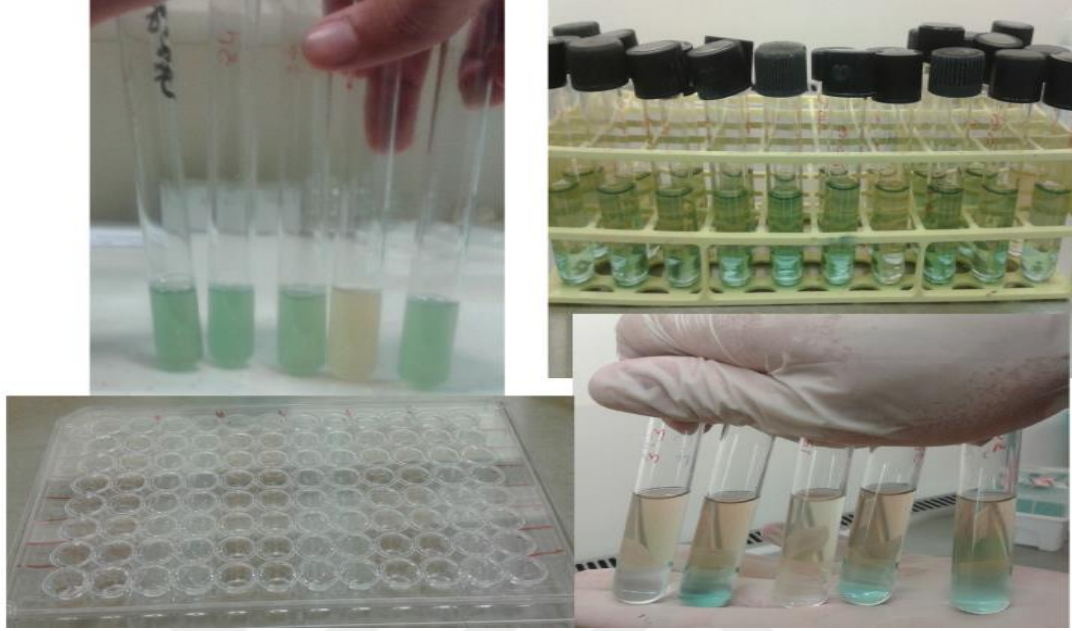
Tablo 13. *P.aeruginosa* izolatlarının hareketlilik, proteaz ve elastaz aktivite test sonuçları

İzolat Sayısı	Titreme (twitching) Hareketi	Kayma (swarming) Hareketi	Yüzme (swimming) Hareketi	Proteaz Aktivite	Elastaz
1.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Pozitif
2.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Pozitif
3.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Zayıf pozitif
4.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Zayıf pozitif
5.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Zayıf pozitif
6.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Poz (+++)
7.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Zayıf pozitif
8.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Poz (+++)
9.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Zayıf pozitif
10.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Poz (+++)
11.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Negatif
12.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Negatif
13.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Negatif
14.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Negatif
15.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Negatif	Negatif
16.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Negatif
17.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Negatif	Negatif
18.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Negatif
19.	Hareketli	Hareketli	Negatif	Pozitif	Poz (+++)
20.	Hareketli	Hareketli	Negatif	Pozitif	Poz (+++)
21.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Poz (+++)
22.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Poz (+)
23.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Poz (+++)
24.	Hareketli	Hareketli	Negatif	Negatif	Negatif
25.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Negatif
26.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Negatif
27.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Negatif
28.	Hareketli	Hareketli	Negatif	Pozitif	Zayıf pozitif
29.	Hareketli	Hareketli	Hareketli	Pozitif	Zayıf pozitif
30.	Hareketli	Hareketli	Negatif	Pozitif	Pozitif
Pozitif izolat sayısı	30 (%100,00)	30 (%100,00)	25 (%83,33)	27 (%90,00)	18 (%60,00)



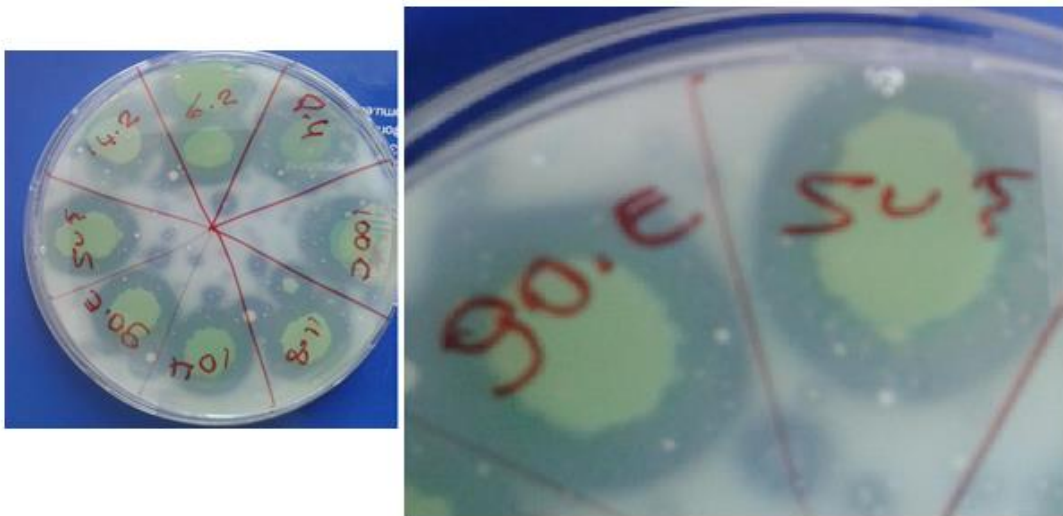
Şekil 18. *P.aeruginosa* izolatlarının hareket test sonuçları

Piyosiyanin test sonuçları: 30 izolattan 22(%73,33)'sinin piyosiyanin üretebilme kabiliyetine sahip olduğu görüldü. (Tablo 13, Şekil 19)



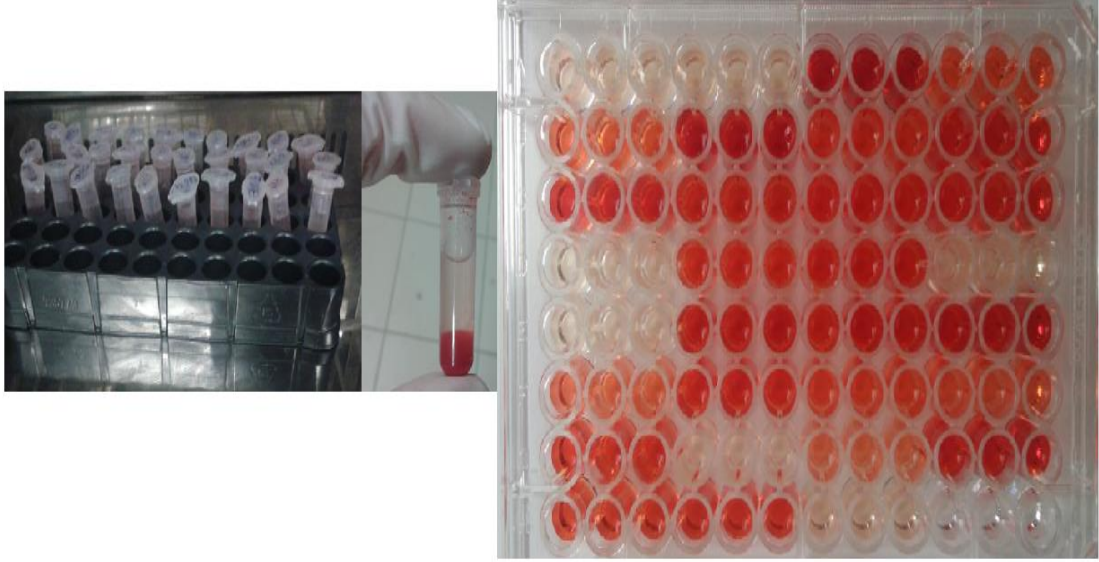
Şekil 19. Piyosiyanin üretim özelliği

Proteaz Aktivite: Proteaz aktivitesi test sonuçları Tablo 13'de gösterilmiştir. Tabloda da görüldüğü üzere toplam 30 izolatın 27(%90)'sinde proteaz aktivitesine sahip olduğu görüldü (Şekil 20).



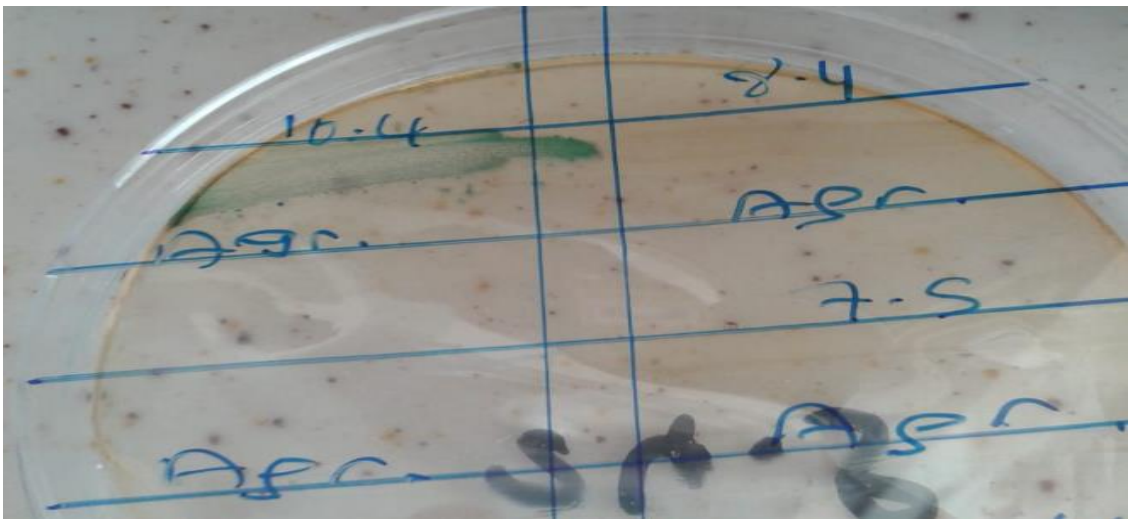
Şekil 20. İzolatların proteaz aktivitesi

Elastaz Aktivite: Elastaz testi toplam 30 *P. aeruginosa* izolatlarının 18(%69)'i elastaz üretebilme özelliği yönünden pozitif bulundu (Tablo 13, Şekil.21).



Şekil 21. *P.aeruginosa* izolatlarının elastaz aktivitesi

Homoserin lakton (HSL): Homoserin lakton (HSL) oluşumu test sonuçları Tablo 14'de gösterilmiştir. Tablo incelendiğinde, test edilen 30 *P. aeruginosa* izolatının 13 (% 43,33)'ünün HSL üretebilme kabiliyetine sahip olduğu görüldü (Şekil 22).

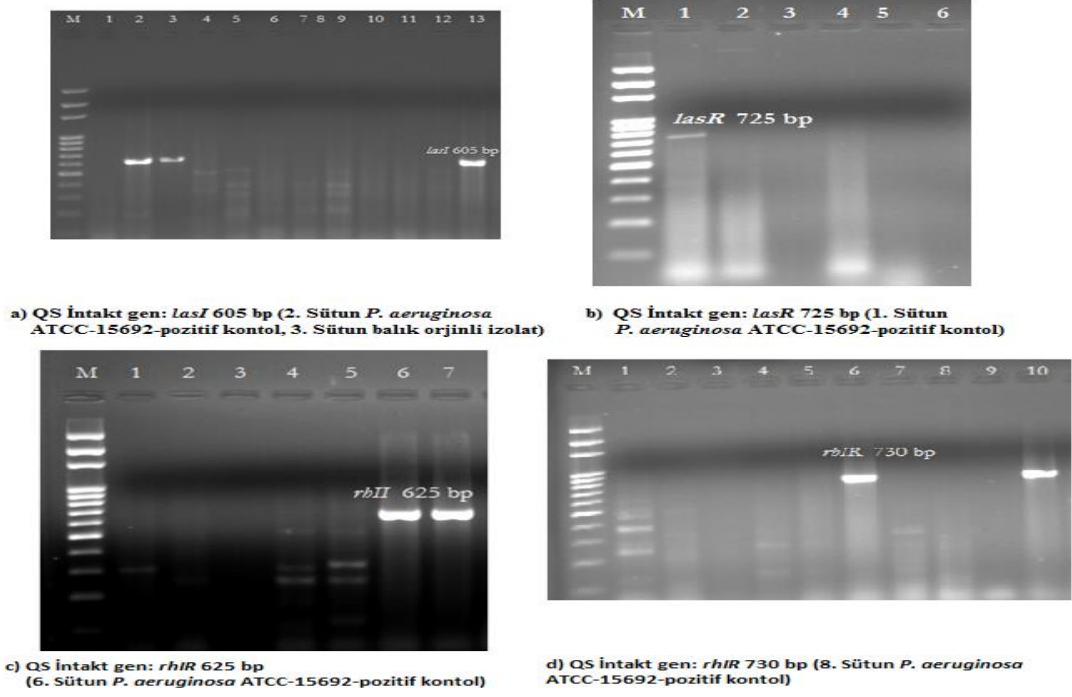


Şekil 22. HSL oluşumu (yeşil renk pozitif)

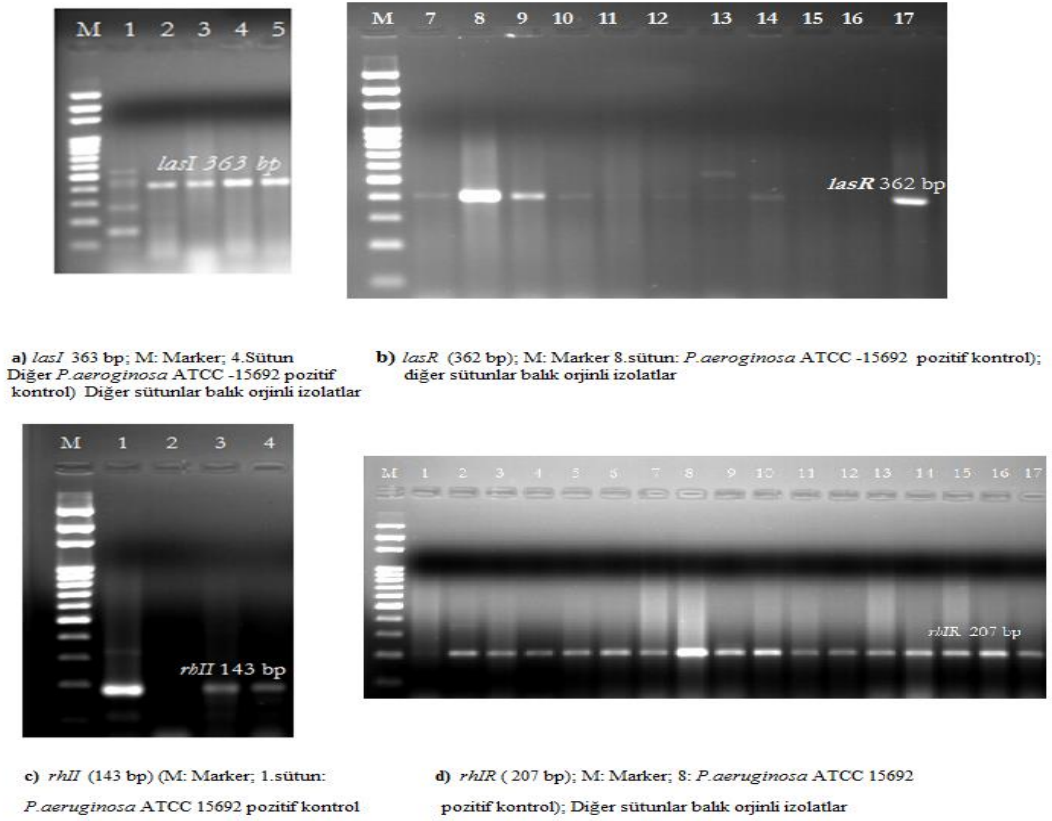
QS intakt ve internal gen profillerinin belirlenmesi: PZR analiz sonuçları Tablo 14'de (Şekil 23 ve Şekil 24) gösterilmiştir. Intakt *lasI* ve *lasR* 30 izolattın hiçbirinde saptanamazken, *rhII* geni 7 (%23,33) ve *rhIR* ise 11 (%36,66) izolatta saptandı. İnternal genlerden *lasII* geni 22 (73,33), *lasIR* geni 15 (%50), *rhII* geni 30 (%100), *rhIR* geni ise 28 (%93,33) izolatta saptandı. Analiz edilen 4 internal gen bölgesinin 4'ü de 10 (%33,33) izolatta saptandı. Toplam *las* geni 27, toplam *rhI* geni ise 30 izolatta saptandı.

Tablo 14. İzolatların intakt ve internal PZR sonuçları

No	Piyosyanin	HSL	İNTAKT GEN BÖLGESİ (bp)				INTERNAL GEN BÖLGESİ (bp)			
			<i>lasI</i> - 605	<i>lasR</i> - 725	<i>rhII</i> - 625	<i>rhIR</i> - 730	<i>lasI</i> - 363	<i>lasR</i> - 362	<i>rhIR</i> - 207	<i>rhII</i> - 143
1	Poz(+++)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
2	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
4	Poz(+++)	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.
5	Poz. (+)	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.
6	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
7	Zayıf Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.
8	Poz(+++)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
9	Poz(+++)	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.
10	Poz. (+)	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
11	Poz(+++)	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
12	Poz (+)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
13	Poz (+)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.
14	Zayıf Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
15	Zayıf Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
16	Poz. (+)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
17	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
18	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
19	Poz. (+)	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
20	Poz. (+)	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
21	Poz. (+)	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
22	Poz. (+)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
23	Poz (+)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.
24	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
25	Poz. (+)	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
26	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
27	Poz. (+)	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.
28	Zayıf Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.
29	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
30	Poz. (+)	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
Toplam	22 %73,33	13 %43,33	0 %0,00	0 %0,00	7 %23,33	11 %36,66	22 %73,33	15 %50,00	30 %100,00	28 %93,33



Şekil 23. QS intakt gen bölgeleri



Şekil 24. QS internal gen bölgeleri

5. TARTIŞMA

Vahşi ve kültür balıkları için en büyük tehditlerden biri de bakteriyal enfeksiyonlardır. *P. aeruginosa*'da toprak ve sulu ortamlarda bulunabilen bakterilerden biri olup (Spiers ve ark. 2000), balıklarda yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlar ile balık ve balık ürünlerinin bozulmalarından sorumlu en önemli patojenler arasında yer almaktadır (Abdullahi ve ark., 2013). Bu nedenle, *P. aeruginosa*'nın teşhisi, özelliklerinin belirlenmesi, virulans faktörleri, tedavide antibiyotik dirençlilik profilleri gibi özelliklerinin aydınlatılması etken ile mücadelede önemli rol oynamaktadır.

P. aeruginosa'nın identifikasyonu geniş fenotipik varyasyonları nedeniyle problemlili olabilmektedir. Bu nedenle, genelde klinik izolatların *P. aeruginosa* olarak doğrulanması amacıyla değişik gen bölgelerinin saptanması temeline dayanan moleküler tekniklerin uygulanması yoluna gidilmektedir. Bu konu ile ilgili dünyanın değişik bölgelerinden çalışmalar bildirilmiştir (de Vos ve ark., 1997; Quin ve ark., 2003; Béatrice ve ark. 2005; Lavenir ve ark. 2007; Spilker ve ark., 2008; Anuj ve ark., 2009; Abdullahi ve ark., 2013; Benie ve ark. 2017; Boutina ve ark., 2018). Bu çalışmaların birinde (Anuj ve ark. 2009), 35 klinik ve 27 çevresel olmak üzere toplam 62 izolatı (API ile doğrulanmış) *P. aeruginosa* yönünden moleküler düzeyde doğrulamak amacıyla, PA-dupleks-PZR (*ecfX* ve *gyrB*) ile *P. aeruginosa* monopleks PZR yöntemlerini (*ecfX*-PCR, *gyrB*-PCR, *oprL*-PCR, *ETA*-PCR ve PA16S-PCR) kullanmışlardır. Analiz sonucunda, dubleks RT-PZR ile *ecfX* ve *gyrB*'yi saptayabildiklerini ve bu iki geni birlikte kullanılarak yanlış pozitif sonuçların önüne geçebildiklerini bildirmişlerdir. İki klinik izolatın PA 16S-PZR ile ve 4 çevresel izolatın da *oprL*-PZR yöntemiyle, 1 izolatın da *ETA*-PZR ile yanlış pozitif verdiklerini, bunun nedenin ise genellikle *P. aeruginosa*'nın *Chromobacterium violaceum* ile çapraz reaksiyon vermesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Ancak araştırmacılar bu sonuçları elde etmelerine ve sonuç olarak, *ecfX* ve *gyrB* gen hedefli sonuçların uyumlu olmasına rağmen, literatürlede ve GenBankasında bu genler ile ilgili sınırlı dizi (sequens) bilgilerinin olduğunu ve bu nedenle bu sonuçların yalnızca tek hedefli kullanımını desteklediklerine inanmadıklarını bildirmişlerdir. Whiley ve ark. (2008)' da bu araştırmacılar gibi dizi (sequens) varyasyonlarının moleküler teşhis yöntemlerini etkileyen daha yagın problem olduğunu bildirmişlerdir. Lavenir ve ark. 2007 ve Quin

ve ark. (2003)'da bu iki genin *P. aeruginosa*'yı tür düzeyinde belirlenmesinde güvenli olduklarını bildirmişlerdir.

P. aeruginosa'nın tür düzeyde moleküler yöntemlerle tanımlanmasında *toxA* ve *algD* genlerini saptamaya yönelik çalışmalar Quin ve ark. (2003) ve Lavenir ve ark. (2007) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar analiz sonucunda yanlış negatif sonuçlar elde ettiklerini, bu durumu etkenin genetik olarak oldukça polimorfik olmasından ve dizi (sequens) varyasyonundan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Benie ve ark. (2017) ise cins düzeyinde saptadıkları *Pseudomonas* spp. izolatlarının tür düzeyinde *P. aeruginosa* olup olmadığını belirlemek amacıyla *rpoB* gen varlığını araştırmışlar ve izolatların %99,5'inde bu geni saptadıklarını ve bu izolatları *P. aeruginosa* olarak değerlendirdiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, *P. aeruginosa*'nın tür düzeyinde saptanmasında etkenin heterojinetiği nedeniyle (Ait-Tayeb ve ark., 2005; Mehri ve ark. 2013) fenotipik yöntemlerle tanımlanmış izolatların moleküler olarak da doğrulanması gerektiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, *rpoB* genini yüksek moleküler identifikasyon oranı ile *P. aeruginosa* izolatlarının doğrulanmasında başarı ile kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Boutina ve ark. (2018) ise Béatrice ve ark. (2005)'lerinin çalışmalarında kullandığı protokolü uygulayarak qPZR *oprL* gen bölgesini çoğalttıklarını, kültür yöntemiyle saptayamadıklarını, ancak *oprL* hedefli qPZR ile pozitif olan izolatların daha sonra *ecfX* ve *gyrB* gen hedefli qPZR ile analiz ettiklerini bildirmişlerdir. İki ayrı qPZR uygulama nedenini ise *oprL* qPZR'ı iyi hassasiyetinden (10 kob/ml'nin üçkatı) ve *gyrB/ecfX* qPZR'ı ise daha iyi seçiciliğe (%90) sahip oldukları için birlikte kullandıklarını, ancak elde edilen sonuçlar doğrultusunda her iki yöntemde birbirleriyle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Nitekim Béatrice ve ark. (2005)' da *oprL*-RT-PZR ile *P. aeruginosa*'yı ratlarda akciğer örneklerinde saptama sınırını 10^{3-4} kob/g olarak bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada, Spilker ve ark. (2004), toplam 85 izolatı materyal olarak kullanmışlardır. Bu izolatların 14'ü *P. aeruginosa* ve 28'ide *Pseudomonas* ile yakın ilişkili diğer türlerden oluşan toplam 42 kültür koleksiyon türleri ile birlikte 43 *Pseudomonas* olmayan izolatlardan (bunların 28'i kistik fibrosisli hastalardan izole edilmiş) oluşmuştur. *Pseudomonas* spp.'yi cins düzeyinde saptamak amacıyla PA-GS (618 bp) ile *P. aeruginosa* olup olmadığını yani *P. aeruginosa*'nın tür düzeyinde

saptamak amacıyla bizim çalışmamızda da kullandığımız PA-SS (956 bp) gen varlıklarını araştırmışlardır. Sonuç olarak, amplifiye ettikleri bütün *Pseudomonas* spp. izolatlarının tamamında PA-GS'yi saptadıklarını, PA-SS'yi ise *P. aeruginosa* izolatlarında saptadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu iki gen bölgesinin *Pseudomonas*'ın cins düzeyinde ve *P. aeruginosa*'yı da tür düzeyinde belirlemede seçicilik ve hassasiyet oranlarını %100 olduğunu bildirmişlerdir.

P.aeruginosa'nın dış membran proteini bakterinin çevre ile uyumunda önemli rol oynar. *P. aeruginosa*'nın pek çok antibiyotiğe karşı kalıtsal dirençliliğinde de (effluks transport sistemi veya membran seçiciliği) spesifik bu dış membran proteinin varlığı önemli rol oynar (de Vos ve ark., 1997). *oprL* geni *P. aeruginosa*'nın yapısal membran lipoproteini kodlar. Bu gen klinik ve diğer örneklerden *P. aeruginosa*'nın tür düzeyinde PZR ile (de Vos ve ark., 1997) veya RT-PZR yöntemiyle (Quin ve ark., 2003) saptanması amacıyla kullanılır. de Vos ve ark. (1997) moleküler olarak karakterize edilmiş iki dış membran lipoprotein genlerini dizayn ettiklerini ve klonladıklarını bildirmişlerdir. Bunlar *oprI* ve *oprL* genlerdir (Deep ve ark., 2011; Moghaddam ve ark., 2014). Bu genlerden *oprI*'nin floresan özellikli psedomonaslar için spesifik olduğunu (de Vos ve ark., 1992; Rodriguez-Herva ve ark., 1996), *oprL*'nin ise *P. aeruginosa*'nın klinik izolatlardan identifikasyonu için *oprI* ile birlikte multipleks-PZR yöntemini geliştirmişlerdir. Çalışmalarında 20 farklı floresan psedomonasları test etmişler ve sonuçta, her iki geni yalnızca klinik ve çevresel kökenli *P. aeruginosa* (n=250) izolatlarında saptadıklarını, *oprI* genini ise diğer floresan *Pseudomonas* izolatlarında saptadıklarını bildirmişlerdir. Test edilen *Pseudomonas* olmayan izolatlarında (n=15) ise bu iki geni saptayamamışlardır. *P. aeruginosa*'nın en düşük saptama sınırını ise *oprL* için 10^2 bakteri/ml olarak saptamışlardır. Çalışmamızda klasik yöntemle izole edilen ve izolatların moleküler düzeyde doğrulanması için PZR yöntemi uygulandı. Bu kapsamda *P. aeruginosa* türüne özgü (tür spesifik) iki ayrı gen bölgesinin -*oprL* (outer membrane protein) ile 16 S rDNA gen bölgeleri – varlıkları araştırıldı. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 15692 kullanıldı. Kontrolde her iki gen bölgesi saptanırken, balıklardan elde edilen izolarda PA-SS 16S rDNA gen bölgesi saptanamadı. Buna karşın, *oprL* gen bölgesi saptandı. Sonuç olarak, *oprL* gen bölgesini içeren toplam 30 balık orjinli *P. aeruginosa* izolatı elde edildi. Yaptığımız diğer bir çalışmada da bu çalışma sonuçları ile paralellik gösterdi. Yaptığımız çalışmada, tavuk

ve kıyma kökenli toplam 50 *P. aeruginosa* izolatında da *oprL* gen bölgesi saptanırken, PA-SS 16S rDNA saptanamadı. Bu konu ile ilgili Malazya'dan bir çalışma bildirilmiştir. Bu çalışmada, Abdullahi ve ark. (2013)'da *Pseudomonas* spp. şüpheli 46 su ve çeşitli balık kökenli izolattan 29 (%63,04)'unun morfolojik özellikleri, Gram boyama ve diğer biyokimyasal testler sonucu *Pseudomonas* spp. olarak doğruladıklarını, daha sonra bu izolatların *P. aeruginosa* olarak doğrulamak amacıyla *oprL* gen bölgesini bizim çalışmamızda kullandığımız primer dizilimini kullanarak belirlemişler ve sonuçta 13 izolatı *P. aeruginosa* olarak saptamışlardır. Sonuç olarak, şüpheli *P. aeruginosa* izolatlarının doğrulanması amacıyla PZR yönteminin ve bu amaçla da *oprL*'nin varlığının araştırılmasıyla başarılı bir şekilde uygulanabileceğini bildirmişlerdir. Bizim çalışma bulgularımızda bu sonucu doğrulamaktadır.

P. aeruginosa'nın büyük genoma sahip olması ve genetik varyasyonları nedeniyle fenotipik yöntemlerle teşhis edilmesinin güç ve yanlış pozitif veya negatif sonuçlar elde edilebilecek, bu nedenle izolatların moleküler düzeyde doğrulanması gerekmektedir. Yukarıda bildirilen veriler ışığı altında; klinik veya hayvansal kökenli veya diğer çevresel kökenli şüpheli *P. aeruginosa* izolatlarının tür düzeyinde belirlenmesinde, *oprL* gen bölgesinin kullanılabilmesi, hassasiyeti artırmak için ikinci bir gen bölgesinin de kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

P. aeruginosa'nın antimikrobiyal dirençliliği ile ilgili diğer hayvansal orjinli gıdalara kıyasla daha sınırlı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda etkeninin antibiyotiklere karşı dirençlilik profilleri değişkenlik göstermektedir (Abdullahi ve ark., 2013; Apenteng ve ark., 2017; Benie ve ark., 2017). Son yıllarda yapılan çalışmaların biri Batı Afrika'dan bildirilmiştir. Benie ve ark. (2017) tarafından bu bölgede yürütülen çalışmada, 225 şüpheli sığır eti, balık ve dumanlanmış balık kökenli *Pseudomonas* izolatından 205 (%91.1)'inin API sistemiyle *P. aeruginosa* olarak doğrulandığı, *rpo* gen bölgesinin (*P. aeruginosa* tür spesifik gen) saptanması amacıyla PZR tekniği uyguladıklarını ve sonuçta 204 izolatın *P. aeruginosa* olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir. Bu izolatları disk difüzyon yöntemi uygulayarak 11 farklı antibiyotiğe karşı (tikarsilin, tikarslin-klavulanik asit, aztreonam, sefepim, seftazidin, siprofloksasin, kolistin, imipenem, piperasilin, fosfomisin ve kanamisin) antibiyotik duyarlılıklarını belirlemişlerdir. Toplam 181(110 sığır eti, 43 balık eti ve 33 dumanlanmış balık eti orjinli) *P. aeruginosa* izolatlarının çoklu antibiyotik direnç gösterdiğini; bu açıdan sığır

orjinli izolatların %4,8 ile birinci sırada yer alırken, bunu %33,1'lik oranla taze balık orjinli *P. aeruginosa* ve %20,0'lık oranla da dumanlanmış balık orjinli izolatların izlediği bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca dumanlanmış balık eti izolatlarının %68,4'lük oranla tikarsilin/tikarsilin+klavulanik asite karşı dirençli olduklarını, bu antibiyotiğe karşı taze balık orjinli izolatların sırasıyla %52,5 ve %50,0 oranda olduğunu, sefepim antibiyotiğine karşı ise dumanlanmış balık ve taze balıkların sırasıyla %17,5 ve %10'luk oranla dirençli olduklarını, seftazidim/imipenem antibiyotiğine karşı ise taze balık orjinli izolatların %7,5, dumanlanmış balık orjinli izolatların %5,3 oranında, kolistin antibiyotiğine karşı dirençlilik oranını da %3,2 ila %5,3 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bütün izolatların %34,2 ila %28 oranında piperasiline karşı ve %32,2- %35,4 ile de siprofloksasine karşı dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Tüm izolatların fosfomisine karşı hassas, buna karşın %97'lik oranla aztreonama karşı dirençli olduklarını saptamışlardır. Bizim çalışmamızda elde edilen izolatlardan 4 antibiyotiğe karşı sadece 1(%3,22) izolatta çoklu antibiyotik dirençliliği (orta düzeyde veya dirençli) saptanmıştır. Diğer antibiyotiklere karşı ise %3,22-12,90 oranlarında dirençlilik (orta düzeyde veya dirençli) bulunmuştur. Bu oran Benie ve ark. (2017)'nin buldukları değerden çok daha düşük orandadır. Çalışmamızda 3. kuşak sefalosporin antibiyotiklerinden seftazidime karşı % 6,4 oranda (2/31 izolat) dirençli (orta düzeyde veya dirençli) iken, Benie ve ark (2017)'nin yaptığı çalışmada 3. kuşak sefalosporin antibiyotiklerinden seftazidime karşı oldukça düşük oranda dirençlilik saptanmış, 4. kuşak sefalosporin antibiyotiklerden sefepime karşı ise %10 oranda dirençlilik bildirilmiştir.

Ermenistan'dan bildirilen bir çalışmada, (Ginovyan ve ark. 2018), *P. aeruginosa* izolatlarının siprofloksasine karşı çok duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Abdullahi ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalarında balık, karides ve su kökenli *P. aeruginosa* izolatlarının en az bir antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, en yüksek dirençliliğin ampisilin ve eritromisine karşı (%100) olduğu, buna karşın yine %92,30 gibi yüksek oranda nitrofurantoine, %76,92 oranında karbenisiline ve %23,08 oranında ise gentamisine karşı dirençli olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. En düşük dirençliliğin ise gentamisine, norfloksasine ve nalidiksik asite karşı belirlemişlerdir.

Bu konu ile yapılan başka bir çalışmada da Apenteng ve ark. (2017), 18 *P. aeruginosa* izolatını balık yetiştirme havuzundan izole ettilerini, bu izolatların test

ettikleri 5 farklı antibiyotikten gentamisine karşı %66,66, tetrasikline %61,1 ve siproflaksosine karşı %50, yine tetrasiklin ve siprofloksasin antibiyotiklerine karşı orta düzeyde dirençlilik oranının ise %5,56 olarak bildirilmiştir.

Mısır'dan bildirilen bir çalışmada sazan (common carp-*Cyprinus carpio*) balığı Nil çipurası (Nile tilapia –*Oreochromis niloticus*) ve Afrika yayın balığından (African catfish-*Clarias gariepinus*) izole edilen *P. aeruginosa* izolatları kolistin sulfat, danofloxacin, nalidiksik asit, oxolonik asit ve oxytetrasikline karşı duyarlı iken, amoksisilin, sefalosporin, eritromisin, linkomisin, nitrofurantoin ve sulfametoksazol + trimetoprim antibiyotiklerine karşı dirençli, gentamisine karşı ise orta düzeyde dirençli oldukları bildirilmiştir (Hanna ve ark., 2014).

Başka bir çalışmada da Algama ve ark. (2012), balıklardan izole ettikleri *P. aeruginosa* izolatlarının kanamisin, sefalotin, sulfatriad, kolistin metan sulfonat, tobtamisin, nitrofurantoin, sefodoksim, sefoksitin ve aztreonam antibiyotiklerine karşı oldukça dirençli, buna karşın tetrasiklin, sefotaksim, siprofloksasin, norfloksasin, ofloksasin, moksifloksasin, gatifloksasin ve levofloksasine karşı ise oldukça duyarlı olduklarını bildirmişlerdir.

Bizim çalışma bulgularımız ile yukarıda bildirilen çalışma bulguları arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar bölgesel farklılıklardan kaynaklanacağı gibi, balıkların kültür balığı olup olmadığına göre de değişiklik göstermektedir. Kültür balıkçılığında, balık yemlerine antibiyotik katıldığından dolayı (supplement veya tedavi edici amaçlarla), bu balıklardan veya bu tür balıkçılık yapıldığı bölgelerdeki balık, su ve sedimentlerden izole edilen bakterilerde antibiyotik dirençlilik oranı çok daha yüksektir. Nitekim, antibiyotik dirençlilik ile kültür balıkçılığında uygulanan antibiyotiklerin yaklaşık %70-80'inin su sistemi içine dağıldığı ileri sürülmüştür (Burrige ve ark., 2010).

Antibiyotiklerin balık yetiştiriciliğinde koruyucu ve tedavi amaçlarıyla kullanılmaktadır (Serrano ve ark., 2017). Sadece balıklara özgü antibiyotik olmadığı için, bu alanda kullanılan antibiyotikler veteriner hekimlik alanında kullanılan antibiyotikler arasından seçilmektedir. Balıkçılıkta antibiyotiklerin kullanımı ve kültür balıkçılığında bazen aşırı miktarda antibiyotik kullanımı, su ve sucul kaynaklı antimikrobiale dirençli bakterilerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu tür balık ve diğer yenilebilir ürünlerin birçoğu marketlerde insan tüketimine de sunulmaktadır (Cabot ve

ark.,2016; Serrano ve ark., 2017). Kùltür balıkçılığında ortaya çıkan antibiyotik dirençli bakteriler ve bunlara neden olan genler ile karasal hayvan yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotik dirençlilik ve bu dirençliliğe neden olan genler arasında benzerlik bulunmaktadır ve hatta aynı özelliklere sahiptir (Benie ve ark., 2017). Ayrıca, *P. aeruginosa* dış membran proteininin düşük geçirgenlik özelliği, değişik effluks pompalama sistemleri ve antibiyotikleri inaktive edici enzimleri nedeniyle pek çok antibiyotiğe karşı dirençli olduğu bildirilmiştir (Hancock, 1998). Vaisvila ve ark. (2001)'da bu varyasyonların bakterinin büyük ve çeşitli genomlarıyla ilişki olduğunu ve akuatik ortamda onu dağıtabildiği ve bu durumda diğer dirençli genleri taşıyan bakteri için bir rezervuar oluşturabileceğini bildirmiştir.

P. aeruginosa dış membran geçirgenliğini azaltabilme, antibiyotiklerin aktif olarak hücrenin dışına pompalayan effluks sistemi ve antibiyotikleri inaktive eden enzimler üretmesi nedeniyle kalıtsal dirençlilik özelliklerine sahiptir. Bizim çalışmamızda da *oprL* geni bütün izolatlarda saptamıştır. Bu gen *P.aeruginosa* 'ya özgü yani tür spesifik bir gen olmasının yanı sıra antibiyotik dirençliliğinden de sorumlu olan genlerden birisidir. Deep ve ark. (2011) ve Moghaddam ve ark. (2014) da hem OprL ve OprI'nin effluks mekanizması ve membran geçirgenliğini değiştirmek yoluyla antibiyotik dirençlilikte önemli role sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle effluks pompalama sistemi yoluyla dirençlilik oluşturan antibiyotikler (fluoroquinolones, aminoglycosides, β -Lactams (özellikle meropenem, ticarcillin), tetracycline, tigecycline, chloramphenicol, makrolitler gibi) göz önünde bulundurulursa (Meletis ve Bagkeri, 2013), bu tür antibiyotiklerine karşı *oprL* nedeniye izolatların dirençli olması beklenirdi. Yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa*'nın effluks pompalama sistemini regüle eden başka mekanizmaların da bulunduğu bildirilmiştir. Bu konu ile ilgili olarak, Meletis ve Bagkeri (2013), *P. aeruginosa*'nın çeşitli effluks pompalama sistemine sahip olduğunu ve bu pompaların 3 proteinden oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu proteinler 1) proton hareket gücünden enerjiyi kullanan sitoplazmik membranın bir protein nakledicisi, 2) periplazmik bağlayıcı protein ve 3) dış membran porini. Çalışmamızda izolatların antibiyotiklere karşı duyarlı olması da *oprL* varlığının diğer mekanizmalarla birlikte yetersiz kaldığını göstermektedir.

Akuatik çevre, ilaç kalıntılarının, mikrobiyal patojenlerin ve antibiyotik dirençli genlerin dağılımı için sürekli ve kolay mekanizma sağlar. Bu nedenle, kültür

balıkçılığı antimikrobiyal belirteçlerin (hareketli genetik elementler) naklinde ve hızlı yayılımı bakımından büyük bir tehdit olarak devam edecektir.

P. aeruginosa ekstraselülüler proteaz üretir. Bu bakteride 3 farklı proteaz elde edilmiştir. Bütün proteazlar kazeini sindirebilirlerken, proteaz II kazein ile birlikte elastini de parçalar. Bu nedenle proteazlar doku yıkımında ve etkenin invazyonunda önemli role sahiptirler. Ancak, bu enzimin etkisi lokalize olup, hayvanlar için çok toksik değildir. *P. aeruginosa* izolatlarının %90'ında üretilen "toxin A" ise etkenin en toksik proteaz tipidir (Iglewski, 1996). Bizim çalışmamızda, izole edilen 30 *P. aeruginosa* izolatından 27'sinin proteaz aktivitesine sahip olduğu görüldü. Bu nedenle etkenin lokal harabiyet ve invaze olmasında yardımcı bir enzime sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bu izolatların 17'sinde aynı zamanda elastaz aktivitesi de saptandı. Bu özelliği proteaz II'den mi yoksa elastaz aktivitesini regüle eden genin mi regüle ettiğini söyleyemeyiz. Ancak, bunlar arasında en toksik olan *toxA* ve elastaz genlerinin varlıklarını araştırılmadığı için çalışma bu yönleriyle değerlendirememektedir.

Pekçok planktonik organizma, flagellum sayesinde yüzeye doğru yüzerek başlangıçta bir yüzeye kolonize olabilir ve tip IV pili ve flagella gibi bakteriyel adezinler yoluyla da yüzeye yapışabilir (O'Toole ve Kolter, 1998; Pratt ve Kolter, 1998; Costerson ve ark., 1999; Sauer ve ark., 2002; Stoodley ve ark., 2002). Bakteri bir kez tutunduktan sonra, tekrar eden özel-yüzey ilişkili hareketleri ve çoğalmaları ile "mikrokoloni" olarak adlandırılan bakteri kümelenmesinin oluşmasına, daha sonrada olgun biyofilm şekillenmesine neden olur (Garrett ve ark., 1999; O'Toole ve ark., 2000; Toutain ve ark., 2004). *P. aeruginosa* hiperflagelasyon ile flagellum-aracılı yüzme hareketi, tip-IV pili ile yüzey-ilişkili kayma (swarming) ve titreme (twitching) hareketi gösterebilir (Alm ve Mattick, 1995; Köhler ve ark., 2000). Yüzme ve titreme hareketinde hücreler bağımsız olarak hareket edebilir, fakat kayma (swarming) hareketi için bakteri çeşitli mekanizmalara ihtiyaç duyar; bunlardan birincisi QS prosesi ile birlikte çalışma (Tremblay ve ark., 2007), ikincisi fonksiyonel lipopolisakkaritler (Lindhout ve ark., 2009) ve üçüncü olarakta hiperflagellasyondur (Copeland ve Weibel, 2009). Yüzme ve titreme hareketleri için gerekli olmayan, ancak kayma hareketi için *P. aeruginosa*'nın ihtiyaç duyduğu diğer bir mekanizma ise biyosürfaktan (ramnolipit) madde üretimidir. Ramnolipit yüzey boyunca hareket için gerekli olan yüzey geriliminin azaltılmasını sağlar (Deziel ve ark., 2003; Caiazza ve ark., 2005; Copeland

ve Weibel, 2009). Nemli yüzey, kayma (swarming) hareketi için gereklidir ve ramnolipit üretimi sayesinde ancak kayma (swarming) hareketi için gerekli nemlilik sağlanır. Kayma (swarming) hareketine sahip bakteri hidrofilik özelliktedir. Oysa, yüzme hareketi yarıkatı besiyeri içinde gerçekleştiğinden dolayı nemli yüzey ve ramnolipit üretimine ihtiyaç duyulmaz (Copeland ve Weibel, 2009). Kayma (swarming) hareketi biyofilm şekillenmesini (Garrett ve ark., 1999; O'Toole ve ark., 2000; Toutain ve ark., 2004) ve antibiyotik dirençliliğinin şekillenmesini de sağlar (Caiazza ve ark., 2005; Butler ve ark., 2010).

Bizim çalışmamızda, 30 *P. aeruginosa* izolatın tamamı kayma (swarming) hareketi gösterdi. Bu sonuçlar, izolatların kayma hareketi için gerekli olan QS prosesi ile birlikte çalışma, fonksiyonel lipopolisakkaritler, hiperflagellasyon ile bu izolatların yüzey boyunca hareket için gerekli olan nemliliği ve yüzey geriliminin azaltılmasını sağlayan biyosürfaktan (ramnolipit) madde üretebildiği, başka bir deyişle 4 mekanizmaya da sahip olduğunu gösterdi. Kayma hareketinde, izole ettiğimiz 1 izolat (22 mm) *P. aeruginosa* (14 mm) suşunun gösterdiği kayma hareketinden daha fazla alanda kayma hareketi gösterdi. Bu izolat bir antibiyotiğe (imipenem) dirençli, tüpte biyofilm özelliği pozitif olmakla beraber, CRA'da ve mikrotitrasyon yöntemiyle biyofilm oluşturma özelliği saptanamadı. Ancak, HSL test sonucu pozitif bulundu. Aynı izolatın QS yönünden intakt ve internal gen varlıkları yönünden değerlendirildiğinde; intakt gen bölgesinden *rhIR* ile internal gen bölgelerinden *rhIR* ve *rhII* gen bölgelerinin varlıkları bu izolatta tespit edildi. Bu kapsamda, kayma hareketi büyüklüğünün bu sayılan özellikler yönünden direk bir korelasyonunun bulunmadığını söyleyebiliriz. Çünkü, diğer bir izolatın kayma hareketi çapı (2,5 mm) *P. aeruginosa* suşundan daha küçük olmasına rağmen, 4 farklı antibiyotiğe karşı dirençli, CRA'da ve tüpte biyofilm oluşturma özellikleri pozitif, QS varlığını gösteren HSL özelliği pozitif, intakt gen bölgesinden *rhIR* ve internal gen bölgesinden *lasI*, *rhIR* ve *rhII* gen varlıkları da pozitif bulundu.

Çalışmamızda yapılan üç ayrı hareketlilik testlerinden 30 izolatın kayma (swarming) ve titreme (twitching) hareketlerinin her ikisine de sahip olduğu görüldü. Bu özellik, çalışmada izole ve identifiye edilen 30 izolatın da bu hareketlerden sorumlu olan tip-IV piliye sahip olduğunu göstermektedir. Ancak, yüzme (swimming) hareketi 30 izolatın 25'inde saptandı. Bu 5 izolatın titreme ve kayma hareketlerinin bulunmayışı,

bu 5 izolatında tip-IV piliye sahip olmadığını göstermektedir. Tüm hareketlilik test sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; 25 izolatın tip-IV pili ile hiperflagelasyona sahip olduğu, bu oluşumlar sayesinde yüzme, titreme ve kayma hareket kabiliyetlerine sahip olduğu, 5 izolatın ise sadece tip-IV piliye sahip olmakla beraber, hiperflagelasyona sahip olmadığı sonucuna varılabilir.

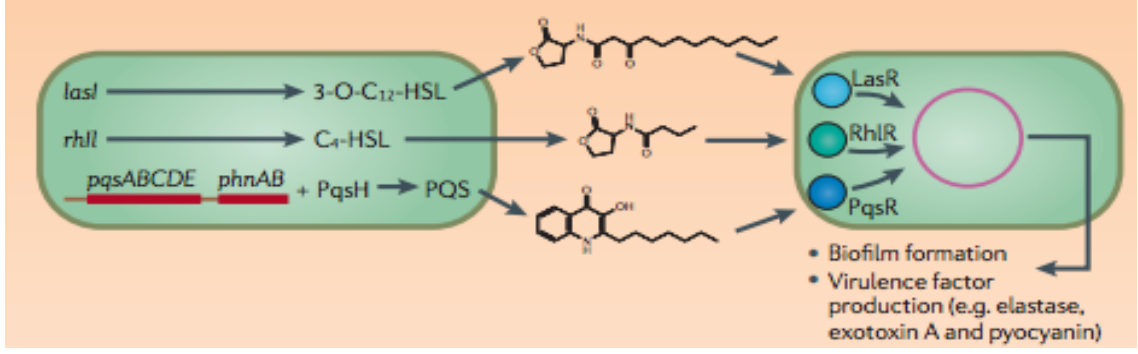
Pilus çok yönlü fonksiyone sahip olup, kolonizasyonun başlatılmasında ve konakçının epitel yüzeyi üzerine adezyonunda çok önemli role sahiptir (Babapour ve ark., 2012; Rostamzadeh ve ark., 2016). Pili aynı zamanda etkenin biyofilm oluşturması içinde önemlidir (Lisboa ve ark., 2010; Babapour ve ark., 2012). *Pil* diye adlandırılan bu genler bakterial kromozomun farklı bölgelerinde bulunur. Bu genlerin salınımı Pil-S ve Pil-R ile alternatif sigma faktor RpoN adı verilen iki komponentli sistem tarafından kontrol edilir (Benie ve ark., 2017).

Hareketlilik ile *P. aeruginosa* patojenitesi arasındaki ilişki incelendiğinde; *P. aeruginosa*'nın "yüzme" şeklindeki hareketinden sorumlu olan kirpik (flagella) sayesinde, etken yaygın membran komponentleri (asiolaGM1 gibi) aracılığıyla epitel hücrelerine bağlanarak, önce adeze daha sonra kolonize olabilir. Bu bakterinin titreme ve kayma hareketlerinden sorumlu olan pilus, bir adezin protein olup, *P. aeruginosa*'nın hücre yüzeyine tutunmasında önemli role sahiptir. Pilus, etkenin hava yollarına hızla yayılmasına ve kolonize olmasına yardımcı olur. Bu bilgiler ışığı altında, balıklardan izole edilen *P. aeruginosa* izolatları konakçı hücre yüzeyine tutunma ve kolonize olabilme özelliklerine sahiptir. Ancak, solunum sisteminde hava yollarına (bronşlara) tutunabilmesi için, pilus dışında pilus dışı ikinci bir adezin yapısına da ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (O'May ve ark., 2009). Bu adezin yapı *P. aeruginosa*'nın asialoGM1 reseptörlerine bağlanmasında önemli rol oynar. Bunun içinde etken önce nöromidaz enzimini üretir (Baron ve ark., 1986; Erdem, 1999). Bu enzim, enfeksiyon bölgesinde önce etkenin bağlanacağı bölgede gangliozitlerdeki siyalik asit kalıntılarını yok eder. Daha sonra etken adezinlerle asialoGM1 reseptörlerine bağlanır. Çalışmamızda ise izolatlar bu yönüyle analiz edilmedi. Ancak, mevcut veriler izolatların patojenitede rol oynayan özelliklere sahip olabileceğini göstermektedir.

QS Sisteminde AI oldukça önemli olup, bakteriler arasındaki iletişimden sorumlu diffuse olabilen küçük kimyasal mddelerdir. AHL moleküllerinin tespiti için, *C. violaceum* CV026 indik素 suşu kullanılabilir. Ortamdaki AHL molekülleriyle *C.*

violaceum CV026 biyosensör suşunda mor pigment olan “viyolasinin” üretilir (McClellan ve ark., 1997). Bizim çalışmamızda ise AHL moleküllerinin saptanması için, pZLR4 plazmiti taşıyan *A. tumefaciens* NT1 (Shaw ve ark., 1997; Cha ve ark., 1998; Ravn ve ark., 2001) indikatör suşu, ortama X-Gal (5-Bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid) eklenip, N-acyl yan zincirinde 6-12 karbona sahip AHL molekülünü uyarması sağlanmış ve “yeşil renk” oluşturulmuştur. Bu şekilde, *P.aeruginosa* izolatlarının orijinal krem renginin yeşil renge değişimiyle çevreyi algılamının varlığı ispatlanmaktadır (Ulusoy, 2007; Myszka ve Czaczyk, 2012). HSL testinde yeşil rengin oluşumu pozitif olarak değerlendirilmektedir. Çünkü bu renk, N-acyl yan zincirinde 6-12 karbona sahip AHL molekülünü uyarmasıyla şekillenmekte ve çevreyi algılamının varlığını göstermektedir (Ulusoy, 2007; Myszka ve Czaczyk, 2012).

P. aeruginosa'da QS sisteminin ana düzenleyicilerinden birisi LasR proteinidir. Bu proteine, QS regülasyonu için, AI (N-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone (OdDHL) molekülünün bağlanması için ihtiyaç duyulur (Şekil 25) (Huang ve ark., 2016). *LasR* geni, *P. aeruginosa*'da QS sistemi ile ilişkili sayısız hedef genlerin aktivasyonundan sorumlu olan transkripsiyon (kopyalama-çoğaltma) faktörlerini kodlar. *lasR*'de meydana gelen mutasyonlar, onlar tarafından düzenlenen fenotipler kadar çeşitlidir (Wang ve ark., 2016). Yapılan bu çalışmada, AI- HSL moleküllerinden sadece C₆₋₁₂-HSL olan AI varlığı araştırıldı. C₄-HSL varlığı ise araştırılmadı. *P.aeruginosa*'da lasR-3-O-C₁₂-HSL kompleksi virulans genlerinin transkripsiyonunu aktive eder. Bu çalışmada, 30 izolattan 13'ü (%43,33) C₆₋₁₂- HSL üretimi pozitif bulunmuştur. Bu sayede, *P.aeruginosa* bakterileri kendi aralarında biyofilm oluşturmak üzere iletişim kurabilir, antibiyotiklere karşı da direnç gösterebilir ve virulans genleri de üretebilirler. Çalışmamızda 30 izolattan sadece 1'inde çoklu antibiyotik (4 antibiyotik) dirençliliği ile birlikte AHL varlığı saptanmıştır. Bu izolatın aynı zamanda proteaz aktivesi de pozitif bulunmuştur. Beş (5) izolat ise 1 antibiyotiğe karşı dirençli bulunmuştur.



Şekil 25. AI ile *lasI* ve *rhlI* ilişkisi

https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Microbial_biofilm_inhibits_wound_healing

QS sistemi ile HSL arasındaki ilişki incelendiğinde (Tablo 14); *lasI* geni HSL pozitif 13 izolatın 8'inde saptanmış olup, *lasR* ise 6 izolatta saptanmıştır. *LasI* veya *lasR* genlerinin en az birinin bulunduğu izolat sayısı ise 12 idi. Bir izolatta ise her iki gen saptanamamıştır. Her iki geninde mevcut olduğu gen sayısı ise 2 idi. *P. aeruginosa*'da *lasR* sentezi için ve takiben *lasR* aktivasyonu için *lasI* aracılıklı 3-O-C₁₂-HSL üretiminin hücrede belli bir konsantrasyon düzeyine ulaşması gerekir. Dolayısıyla *lasI*'nin mevcudiyeti her zaman *lasR*'inde mevcut olacağı anlamına gelmemektedir ve *P. aeruginosa*'da temel düzeyde *lasI* geninin ve *lasI* aracılıklı 3-O-C₁₂-HSL üretiminin gerçekleşebileceği bildirilmiştir (Hill ve ark., 2005). Bu nedenle çalışmamızda *lasI*'nin mevcut olup, *lasR*'nin saptanamadığı 2 izolatın *lasI* aracılıklı 3-O-C₁₂-HSL üretiminin *lasR*'nin sentezi için gerekli konsantrasyona ulaşamadığı için sentezlenemediği ve aktive olamadığı sonucuna varılabilir.

Biyofilm ile AI-HSL ilişkisi incelendiğinde; 13 izolatın tüpte, 6 izolatın mikrotitrasyon yöntemiyle ve 5 izolatın ise CRA'da biyofilm oluşturabilme özelliğine sahip olduğu görülmektedir. Her üç yöntem birlikte karşılaştırıldığında; HSL-pozitif 2 izolatın 3 ayrı yöntemle saptanan biyofilm aktivitesine sahip olduğu, iki yöntemle ise; 3 izolatın CRA'da ve tüpte biyofilm yapma, 4 izolatın da tüpte ve mikrotitrasyon yöntemiyle biyofilm oluşturma özelliğine sahip olduğu görüldü. Sonuç olarak HSL üretimi pozitif izolatlarının tamamının en az bir yöntemle biyofilm oluşturma özelliğine sahip olduğu görüldü.

AI-HSL ile piyosiyenin üretimi yönünden incelendiğinde, piyosiyenin üreten 22 izolatın 10'unda HSL üretimi pozitif bulunmuştur (Tablo 14, Tablo 15). Şekil 8'de

görüldüğü gibi *rhII-rhIR*'nin piyosiyanın üretiminden sorumlu genlerdir. Bizim çalışmamızda da AI-HSL pozitif 13 izolatın 10'unda piyosiyonin üretebilme kabiliyetine sahip olduğu görüldü. Bu izolatların QS Sisteminde yer alan *rhII-rhIR* genlerin aktivasyonu sonucu transkriptte olan *rhII* ile *rhIR* aktivatör proteinleri sayesinde üretildiği bilinmektedir (Şekil 8). Çalışmamızda 10 izolatın 9'unda adı geçen her iki gene de sahip olduğu, sadece 1 izoatta *rhIR* pozitif iken, *rhII*'nin negatif olduğu saptandı. *LasR* ise piyosiyanın üreten izolatların 5'inde saptandı. Bilindiği gibi *lasR* geni *rhII-rhIR*'yi uyarmakta ve uyarılan genlerin ürettiği proteinler tarafından piyosyanin üretilmektedir. *LasR*'nin 5 izolatta bulunmamasına rağmen üretilmesi, *lasR* dışında başka genler tarafından da aktive edilebileceğini göstermektedir. Nitekim Şekil 8 incelendiğinde PQS gibi 3. QS Sistem genleri ile GacA ve RelA tarafından da aktive edildiğini görebiliriz.

Tablo 15. HSL Pozitif 13 izolatın elastaz, proteaz, QS sistemi, biyofilm ve hareketlilik özellikleri

İzolat Sayısı	HSL	Piyosiyon	Elastaz	Proteaz	İNTAKT GEN BÖLGESİ				INTERNAL GEN BÖLGESİ			
					<i>lasI</i>	<i>lasI</i>	<i>rhII</i>	<i>rhII</i>	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhIR</i>	<i>rhII</i>
1	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
2	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.
3	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.
4	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.
5	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
6	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
7	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
8	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
9	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
10	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.
11	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.
12	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.
13	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Poz.	Poz.	Poz.
Toplam	13	10	8	13	0	0	4	6	8	6	13	12
İzolat Sayısı	CRA Biyofilm		Tüpte Biyofilm		Mikrotitrasyon Biyofilm		Titreme Hareketi	Kayma Hareketi	Yüzme Hareketi			
1	Neg.		Poz.		Neg.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
2	Neg.		Poz.		Poz.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
3	Neg.		Poz.		Poz.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
4	Poz.		Poz.		Neg.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
5	Poz.		Poz.		Poz.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
6	Poz.		Poz.		Poz.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
7	Poz.		Poz.		Neg.		Hareketli	Hareketli	Negatif			
8	Neg.		Poz.		Poz.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
9	Poz.		Poz.		Neg.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
10	Neg.		Poz.		Neg.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
11	Neg.		Poz.		Neg.		Hareketli	Hareketli	Negatif			
12	Neg.		Poz.		Neg.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
13	Neg.		Poz.		Poz.		Hareketli	Hareketli	Hareketli			
Toplam	5		13		6		13	13	11			

HSL-pozitif 13 izolatın hareket yetenekleri ile proteaz ve elastaz aktiviteleri incelendiğinde; 13 izolatın tamamının hem titreme (twitching) hem de kayma (swarming) hareketine, 11'inin ise sadece yüzme hareketine sahip olduğu görüldü. Dolayısıyla bu izolatların QS sistemi, IV tip pili ile hiperflagellasyon ve flagelluma ve ramnolipit sentez edebilme yeteneğine sahip olduğu, 12 izolatın proteaz aktivitesine ve 8'inin de elastaz aktivitesine sahip olduğu görüldü. Elastaz aktivitesi hem AI olarak C₁₂-HSL hem de C₄-HSL üretimi ile QS Sisteminin başlatılması ve takiben hem C₁₂-HSL üretimi belli bir konsantrasyona ulaştığında aktive olan lasI-lasR sistemi, hem de C₄-HSL AI konsantrasyonu belli bir düzeye geldiği zaman QS Sisteminin aktivasyonu sonucu rhII-rhIR sisteminin aktivasyonu sonucu bakteriden sentez edilmektedir. Bizim çalışmamızda sadece C₁₂-HSL üretimine bakıldığı için lasI ve/veya lasR 8 izolatın 7'sinde mevcut olup, 1 izolatta ise saptanamamıştır (Tablo 15). Sadece 1 izolatta ise hem *lasI* hem de *lasR* saptanmış, 3 izolatta sadece *lasI*, 3 izolatta ise sadece *lasR* saptanmıştır. Dolayısıyla bu izolatlar dışında HSL pozitif ve elastaz aktivitesine sahip 1 izolattın hem intakt hem de internal *rhII-rhIR* gen bölgelerine sahip oluşları, AI olarak C₄-HSL sistemine sahip olduğu ve genlerin aktivasyonu sonucu virulans faktör olarak üretebildikleri düşünülmektedir (Şekil 8). Bu sonuçlar, proteaz aktivitesi için de geçerli olup, proteaz da *P. aeruginosa*'nın virulans faktörlerinden brisidir. Proteaz ise C₁₂-HSL üretimi pozitif 12 izolatta saptanmış (Tablo 15), *lasI* geni bu izolatların 5'inde, *lasR* ise 3'ünde saptanmış, her iki gen birlikte 1 izolatta saptanmıştır. *rhII* ise proteaz aktivitesine sahip izolatlarda, *rhII-rhIR* birlikte 12 izolatta saptanmıştır.

Çalışmamızda intakt ve internal bulgu sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; *lasI* geni 30 izolatın 22 (%73,33)'sinde saptanırken, *lasR* 15 (%50) izolatta saptanmıştır. *P. aeruginosa*'da *lasR* sentezi için ve takiben lasR aktivasyonu için *lasI* aracılıklı 3-O-C₁₂-HSL üretiminin hücrede belli bir konsantrasyon düzeyine ulaşması gerekir. Dolayısıyla *lasI*'nin mevcudiyeti her zaman *lasR*'inde mevcut olacağı anlamına gelmediği ve *P. aeruginosa*'da temel düzeyde *lasI* geninin ve *lasI* aracılıklı 3-O-C₁₂-HSL üretiminin gerçekleşebileceği bildirilmiştir (Hill ve ark., 2005). Bu nedenlerle çalışmamızda, *lasR*'nin saptanamadığı toplam 4 *lasI* geni mevcut olan izolatlarda *lasI* aracılıklı 3-O-C₁₂-HSL üretiminin *lasR*'nin sentezi için gerekli konsantrasyona ulaşamadığı için sentezlenemediği ve aktive olamadığı sonucuna varılmıştır. 3 izolatta ise sadece *lasR* geni saptanmış ama bu izolatlarda *lasI* geni saptanamamıştır. LasR'nin

regülasyonu için GacA, Vfr ve relA dahil pek çok faktörün *LasR*'yi pozitif olarak regüle ettiği bilinmektedir (van Delden ve Iglewski, 1998; de Kievit ve ark., 2000). Nitekim, Shuster ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* suşunda *vfr*'nin delesyonunda bütün *lasR* ekspirasyonunun elimine edildiği ve virulans genlerin üretiminin azaldığı bildirmişlerdir (Hentzer ve ark., 2003; Shuster ve ark., 2003).

QS Sisteminde, *lasR* aracılı ile de *rhIR*'nin aktivasyonu gerçekleştiği bildirilmiş ve sonuç olarakta *rhl* sisteminin aktivasyonu için *las* sistem aktivasyonuna ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Hill ve ark., 2005). Bu bağlamda, çalışmamızda *lasR* geni toplam 15 izolatta saptanmış ve bu gen 15 *rhIR* genini aktive etmiş, ama *rhIR* geni 30 izolatta saptanmıştır. Dolayısıyla 15 izolatın *lasR* geni tarafından aktive edilmediği görülmektedir. Toplam *las* genleri ise 27 izolatta saptanmıştır. Dolayısıyla *las* genleri 27 izolat *rhl* genlerini aktive ederken, 3 izolatta *rhIR* pozitif ve 1 izolatta da *rhII* pozitif iken, *las* genleri bu izolatlarda saptanamamıştır. Teresa ve ark. (2002) yaptıkları çalışma bulgularına dayanarak, *rhII*'nin dominant olarak güçlü bir şekilde *las* QS Sistemi tarafından regüle edildiğini ve yalnızca küçük bir oranda ise *rhl* QS Sistemi tarafından regüle edildiğini bildirmiştir. Sonuç olarak *rhII* expressiyonunun her oranları değişmekle birlikte iki sistem tarafından da kontrol ettiklerini bulmuşlardır. Ayrıca, Şekil 8'de görüldüğü üzere, genel olarak *rhl* sisteminin *las* sistem genleri dışında *P. aeruginosa*'nın QS sisteminin üçüncü QS sistemini oluşturan PQS sistemi ile *relA* tarafından da uyarılabileceği görülmektedir. Bu görüş doğrultusunda bu izolatlarda PQS sistemi veya *relA*'nın var olabileceğini söyleyebiliriz.

Yapılan bu çalışmada QS Sisteminde rol alan *lasI* (605 bp), *lasR* (725 bp), *rhII* (625 bp) ve *rhIR* (730 bp) genleri ile internal gen bölgelerinden *lasI* (363 bp), *lasR* (362 bp), *rhIR* (207 bp) ve *rhII* (143 bp) olmak üzere toplam 8 gen bölgesi PZR yöntemi ile saptandı. Çalışmamızda pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* (ATCC 15692) kullanıldı. QS için toplam 30 *P. aeruginosa* izolatu kullanıldı. Yapılan PZR çalışması sonucu intakt ve internal gen bölge sonuçları arasında farklılıklar bulundu. Bu konu ile yapılan bazı çalışmalarda da bizim çalışma bulgularımıza benzer sonuçlar elde edilmiştir (Schaber ve ark., 2004; Çevik Tepeli, 2009). Analiz bulguları çerçevesinde; intak gen bölgelerinden *lasI* (605 bp) geni ve *lasR* (725 bp) geni hiçbir izolatta saptanamazken, intakt *rhII* (625 bp) 7 ve *rhIR* (730 bp) genleri ise 11 izolatta saptanmış, internal gen bölgelerinden *lasI* (363 bp) geni 22, *lasR* (362 bp) geni 15, *rhIR* (207 bp) geni 30 ve *rhII* (143 bp) geni ise

28 izolatta saptanmıştır. Görüldüğü üzere intakt gen bölge varlıkları internal gen varlıklarından çok daha düşük düzeydedir. Bu durumun intakt gen kaybından ileri gelebileceği bildirilmiştir. Gen kaybı intakt genlere komşu bölgelerdeki mutasyon veya delesyon gibi değişimlerden olabileceği, bu değişimlerin de primerlerin hibridizasyonuna ve PZR ürünlerinin sentezini engellenmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Cabrol ve ark. 2003; Schaber ve ark., 2004; Schaber ve ark. 2007; Çevik Tepeli, 2009; Düzgün, 2009). Nitekim, Çevik Tepeli (2009) çalışmasında, izolatlardan DNA eldesi için farklı metodları kullandıklarını, ancak intakt genlerini saptayamama nedenini DNA'nın elde etme yöntemlerine veya PZR koşullarına bağlı olmadığını, bu durumun intakt gen bölgesi için tasarlanmış primerlerin bağlanma bölgesindeki nokta mutasyonu, baz kaybı veya buna benzer nedenlerden dolayı değişim nedeniyle intakt primerlerin bağlanamadığı ve sonuç olarak DNA amplikasyonunun gerçekleşemediğini bildirmişlerdir. Bu konu ile yapılan başka bir çalışmada da Cabrol ve ark. (2003) 66 adet izolatta sadece *lasR* geninin varlığını araştırmışlar ve *lasR*'in 54 izolatta saptadıklarını, 12 izolatta ise belirleyemediklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar 12 izolattan 9'unda nükleotid değişikliği saptadıklarını, geriye kalan 3 izolatta ise insersiyon sıra değişikliği olduğu ve bu nedenle de PZR'da görüntülenemediğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışma da Schaber ve ark. (2007) QS-Sisteminden yoksun (QS deficiency) 5 adet suş ile yaptıkları çalışmada, intakt *rhIR* genini 5 suşun 2'sinde saptanmış, 3 suşta ise saptanamamıştır. İnternal fragman ise 3 suşta saptanırken, 2 suşta saptanamamıştır. Başka bir ifadeyle 5 izolattın 1'inde intakt gen pozitif iken, internal fragment saptanamamış, 1 izolatta da intakt gen sentezlenemediği halde internal fragman saptanmıştır. Bu durum araştırmacılar tarafından bu suşların gen bölgelerindeki değişiklikten kaynaklandığını ve bunun da PZR sırasında primer ile hibridizasyonu engelleyebileceğini bildirmişlerdir. Düzgün (2009)'de bizim bulduğumuz bulgulara benzer sonuçlar bulmuştur. Bu durumu, ökaryot hücrelerde protein sentezinden sorumlu gen kendi içinde intron (mRNA sentezi sonrası zincirden ayrılması) ve exon (üretilen proteinden sorumlu) adlı internal fragmanlardan oluştuğunu, buna karşın bakteri gibi prokaryot hücrelerde genetik materyalin tek uzun bir DNA iplikçığı üzerinde kodlandığını, intronun ise son derecede seyrek bulunduğunu bildirmiştir. Bu DNA iplikçığı üzerinde de operon bulunmaktadır. Cabrol ve ark. (2003) ve Schaber ve ark. (2007) *P. aeruginosa*'nın genomik çeşitliliği nedeniyle genetik materyalde internal

fragmanın farklı yerlerde yerleşmiş olabileceğini, bu nedenle bazı suşlarda intakt gen sentezlenirken internal fragmanın sentezlenemediğini, bazı suşlarda ise tam tersi olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmalarımızda bu görüşleri destekler niteliktedir.

Yukarıda bildirilen QS, biyofilm, virulans faktörler ve hareketlilik ile sayılan parametreler arasındaki ilişkiler daha çok insan klinik *P.aeruginosa* izolatlarından elde edilen veriler ışığında değerlendirilebilmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucu balık dahil hayvansal orjinli gıdalardan izole edilen izolatların baktığımız parametrelere yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu nedenlerle tartışma yapılamamıştır. Balık orjinli *P. aeruginosa* izolatları ile ilgili ise sınırlı sayıda çalışmalar yapılmıştır. Ancak elde ettiğimiz veriler ışığında; balık orjinli *P. aeruginosa* izolatları, patojen özelliklere sahip olup, biyofilm oluşumu için gerekli haberleşme sistemine, QS Sistemine ve biyofilm oluşturma yeteneklerine ve hastalık yapabilme potansiyeline sahiptir. Bu yönleriyle, *P. aeruginosa* izolatları gıda sanayisinde problem olarak karşımıza çıkabileceği gibi, etkenin sayılan özellikleri yönüyle insan sağlığını da tehdit edebilecek özelliklere sahiptir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

P. aeruginosa büyük genoma sahip bir mikroorganizma olup, hem insan hem de hayvanlar için önemli bir bakteri grubunu oluşturmaktadır.

Yapılan bu çalışmada balıklardan klasik kültür yöntemiyle izole ve identifiye edilen *P. aeruginosa* izolatlarının moleküler düzeyde iki farklı gen bölgesinin PZR ile saptanmasıyla moleküler düzeyde doğrulanması yapıldı. Çalışma bulguları sonucunda, *P. aeruginosa*'nın klasik kültür tekniği ile identifiye edilmesinin yetersiz kalabileceği, izolatların PZR ile moleküler tekniklerle doğrulanması gerektiği, bu kapsamda başta *oprL* geni olmak üzere bu gen ile birlikte ikinci bir geninde kullanılması gerektiği sonucuna varıldı.

Balık orjinli bazı *P. aeruginosa* izolatlarında; QS Sisteminin var olduğu ve QS mekanizması ile etkenin virulans faktörleri, biyofilm oluşturma kabiliyetleri ve hareket yeteneklerini düzenleyebildiği, ancak bu mekanizma dışında başka mekanizmaların da var olabileceği saptandı. QS mekanizmasında HSL'in etkili olduğu görüldü. Bu çalışmada elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarının patojenitede rol oynayan hareket sistemine (tip IV pili, flagellum, hiperfilagasyon ve ramnolipid üretme gibi) sahip olduğu görüldü. Elastaz ve piyosiyenin, proteaz aktivitelerine sahip izolatların var oluşu patojenitede bu izolatların önemli rol oynabileceğini de gösterdi. İzolatlar düşük antibiyotik dirençlilik profili gösterdi.

Sonuç olarak bu izolatlar hastalık yapabilme potansiyeline sahip olduğu ve *P. aeruginosa* izolatları gıda sanayisinde de başta biyofilm oluşturma özelliği olmak üzere QS mekanizması sayesinde problem olarak karşımıza çıkabileceği, etkenin sayılan özellikleri yönüyle insan sağlığını tehdit edebileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Abdel-Mawgoud AM, Lepine F, Deziel E. Rhamnolipids. Diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;86:1323-1336.
- Abdullahi R, Lihan S, Carlos BS, Bilung ML, Mikal MK, Collick F. Detection of *oprL* gene and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from aquaculture environment. *European J Experimen Biol* 2013; 3(6):148-152.
- Ahmed SHM, Shoreit AAM. Bacterial hemorrhagic septicemia in *Oreochromis niloticus* at Aswan fish hatcheries. *J Vet Med Sci* 2001;45:89.
- Ait-Tayeb L, Ageron E, Grimont F. Grimont PAD. Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates. *Res Microbiol* 2005;156:763–773.
- Alipour M, Suntres ZE, Azghani AO, Omri A. Pulmoner infection in cystic fibrosis: Role of quorum-sensing. *Recent Develop Signal Transd Res*, 2008: 51-69.
- Alcorn JF, Wright JR. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* 2004; 279(29):30871-30879.
- Alm RA, Mattick JS. Identification of a gene, *pilV*, required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*, whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence. *Molec Microbiol* 1995;16(3):485-96.
- Altinok I, Kayis S, Capkin E. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*. 2006; 261:850–855.
- Anuj SN, Whiley DM, Kidd TJ, Bell SC, Wainwright CE, Nissen MD, Sloots TP. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63 (2): 127-31
- Apenteng JA, Osei-Asare C, Opong EE, Amihere I, Hafiz MY. Antibiotic sensitivity patterns of microbial isolates from fish ponds: A study in the Greater Accra Region of Ghana. *Afr J Pharm Pharmacol* 2017;11(28):314-320.
- Arevalo-Ferro C, Hentzer M, Reil G, Görg A, Kjelleberg S, Givskov M, Riedel K, Eberl L. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environ Microbiol* 2003;5(12):1350-1369.
- Arda M, Seçer S, Sarıeyyüpoğulları M. Balık Hastalıkları. 1. Baskı, Ankara, Medisan Yayın Serisi 56. 2002.

- Aryal S. Biochemical Test of *Pseudomonas aeruginosa*.
<https://microbiologyinfo.com/biochemical-test-and-identification-of-pseudomonas-aeruginosa/>. 2018. Erişim Tarihi: 15 Ocak 2019
- Arengi FL, Barbieri P, Bertoni G, de Lorenzo V. New insights into the activation of o-xylene biodegradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1 by pathway substrates. *EMBO* 2001;2:409-414.
- Austin B, Austin DA. Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish. United Kingdom, Springer-Praxis Publishing Ltd. 2007.
- Babapour A, Azami L, Fartashmehr J. Overview of antibiotic residues in beef and mutton in Ardebil, North West of Iran. *World Appl Sci J* 2012; 19: 1417-1422.
- Baron E, Tenenbaum S, Tenenbaum S, Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 7th ed. St Louis. Mosby Co, 1986; 422-424.
- Bayrakal V. *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonu gelişiminde, etken-konak etkileşiminin karşılıklı kinetiği. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Yüksek Lisans Tezi, 2008.
- Beare PA, For RJ, Martin LW, Lamont IL. Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa*, Divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Molec Microbiol*. 2003;47:195–207.
- Béatrice J, Maud P, Stéphane A, François C, Féréderic G, Benoit G, Husson M-O. Relative expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes analyzed by a real time RT-PCR method during lung infection in rats. *FEMS Microbiol Lett* 2005;243:271–278.
- Benie CKD, Nathalie GG, Adjéhi D, Solange A, Fernique K, Desire K, Bourahima B, Marcellin DK, Mireille D. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Bovine Meat, Fresh Fish and Smoked Fish. *Arc Clin Microbiol* 2017;8(3):40.
- Bilgehan H. Fermentasyon yapmayan gram olumsuz bakteriler. In: Bilgehan H, editor, Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları. İzmir, Fakülteler Kitapevi, Barış Yayınevi. 2000;175-197, 422.
- Boles BR, Thoendel M, Singh PK. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* 2005;57(5):1210-1223.
- Boucher JC, Schurr MJ, Deretic V. Dual regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* and sigma factor antagonism. *Molec Microbiol*. 2000;36:341-351.

- Boutina S, Weitnauer M, Hassela S, Graeber SY, Stahl M, Ditttrich AS, Mallb MA, Dalpkea AH. One time quantitative PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* to discriminate intermittent from chronic infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2018;17:348-355.
- Boyd A, Chakrabarty AM. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J Ind Microbiol* 1995;15(3):162-8.
- Byrd MS, Sadovskaya I, Vinogradov E, Lu H, Sprinkle AB, Richardson SH, Ma L, Ralston B, Parsek MR, Anderson EM, Lam JS, Wozniak DJ. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol Microbiol* 2009;73(4):622–638.
- Brinkman FS, Schoofs G, Hancock RE, De Mot R. Influence of a putative ECF sigma factor on expression of the major outer membrane protein, OprF, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 1999;181(16):4746–4754.
- Britigan BE, Railsback MA, Cox CD. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect Immun* 1999;67(3):1207–1212.
- Burridge L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 2010;306(1-4):7-23.
- Butler MT, Wang QF, Harshey RM. Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:3776–3781
- Cabello F, Godfrey H, Buschmann A, Dölz H. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis* 2016;16:127–33.
- Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dölz H, Millanao A, Buschmann AH. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ Microbiol* 2013;15(7):1917–42.
- Cabello FC. Fundacion Terram. Antibiotics and aquaculture. An analysis of their potential impact upon the environment, human and animal health in Chile. *Analisis de Politicas. Publicas* 2003;17:1–16.
- Cabot G, Zamorano L, Moyà B, Juan C, Navas A, Blázquez J, Olivera A. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(3):1767-1778.

- Cabrol S, Olliver A, Pier GB, Andremont A, Ruimy R. Transcription of quorum-sensing system genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2003;185:7222–7230.
- Caiazza NC, Shanks RMQ, O'Toole GA. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2005;187:7351–7361
- Carlsson M, Shukla S, Petersson AC, Segelmark M, Hellmark T. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pyocyanin negative strains are associated with BPI-ANCA and progressive lung disease. *J Cyst Fibros* 2011;10(4): 265-271.
- Case RJ, Labbate M, Kjelleberg S. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* 2008;2:345–349.
- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 1998;11(11):1119-29.
- Christensen GD, Simpson WA, Yonger JJ, Baddor LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22:996–1006.
- Collier DN, Hager PW, Phibbs Jr PV. Catabolite repression control in *Pseudomonads*. *Res Microbiol* 1996;147:551–561.
- Copeland MF, Weibel DB. Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. *Soft Matter* 2009; 5:1174–1187
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999;284: 1318-1322.
- Costerton WJ, Wilson M. Introducing Biofilms. *Biofilm* 2004;1(1):1-4.
- Craig W, Ebert S. Antimicrobial Therapy in *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *P. aeruginosa Infect Treat* 1994;470-491.
- Çetin ÇB, Yalçın AN, Turgut H, Kaleli İ, Orhan N. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde hastane infeksiyonları. *Hast İnfek Derg* 1999;3:161.
- Çevik Tepeli E. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Biyofilm Yapımının ve Quorum Sensing'de Rol Alan Genlerin Araştırılması. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Uzmanlık Alan Tezi, 2009.
- Darak O, Barde RD. *Pseudomonas fluorescens* associated with Bacterial Disease in Catla catla in Marathwada Region of Maharashtra. *IJBR* 2015;6(2):189-195.

- Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA, "Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1," J Bacteriol 2003;185(3):1027–1036.
- Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat Rev Drug Discov 2003;2(2):114-22.
- Davies DG, Geesey GG. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. Appl Environ Microbiol 1995;61(3):860-7.
- De Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. Infect Immun 2000; 68:4839–4849.
- De Vos, D, Lim A Jr, De Vos P, Sarniguet A, Kersters K, Cornelis P. Detection of the outer membrane lipoprotein I and its gene in fluorescent and non fluorescent pseudomonas: implications for taxonomy and diagnosis. J Gen Microbiol 1992;139: 2215–2223.
- De Vos D, Lim A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L, Vanderkelen A, Cornelis P. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. J Clin Microbiol 1997;35:1295–1299.
- Dean CR, Poole K. Expression of the ferric enterobactin receptor (PfeA) of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of a two-component regulatory system. Molec Microbiol 1993;8:1095-1103.
- Dede BY. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının beta-laktamaz yapımı ve çeşitli antimikrobiyallere duyarlılıkları. Sağlık Bakanlığı, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, Uzmanlık Tezi, 2006.
- Deep A, Chaudhary U, Gupta V. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. J Lab Physicians 2011;3(1):4–11.
- Deziel E, L'epine F, Milot S, Villemur R. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoxyloxy) alkanic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. Microbiol 2003;149(8):2005–2013.
- Difco TM & BBL Manuel Manuel of Microbiological Culture Media. Edit by Zimbrow MJ, David BS, Power A, Miller SM, B.S., Wilson GE:2009.
- Domenech A, Fernandez-Garayzabal JF, Garcia JA, Cutuli MT, Blanco M, Gibello A, Moreno MA, Dominguez L. Association of *Pseudomonas anguilliseptica* infection with 'winter disease' in sea bream, Sparus aurata L. J Fish Dis 1999;22(1):69–71.

- Domínguez-Cuevas P, Marqués S. Compiling sigma-70-dependent promoters. In: Ramos JL, Kluwer, editor. *Pseudomonas*. New York, NY, Academic/Plenum Publishers. 2004;2:319–344.
- Done HY, Venkatesan AK, Halden RU. Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? *AAPS J* 2015;17(3):513–24.
- Dong YH, Zhang LH. Quorum sensing and quorum quenching enzymes. *J Microbiol* 2005;43:101-9.
- Donlan RM. Biofilm; microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):881-90.
- Dunne Jr WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002;15:155-166.
- Dusane DH, Zinjarde SS, Venugopalan VP, Mclean RJC, Weber MM, Rahman PKSM. Quorum sensing: implications on Rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnol Genet Engin Rev* 2010;27:159–184.
- Düzgün D. Değişik kaynaklardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virulans faktörlerin, Biyofilm formasyonu ve Quorum sensing yönünden değerlendirilmesi. T.C. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bursa, Doktora Tezi, 2009.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), and EMA (European Medicines Agency) ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals – Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report. *EFSA J* 2017a;15(7):4872-135.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm:ECDC. 2017.
- El-Naggar MMA, Said TO HAM, Barakat KM. Integrated system for rearing Mugil species in a crude oil treated seawater using a marine *Pseudomonas aeruginosa* strain el naggar1. *African J Microbiol Rew* 2009;3:930-938.
- EMA/AMEG (European Medicines Agency - Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group). Answers to the requests for scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals. EMA, 2014. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2014/07/WC500170253.pdf. Erişim Tarihi:7.12.2018.

- Erdem B. Pseudomonaslar. In: Ustaçelebi Ş, editor. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Gündeş Kitapevi. 1999;551-557.
- Ertesvag H, Valla S. Biosynthesis and applications of alginates. Polym Degrad Stab 1998;59(1-3):85-91.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all, Rome: FAO; 2016.
<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Erişim Tarihi: 7.12.2018.
- Ferguson HW, Collins RO, Moore M, Coles M, MacPhee DD. *Pseudomonas anguilliseptica* infection in farmed cod, *Gadus morhua* L. J Fish Dis 2004;27(4):249-253.
- Fick RB. *Pseudomonas aeruginosa*: the microbial hyena and its role in disease: an introduction. In: RB. Fick, editor. *Pseudomonas aeruginosa*, the opportunist: pathogenesis and disease. CRC Press, Boca Raton, F, 1993: 1-5.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nature Rev Micro 2010;8(9):623-633.
- Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989;42:872-874.
- Friedman L, Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. Molec Microbiol 2004;51(3):675-690.
- Fromin N, Achouak W, Thiéry JM, Heulin T. The genotypic diversity of *Pseudomonas brassicacearum* populations isolated from roots of *Arabidopsis thaliana*: Influence of plant genotype. FEMS Microbiol Ecol 2001;37:21-29.
- Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. Annu Rev Genet 2001;35:439-468.
- Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystems : the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annu Rev Microbiol 1996;50:727-751.
- Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. Infect Immun 1993;61(4):1180-4.
- Garrett ES, Perlegas D, Wozniak DJ. Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). J Bacteriol 1999;181:7401-7404.

- Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA. "Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture," *Appl Environ Microbiol* 2011;77(15):5238–5246.
- Ginovyan M, Hovsepyan V, Sargyan M, Grigoryan K, Thrchunyan A. Antibiotic resistance of *Pseudomonas* species isolated from Armenan Fish farms. *Труды ВНИРО* 2017;167:173-183.
- Girard G, Bloemberg GV. Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol* 2008;3(1):97-106.
- Gloag ES, Turnbull L, Huang A, Vallotton P, Wang H, Nolan LM, Mililli L, Hunt C, Lu J, Osvath SR, Monahan LG, Cavaliere R, Charles IG, Wand MP, Gee ML, Prabhakar R, Whitchurcha CB. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(28):11541–11546.
- Goto S, Enomoto S. Nalidixic acid cetrinide agar. A new selective plating medium for the selective isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Microbiol* 1970;14(1):65–72.
- Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996;60:539–574.
- Guerra-Santos LH, Kappeli O, Fiechter A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl Microbiol Biotechnol* 1986;24:443-448.
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(2):95-108.
- Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 1998;27(1):93-9.
- Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* 2011;15(4):305–11.
- Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(9):654-665.
- Hendrickson EL, Plotnikova J, Mahajan-Miklos S, Rahme LG, Ausubel FM. Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 rpoN gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *J Bacteriol* 2001;183:7126–7134.

- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Høiby N, Givskov M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* 2003;22:3803–3815.
- Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, Thompson B, Macleod C, Aaron SD. Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol* 2005;43(10):5085-5090.
- Hobbs M, Collie ES, Free PD, Livingstone SP, Mattick JS. PilS and PilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molec Microbiol* 1993;7:669–682.
- Iglewski BH. *Pseudomonas*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston, University of Texas Medical Branch, 1996.
- Jaeger KE, Schneidinger B, Liebeton K, Haas D, Reetz MT, Philippou S, Gerritse G, Ransac S, Dijkstra BW. Lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular biology and biotechnological application. In: Nakazawa T, Furukawa K, Haas D and Silver S, editors. *Molecular Biology of Pseudomonads*. Washington, DC., ASM Press. 1996; 319–330.
- James PS, Eileen MB. Other gram negative and gram variable bacilli. *Principles and practice of infectious disease*. 7th ed. Churchill living, 2010.
- Jarvis FG, Johnson MJ. Aglyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* 1949;71:4124-4126.
- Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012;76(1):46-65.
- Juhasz AL, Britz ML, Stanley GA. Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ Sci Technol* 1996;30:1436-142.
- Karatuna O, Yağci A. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008;38(1):42-51.
- Kennedy P, Brammah SW, Burns E. Biofilm and a new appraisal of burn wound sepsis. *Burns* 2010;36:49.
- Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 2009;73:338–344.

- Khalifa BHA, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin* 2011;69(4):393-403.
- Khalil SA, Khalil RH, Saad TT, Safaa MM. Studies on *Pseudomonas* septicemia among cultured *Oreochromis niloticus*. *J Aquacul Assoc Saudi Arabia* 2010;5(1):55-60.
- Kim EJ, Wang W, Deckwer WD, Zeng AP. Expression of the quorum-sensing regulatory protein LasR is strongly affected by iron and oxygen concentrations in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* irrespective of cell density. *Microbiol* 2005;151(4):1127-1138.
- King A, Philips I. The Identification of *Pseudomonas* and Related Bacteria in a Clinical Microbiology. *Int Med Microbiol* 1978;11:165-175.
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 2006;36:78-91.
- Kirisits MJ, Prost L, Starkey M, Parsek MR. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:4809–4821.
- Kohler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechere JC. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 2000;182(21):5990–5996.
- Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 2009;75:417–34
- Lagournintzis G, Christofidou M, Ditnitracopoulos G, Paliogianni F. *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein is a potent stimulant of 67 tumor necrosis factor alpha gene expression and activation of transcription activators nuclear factor kappa B and activator protein 1 in human monocytes. *Infect Immun* 2003;71(8):4614-4622.
- Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:7072-7077.
- Lang S, Wullbrandt D. Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;51:22-32.
- Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The Role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 2004;10(12):599-606.

- Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, Nazaret S, Cournoyer B Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J Microbiol Methods* 2007;70:20–29.
- Lederbeng J. *Pseudomonas*. Encyclopedia of Microbiology. Second Edition. Volume 3, San Diego. 2000;876-891.
- Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 2015;6(1):26–41.
- Lindhout T, Lau PC, Lam JS. Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affected flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiol* 2009;155:3449-3460.
- Lisboa T, Waterer G, Rello J. We should be measuring genomic bacterial load and virulence factors. *CCM* 2010; 38: 656-662
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16(2):161–8.
- López JR, Díguez AL, Doce A, de la Roca E, de la Herran R, Navas JI, Toranzo AE, Romalde JL. *Pseudomonas baetica* sp. nov, a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *Int J Syst Evolut Microbiol* 2012;62:874–882.
- LPSN (List of procaryotik names with standing nomenclature. Bergey's Manual of Systematics of Archae and Bacteria. 2017. <http://www.bacterio.net/allnamesmr.html>. Erişim tarihi: 9.06.2017.
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens* 2009;5(3):Article ID e1000354.
- Maçın S. Pigmentli ve pigmentless *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virulans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak karşılaştırılması. T.C. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Uzmanlık Tezi, 2014.
- Malloy JL, Veldhuizen RA, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:409–418.
- Marshall KC. Interfaces in Microbial Ecology. Cambridge, Harvard University Press, MA. 1976;44-47.

- Martínez-Bueno MA, Tobes R, Rey M, Ramos JL. Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ Microbiol* 2002;4:842–855.
- Mastan SA. *Pseudomonas septicaemia* in *Labeo rohita*(Ham)and *Cyprinus carpio* (Linn) in Andhra Pradesh-natural occurrence and artificial challenge *Int J Pharm Sci* 2013;5:564–568
- Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT, Bosso JA. Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant Gram- negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:109–115.
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol* 1997;143(12):3703-11.
- Mehri I, Turki Y, Daly I, Rjab AB, Hassen A, Maher G. Molecular identification and assessment of genetic diversity of fluorescent *Pseudomonads* based on different polymerase chain reaction (PCR) methods. *Afr J Microbiol Res* 2013;7:2103-2113.
- Meletis G, Bagkeri M. *Pseudomonas aeruginosa*: Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options. Published May 29th 2013. <https://www.intechopen.com/books/infection-control/pseudomonas-aeruginosa-multi-drug-resistance-development-and-treatment-options>. Erişim Tarihi: 15 Mayıs 2018.
- Meliani A, Bensoltane A. Review of *Pseudomonas* Attachment and Biofilm Formation in Food Industry. *Poult Fish Wildl Sci* 2015;2:126.
- Meyer JM, Geoffroy VA, Baïda N, Gardan L, Izard D, Lemanceau P, Achouak W, Palleroni NJ. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent *pseudomonas*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2745–2753.
- Mickova V, Lukasova J, Konencny S. *Pseudomonas aeruginosa* in raw and pasteurized milk. *Veter Med (Praha)* 1989; 34(7):411-419.
- Midtlyng PJ, Grave K, Horsberg TE. What has been done to minimize the use of antibacterial and antiparasitic drugs in Norwegian aquaculture? *Aquacult Res* 2011;42:28–41.
- Mitov I, Strateva T, Markova B. Prevalence of Virulence Genes among Bulgarian Nosocomial and Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian J Microbiol* 2010;41(3):588-595.

- Moghaddam MM, Khodi S, Mirhosseini A. Quorum Sensing in Bacteria and a Glance on *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol 2014;3:156.
- Moore ERB, Tindall BJ, Martins dos Santos VAP, Pieper DH, Ramos JL, Palleroni NJ. Nonmedical *Pseudomonas* Chapt. 3.3.21. Prokaryotes. 2006;6:646-703.
- Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. Environ Microbiol 2010;12(6):1621–1629.
- Mulet M, Bennasara A, Lalucata J, Garcí'a-Valde BE. An rpoD-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environ samples. Mol Cell Prob 2009;23:140–147.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Pseudomonas*. Tıbbi Mikrobiyoloji (6), Başustaoğlu AC, editor, Atlas Kitapçılık. 2010: 333-338.
- Myszka K, Czaczyk K. Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces – a Review. Pol J Food Nutr Sci 2011; 61(3):173-18.
- Nicas TI, Frank DW, Stenzel P, Lile JD, Iglewski BH. Role of exoenzyme S in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. Eur J Clin Microbiol 1985;4(2):175-179.
- Nicas TI, Iglewski BH. The Contribution of Exoproducts to Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Microbiol 1985;31(4):387-392.
- Norman RS, Moeller P, MacDonald TJ, Morris PJ. Effect of pyocyanin on a crude oil degrading microbial community. Appl Environ Microbiol 2004;70:4004-4011.
- Nouraldin AAM, Baddaour MM, Harfous AH, Essa AAM. Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Alexandria J Med 2016;52(2);99-105.
- Novick RP, Muir WM. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. Current Opinion in Microbiol 1999;2:40-45.
- Ohman DE, Cryz SJ, Iglewski BH. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. J Bacteriol 1980;142(3): 836–842.
- O'Toole GA, Gibbs KA, Hager PW, Phibbs Jr PV, Kolter R. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2000;182:425–431.
- O'May CY, Sanderson K, Roddam LF, Kirov SM, Reid DW. Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. J Med Microbiol 2009;58(6):765–73.

- O'Neill, J. Antimicrobials in Agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. The Review on antimicrobial resistance. London, UK. 2015; 44.
- O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998;30(2):295–304.
- Palleroni NJ. *Pseudomonas*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Wiley Online Library. 2015.
- Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*, ” *J Bacteriol* 2007;189(6):2531–2539.
- Paniagua C, Octavio R, Juan A, German N. Pathogenicity Factors and Virulence for Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) of Motile Aeromonas spp. Isolated from a River. *J Clin Microbiol* 1990;28(2):350-355.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1997;179:3127-3132.
- Pesci EC1, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(20):11229-11234.
- Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Dolan R, Bennett JE, editors. Principles and Practices of Infectious Diseases. Churchill Livingstone; New York, NY, USA. 1995;1820–2003.
- Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surgery* 2004;12:185-190.
- Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 1998;30:285–293.
- Quin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other non fermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:4312–4317.
- Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT, Terleckyj OD, Young JM. Bacterial communication (“quorum sensing”) via ligands and receptors: A novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:417– 4

- Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Res Int* 2015;759348.
- Ravn L, Christensen AB, Molin S, Givskov M, Gram L. Methods for acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *J Microbiol Methods* 2001;44:239–251.
- Reimann CM, Beyeler A, Latifi H, Winteler M, Lazdunski FA, Haas D. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer Nbutyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Molec Microbiol* 1997;24:309–319.
- Richtings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. Cloning and phenotypic characterization of fleS and fleR, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect Immun* 1995;63:4868–4876.
- Rodriguez-Herva JJ, Ramos-Gonzalez MI ve Ramos JL. The *Pseudomonas putida* peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein is involved in the maintenance of the integrity of the cell envelope. *J Bacteriol* 1996;178:1699–1706.
- Rojo F, Dinamarca A. Catabolite repression and physiological control. In: Ramos JL, editor. *Pseudomonas*. Kluwer Aca/Plenum P. New York, NY. 2004;2:365–387.
- Romero J, Gloria Feijoo C, Navarrete P. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. In: Carvalho ED, David GD, Silva RJ, editors. *Health and Environ in Aquac*. Rijeka, Croatia. 2012;159–98.
- Romero MC, Cazau MC, Giorgieri S, Arambarri AM. Phenantrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environ Pollut* 1998;101:355-359.
- Rostamzadeh Z, Mohammadian M, Rostamzade A. Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* Resistance Pattern against Antibiotics in Clinic Samples from Iranian Edu Hosp.. *AIM* 2016;6:190-194.
- Rust L, Messing CR, Iglewski BH. Elastase assay. *Met Enzymol* 1994;235:554-62.
- Salyers AA, Whitt DD. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach* ASM Press, Washington, D.C., USA. 1994;260-268.
- Sands DC, Rovira AD. Isolation of fluorescent pseudomonas with a selective medium. *Appl Microbiol* 1970;20:513-514.
- Santos L, Ramos F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem. *Int J Antimicrob Agents* 2018;52:135-142.

- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during dev biofilm. J Bacteriol 2002;184:1140–54.
- Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, Hamood AN. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 2004;53(9):841-53.
- Schaber JA, Hammond A, Carty NL, Williams SC, Colmer-Hamood JA, Burrowes BH, Dhevan V, Griswold JA, Hamood AN. Diversity of biofilms produced by quorum-sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 2007;56(6):738-48.
- Schuster M, Hawkins AC, Harwood CS, Greenberg EP. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. Mol Microbiol 2004;51:973-985.
- Schuster M, Lostroh P, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. J. Bacteriol 2003;185:2066–2079.
- Serrano I, Oliveira M, Santos JP, Bilocq F, Leitão A, Tavares L, Pirnay JP, De Vos D. Antimicrobial resistance and genomic rep-PCR fingerprints of *Pseudomonas aeruginosa* strains from animals on the background of the global population structure. BMC Vet Res 2017;13(1):58.
- Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS and ExoT to virulence in the lung. Infect Immun 2004;72(12):6969-6977.
- Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JEJ, Rinehart KL, Farrand SK. Detecting and characterizing N-acyl homoserine lactone signal molecules by thin layer chromatography. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:6036–6041.
- Shrout JD, Chopp DL, Just CL, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. Molec Microbiol 2006;62(5):1264–1277.
- Shunmugaperumal T. Biofilm Eradication and Prevention: A Pharmaceutical Approach to Med Dev Inf. Wiley. 2010;448.
- Silva VO, Soares LO, Silva Júnior A, Mantovani HC, Chang YF, Moreira MA. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* Isolates from cases of bovine mastitis. Appl Environ Microbiol 2014;80(19):6136-45.
- Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm dev. Nature 2002;417(6888):552–555.

- Sivakami R, Premkishore G, Chandran MR. Occurrence and distribution of potentially pathogenic Enterobacteriaceae in carps and pond water in Tamil Nadu, India. *Aquacult. Res* 1996;27:375-378.
- Smith KM, Bu Y, Suga H. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chem Biol* 2003;10(1):81–9.
- Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski B. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone contributes to virulence and induces inf in vivo. *J Bacteriol* 2002;184:1132.
- Song J, Jensen RA. PhhR, a divergently transcribed activator of the phenylalanine hydroxylase gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molec Microbiol* 1996;22:497–507.
- Song Z, Kong KF, Wu H, Maricic B, Ramalingam B, Priestap H, Scheper L, Quirke JME, Iby NH, Mathee K. Panax ginseng has anti-inhibiting quorum sensing, a bacteria communication process critical for estab inf. *Phytomed* 2010;17:1040-1046.
- Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB. The causes of *Pseudomonas* div. *Microbiol* 2000;146:2345–2350.
- Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from Other Pseudomonas Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. *J Clinical Microbiol* 2004;42(5):2074–2079.
- Stanier RY, Palleron NJi, Doudoroff M. The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *J Gen Microbiol* 1996;43:159-271.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000;40(2):175-9.
- Stewart DJ, Woldemariam K, Dear G, Mochaba FM. An outbreak of 'Sekiten-byo' among cultured European eels, *Anguilla Anguilla* L. in Scotland. *J Fish Dis* 1983;6(1):75–76.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002;56:187–20.
- Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol* 2001a;147(1):3–9.
- Sutherland IW. The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environ. *T Microbiol* 2001;9(5):222–227.

- Swartjes JJTM, Das T, Sharifi S, Subbiahdoss G, Sharma PK, Krom BP, Busscher HJ, van der Mei HC. A functional DNase i coating to prevent adhesion of bacteria and the formation of biofilm. *Adv Func Mat* 2013; 23(22):2843–2849.
- Şahin R. *Staphylococcus aureus* Suşlarında Biyofilm Üretimi, Biyofilm Pozitif ve Negatif Suşların Genotipik ve Fenotipik Karakterlerinin Karşılaştırılması. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Uzmanlık Tezi. 2007.
- Thomas J, Thanigaivel S, Vijayakumar S, Acharya K, Shinge D, Jeba Seelan TS, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in *Oreochromis mossambicus* and treatment using lime oil nanoemulsion. *Col Surf B: Bioint* 2014;116:372-377.
- Todar K. Todar’s Online Textbook of Bacteriology. In: *Pseudomonas aeruginosa* <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>. Erişim Tarihi: 13 Şubat 2019.
- Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture system. *Aquac* 2005;246:37–61.
- Tormo MA, Martí M, Valle J, Manna AC, Cheung AL, Lasa I, Penadés JR. SarA Is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Development. *J Bacteriol* 2005;187:2348–2356.
- Toutain CM, Caiazza NC, O’Toole GA. Molecular basis of biotilm development by Pseudomonads. M. Ghannoum and G.A. O’Toole, eds. *Microbiol Biofilms*. Washington, D.C, ASM Press. 2004; 43-63
- Töreci GÜ. *Pseudomonas aeruginosa*’nın pigmentleri, toksinleri ve enzimleri”, II. Ulusal Kükem Kongresi. 1981;76-91.
- Tremblay J, Lépine F, Déziel E. Self- produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ Microbiol* 2007;9(10):2622-2630
- Ulusoy, S. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında N-açıl homoserin lakton üretiminin araştırılması. SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, Doktora tezi, 2007.
- Vaisvila R, Morgan RD, Posfai J, Raleigh EA. Discovery and distribution of super-integrans among pseudomonads. *Mol Microbiol* 2001;42:587-601.
- Valls M, Cases I, de Lorenzo V. Transcription mediated by rpoN-dependent promoters. In: J. L. Ramos, editors. *Pseudomonas*. New York. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2004; 2:289–318.
- Van Delden C, Iglewski B. Cell to cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 1998;4:551-560.

- Van Delden C. Virulence factor in *Pseudomonas aeruginosa*. Volume 2. In *Pseudomonas virulence and Gene Regulation*. Ramos, Juan-Luis, editor. Kluwer Academic I Plenum Publishers. 2004;3-45
- Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect Dis* 1998;4:551–560.
- Van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, Phipps R, Jensen PØ, Christophersen L, Pamp SJ, Moser C, Mikkelsen PJ, Koh AY, Tølker-Nielsen T, Pier GB, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T. Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *Acta Pat Microbiol Immun Scandinavica* 2009;117(7):537–546.
- Vasil ML, Ochsner UA. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: Genetics, biochemistry and virulence. *Molec Microbiol* 1999;34:399–413.
- Vasseur P, Vallet-Gely I, Soscia C, Genin S, Filloux A. The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiol* 2005;151(3):985–997.
- Vennerström P. Pseudomoniasis (*P. anguilliseptica*) in farmed fish. In: ICES identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish. Leaflet No. 63. International Council for the Exploration of the Sea Conseil International pour l'Exploration de la Mer H.C. Andersens Boulevard 44–46 DK-1553 Copenhagen V Denmark. 2015.
- Venturi V, Ottevanger C, Bracke M, Weisbeek P. Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: Involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein. *Molec Microbiol* 1995;15:1081-1093.
- Wakabayashi H, Egusa S. Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Bull Jap Soc Sci F* 1972;38(6):577–587.
- Wang C, McPherson JR, Zhang LH, Rozen S, Sabapathy K. Transcription-associated mutation of *lasR* in *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Rep* 2016;46:9–19
- Whiley DM, Lambert SB, Bialasiewicz S, Goire N, Nissen M D, Sloots T P False-negative results in nucleic acid amplification tests-do we need to routinely use two genetic targets in all assays to overcome problems caused by sequence variation *Crit Rev Microbiol* 2008;34:71–76.
- Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, Ko T, Delden C, Weinel C, Slickers P, Tu B. “Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2007;104:8101–8106.

- Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, Pittet JF, Frank D, Dobbs L, Vasil ML, Matthay MA. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa pneumonia* in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1993;75(4):1661–1669.
- Wiklund T, Bylund G. *Pseudomonas anguilliseptica* as a pathogen of salmonids in Finland. *Dis Aquat Org* 1990;8:13-19.
- Wilson MJ, McMoraran BJ, Lamont IL. Analysis of promoters recognized by PvdS, an extracytoplasmic-function sigma factor protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2001;183:2151–2155.
- Wilson R, Pitt T, Taylor G, Watson D, MacDermot J, Sykes D, Roberts D, Cole P. Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro. *JCI* 1987;79(1):221–229.
- Wolterink A FW, Jonker AB, Kengen SW, Stams AJ. *Pseudomonas chloritidismutans* sp. nov., a non-denitrifying, chlorate-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:2183–2190.
- Wong ACL. Biofilms in food processing environments. *J Dairy Sci.* 1998; 81:2765-2770
- Woods DE. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiol* 2004;12(10):437-439.
- Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7907-7912.
- Wu LC, Estrada O, Zaborina O, Bains M, Shen, Kohler JE, Patel N, Musch MW, Chang EB, Fu YX, Jacobs MA, Nishimura MI, Hancock RE, Turner JR, Alverdy JC. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci* 2005;309(5735):774-777.
- Yang L, Barken K. B, Skindersoe M E, Christensen A B, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* 2007;153(5):1318–1328.
- Yuste L, Rojo F. Role of the *crc* gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J Bacteriol* 2001;183:6197–6206.
- Zhu J, Winans S.C. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(4):1507–1512.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Veli ÖZ
Doğum Yeri : Almanya
Doğum Tarihi : 19.09.1971
Medeni Hali ve Çocuk : Evli ve bir Kızı var
Bildiği Yabancı Diller : Almanca
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) : Ankara Üniversitesi 1997
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : Tarım ve Orman Bakanlığı 2007
E-posta : veterinerhekim09@gmail.com

