

**T.C.**  
**AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEVRESEL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN**  
***PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'NİN BAZI VİRÜLANS**  
**ÖZELLİKLERİNİN VE ANTİBİYOTİKLERE KARŞI**  
**DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Zeynep KARAKAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KIRŞEHİR 2013**

**T.C.**  
**AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEVRESEL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN**  
***PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'NIN BAZI VİRÜLANS**  
**ÖZELLİKLERİNİN VE ANTİBİYOTİKLERE KARŞI**  
**DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Zeynep KARAKAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**  
**Yrd. Doç. Dr. Belgin ERDEM**

**KIRŞEHİR 2013**

**Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne**

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan .....(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Üye.....(İmza)

Akademik Ünvanı, Adı-Soyadı

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../20..

(İmza Yeri)

Akademik Ünvan, Adı-Soyadı

Enstitü Müdürü

## ÖZ

Bu çalışmada, Kırşehir ili civarındaki farklı bölgelerden alınan toprak, su ve çamur olan 100 örnekten elde edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşu kullanılmıştır. Toplam 12 *P. aeruginosa* suşunun ramnolipid, biyofilm, proteaz, hemoliz aktiviteleri ile antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışma sonucunda bütün suşlar beta hemolitik aktivite göstermiştir. Proteaz aktivitesi, ramnolipid ve biyofilm oluşturabilme yetenekleri ise suşlar arasında farklılık göstermiştir. Tüm izolatlar nalidixic asit, ceftazidime, ceftizoxime, cefotaxime, ceftriaxone karşı %100 (12/12) dirençli olmasına rağmen, *P.aeruginosa* izolatları bir veya daha çok antibiyotiklere duyarlıdır.

**Anahtar Kelimeler:** *Pseudomonas aeruginosa*, virülans faktörü.

## ABSTRACT

In this study, taken from different regions near Kırşehir soil, water and sludge obtained from 100 samples *Pseudomonas aeruginosa* strains were used. A total of 12 strains of *P. aeruginosa* rhamnolipids, biofilm, protease, with hemolytic activities were aimed to investigate their sensitivity to antibiotics.

As a result all of the strains showed beta-hemolytic activity. Protease activity, rhamnolipid and biofilm forming ability to create differences between isolates showed. Although all isolates were resistant to nalidixic acid, ceftazidime, ceftizoxime, cefotaxime and ceftriaxone 100% (12/12), the *P. aeruginosa* isolates were susceptible to one or more antibiotics.

**Key Words:** *Pseudomonas aeruginosa*, virulence factors.

## TEŞEKKÜR

Tez alıŐmalarım boyunca değerli tecrube ve destekleriyle bana yol gosteren, ilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Belgin ERDEM'e, araŐtırmam suresince bueyuek yardımlarını gorduğuim hocam Doç. Dr. Ergin KARİPTAŐ'a, laboratuvar çalıŐmalarımnda deneyim ve tecrubeleriyle bana yardımcı olup, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen hocam ArŐ. Gör. Tayfun KAYA'ya teŐekkuru bir borç bilirim.

Yapmış olduğu yardımlardan dolayı Dr. Behçet Uz ocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitimi ve Araştırma Hastanesi alıŐanlarından Dr. Őener TULUMOğLU'na çok teşekkür ederim.

Başta babam olmak uzeze tezimin her aŐamasında yanımda olan, hiçbir desteğini benden esirgemeyen ve hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan AİLEM'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu alıŐma, Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından FBA-11-10 kodlu projeyle desteklenmiŐtir.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	iv
TABLolar DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
<b>1.GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2.KAYNAK ARAŞTIRMASI (KURAMSAL ÇERÇEVE) .....</b>	<b>3</b>
<b>3.MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>11</b>
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Materyal Örnekleri .....	11
3.1.2. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri.....	11
3.1.2.1. İzolasyon Besiyerleri .....	11
3.1.2.2. İdentifikasyon Besiyerleri.....	12
3.1.2.3. Biyofilm Üretiminde Kullanılan Besiyerleri.....	14
3.1.2.4. Ramnolipid Üretiminde Kullanılan Besiyerleri .....	15
3.1.3. Ayraçlar .....	15
3.1.3.1. İndol Ayıracı (Kovaks Ayıracı).....	15
3.1.3.2. Metil Red Ayıracı .....	15
3.2. Metot .....	16
3.2.1. Mikrobiyolojik Muayene .....	16
3.2.1.1. Bakterilerin İzolasyonu.....	16
3.2.1.2. Bakterilerin Muhafaza Edilmesi.....	16
3.2.1.3. Toprak ve Su Örneklerinden İzole Edilen Bakterilerin Tanımlanması.....	17
3.2.2. Biyofilm Oluşumunun Araştırılması.....	19
3.2.2.1. Mikroplate ile Biyofilm Testi .....	19

3.2.2.2. Tüp Testi (Cam yüzeyde tutunma).....	20
3.2.2.3. Congo Red Agar (CRA) ile biyofilm ölçümü.....	23
3.2.3. Ramnolipid Üretimi Testi.....	23
3.2.4. Proteaz Testi .....	24
3.2.5. Hemoliz Testi.....	24
3.2.6. Antibiyotik Duyarlılığı.....	24
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>26</b>
4.1. Bakterilerin izolasyonu ve tanımlamaları.....	26
4.2. Biyofilm Oluşum Testi.....	32
4.3. Ramnolipid Üretimi .....	33
4.4. Proteaz Testi .....	35
4.5. Hemoliz Testi .....	36
4.6. Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	38
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>41</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>44</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>51</b>



## TABLolar DİZİNİ

Sayfa

<b>Tablo 3.1.</b> Farklı materyallerden elde edilen <i>P.aeruginosa</i> türünün sayısı ve yüzde değerleri.....	16
<b>Tablo 4.1.</b> İzolatların biyokimyasal test sonuçları .....	29
<b>Tablo 4.2.</b> Biyofilm oluşum testi sonuçları .....	32
<b>Tablo 4.3.</b> Suşların biyofilm oluşturma dereceleri yüzdesi.....	33
<b>Tablo 4.4.</b> Ramnolipid üretimi için test sonuçları.....	35
<b>Tablo 4.5.</b> Proteaz aktivitesi için kuyucuk difüzyon agar testi sonuçları.....	36
<b>Tablo 4.6.</b> Hemoliz aktivitesi için kuyucuk difüzyon agar testi sonuçları .....	38
<b>Tablo 4.7.</b> İzolatların antiyotik disklerine karşı oluşturmış oldukları Hassasiyet .....	39

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Kristal viole ile boyanmış pleytlerde biyofilm oluşumu .....	20
Şekil 3.2. Kristal viole ile boyandıktan sonra saf su ile yıkanan pleytlerde biyofilm oluşumu .....	20
Şekil 3.3. Safranin ile boyanan tüpte biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi.....	21
Şekil 3.4. Kristal viyole ile boyanan tüpte biyofilm oluşumunun Gözlemlenmesi.....	22
Şekil 3.5. Congo Red Agar ile biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi .....	23
Şekil 4.1. A) <i>P. aeruginosa</i> Mac Conkey Agarda Laktöz negatif özellikte, B) <i>P. aeruginosa</i> 'nın Mac Conkey Agarda oluşturduğu pigment .....	26
Şekil 4.2. A) <i>P. aeruginosa</i> 'nın tüpte oluşturduğu Pigment, B) <i>P. aeruginosa</i> 'nın Pseudomonas Agar Base'de oluşturduğu Pigment .....	27
Şekil 4.3. A) <i>P. aeruginosa</i> 'nın mikroskopik görüntüsü, B) <i>P. aeruginosa</i> 'nın Nutrient Agar'daki koloni morfolojisi .....	27
Şekil 4.4. A) İndol testi pozitif kontrol ve negatif suşlar, B) Metil red testi pozitif kontrol ve negatif suşlar, C) Negatifnişasta hidrolizi .....	31
Şekil 4.5. Pozitif kontrol olarak kullanılan <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 suşunun M9-glutamat minimal medium agar üzerindeki açık sarı renk ve zon oluşumuyla ramnolipid üretimi ve negatif kontrol steril LBB .....	34
Şekil 4.6. Proteaz aktivitesi pozitif ve proteaz aktivitesi negatif olan suşlar.....	35
Şekil 4.7. <i>P. aeruginosa</i> suşlarında kuyucuk difüzyon testinde oluşan hemoliz zonu .....	37
Şekil 4.8. <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 suşunun çizgi ekimde oluşturduğu hemoliz zonu .....	37
Şekil 4.9. Disk difüzyon testi sonucu antibiyotiklere dirençli, orta duyarlı ve duyarlı aktivite gösteren suş sayısı .....	40

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
CTAB	Cetyltrimetylammonium Bromide
LBA	Luria Bertani Agar
LBB	Luria Bertani Broth
LBBS	Luria Bertani Broth Salinity
NB	Nutrient Broth
NA	Nutrient Agar
TSB	Trypticase Soy Broth
TSA	Trypticase Soy Agar
TSI	Triple Sugar Iron
CRA	Congo Red Agar
MCA	Mac Conkey Agar
PAB	<i>Pseudomonas</i> Agar Base
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
mg	Miligram
lt	Litre
ml	Mililitre
g	Gram
MHA	Muller Hinton Agar
MHB	Muller Hinton Broth
OD	Optik Dansite (yoğunluk)
UV	Ultra violet ışığı
EPS	Ekzopolisakkarit

ATCC	American Type Culture Collection
Ph	Asitlik-Bazlık Birimi
°C	Santigrat derece
LPS	Lipopolisakkarit
EPS	Eksopolisakkarit
API	Analitik Profil İndeksi

## 1.GİRİŞ

Canlı organizmaların içinde buldukları sistem (çevre); fiziksel, biyolojik ve sosyal çevreden oluşur. Fiziksel çevrenin en önemli faktörü su olduğu için suyun kirlenmesi çevreye ve insan sağlığına zarar verebilecek niteliktedir. Suya kanalizasyon, sanayi atığı ile diğer zararlı maddelerin karıştırılması su kirliliğine neden olmaktadır. Kirletici maddelerin ana kaynağı olan kanalizasyon suları, fabrika atıkları, evsel atıklar, otomobil yakıtları ve atıkları ile tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar mikroorganizmaların üremesi için iyi bir ortam oluşturmaktadır. Ayrıca suyun mikrobiyal kirlenmesi ise, sulara patojen mikroorganizmaların karışması yoluyla meydana gelen bir kirlenmeye neden olması sonucunda hayvan ve insan sağlığını tehlikeye sokmaktadır.

*Pseudomonas* türleri gibi bazı bakteriler de suda bulunan organik maddelerle beslenerek su içerisinde çoğalabilmektedirler. Çevremizdeki toprak, kanalizasyon suyu, nehir ve içme sularında bu tür mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar halk sağlığını doğrudan tehdit edici bir nitelik taşıyorsa da özellikle hastane gibi risk gruplarının topluluklarının bulunduğu yapılarda alışılmadık enfeksiyonlar için potansiyel oluşturabilmektedir (Erişim: [http://www.hastaneinfeksiyonlaridergisi.org/managete/fu\\_folder/1998](http://www.hastaneinfeksiyonlaridergisi.org/managete/fu_folder/1998))

*Pseudomonas aeruginosa* insan ve hayvan dışkı örneklerinde bulunduğu araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Lavenir vd. 2008). Köpeklerde göz enfeksiyonlarından sorumlu patojen ve sığırlarda mastitise sebep olduğu da ortaya konulmuştur (Daly vd. 1999, Ledbetter vd. 2007).

Özellikle gram negatif bakteriler, değişik çevrelerde kolonize olarak her yerde bulunan mikroorganizma grubundadırlar. Nehir (Pirnay vd. 2005), deniz suyu (Kimata vd. 2004), şişe suyu (Hunter, 1993) ve atık su (Filali vd. 2000) kaynaklarından sıklıkla izole edilmiştir.

*Pseudomonas* cinsinin toprak, petrolle kirlenmiş toprak, deniz, tatlı su ve hayvanların sindirim sistemlerinde bulunduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Chythanya vd. 2002, Tanaka vd. 2003).

*Pseudomonas* cinsi gıdalarda, toprakta, insan ellerinde kontaminant olarak bulunur ve bu bakteri değişik organik ve inorganik maddeleri yaşamı için kullanır.

Bu bakteri toprağın yanısıra sularda gelişen bir mikroorganizma olup değişik türlerde tuzlu ortamlarda ve tatlı sularda da bulunduğu bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Demnerovavd. 2005).

Çevresel kaynaklardan izole edilen izolatlardaki dirençliliğin görülme sıklığı tedavide önemli bir etki yaratabilir. Sulardan *P. aeruginosa* izolatlarının önemli derecedeki varlığı virülans faktörlerin gelişmesini sağlar. Petrol ve gübreyle kirlenmiş toprak, çamur, sudan izole edilen *P. aeruginosa*'nın bazı virülans faktör özelliklerinin gelişmiş olması bu bakterinin direnç oranını arttırarak hastalık yapma riskini arttırdığı düşünölmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız petrol ve gübreyle kirlenmiş toprak, çamur, sudan izole edilen *P. aeruginosa*'nın bazı virülans faktör özelliklerini ve antibiyotiklere karşı dirençliliğini araştırmaktır.

## 2.KAYNAK ARAŞTIRMASI (KURAMSAL ÇERÇEVE)

Bugüne kadar yapılan literatür taramalarında klinik kaynaklı *P. aeruginosa* çalışmalarının çevresel kaynaklı izolatlar göre çok fazla sayıda olması nedeniyle bu çalışmada çevresel kaynaklı izolatlar yer verilmiştir. Bu nedenle petrol ve gübreyle kirlenmiş toprak, çamur, sudan izole edilen *P. aeruginosa* ile ilgili bazı araştırmalar kısaca özetlenmiştir.

*P. aeruginosa* cerrahi yara pansumanlarında 1850'de Sedillot tarafından ilk kez tanımlanmıştır. Bu bakteri ilk olarak *Bacillus pyocyaneus* ve daha sonra *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmıştır. 1862' de Piyosiyanin izolasyonu Lucke tarafından yapılmıştır. Gessard' ın klasik çalışmaları ile 1882' de saf kültür olarak izole edilmiştir. 1897' de Hitschman ve Kreibich, 1917' de Frenkel ve 1925' te Osler bu bakterinin patojen bir bakteri olduğunu tanımlamışlardır. 1926 yılında ise Dooren de Jong, *Pseudomonas* türlerini, çeşitli organik bileşiklerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına dayanan fenotipik özelliklerine göre sınıflandırma çalışmalarını yapmışlardır. 1966' da Buchanon, Holt ve Lessel *Pseudomonas* türlerini fenotipik özelliklerine göre gruplandırmışlardır. Sonraki yıllarda DNA hibridizasyon çalışmaları başlamıştır (Aydın, 2001).

*Pseudomonas* türleri Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alırlar. Bazı türleri insan, hayvan ve bitki patojeni olan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin çoğu doğada toprak ve sularda yoğun olarak bulunur (Ulusoy, 2007).

Buyyonda yüzeyde bir zar oluşturarak homojen bir şekilde ürerler ve zarın altında mavi yeşil pigment ayırt edilmesini sağlayan en önemli özelliğidir. Eski kültürleri zamanla alkali olduğundan bakteriler eritici fermentlerin etkisiyle erirler ve buyyon berrak hale dönüşür.

(Erişim:<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?>)

Katı besiyerinde yaklaşık 3-5 mm boyutlarında, yuvarlak, yumuşak, yassı, metalik parlaklık veren koloniler şeklindeyken; kanlı agarda düz, tüysü kenarlı, pürüzlü veya buzlu cam görünümünde beta hemolitik koloniler şeklindedir ve tipik yeşil metalik renkte koloniler oluşturur. Bu görünüm piyosiyanin pigmentine bağlıdır (Gür, 2003, Koneman vd. 2006).

*P. aeruginosa*'nın sahip olduğu bu virülans özelliklerinden dolayı insanlarda klinikal öneme sahip çeşitli hastalıklara neden olduğu araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Fırsatçı patojen olan *P.aeruginosa* solunum ve alt solunum yolu rahatsızlıkları, bakteriyemi, kistik fibrozis hastalarında kronik akciğer enfeksiyonu, kontakt lens kullananlarda kornea enfeksiyonları, kulak, burun, boğaz enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonu, dermatitis, yumuşak doku enfeksiyonu gibi hastalıklara neden olmaktadır (Bitsori, 2012).

*P. aeruginosa*'nın proteolitik enzim, letal ekzotoksin ve enterotoksin özellikli hücre dışı salgılarının olması ve fırsatçı patojen özelliğinin bulunması çeşitli hastalıkların oluşmasına neden olur

(Erişim : <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?>).

*P. aeruginosa* sağlıklı ve normal insanda hemen nadiren hastalık oluşturur. Oysa özellikle hastane ortamında, bağışık yanıtı ve savunma sistemleri bozulmuş insanlarda, başka bir deyişle fırsat bulduğunda her sistem ve organda enfeksiyon oluşturabilir. Endokardit, pnömoni, santral sinir sistemi enfeksiyonları, kulak enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, gastrointestinal enfeksiyonlar, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları bu bakterinin oluşturduğu hastalıklardandır (Bitsori, 2012).

Demir vd. (2008), alt solunum yolu ve solunum yolu dışı örneklerinden *P. aeruginosa* izole etmişlerdir. Bu izolatlarının siderofor, total matriks proteaz ve elastaz aktiviteleri ile antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda alt solunum yolundan izole edilen suşlarla diğer suşlar arasında virülans faktörleri açısından hiçbir fark bulamadıklarını belirtmişlerdir.

*P. aeruginosa* yatan hastalarda idrar yolu enfeksiyonuna neden olabilir (Mittal vd. 2006). *Pseudomonas aeruginosa* hastane dışında kontakt lens kullananlarda kornea enfeksiyonlarının önde gelen nedenidir (Willcox, M.D. P.2007). Bunların yanı sıra alt solunum yolu ve solunum yolu dışı örneklerinden de *P. aeruginosa* izole edildiği yapılan araştırmalar neticesinde görülmüştür (Demir vd.2008).



*P. aeruginosa* yaşama alanı ve kolonize olabilme yeteneği geniş olan fırsatçı bir patojendir (Mena ve Gerba 2009). Yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa*'yı izole etmek için musluk suyu, maden suyu (mineral su) ve artezyen kuyu suları kaynak olarak kullanılmıştır (Silva vd.2008). Sıklıkla sucul ortamlarda tespit edilmesi nedeniyle insan sağlığı açısından risk ihtiva ettiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Mena ve Gerba 2009).

Colinon vd. (2013), *P. aeruginosa*'yı tespit etmek için toprak ve gübreyi materyal olarak kullanmışlardır.

Tekoriene (2008), petrolle kirlenmiş toprak, su, polimerik malzemeler, bitki kalıntıları ve gıda ürünlerinde *Pseudomonas* cinsi bakterilerinin dağılımını araştırmıştır. Yapılan araştırma sonucunda *P. aeruginosa* dağılımını petrolle kirlenmiş toprakta % 62.7, gıda ürünlerinde % 2.5, ağaç ve ahşap kalıntılarında % 25 olarak bulurlarken, sudan ve polimerik malzemelerden izole edememişlerdir.

*P. aeruginosa*' da hem hücre ile ilişkili flagel, pilus, adhezinler, biyofilm, lipopolisakkarit (LPS) hem de proteaz, hemolizin, ekzotokzin A, ekzoenzim S, piyosiyenin gibi hücre dışı virülans etmenleri bulunur (Delden ve Iglewski 1998). Elastaz, proteaz, ramnolipid, piyosiyenin, piyoverdin *P. aeruginosa*'nın ürettiği ve virülansda önemli olduğu bilinen ekstraselüler enzimler arasında yer almaktadır.

Virülans, bir mikrobuun patojenliği, yani onun hastalığa neden olma yeteneğidir. Patojenlik terimi mutlak anlamda hastalığa neden olma yeteneği için kullanılırken virülans ise bir patojenin ne derecede hatalık yapabileceğinin göstergesi olarak kullanılmaktadır Bakterilerin hastalığa yol açma yeteneğini belirleyen faktörler; infeksiyon yapan bakteri sayısı, vücuda giriş yolu, konak organizmanın savunma mekanizmalarının etkisi ve virülans denen, bakterinin kendine has özellikleridir (Erişim :<http://tr.wikipedia.org/wiki/Vir%C3%BClans>). *P. aeruginosa* türüne 'aeruginosa' isminin verilme nedeni; Piyoverdin (sarı - yeşil) ve piyosiyenin (mavi) adı verilen floresan pigmentler yapması ve bunun da nötral pH' da mavi veya yeşilimsi mavi görülmesindedir (Bilgehan, 2000).

Pigment oluşumu kültür koşullarına bağlıdır. Bu özellik mutasyonla kaybolabilir veya aynı anda birçok pigment oluşumu görülebilir. Bu pigmentler oksijensiz ortamda oluşmazlar, en iyi oda sıcaklığında oluşurlar (Davis vd. 1968, Aydın, 2001). Pyosiyenin mavimsi-yeşil renkte, pyoverdin (flourescein) sarımsı yeşil renkte, pyorubin kırmızı renkte, pyomelanin kahverenkte, floresin sarımsı renkte pigmenttir.

Floresan özellik taşıyan *Pseudomonas*'ların (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichori*, *P. flavescens*) karakteristik özelliği floresan pigment oluşturmalarıdır. King B kültür ortamı, floresan pigmentlerin üretimini uyarmakta kullanılır (Wilson ve Miles, 1964, Rajmohan vd. 2002).

*P. aeruginosa* bakterileri farklı karbon kaynaklarından ramnoz şekerleri ve  $\beta$ -hidroksidekanoik yağ asitleri içeren glikolipit yapısında biyosürefektanlar sentezlemektedir. Bu biyosürefektanlara ramnolipid denilmektedir. Ramnolipidler ilk defa Bergström ve arkadaşları (1946), daha sonra da Jarvis ve Johnson (1949) tarafından *P. aeruginosa* kültürlerinden elde edilmiştir. Ramnolipidler hücre duvarının yapısında bulduklarında hidrokarbonlu bileşikleri periplazmik yüzeye penetrasyonunu kolaylaştırmaları, hücre dışına salındıklarında ise hidrokarbonlu bileşikleri emülsifiye etme özellikleri ile tanınan biyosürefektanlardır (Kosaric, 2001, Lang, 2002).

Ramnolipid biyosürefektanlar kara ve denizlere dökülmüş petrol atıklarının temizlenmesinde veya petrol taşıyan boru ve depolarda vizkoziteyi artırmak için kullanılmaktadır. Dünya üzerinde üretilen petrolerin çoğunun deniz yoluyla taşındığını denizlerde ve okyanuslarda meydana gelen kazaların önemli kirliliklere neden olduğu bildirilmiştir (Christofi ve Ivshina, 2002, Makkar ve Cameotra, 2002). Bu nedenlerden biyosürefektanlar çevre teknolojilerinde, sanayi ve motor yağlarında, makine, kozmetik, sağlık tarım ve petrol endüstrisi gibi alanlarda da kullanılmaktadır (Kosaric, 2001, Lang, 2002).

*P. aeruginosa* tarafından üretilen ramnolipid biyosürefektanının önemli özelliklerinden biri de biyofilm oluşumunda rol oynamalarıdır. Ramnolipidler biyofilm oluşturulmasının yanında kültür ortamında başlangıç mikrokolonilerinin oluşturulmasında, yüzeyle ilişkili bakteriyel hareketlerin ve dolayısıyla mantar

görünümlü şekillerin oluşturulmasında, mantar şekilli yapıların arasında boşluklarda koloni oluşumunun önlenmesinde ve oluşturulan biyofilmin yayılmasında rol oynadığı belirlenmiştir (Boles vd. 2005, Lequette ve Greenberg, 2005, Pamp ve Tolker-Nielsen, 2007).

Mikroorganizmalar bir süre öncesine kadar, hızlı çoğalan ve tek başlarına hareket ederek serbestçe dolaşan canlılar olarak görülmekteydi. Araştırmacılar bu yüzden bu güne kadar, planktonik olarak da adlandırılan ve diğer bakterilerden bağımsız olarak, tek başlarına dolaşan mikrobiyal hücrelerin davranışlarını incelemiş ve araştırmalarını bu yönde geliştirmişlerdir. Bununla beraber, bakterilerin planktonik formdan çok, bir yüzeye tutunarak ve biyofilm adı verilen bir yapı oluşturarak hayatlarını devam ettirdiğine dair kanıtların ortaya konduğu birçok çalışma gerçekleştirilmiştir ( Rijnarts vd. 1993, Donlan, 2002).

Biyofilm (slime) kavramı, ilk olarak 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek'un kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları göstermesi ile ortaya çıkmıştır. Uzun yıllar konu üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamasına karşın, biyofilmler ve özellikleri ile ilgili genel teori 1978' den sonra artarak bildirilmeye başlanmıştır (Costerton vd. 1978). O zamandan sonra biyofilmle ilgili çalışmalar ilerlemiştir. Biyofilmlerin varlığı derin yeraltı suları ve okyanusun derinleri dışında tüm doğal ekosistemlerde saptanmıştır (Costerton vd. 1995).

Marshall 1976 yılında çok ince ekstraselüler polimer fibrillerin bakteri yüzeyine sabitlendiğini bildirmiştir (Marshall, 1976). 1978 yılında ise Costerton ve arkadaşları su sistemlerindeki bakteri topluluklarının, doğal olarak polisakkarid içinde bulunurken, yapışmış bakteri topluluklarının glikokaliks matriks içinde bulunduğunu ve bu matriks yapısının adhezyona aracılık ettiğini gözlemlemişlerdir (Costerton vd. 1978). Yine Costerton ve arkadaşları 1987' de biyofilmin daha çok aniyonik eksopolimer matriksden oluşan oldukça hidrate yapı içinde sesil hücreler ve mikrokolonilerden oluştuğunu bildirmiştir (Costerton,1987).1995'te ise, bakterilerin biyofilm oluşturmasının ve adezyonunun bir kısım spesifik genler tarafından düzenlendiği bildirilmiştir (Costerton ve Lappin-Scott, 1995).

Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaridler biyofilmin ana ekstraselüler komponentini oluşturur. İçerisinde

yaşayan organizmaya bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler taşıyabilir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilmler oluşturduğu ve Gram pozitif bakterilerin katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir.

Biyofilmler inert veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları ve doğal akuatik sistemler yer alır. Biyofilm oluşumunda hücrel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir (Donlan, 2002).

Yapılan araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur (Davey ve O'Toole, 2000).

Donlan ve Costerton biyofilm tanımını biraz daha geliştirerek hücreleri geri dönüşümsüz olarak bir substrata, ara yüzey veya birbirlerine tutunmuş olan, kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülmüş ve büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıkları olan mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamışlardır (Donlan ve Costerton, 2002).

Proteaz, proteinlerin parçalanmasından sorumlu enzim grubudur. Hücrede protein sentezi ve yıkımı hücrel bileşenlerin ihtiyaç duyduğu homeostasisi sağlar. Proteazlar veya peptidazlar peptid bağlarının yıkımını katalizler. Katalitik mekanizmalarına göre 5 ana sınıfa ayrılırlar; serin, treonin, sistein, aspartat ve metallo proteazlar. Proteolitik reaksiyonlar basit veya karmaşık biyolojik proseslerdir ve iyi şekilde düzenlenmeleri gerekir (Erişim: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Proteaz>).

Bazı bakteriler sahip oldukları çeşitli tipteki hemolizin enzimleri ile kandaki hemoglobini farklı derecelerde hemoliz etme yani parçalama yeteneğine sahiptirler. Bakterilerin hemoliz yeteneği kanlı agar besiyeri kullanılarak test edilebilmektedir. Hemoliz testi, daha çok streptokok ve stafilokokları kendi içlerinde ayırmak için kullanılmaktadır. Streptokoklar Kanlı Agar besiyerinde  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -hemolitik reaksiyon verirler.  $\alpha$ -hemolitik streptokokların kanlı agar besiyerinde oluşturdukları kolonilerin etrafında, kenarları keskin hatlı olmayan, bulanık ve yeşilimsi bir zon

oluşur.  $\beta$ -hemolitik streptokoklar, aynı besiyerinde tam hemoliz yaparak, kolonilerin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu oluşturur.  $\gamma$ -hemolitik streptokoklar ise hemolizin enzimine sahip olmayan, kanlı agar besiyerinde hemoliz oluşturmayan streptokoklardır

(Erişim: <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?>).

Bakteriler gerek in vitro gerekse in vivo ortamlarda biyofilm oluşturmak suretiyle bir dizi avantaja sahip olurlar. Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişikliklerinin ve ultraviyole ışığına maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur. Besinlerin depolanmasının ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması da biyofilm oluşumunun getirdiği diğer avantajlardır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarid matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur (Post vd. 2004).

*Pseudomonas*'lar biyofilm oluşturarak biyolojik, fiziksel, kimyasal ve çevresel streslere karşı korunmaktadır (Szewzyk vd. 2000). Biyofilm büyüme, çevresel stres, dezenfektanlar, ve antibiyotiklere karşı direnç potansiyelini artırır ve geniş bir genetik çeşitliliğe yol açar (Boles vd. 2004).

Antibiyotiğin koruyucu dozları mikroorganizmaları kontrol ederken biyofilme etki etmez. Bu nedenle biyofilm antibiyotiğin bakteriye olan etkisini engeller.

Regni vd. (2002) yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa*'nın virülans faktörleri üzerine yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa*'nın virülansında önemli rol oynayan biyofilm ve lipopolisakkaritin kistik fibrozlu hastalardaki kronik akciğer infeksiyonunun ve antibiyotik direncinin gelişmesinde önemli rol oynadığını bildirmişlerdir.

*P. aeruginosa*'nın nemli ortamları sevmesi, ısı ve çeşitli fiziksel ortamlara dayanıklı olması, üreyebilmek için oldukça az besine ihtiyaç duyması, antiseptiklerden birçoğuna ve antibiyotiklere dirençli olması, distile suda dahi üreyebilmesi bu mikroorganizmanın dış ortamlarda özellikle hastane ortamında yaşamasını kolaylaştırır.

*P. aeruginosa* hastane infeksiyonlarının en önemli nedenlerinden biridir. Birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmasının yanı sıra mutasyon ile tüm tedavilere dirençli hale gelebilmesi ve son yıllarda tedavide kullanılacak tüm antibiyotiklere dirençli olması *P. aeruginosa*'nın hastane infeksiyonlarında en önemli bakterilerden biri olmasında etkili olmuştur ( Gür, 2003).

Paköz vd. (2011), yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu infeksiyonların tedavisinde aminoglikozidlerin halen tercih edilen antibiyotikler olmasına rağmen, bu grup ve diğer grup antibiyotiklerin büyük çoğunluğuna karşı artan direnç oranlarına dikkat edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle rasyonel olmayan ilaç kullanımını önlemek için alınan önlemlerin dikkatle incelenmesi ve direnç gelişiminin düzenli olarak takip edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

*Pseudomonas* kökenlerinde doğru tedavi politikalarının oluşturulabilmesi ve antibiyotik direncinin artmasını engellemek amacıyla uygun antibiyotik kullanım kurallarının uygulanması ve etkili önlemlerin alınmasının önemli olduğunu düşündüğünü belirtmişlerdir (Ekşi vd. 2007).

Jenifer vd. (2013), toprak kökenli bitki hastalıklarının bastırılmasında *Pseudomonas* tarafından biyokontrolle ilgili çalışılan en iyi iki mekanizmanın siderofor aracılı ve antiyotik aracılı bastırma olduğunu belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada farklı faktörlere bağlı olarak ifade edilebilir. Böylece mevcut çalışmalarda biyokontrol ajanı olarak siderofor üreten bakterinin iyi bir gösterge olarak hizmet verdiğini belirtmişlerdir. Bu alanda daha fazla çalışma yapılarak tarım alanında karşılaşılan problemler için bir çözüm olabileceğini açıklamışlardır.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Materyal örnekleri

Bu çalışma Kırşehir ili civarındaki petrolle kirletilmiş alanlar başta olmak üzere 20 farklı bölgeden alınan toprak, su, çamur örneklerinde bulunan bakteri izolatlarından elde edilen 12 adet *P. aeruginosa* suşu ile gerçekleştirilmiştir.

##### 3.1.2. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

###### 3.1.2.1. İzolasyon Besiyerleri

###### Nutrient Agar

<u>Bileşimi:</u>	<u>gr/lt</u>
Beef Extract	1.0 gr
Yeast Extract	2.0 gr
Peptone	5.0gr
Sodium chloride	5.0 gr
Agar	15.0 gr

Karışımdan 28 gr alınıp 1000 cc distile suda eritilip, 15 dakika 121°C' de otoklavlanmak sureti ile sterilize edildi.

###### Nutrient Broth Besiyeri

<u>Bileşimi:</u>	<u>gr/lt</u>
Beef Extract	1.0 gr
Yeast Extract	2.0 gr
Peptone	5.0gr
Sodium chloride	5.0 gr

Maddeler 1000 ml distile suya tamamlanmıştır. Besiortamının pH'sı 0.01 N HCl ve 0.01 N NaOH'le  $6,8 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Amaca uygun olacak şekilde besiortamına % 1.5 oranında agar ilave edilip katı besiortamı hazırlanmıştır. Besiortamı 121 °C' de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

### **Mac Conkey Agar**

<u>Bileşimi:</u>	<u>gr/lt</u>
Peptone from casein	17.0 g/L;
Peptone from meat	3.0 g/L;
NaCl	5.0 g/L;
Lactose	10.0 g/L;
Bile salt mixture	1.5 g/L;
Neutral red	0.03 g/L;
Crystal violet	0.001 g/L;
Agar-agar	13.5 g/L

Karışımdan 50 gr alınıp 1000 cc distile suda eritilip, 15 dakika 121°C’ de otoklavlanmak sureti ile sterilize edildi.

### **3.1.2.2. İdentifikasyon Besiyerleri**

#### **Pseudomonas Agar Base**

<u>Bileşimi:</u>	<u>gr/lt</u>
Gelatin pepton	16 .0 gr
Casein hidrolizat	10.0 gr
Potassium sülphate	10.0 gr
Magnesium chlorid	1.4 gr
Agar	11.0 gr

24.2 gr toz karışım 500 ml distile suda eritildi. Üzerine 5 ml gliserol eklendi. 121°C’da 15 dakika otoklavlandıktan sonra karışımın ısısı yaklaşık 50°C’ ye kadar düşünce 1 flakon supplement (SR 103E) eklendi.



### **Pseudomonas C-F-C Selektive Supplement**

<u>Bileşimi:</u>	<u>mgr/lt</u>
Cetrimide	5 mgr
Fucidin	5 mgr
Cephaloridine	25 mgr

### **Jelatin Hidrolizi**

Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan Nutrient Broth besiortamına % 10 oranında jelatin eklenerek hazırlanan besiortamından tüplere 5'er ml dağıtıldıktan sonra 115 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilip kullanılmıştır.

### **Nişasta Hidrolizi**

Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan Nutrient Agar besiortamına % 2 oranında olmak üzere nişasta eklenmiştir. Kontaminasyon kontrolü yapıldıktan sonra test gerçekleştirilmiştir.

### **Metil Red- Voges Proskauer (Clark-Lubs) Besi Yeri**

<u>Bileşimi:gr/lt</u>	
Polipepton	7.0 gr
Glukose	5 .0 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.0 gr
Distile su	1000 ml

Karışım yapılacak maddeler hafifçe ısıtılıp suda eritilir. Süzgeç kâğıtlarından süzülür. pH'sı 6.9' a ayarlanır ve 1000ml' ye tamamlanır. Miktarı 5'er ml olacak şekilde steril tüplere taksim edilip 121°C'de 15 dakika otoklavlanır.

### 3.1.2.3.Biyofilm Üretiminde Kullanılan Besiyerleri

#### Luria Bertani Broth Salinity (LBBS)

<u>Bileşimi:</u>	<u>gr/lt</u>
Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	20 g

#### Tripticase Soy Broth (TSB) (Oxoid)

<u>Bileşimi:</u>	<u>gr/lt</u>
Enzymatic digest of casein	17.0 gr
Enzymatic digest of soybean meal	3.0 gr
Sodium chloride	5.0 gr
Dipotassium phosphate	2.5 gr
Dextrose	2.5gr
pH 7,3±0,2	

Triptic Soy Broth besiyerinden 30 gram tartılıp 1 litre distile su içerisinde çözdürüldükten sonra 121°C’de 15 dakika steril edilir.

#### Tripticase Soy Agar (TSA)

<u>Bileşimi:</u>	<u>g/lt</u>
Tryptone	15 gr
Soytone	5 gr
Sodyum chloride	5 gr
Agar	15 gr

#### Congo Red Agar

<u>Bileşimi:</u>	<u>g/lt</u>
Brain heart infusion broth	37g/lt
Sakkaroz	50g/lt
Agar	10g/lt
Congo red	0.8 g/lt

### 3.1.2.4. Ramnolipid Üretiminde Kullanılan Besiyerleri

#### M9-glutamat minimal medium agar

48mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
22mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8.5mM NaCl  
18.7mM NH<sub>2</sub>Cl  
2mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O  
0.1mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O  
15g Agar  
%0.02 CTAB  
%0.2 Glikoz  
%0.0005 Metilen Mavisi  
%0.05 Glutamat

#### Luria Bertani Broth (LBB)

<u>Bileşimi:</u>	<u>g/lt</u>
Trypton	10
Yeast Extract	5
NaCl	5

### 3.1.3. Ayıraçlar

#### 3.1.3.1. İndol Ayıracı ( Kovaks Ayıracı )

P- Dimethylaminobenzaldehyde	10.0 gr
İsoamyl alcohol	150.0 ml
HCl ( Konsantre)	50 ml

#### 3.1.3.2. Metil Red Ayıracı

Metil Red	0.050 gr
Etil Alkol (% 95 'lik)	150 ml
Distile su	100 ml

### 3.2. Metot

#### 3.2.1. Mikrobiyolojik Muayene

##### 3.2.1.1. Bakterilerin İzolasyonu

Çalışma Kırşehir ili civarındaki petrolle kirletilmiş bölgeler başta olmak üzere 20 farklı bölgeden alınan toprak, su, çamur örneklerinden elde edilen bakteri izolatlarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çevresel kaynaklı izolatların 4'ü Kırşehir ili civarındaki farklı toprak alanlarından, 3'ü farklı çamur alanlarından, 5 tanesi ise farklı su alanlarından temin edilmiştir (Tablo 3.1). Toprak örnekleri steril serum fizyolojik suyla sulandırıldıktan sonra, su ve çamur örnekleri ise doğrudan alınıp Mac Conkey Agar (MCA) besiortamına çizgi ekimler yapılmıştır. Ekimlerin yapıldığı besiortamları 24 saat süreyle 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiortamlarındaki laktoz negatif özellik gösteren koloniler belirlenip, 24 saat süreyle 37 °C'de Nutrient Broth (NB) besiortamlarına alınmıştır. İzolatların tanımlamalarının yapılabilmesi ve çalışmalarda kullanılabilmesi için stokları hazırlanıp -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

**Tablo 3.1.** Farklı materyallerden elde edilen *P. aeruginosa* türünün sayısı ve yüzde değerleri.

Örnek Alınan Materyal	Alınan Örnek Sayısı	<i>P. aeruginosa</i> Sayısı	Alınan Örneklerden Elde Edilen <i>P. aeruginosa</i> (%)
Toprak	40	4	10
Su	35	5	14,2
Çamur	25	3	12
Toplam	100	12	12

##### 3.2.1.2. Bakterilerin muhafaza edilmesi

Ependorf tüplerine 0.3 ml gliserol (Merck) konulduktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmesi sağlanmıştır. Bakteriler uygun sıvı besiyerinde aktifleştirildikten sonra bu aktif kültürlerden 0.6 ml gliserol içeren steril ependorflara ilave edilmiş -20°C'de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir (Cruikshank, 1972, Rajmohan vd. 2002).

### 3.2.1.3. Toprak ve su örneklerinden izole edilen bakterilerin tanımlanması

Toprak, su ve çamur örneklerinden izole edilip stokları hazırlanan bakterilerin NA besiyerine çizgi ekimleri yapıp 37 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda izolatların oluşturmuş olduğu kolonilerin morfolojileri incelenmiştir. Bunun dışında Gram boyamaları yapılmış ve stoklanan bütün izolatların Gram (-) oldukları görülmüştür. İzolatların MCA besiyerinde laktoz negatif özellik göstermeleri, yeşil pigment oluşturmaları, Gram negatif olmaları ve koloni morfolojileri incelendiğinde izolatların *Pseudomonas* cinsine ait *P. aeruginosa* türüne benzer şekilde olduğu görülmüştür. Daha sonra bütün izolatlar NB besiyerinde aktifleştirilerek *Pseudomonas* türleri için selektif olan *Pseudomonas* Agar Base (PAB) besiyerine ekilmişlerdir (Atlas ve Parks, 1997). Bütün izolatların PAB besiyerinde geliştiği görülmüştür.

PAB besiyerinde gelişen ve *Pseudomonas* cinsine ait olduğu düşünülen izolatların tür düzeyinde tanımlamaları için VITEK2 cihazıyla (BioMerieux (R) sa 69280 Marcy-I'Etoile France) tiplendirilmiştir. Bunlara ilaveten fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanmıştır. Bütün bu testler *P. aeruginosa* ATCC 27853 referans suşu için de yapılmış ve izolatların sonuçları ile mukayese edilmiştir.

#### Fizyolojik ve biyokimyasal testler

Tüm *Pseudomonas* izolatlarının tanımlanması için gram boyama, 4 ve 42 °C'de gelişim, oksidaz, katalaz, nitrat testi, jelatin hidrolizi, nişasta hidrolizi, indol testi, metil red testi gibi biyokimyasal-fizyolojik testler yapılmıştır (Bilgehan, 1995, Koneman vd. 1997, Moore, 1997, Chakraborty ve Roy, 2001).

#### *4/42 °C'de Gelişim Testi*

Aktifleştirilen izolatların herbirinden biri +4 °C için, diğeri 42 °C için iki nutrient broth (5'er ml' lik) besiyerine % 1'lik ekimler yapılmış, kültürler 48 saat süreyle 37 °C'de inkübasyona tabii tutulmuştur. İnkübasyon sonucunda +4 °C ve 42 °C'deki besiyerlerindeki bulanıklığa bakılarak bakteri gelişimi incelenmiştir.

### *Oksidaz Testi*

Gram boyamada negatif görünen bakterilerin oksidaz aktivitelere, oksidaz çubukları (Oxoid) ile bakıldı. Şüpheli bakterinin 18-24 saatlik saf kültürüne oksidaz çubuğu daldırılıp, 25-30 saniye beklendi. Çubuğun eflatun mor renk alması (+) reaksiyon olarak değerlendirildi (Oxoid).

### *Katalaz Testi*

Gram boyamada negatif olarak görünen bakterilerin katalaz aktiviteleri hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile ölçüldü. Lam üzerinde  $O_2$  açığa çıkmasından dolayı gaz oluşturan koloniler katalaz pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

### *Jelatin Hidrolizi*

Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan jelatin içerikli Nutrient Broth besiyortamına aktiveleştirilen izolatlardan % 1'lik inokülasyonlar yapıp, kültürler 48 saat süreyle 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bütün kültürler ve kontrol besiyortamı buzdolabında 2 saat süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda tüm kültürler kontrolle karşılaştırılmıştır. Sıvılaşmanın görüldüğü kültürler (jelatinin hidroliz edildiği) pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### *Nişasta Hidrolizi*

İzolatlar nişasta içerikli Nutrient Agar besiyortamlarına çizgi ekimlerle ekilip, 48 saat süreyle 3 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda kültürlerin üzerine nişasta ayırıcı olan lugol eklenmiştir. Lugol eklendikten sonra kolonilerin çevresinde görülen şeffaf zonlar pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

### *İndol Testi*

İndol test ortamına izolatların saf kültürlerinden inokule edildikten sonra 37 °C' de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra indol test ayracından 3-5 damla tüpün yan tarafından akıtılıp, üst tarafta bir katman oluşturması sağlandı. Besiyeri ve araç arasında kırmızı renginde bir halkanın oluşmaması negatif reaksiyon olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

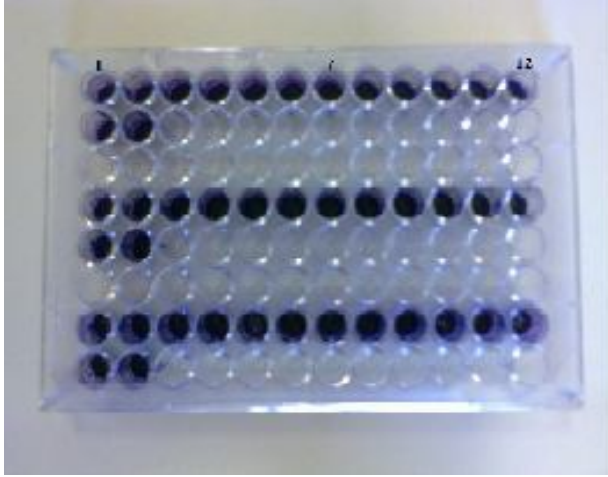
### *Metil Red Testi*

İzolalar hazırlanan Metil Red-Voges Proskauer (Clark-Lubs) besiyerine inoküle edildikten sonra 37°C' de 2-7 gün inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültürlerin üzerine Metil Red ayırıcından damlatıldı. Besiyeri ve ayraç arasında kırmızı renginde bir halkanın oluşmaması negatif olarak değerlendirildi.

### **3.2.2.Biyofilm Oluşumunun Araştırılması**

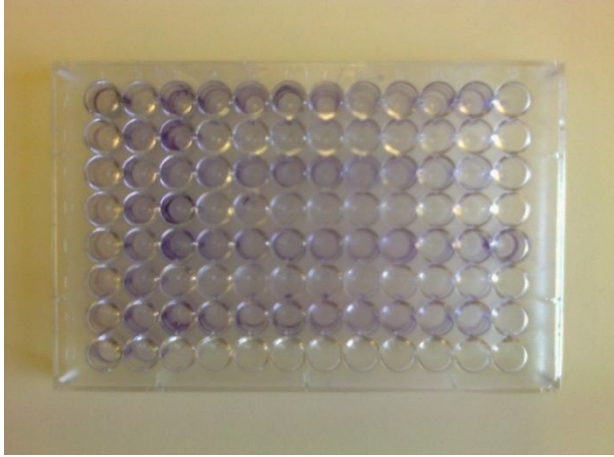
Biyofilm çalışma yöntemi olarak sıklıkla kullanılan bir yöntem olan standart mikropate (96 kuyucuklu plastik mikropate) yönteminin yanı sıra tüp (camda tutunma) testi ve Freeman ve arkadaşlarının tanımladığı Congo Red Agar (CRA) yöntemi ile çalışılmıştır.

**3.2.2.1.Mikropate ile biyofilm testi:** Mikropate ile biyofilm testi O'Toole and Kolter (1998)' de tanımladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir (Ye vd. 2008). Suşlar (%3 NaCl eklenmiş) Luria-Bertani ortamda (LBBS) 16 saat üretilmiştir. İnkübasyondan sonra bakteri yoğunluğu OD600'de 0.8' e ayarlanmıştır. Bakteri kültürü 1/100'lük steril LBBS ortamı ile sulandırılmıştır. Sulandırılan kültürlerin tümünden düz tabanlı 96 çukurlu pleytlere (mikroplak) 100 µl olacak şekilde 24 çukura ilave edilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben çukurlar distile su ile yıkanıp, biyofilmle ilişkili hücre kalıntıları %1'lik kristal viole ile 15 dk süresince boyanmıştır (Şekil 3.1). Boya fazlası hafif akan çeşme suyunda dikkatli bir şekilde yıkandıktan sonra bakterilerin plâtelere tutunarak oluşturduğu biyofilm fotoğraflanmıştır (Şekil 3.2). Sonuçlar değerlendirilirken LBBS negatif kontrol, *P. aeruginosa* 27853 standart suşu ise pozitif kontrol olarak çalışılıp değerlendirilmiştir.



**Şekil 3.1.** Kristal viole ile boyanmış pleytlerde biyofilm oluşumu.

1:Zayıf, 7: Kuvvetli, 12: Negatif

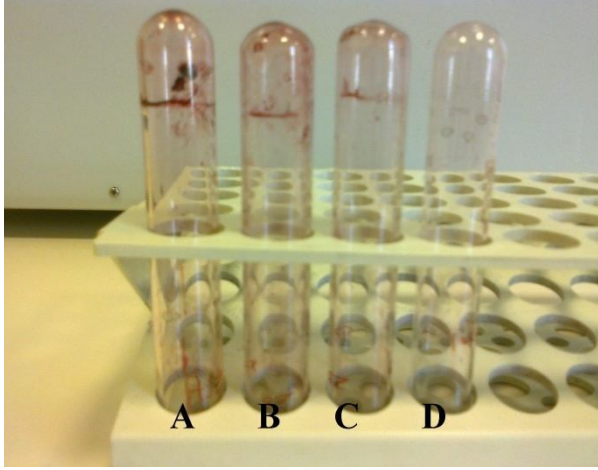


**Şekil 3.2.**Kristal viole ile boyandıktan sonra saf su ile yıkanan pleytlerde biyofilm oluşumu.

**3.2.2.2.Tüp testi (Cam yüzeyde tutunma):** Christensen vd. (1985) tarafından tanımlanan biyofilm oluşumunun ölçülmesinde kullanılan tüp testi bazı değişimler yapılarak çalışılmıştır. Tüp testinde safranin ve kristal viyole ile ayrı ayrı çalışılıp suşların biyofilm oluşturma dereceleri belirlenmiştir. Safranin ile yapılan testte çalışılacak suşlar TSA' da 1 gece 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra özdeş koloniler seçilmiş ve her bir tüpte 2 ml olan TSB' ye inoküle edilip tekrar 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tüplerin içeriği mikropipet aracılığıyla boşaltılmıştır. Boşaltılan tüpler 2 ml hacmindeki % 0,25' lik safranin ile boyanıp 1 dakika bekletilmiştir. Boyama sonrası fazla boya pipet yardımıyla boşaltıldıktan sonra boyanma derecelerinin belirlenebilmesi için tüpler

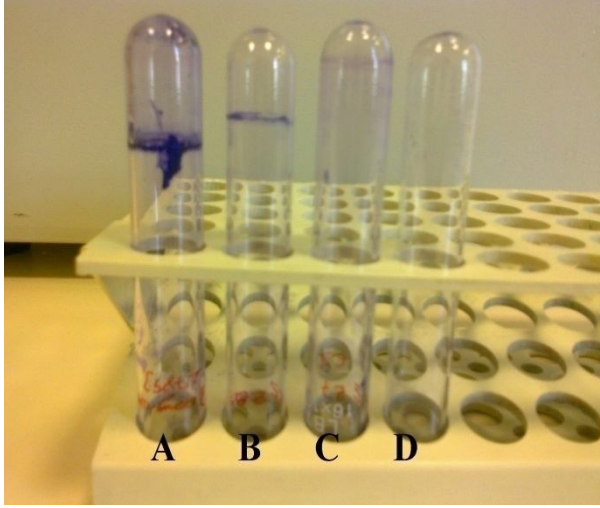


ters pozisyonda bir gece oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ertesi gün ölçümler tüpün iç yüzeyinde ki boyanma derecesine göre negatif (-), zayıf (+), orta dereceli (++) ve kuvvetli (+++) olmak üzere değerlendirilmiştir (Stepanovic vd. 2000). (Şekil 3.3).



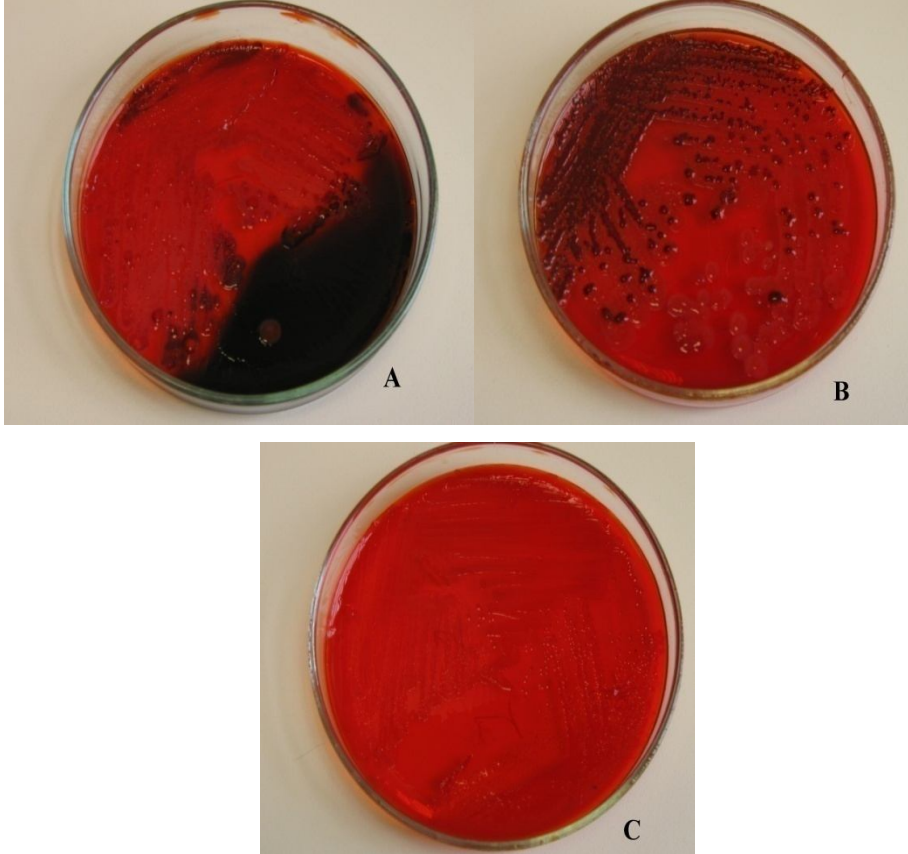
**Şekil 3.3.** Safranin ile boyanan tüpte biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi.  
A.Kuvvetli (+++), B.Orta (++) , C. Zayıf (+), D. Negatif (-)

Kristal viyole ile tüpte biyofilm oluşumunu incelerken de safranin testinde olduğu gibi çalışılacak suşlar TSA’ da 1 gece 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra özdeş koloniler seçilmiş ve her bir tüpte 2 ml olan TSB’ ye inoküle edilip tekrar 1 gece 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tüplerin içeriği boşaltılıp steril tamponlanmış fosfat tuzu (PBS) ile yıkanmıştır. Kurumaları için ters pozisyona bırakılmıştır. Kuruduktan sonra %1’lik kristal viyole ile boyanıp 15 dakika bekletilmiştir. Boyama işleminden sonra içeriği boşaltılan tüpler akan su altında yıkanıp ters pozisyonda kurumaya bırakılmıştır. Tüpün iç yüzeyinde ki boyanma derecesine göre sonuçlar negatif (-), zayıf (+), orta dereceli (++) ve kuvvetli (+++) olmak üzere değerlendirilmiştir (Christensen vd. 1982). (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4.** Kristal viyole ile boyanan tüpte biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi.  
A.Kuvvetli (+++), B.Orta (++), C. Zayıf (+), D. Negatif (-)

**3.2.2.3.Congo Red Agar (CRA) ile biyofilm testi:** Congo Red Agar hazırlanmıştır. Aktif suşlardan besiyerine ekim yapıp kolonilerde gözlenen renk oluşumuna göre siyah-bordo (+++), kırmızı (++) , pembe (+) ve beyaz (-) olmak üzere değerlendirme yapılmıştır (Freeman vd. 1989). (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5.** Congo Red Agar ile biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi.

A)Kuvvetli, B)Orta, C)Zayıf

### **3.2.3.Ramnlipid Üretimi Testi**

Ramnlipid üretim testi 0.2 g cetiltrimetilamonyumbromid (CTAB) ve 5 mg/l<sup>-1</sup> metilen mavisi içeren M9-glutamat minimal medium agar içeren petriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Siegmond ve Wagner, 1991). Öncelikle çalışılan suşlar LBB besiyerinde 1 gece 37 °C’de inkübe edilmiştir. Bu aktif kültürlerden 2’şer µl petrilerin ortasına damlatılıp 37 °C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda bakteri kolonileri etrafında oluşan saydam zon ramnolipid üretiminin pozitif yönde göstergesi olarak kabul edilmiştir. Test sırasında LBB negatif kontrol olarak değerlendirmeye alınmıştır. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır.

#### **3.2.4. Proteaz Testi**

Test edilecek *P. aeruginosa* suşları bir gece LB besiyerinde 37°C'de üretilmiştir. Her bir kültürden % 2 yağsız süt tozu içeren LB agar petrilerinin ortasına, 20'şer µl ilave edilmiş ve 37 °C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır (Dong vd. 2005, Ulusoy, 2007). Suşların proteolitik aktiviteleri bakteri kültürü ilave edilen bölgedeki berrak zon çapı ölçülerek kayıt edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon proteolitik aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Test sırasında LB negatif kontrol olarak, *P. aeruginosa* ATCC 27853 pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.5. Hemoliz Testi**

Test edilecek *P. aeruginosa* suşları LB besiyerinde 37 °C'de 24 saat üretilmiştir. Her bir kültürden % 5 insan kanı içeren kanlı agar petrilerinin ortasına, 20'şer µl ilave edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Suşların hemolitik aktiviteleri bakteri kültürü ilave edilen bölgedeki berrak zon çapı ölçülerek kayıt edilmiştir. İnkübasyon sonucunda bakteri kolonisi etrafındaki saydam zon hemoliz aktivitenin göstergesi olarak kabul edilmiştir (Brender ve Janda, 1987). Aynı zamanda hemolitik aktiviteyi görmek için besiyerine çizgi tarzında ekimlerde yapılmıştır.

#### **3.2.6. Antibiyotik Duyarlılığı**

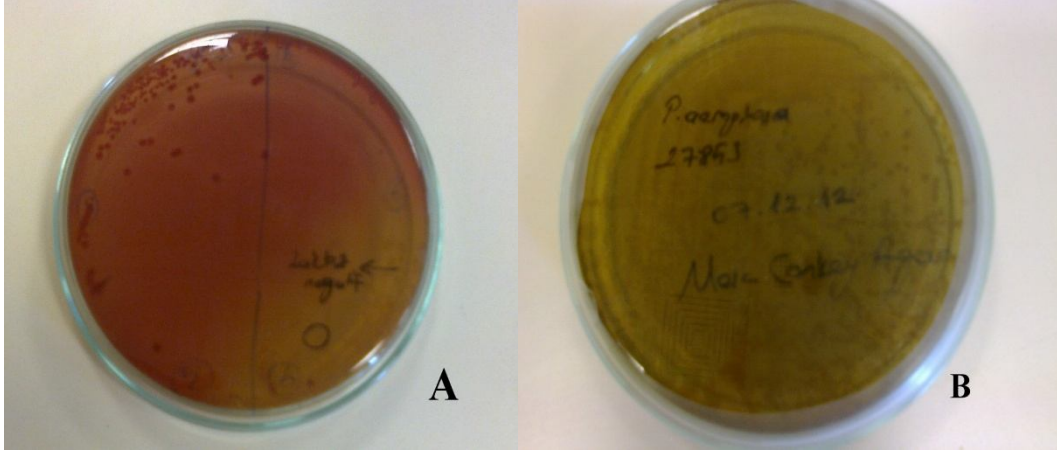
İzolatların antibiyotik duyarlılığını belirlemek için disk difüzyon metodu uygulanmıştır. Bunun için *P. aeruginosa* suşları piperacillin, nalidixic acid, ceftazidime, gentamicin, ceftizoxime, amikacin, cefotaxime, ceftriaxone, aztreonam, imipenem antibiyotik diskleri ile test edilmiştir. Mc Farland 0.5 bulanıklığında hazırlanan 2 mL bakteri suspansiyonu, MHA besiyeri bulunan petrilere yayılmıştır. Sonra antibiyotik diskleri, besiyeri yüzeyine yerleştirilmiştir. Petriler ters çevrilmiş

ve 35 °C'de 18-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda her bakteri suşu için inhibisyon zon çapı milimetrik cetvel ile ölçülmüştür. Test sonuçları, suşlar için hassas, dirençli ve orta derecede duyarlı olarak CLSI'in kriterlerine göre değerlendirilmiştir. *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kontrol olarak kullanılmıştır (CLSI, 2011).

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

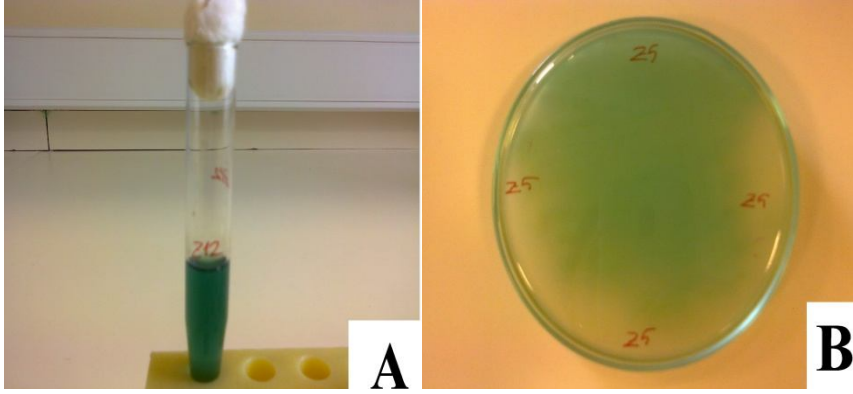
### 4.1. Bakterilerin izolasyonu ve tanımlamaları

Bu çalışmada Kırşehir ili civarındaki petrolle kirletilmiş alanlar başta olmak üzere farklı toprak, su, çamur örneklerinden elde edilen bakteri izolatlarından elde edilen 12 adet *P. aeruginosa* suşu kullanılmıştır. İlk izolasyonlar MCA besiortamına ekilmiştir. Ekimlerin yapıldığı besiortamları 24 saat süreyle 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiortamlarındaki laktoz negatif özellik gösteren koloniler belirlenip, seçilmiştir (Erdem, 1999, Gür, 2003). (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** A) *P. aeruginosa* Mac Conkey Agarda Laktoz negatif özellikte  
B) *P. aeruginosa* 'nın Mac Conkey Agarda oluşturduğu pigment

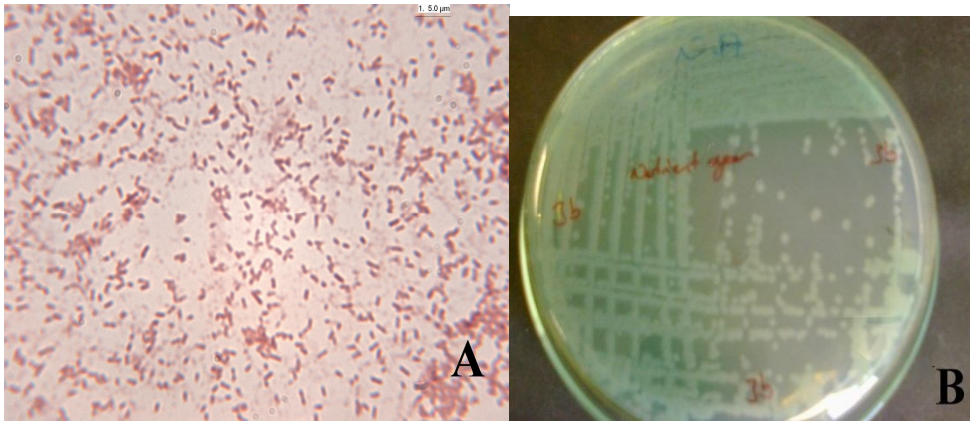
Laktoz negatif özellik gösteren koloniler seçilip, 24 saat süreyle 37 °C’de NB besiortamlarına alınmıştır. Tüp üzerinde halka şeklinde yeşil pigment oluşturan bakteriler belirlendikten sonra *Pseudomonas* türleri için selektif *Pseudomonas* Agar Base (PAB) besiortamına ekilip, gelişme durumları incelenmiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** A) *P. aeruginosa*'nın tüpte oluşturduğu pigment

B) *P. aeruginosa*'nın *Pseudomonas* Agar Base'de oluşturduğu pigment

Ayrıca izolatların ilk seçimleri yapılırken koloni morfolojileri, gram boyamaları, pigment oluşturmaları dikkate alınmıştır. Şekil 4.3' de *P. aeruginosa* bakterilerinin gram boyama ve koloni morfolojilerinin resimleri verilmiştir.



**Şekil 4.3.** A) *P. aeruginosa*'nın mikroskopik görüntüsü

B) *P. aeruginosa*'nın Nutrient Agar'daki koloni morfolojisi

PAB besiyerinde gelişen ve *Pseudomonas* cinsine ait olduğu düşünülen izolatların tür düzeyinde tanımlamaları için VITEK 2 cihazıyla (BioMerieux (R) sa 69280 Marcy-I'Etoile France) tiplendirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre izolatlar 91-99 arasında değişen yüzdelerle *P. aeruginosa* olarak tür düzeyinde tanımlanmıştır (Tablo 4.1.).

Bunlara ilaveten fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanmıştır. Bütün bu testler *P. aeruginosa* ATCC 27853 referans suşu için de yapılmış ve izolatların sonuçları ile mukayese edilmiştir. İzolatların bu testlerden katalaz, oksidaz ve jelatin hidrolizasyonunda pozitif sonuç verdikleri tespit edilmiştir.



**Tablo 4.1. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları**

Suş Kodu	Tanımlanan Tür	Biyokimyasal Testler									Temin Edildiği Yer
		Tanımlama Yüzdesi (%)	Gram Boyama	PAB Besiyeri	4°C'de Gelişme	42°C'de Gelişme	Jelatin Hidrolizi	Nişasta Hidrolizi	Oksidaz	İndol	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	İzmir Devlet Hastanesi
Z1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Güldiken mevki
Z2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Kervansaray Mah.
Z3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Kılıçözü mevki
Z4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Hılla Gölü
Z5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Organize Sanayi

**Tablo 4.1. (Devam) İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları**

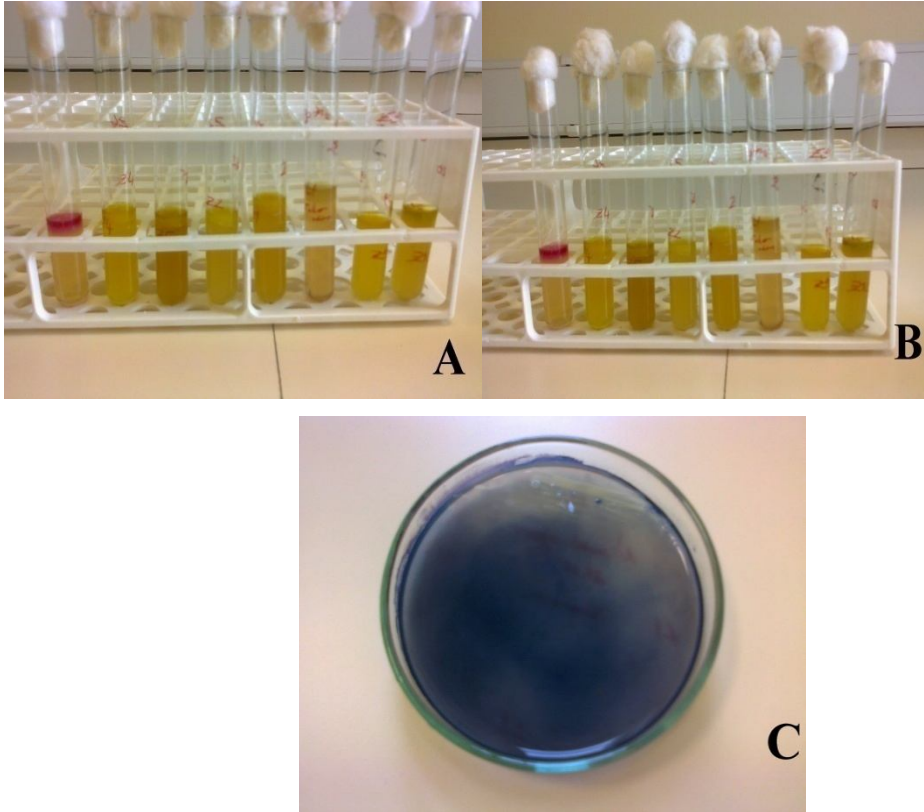
Z6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Organize Sanayi
Z7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Göhlisar mevki
Z8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	93	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Petlas atık kanalı
Z9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Petlas atık kanalı
Z10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Karıncalı mevki
Z11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	97	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Dinekbağı mevki
Z12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	95	Gram negatif Basil	+	-	+	+	-	+	-	Hılla Gölü

+ : Pozitif

- : Negatif

PAB: *Pseudomonas* Agar Base

Tanımlanan izolatların nişasta hidroliz testi, indol ve metil red testine vermiş olduğu sonuçlar değerlendirilirken; nişasta hidroliz testinde koloni etrafında saydam zon oluşturmamalarından dolayı, indol ve metil red testlerinde ise besiyeri ve ayraç arasında kırmızı renginde bir halkanın oluşmaması sonucunda negatif reaksiyon olarak değerlendirilmişlerdir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** A) İndol testi pozitif kontrol ve negatif suşlar  
B) Metil red testi pozitif kontrol ve negatif suşlar  
C) Negatif nişasta hidrolizi

#### 4.2.Biyofilm Oluşum Testi

İzolatlarda biyofilm oluşumu gözlenirken; sıklıkla kullanılan bir yöntem olan standart mikroplate (96 kuyucuklu plastik mikroplate) yönteminin yanı sıra tüp (camda tutunma) testi ve Congo Red Agar (CRA) yöntemi ile çalışılmıştır. Bütün bu testler 12 izolatın yanı sıra *P. aeruginosa* ATCC 27853 referans suşu için de yapılmış ve Luria Bertani Broth ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

**Tablo4.2.**Biyofilm oluşum testi sonuçları

Suşlar	Biyofilm Testleri			
	Mikroplate ile Biyofilm Testi	Safranin ile Yapılan Tüp Testi	Kristal Viyole ile Yapılan Tüp Testi	Congo Red Agar ile Biyofilm Testi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC (27853)	+++	+++	+++	++
Z1	+	+++	+++	+
Z2	+++	+++	+++	+++
Z3	+	+++	+	+++
Z4	+++	+++	+++	+++
Z5	+++	+++	+++	+++
Z6	+++	+++	+++	+++
Z7	+++	+++	+++	+++
Z8	++	+++	++	+
Z9	+++	+	++	++
Z10	+	+++	+++	++
Z11	+	+++	+++	+++
Z12	+	+++	+++	+
Luria Bertani Broth	-	-	-	-
- : Negatif	+: Zayıf	++: Orta	+++ : Kuvvetli	

Biyofilm oluşum testi dört farklı test üzerinden gerçekleştirilmiştir. Çalışılan 12 *P. aeruginosa* suşunun ve kullanılan *P. aeruginosa* ATCC 27853 standart suşunun testlerdeki biyofilm oluşturma derecelerinin yüzdesi Tablo 4.3'de verilmiştir.

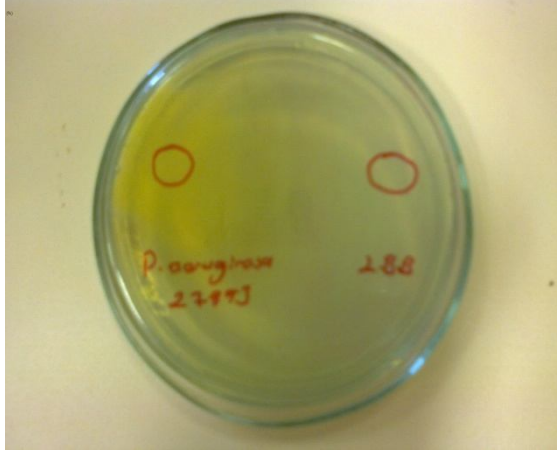
**Tablo 4.3.** Suşların biyofilm oluşturma dereceleri yüzdesi.

Suş Adı	Biyofilm oluşturma dereceleri yüzdesi			
	Kuvvetli	Orta	Zayıf	Negatif
	(%)	(%)	(%)	(%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75	25	-	-
ATCC 27853				
Z1	50	-	50	-
Z2	100	-	-	-
Z3	50	-	50	-
Z4	100	-	-	-
Z5	100	-	-	-
Z6	100	-	-	-
Z7	100	-	-	-
Z8	25	50	25	-
Z9	25	50	25	-
Z10	50	25	25	-
Z11	75	-	25	-
Z12	50	-	50	-
Luria Bertani Broth	-	-	-	100

### 4.3. Ramnolipid retimi

Test edilen *P. aeruginosa* izolatlarının ramnolipid testi sonuçları Tablo 4.4'de gösterilmiştir. Test sonucunda Z5, Z8, Z9, Z12 izolatlarının ramnolipid ürettiği, diğer

izolatların ise üretmediği tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır. Bu suşun M9-glutamat minimal medium agar üzerinde açık sarı renkte zon oluşturması pozitif olduğunu, negatif kontrol olan LBB'nin ise herhangi bir renk değişimi ile zon oluşumu göstermemesi ramnolipid üretmediğini göstermiştir ( Şekil 4.5).



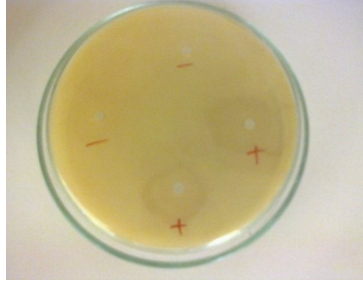
**Şekil 4.5.** Pozitif kontrol olarak kullanılan *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun M9-glutamat minimal medium agar üzerindeki açık sarı renk ve zon oluşumuyla ramnolipid üretimi ve negatif kontrol steril LBB.

**Tablo 4.4.** Ramnolipid üretimi için test sonuçları

Suş Adı	Ramnolipid aktivitesi
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+
Z1	-
Z2	-
Z3	-
Z4	-
Z5	+
Z6	-
Z7	-
Z8	+
Z9	+
Z10	-
Z11	-
Z12	+
Luria Bertani Broth	-

#### 4.4. Proteaz Testi

Çalışılan *P. aeruginosa* izolatlarının proteaz testi sonuçları Tablo 4.5 'de gösterilmiştir. Test sonucunda Z1, Z2, Z4, Z5, Z6, Z7, Z8 izolatlarının proteaz ürettiği, diğer izolatların ise üretmediği tespit edilmiştir. Şekil 4.6'da proteaz aktivitesi pozitif ve negatif olan suşlar gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu, negatif kontrol olarak ise LBB kullanılmıştır.



**Şekil 4.6.** Proteaz aktivitesi pozitif ve proteaz aktivitesi negatif olan suşlar

**Tablo 4.5.** Proteaz aktivitesi için kuyucuk difüzyon agar testi sonuçları

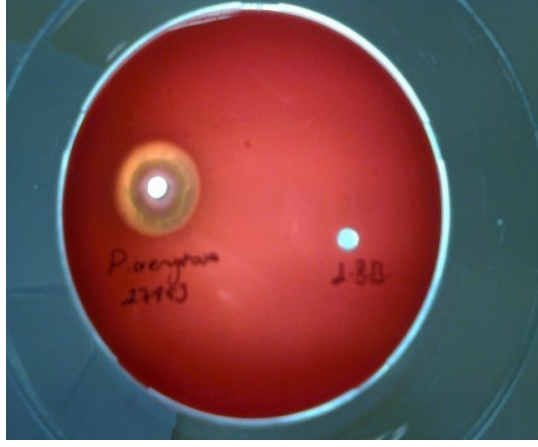
Suş Adı	Oluşan ortalama zon çapı (mm)
<i>P. aeruginosa</i>	25
<i>ATCC 27853</i>	
Z1	15
Z2	13
Z3	–
Z4	14
Z5	20
Z6	17
Z7	18
Z8	18
Z9	–
Z10	–
Z11	–
Z12	–
Luria Bertani	–
Broth	–

#### 4.5. Hemoliz Testi

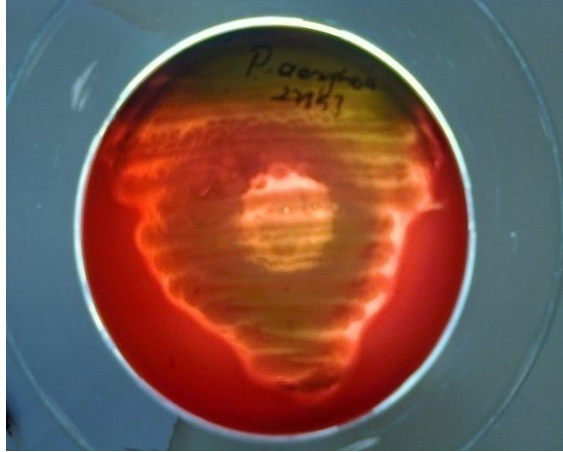
Test edilen *P. aeruginosa* izolatlarının hepsi kanlı agarda hemolitik aktivite göstermişlerdir. Yöntem olarak kuyucuk difüzyon agar testinin (Şekil 4.7) yanı



sıra izolatların kanlı agara çizgi şeklinde ekimleri yapıp etraflarında oluşan şeffaflık incelenmiştir (Şekil 4.8). Yapılan kuyucuk difüzyon agar testi sonucunda oluşan ortalama zon çapları Tablo 4.6’da verilmiştir.



**Şekil 4.7.** *P. aeruginosa* suşlarında kuyucuk difüzyon testinde oluşan hemoliz zonu



**Şekil 4.8.** *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun çizgi ekimde oluşturduğu hemoliz zonu

**Tablo 4.6.** Hemoliz aktivitesi için kuyucuk difüzyon agar testi sonuçları

Suş Adı	Oluşan ortalama zon çapı (mm)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	21
Z1	15
Z2	25
Z3	20
Z4	18
Z5	20
Z6	25
Z7	17
Z8	23
Z9	26
Z10	19
Z11	17
Z12	26
Luria Bertani	–
Broth	

#### 4.6. Antibiyotik Duyarlılık Testi

*P. aeruginosa* izolatlarının amikacin, aztreonam, ceftazidime, cefotaxime, ceftizoxime, ceftriaxone, gentamicin, imipenem, nalidixic acid, piperacillin antibiyotiklerine dirençliliklerini araştırmak için disk difüzyon metodu uygulanmıştır. İzolatların antibiyotik disklerine karşı oluşturmuş oldukları hassasiyet Tablo 4.7.'de verilmiştir.

Disk difüzyon testi sonucu antibiyotiklere dirençli, orta duyarlı ve duyarlı aktivite gösteren suş sayısı Şekil 4.9.'da verilmiştir.

**Tablo 4.7.** İzolatların antiyotik disklerine karşı oluşturmuş oldukları hassasiyet

Antibiyotikler (µg/disk)	Suş Numaraları ve Oluşturdukları Duyarlılık												<i>P.aerugi nosa 27853</i>
	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12	
Piperacillin	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
Nalidixic acid	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidime	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicin	S	R	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S
Ceftizoxime	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amikacin	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R
Cefotaxime	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftriaxone	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Aztreonam	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R
İmipenem	S	I	I	R	I	S	R	I	S	I	I	S	R

R: Dirençli

S: Duyarlı

I: Orta Derecede Duyarlı

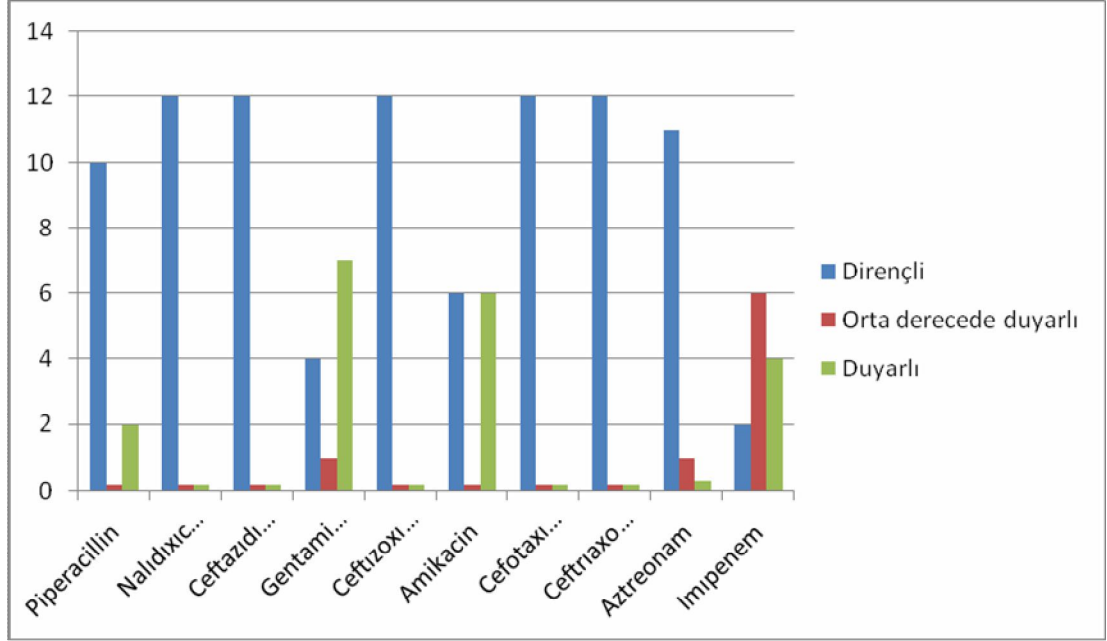
Disk difüzyon testi sonucunda tüm izolatlar Nalidixic acid, Ceftazidime, Ceftizoxime, Cefotaxime, Ceftriaxone antibiyotiklerine karşı %100 (12/12) dirençli olarak bulunmuştur.

Piperacillin antibiyotiği için iki izolat duyarlı % 16,6 (2/12), on izolat dirençli % 83,3 (10/12) olarak tespit edilmiştir.

Amikacin antibiyotiğine altı izolat duyarlı %50 (6/12), altı izolat dirençli % 50 (6/12) olarak tespit edilmiştir.

Aztreonam antibiyotiğine karşı onbir izolat dirençli % 91,6 (11/12) özellik gösterirken bir izolatın orta duyarlı % 8,3 (1/12) olduğu görülmüştür.

İmipenem antibiyotiğine karşı dört izolat duyarlı % 33,3 (4/12), altı izolat orta duyarlı % 50 (6/12), iki izolat ise dirençli % 16,6 (2/12) özellik göstermiştir (Şekil 4.9)



**Şekil 4.9.** Disk difüzyon testi sonucu antibiyotiklere dirençli, orta duyarlı ve duyarlı aktivite gösteren suş sayısı.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan literatür araştırmalarında *P. aeruginosa*'nın klinik izolatlarının virülans faktörleri ve antibiyotik duyarlılıklarının çok çalışılmış olmasından dolayı bu çalışmada çevreden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının virülans faktörleri ve antibiyotik duyarlılıkları üzerinde çalışılarak aralarındaki ilişki ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Kırşehir ili civarındaki petrole kirlenmiş bölgeler başta olmak üzere 20 farklı bölgeden alınan toprak, su ve çamur örneklerinden toplam 100 numune üzerinde araştırma yapılmıştır. Bu numunelerden elde edilen bakteri izolatlarından toplamda 12 adet (% 12) *P. aeruginosa* bakteri izolatları elde edilmiştir. Bu çevresel kaynaklı *P. aeruginosa* izolatlarının 4'ü Kırşehir ili civarındaki farklı toprak alanlarından, 3'ü farklı çamur alanlarından, 5 tanesi ise farklı su alanlarından temin edilmiştir. Bu sonuca göre *P. aeruginosa* izolatlarının % 10'u topraktan, % 14.2'si sudan, % 12'si ise çamurlu alanlardan elde edilmiştir. Bu izolatlardan ramnolipid, biyofilm, proteaz, hemoliz oluşumları incelenmiştir. Ayrıca izole edilen suşların antibiyotiklere dirençlilikleri de ortaya konmuştur.

Yaptığımız çalışmada 12 *P. aeruginosa* izolatından 4 tanesi (% 33) ramnolipid oluşturma kapasitesine sahipken diğer izolatlar böyle bir oluşum göstermemiştir. Petrole kirlenmiş numunelerden elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarından ramnolipid biyosümfektanının elde edilmiş olması Santa Anna vd. (2002)'nin yapmış oldukları çalışmayla paralellik göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda ramnolipidlerin petrol endüstrisinde kara ve denizlere dökülmüş petrol atıklarının temizlenmesi için kullanıldığı görülmüştür. Costaa vd. (2010), Yin vd. (2009), atık sulardan izole ettikleri *P.aeruginosa*'dan üretilen ramnolipidin petrole kirlenmiş toprağın biyoremedasyonu gibi endüstriyel uygulamalar için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Ramnolipid biyosümfektanı biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır. Ramnolipidler biyofilm oluşturulmasının yanında kültür ortamında başlangıç mikrokolonilerinin oluşturulmasında, yüzeyle ilişkili bakteriyel hareketlerin ve dolayısıyla mantar görünümlü şekillerin oluşturulmasında, mantar şekilli yapıların

arasında boşluklarda koloni oluşumunun önlenmesinde ve oluşturulan biyofilmin yayılmasında rol oynadığı belirlenmiştir (Boles vd. 2005, Lequette ve Greenberg, 2005, Pamp ve Tolker-Nielsen, 2007). Bu araştırmaların sonuçlarından hareketle yaptığımız bu çalışmada ramnolipid oluşturan suşların biyofilm oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Suşlar içerisinden Z5, Z8, Z9, Z12 numaralı suşların ramnolipid ürettiği tespit edilmiştir. Diğer suşlarda böyle bir aktivite gözlenmemiştir. Ayrıca ramnolipid üreten suşların hepsinde biyofilm oluşumu da gözlenmiştir. Tielens vd. (2010) yaptıkları çalışmada değişik kaynaklardan izole edilen *P. aeruginosa*'nın ekstraselüler enzimlerin biyofilm oluşumunda etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

*P. aeruginosa* suşlarının kanlı agar üzerinde yapılan kuyucuk difüzyon metodu ve çizgi ekimler sonucunda beta hemolitik aktivite gösterdiği, % 2 oranında nişasta içeren nutrient agarda nişastayı hidrolize edemediği bu suş üzerinde çalışılan bütün araştırmalarda belirtilmiştir. Bizim çalışmamızın sonucunda da bütün *P. aeruginosa* suşları kanlı agarda hemolitik aktivite göstermesinin yanında nişastaya karşı herhangi bir aktivite göstermemişlerdir.

Çalışılan izolatların ramnolipid oluşturma kapasitesi % 33 olarak belirlenirken, proteaz aktivitesine sahip izolatların % 58'lik bir orana sahip olduğu yapılan testlerle belirlenmiştir.

Bakteriler toprakta yaygın olarak bulunur. Toprak ve atık su canlılar dünyasının bakteri bulaştırma zinciri oluşturmasında önemli rol oynar. Bakterilerin hastalık oluşturmasında ve antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesindeki önemli faktör virülans faktörleridir. Virülans faktörlere sahip olan *P. aeruginosa* suşları antibiyotiklere karşı dirençlilik göstermektedir.

Yapmış olduğumuz antibiyotik dirençlilik araştırmalarımıza göre çevresel kaynaklı *P. aeruginosa* suşlarında antibiyotiklere dirençlilik yüksek oranda bulunmuştur. Kaszab, (2010) çevresel kaynaklı *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere dirençliliği üzerinde yapmış olduğu çalışmada izolatların direncinin düşük olmadığını belirtmiştir. Çalıştığımız suşların nalidixic acid, ceftazidime, ceftizoxime, cefotaxime, ceftriaxone, piperacillin, gentamicin, amikacin, aztreonam, imipenem antibiyotiklerine karşı antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amacıyla disk

difüzyon testi uygulanmıştır. Bu test sonucunda tüm izolatlar nalidixic acid, ceftazidime, ceftizoxime, cefotaxime, ceftriaxone antibiyotiklerine karşı %100 (12/12) dirençli olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçların bu çalışmayla uyum içerisinde olduğunu görmekteyiz.

*P. aeruginosa*'nın pigment üreten ve üretmeyen suşlarının virülans faktör ve antibiyotik dirençlilikleri ile ilgili yapılan bir çalışmada pigment üreten suşların birçok antibiyotiğe karşı direnç gösterdiği belirtilmiştir (Finlayson ve Brown 2011). Bu çalışmanın ışığı altında, çalışmamızda kullandığımız çevresel kaynaklı *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu direncin kuvvetli derecede pigment üretmesiyle alakalı olduğunu düşünmekteyiz.

Kontamine olmuş su ve topraklarda değişik virülans özelliklere (ramnolipid, biyofilm, proteaz ve hemoliz) sahip *P. aeruginosa* suşlarının varlığı insanlarda ciddi hastalıklara sebep vermektedir ve bu yüzden bu bakterinin hastane enfeksiyonlarına neden olmasından dolayı halk sağlığı açısından tehlikeli olduğu unutulmamalıdır. Buna ilaveten bu çalışmada insanlarda hastalığa neden olan *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere karşı göstermiş olduğu direnç insan sağlığını tehlikeye sokmaktadır.

Sonuç olarak çevreden izole edilen *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere direnci ve virülans faktörlerinin önemli olduğu, çalışmamızda açıkça ortaya konmuştur. Çevresel kaynaklı *P. aeruginosa*'ların enfeksiyonlara neden olmasından dolayı virülans özelliklerinin asıl rolünü anlamak için genetik bazda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6.KAYNAKLAR

Angel Jenifer, M.R. ; Reena, A. ; Aysha, O. S. ; Valli, S. ; Nirmala, P. ; Vinothkumar, P., *Isolation of siderophore producing bacteria from rhizosphere soil and their antagonistic activity against selected fungal plant pathogens*, 2(1), 59-65 **2013**.

Atlas, R. M. ; Parks, L.C., *Handbook of Microbiological Media*, Second edition, *CRC Press*, New York, 1444, **1997**.

Aydın, F., *Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Değişik Yöntemlerle Çeşitli Antimikrobilyellere Duyarlılıklarının Araştırılması*. A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AnaBilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, **2001**.

Bilgehan, H., *Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitapevi, 2. Basım*,**1995**.

Bilgehan, H., *Fermentasyon Yapmayan Gram Olumsuz Bakteriler " H. Bilgehan (ed): Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları " kitabı, Fakülteler Kitapevi, 422, İzmir, 2000*.

Bitsori, M.; Maraki, S.; Koukouraki, S.; Galanakis, E.; *Pseudomonas aeruginosa urinary tract infection in children: risk factors and outcomes. J Urol. Jan 187(1):260-4 2012*.

Boles, B.R.; Thoendel, M.; Singh, P.K. *Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 16630–16635, 2004*.

Boles, B. R. ; Thoendel, M. ; and Singh P.K., *Rhamnolipids Mediate Detachment of Pseudomonas aeruginosa from Biofilms, Mol. Microbiol.57, 1210–1223, 2005*.

Brender, R.; Janda, JM., *Detection, quantitation and stability of the beta haemolysin of Aeromonas spp. J Med Microbiol 24, 247-251, 1987*.

Chakraborty, M.; J. P. Roy, *Prevalance Biochemical Characterisation and Pathogenicity of P. aeruginosa Isolated from Human and Animal Sources. Indian Vet. J., 78 (12), 1079-1081, 2001*.



Christensen, GD. ; Simpson, WA. ; Bisno, AL. ; Beachey, EH., *Adherence of Slimeproducing Strains of Staphylococcus epidermidis to Smooth Surfaces*”, *Infect Immun.*, 37, 318–26, **1982**.

Christofi, N. ; Ivshina, I.B., *Microbial Surfactants and Their Use in Field Studies of Soil Remediation. Journal of Applied Microbiology.* 93, 915-929, **2002**.

Chythanya, R.; Karunasagar, Indrani.; Karunasagar, Iddya., *Inhibition of shrimp pathogenic vibrios gy marine Pseudomonas I.– 2 strain. Aquaculture. Vol. 208.* P. 1–10, **2002**.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement, M100-S20*, CLSI, Wayne PA **2011**.

Colinon, C. ; Deredjian, A.; Hien, E.; Brothier, E.; Bouziri, L.; Cournoyer, B.; Hartman, A.; Henry, S.; Jolivet, C.; Ranjard, L.; Nazaret, S., *Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa in soil and manure assessed by an ecfX qPCR assay, Journal of Applied Microbiology*, 114, 1734-1749, **2013**.

Costerton, JW. ; Geesey, GG. ; Cheng, KJ., *How Bacteria Stick. Sci Am* 238, 86-95, **1978**.

Costerton, JW. ; Lewandowski, Z. ; Caldwell, DE. ; Korber, DR. and Lappin-Scott HM. *Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol*, 49, 711-45, **1995**.

Costerton, JW. ; Cheng, KJ. ; Geesey, GG., *Bacterial Biofilms in Nature and Disease, Annu. Rev. Microbiol.*, 41, 435, **1987**.

Costerton, JW. ; Lappin-Scott, HM., *Introduction to Microbial Biofilms*, H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton (ed.), *Microbial biofilms, Cambridge University Press*, Cambridge, United Kingdom, 1-11, **1995**.

Cruikshank, R., *Medical Microbiology 11th ed.*, Livingstone, London, 356, **1972**.

Daly, M.; Power, E.; Bjorkroth, J.; Sheehan, P.; O’Connell, A.; Colgan, M.; Korkeala, H. and Fanning, S. *Molecular analysis of Pseudomonas aeruginosa:*

*epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds. Appl Environ Microbiol* 65, 2723–2729, **1999**.

Davey, ME. ; O'Toole, GA., *Microbial Biofilms: From Ecology to Molecular Genetics, Microbiol. Mol. Biol. Rev.*,64, 847-867, **2000**.

Davis, D. B. ; Dulbecco, R. ; Eisen, H. ; Ginsberg, H. S. and Wood, W. B.,*Microbiology. Hober Medical Division, 774 s., 756–757, New York,1968*.

Delden, CV. ; Iglewski, B., *Cell to Cell Signaling and Pseudomonas aeruginosa Infections. Emerging Infectious Diseases. Vol:4, 551- 60, 1998*.

Demir, M. ;Cevahir, N. ; Kaleli, İ. ; Yıldırım, U. ; Şahin, R. ; Çevik Tepeli, E., *Alt solunum yolu örnekleri ve solunum yolu dışı örneklerden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarında siderofor, total matriks proteaz ve elastaz aktivitesinin araştırılması, Mikrobiyol Bül* 42, 197-208, **2008**.

Demnerova, K.; Machova, M.; Spevakova, V.; Baranova, K.; Kochankova, L.; Lovecka, P.; Ryslava, E.; Macek, T., *Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics-characterisation of microbial populations. International Microbiology. Vol. 8. P. 205–211, 2005*.

Dong, Y.; Zhang, X.; Soo, H.L.; Greenberg, P.; Zhang, L.; *The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in P. aeruginosa. Molecular Microbiology, 56, 1287-1301, 2005*.

Donlan, RM. , *Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis, 8, 881-890, 2002*.

Donlan, RM. ; Costerton, JW., *Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 167-93, **2002**.

Ekşi, F.; Bayram, A.; Balcı, İ.; Özer, G., *Pseudomonas aeruginosa suşlarında indüklenbilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması, Türk Mikrobiyol Cem Derg* 37(3), 142-146, **2007**.

Erdem, B.; *Pseudomonaslar*, Ustaçelebi Ş. (ed): *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabı, Gündeş Kitapevi*, Ankara, 551-557, **1999**.

Filali, B.K.; Taoufik, J.; Zeroual, Y.; Dzairi, F.Z.; Talbi, M. And Blaghen, M., *Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. Curr Microbiol* 41, 151–156, **2000**.

Finlayson, EA. ; Brown, PD., *Comparison of Antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented Pseudomonas aeruginosa*, *West Indian Med J*, 60 (1), 24, **2011**.

Freeman, D.J. ; Falkiner, F.R. ; Keane, C.T., *New Method For Detecting Slime Production by Coagulase Negative Staphylococci*, *I. J. Clin. Pathol.*, 42, 872–874, **1989**.

Gür, D., *Hastane İnfeksiyonu Etkeni Çoklu Dirençli Gram Negatif Mikroorganizmalar. Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 7 (3), 111-117, **2003**.

Hunter, P.R., *The microbiology of bottled natural mineral waters. J Appl Bacteriol* 74, 345–352, **1993**.

Kaszab, E., *The importance of Pseudomonas aeruginosa on environmental safety in media under anthropogenic affect*. Szent Istvan University. Ph.D. Thesis, 21, Gödöllü, **2010**.

Kimata, N.; Nishino, T.; Suzuki, S. and Kogure, K., *Pseudomonas aeruginosa isolated from marine environments in Tokyo Bay. Microb Ecol* 47, 41–47, **2004**.

Koneman, E.; Allen, D.S.; Jonda, W.M.; Schreckenberger, P. C.; Winn, C.W Jr. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5. Edn., pp. 268, **1997**.

Koneman, E.; Stephan, DA.; William, MJ.; Schreckenberger, PC.; Winn, CW Jr., *The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. Konoman's Colour Atlas and 55 Textbook of Diagnostic Microbiology 6th Ed*. Philadelphia, Lippincott 303-391, **2006**.

Kosaric, N., *Biosurfactants and Their Application For Soil Bioremediation, Food Technol. Biotechnol.* 39 (4) 295–304, **2001**.

Lang, S., *Biological Amphiphiles (Microbial Biosurfactants), Current Opinion in Colloid Interface Science*, 7, 12-20, **2002**.

Lavenir, R.; Sanroma, M.; Gibert, S.; Crouzet, O.; Laurent, F.; Kravtsoff, J.; Mazoyer, M.A. and Cournoyer, B. *Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a Pseudomonas aeruginosa water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. J Appl Microbiol* 105, 1491–1501, **2008**.

Ledbetter, E.C.; Hendricks, L.M.; Riis, R.C. and Scarlett, J.M. *In vitro fluoroquinolone susceptibility of Pseudomonas aeruginosa isolates from dogs with ulcerative keratitis. Am J Vet Res* 68, 638–642, **2007**.

Lequette, Y.; Greenberg, E. P., *Timing and Localization of Rhamnolipid Synthesis Gene Expression in Pseudomonas aeruginosa Biofilms”, J. Bacteriol.*, 187:1, 37-44, **2005**.

Marshall, K.C. , *Interfaces in microbial ecology, Cambridge, MA: Harvard University Press*, 44-47, **1976**.

Mena, K.D. and Gerba, C.P. *Risk assesment of Pseudomonas aeruginosa in water.Rev Environ Contam Toxicol* 201, 71-115, **2009**.

Mikrobiyoloji, **2013**. *Pseudomonas*. <http://www.mikrobiyoloji.org>.  
[http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?](http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx) Erişim Tarihi: 25.03.2013.

Mittal, R.; Khandwaha, R. K.; Gupta, V.; Mittal, P. K.; Harjai, K., *Phenotypic characters of urinary isolates of Pseudomonas aeruginosa & their association with Mouse renal colonization, Indian J Med Res* 123, 67-72, **2006**.

Moore,, M.D., Reference Paper: *Pseudomonas and the Laboratory Animal*, 10, 4, ([www.criver.com/Hechdocs/pseudomonas.html](http://www.criver.com/Hechdocs/pseudomonas.html)), **1997**.

Pamp, S. J. ; Tolker-Nielsen T., *Multiple Roles of Biosurfactants in Structural Biofilm Development by Pseudomonas aeruginosa, J. Bacteriol*, 189:6, 2531–2539, **2007**.

Pirnay, J.P.; Matthijs, S.; Colak, H.; Chablain, P.; Bilocq, F.; Van Eldere, J.; De Vos, D.; Zizi, M. et al. *Global Pseudomonas aeruginosa biodiversity as reflected in a Belgian river. Environ Microbiol* 7, 969–980, **2005**.

Post, J.C.; Stoodley, P.; Hall-Stoodley, L.; Ehrlich, G.D., *The Role of Biofilms in Otolaryngologic Infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, Jun; 12 (3)*, 185-190. Review, **2004**.

Rajmohan, S.; Dodd, C. E. R.; Waites, W. M.; *Enzymes From Isolates of Pseudomonas fluorescens Involved in Food Spoilage", J. Appl. Microbiol.,93*, 205-213, **2002**.

Rijnarts, H.M.; Norde, W.; Bouwer, E.J.; Lyklema, J. ; Zehnder, A.B., *Bacterial Adhesion Under Static and Dynamic Conditions. Appl Environ Microbiol, 59*, 3255-3265, **1993**.

RS. Makkar.; SS. Cameotra., *Applied Microbiology and Biotechnology, 58* 428, **2002**.

Santa Anna, L. M.; Sebastian, G. V.; Menezes, E.P.; Alves, T.L.M.; Santos, A.S.; Jr. Pereira, N.; Freire, D.M.G., *Production of biosurfactants from Pseudomonas aeruginosa PA1 isolated in oil environments, Brazilian Journal of Chemical Engineering 02*,159-166, **2002**.

Costaa, G.V.A.O.S.; Nitschkeb, M.; Ois Lépinec, F.; Dézielc, E.; Contiero, J., *Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa L2-1 from cassava wastewater, Process Biochemistry 45*, 1511–1516, **2010**.

Siegmund, I.; Wagner, F., *New Methods for Detecting Rhamnolipids Excreted by Pseudomonas species During Growth in Mineral Agar. BioTechniques, 5*, 265-268, **1991**.

Silva, M. E. Z.; Filho, I. C.; Endo, E. H.; Nakamura, C. V.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D., *Characterisation of potential virulence markers in Pseudomonas aeruginosa isolated from drinking water, Antonie van Leewenhoek, 93*, 323-334, **2008**.

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.,40*, 175–9, **2000**.

Szewzyk, U.; Szewzyk, R.; Manz, W.; Schleifer, K.H. *Microbiological safety of drinking water. Annu. Rev. Microbiol.* 54, 81–127, **2000**.

Tanaka, R.; Sugimura, I.; Sawabe, T.; Yoshimizu, M.; Ezura, Y., *Gut microflora of abalone haliotis discus hannai in culture changes coincident with a change in diet. Fish. Sci. Vol. 69.* P. 951–958 **2003**.

Tekoriene, R., *Distribution of the genus Pseudomonas bacteria in oil-polluted soil, water, polymeric materials, plant remnants and food products*, 3, 143-148, **2008**.

Tielen, P.; Rosenau, F.; Wilhelm, S.; Jaeger, K.E.; Flemming, H.C.; Wingender, J., *Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid Pseudomonas aeruginosa, Microbiology*, 156, 2239-2252, **2010**.

Ulusoy, S., *Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretiminin Araştırılması. SüleymanDemirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 100s, Isparta, **2007**.

Ye, J.; Ma, Y.; Liu, Q.; Zhao, D.L ; Wang, Q.Y. ; Zhang, Y.X., *Regulation of Vibrio alginolyticus Virulence by the LuxS Quorum-Sensing System. Journal of Fish Diseases*, 31, 161-169, **2008**.

Yin, H.; Qiang, J.; Jia, Y.; Ye, J.; Peng, H.; Qin, H.; Zhang, N.; He, B., *Characteristics of biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa S6 isolated from oil-containing wastewater, Process Biochemistry*, 44, 302–308, **2009**.

Willcox, M. D. P., PhD, *Pseudomonas aeruginosa infection and inflammation during contact lens wear, Optometry and Vision Science* 4, 273-278, **2007**.

Wilson, S. G. ; Miles, A. A., *Principles of Bacteriology and Immunity*. 636–643. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, **1964**.

Wikipedia, **2013**. Virülans. <http://www.wikipedia.org>.

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Vir%C3%BClans> Erişim Tarihi: 22.03.2013

Wikipedia, **2013**. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Proteaz>

Erişim Tarihi: 10.03.2013

[http://www.hastaneinfeksiyonlaridergisi.org/managete/fu\\_folder/1998-01/html/1998-2-1-025-033.htm](http://www.hastaneinfeksiyonlaridergisi.org/managete/fu_folder/1998-01/html/1998-2-1-025-033.htm).Erişim tarihi: 03.12.2013

## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı:** Zeynep KARAKAŞ

**Doğum Yeri:** Kırşehir

**Doğum Tarihi:** 22.03.1989

**Yabancı Dili:** İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

**Lise:** (2002-2005) Kırşehir Lisesi

**Lisans:** (2006-2010) Ahi Evran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

**Yüksek Lisans:** Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı