

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**MASTİTİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN
PSEUDOMONASLARIN BİYOFİLM ÜRETME
YETENEĞİNİN İNCELENMESİ**

**MELİH ÖZTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap SAVAŞAN**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
VTF17014 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde MELİH ÖZTÜRK tarafından hazırlanan "MASTITİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN PSEUDOMONASLARIN BİYOFİLM ÜRETME YETENEĞİNİN İNCELENMESİ" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/01/2018

Üye : Prof.Dr. Şükrü KIRKAN

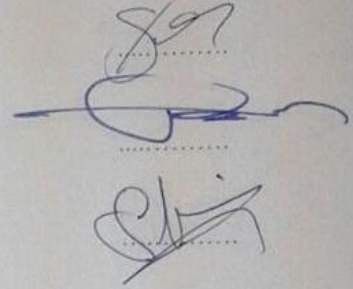
ADÜ

Üye : Prof.Dr. K. Serdar DİKER

AÜ

Üye(Tez Danışmanı): Doç.Dr. Serap SAVAŞAN

ADÜ



ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden bu yana desteğini esirgemeyen saygıdeğer Doç. Dr. Serap SAVAŞAN 'a, yüksek lisans eğitimi boyunca samimi ve içten yaklaşımlarını her an hissettiğim tüm Mikrobiyoloji ABD öğretim üyelerine ve tezin oluşum sürecinde gerek laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamasındaki bilgi destekleri ile yanımda olan Arş. Gör. H. Tuğba Yüksel'e, çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelinceye kadar üzerimdeki emeğini, sevgi ve saygısını bir an esirgemeyen fedakar, canım annem Emine ÖZTÜRK ve babam Nurettin ÖZTÜRK 'e, en zor zamanda dahi bana tebessüm ettiren abim Deniz ÖZTÜRK 'e ve tüm ailem ve de dostlarıma samimi ve içten teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mastitis	3
2.1.1. Mastitis Etiyolojisi	4
2.1.2. Mastitise Sebep Olan Başlıca Mikrobiyel Ajanlar.....	6
2.1.2.1. Bulaşıcı (Kontagiyöz) Mastitise Sebep Olan Mikroorganizmalar	6
2.1.2.1.1. Streptokok Kaynaklı Mastitis	7
2.1.2.1.2. Stafilokok Kaynaklı Mastitis.....	7
2.1.2.1.3. Korinebakteriyum Kaynaklı Mastitis	8
2.1.2.1.4. Mikoplazma Kaynaklı Mastitis	8
2.1.2.2. Çevre Kaynaklı Mikroorganizmalar.....	9
2.1.2.2.1. <i>Escherichia coli</i> Kaynaklı Mastitis	9
2.1.2.2.2. Klebsiella Kaynaklı Mastitis	10
2.1.2.2.3. <i>Enterococcus faecalis</i> Kaynaklı Mastitis	11
2.1.2.2.4. <i>Actinomyces pyogenes</i> (<i>Arcanobacterium pyogenes</i>) ‘den Kaynaklanan Mastitis.....	12
2.1.2.2.5. Pseudomonaslardan Kaynaklı Mastitis	12
2.2. Biyofilm	17
2.2.1. Biyofilmin Tanımı.....	17
2.2.2. Biyofilmin Yapısı	18
2.3. Biyofilm Olusum Aşamaları	19
2.2.4. Biyofilm Oluşumunun Önemi	22
2.2.5. Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama)	23
2.2.5.1. Bakteriyel Çoğunluğu Algılamada Ortak Temalar	25

2.2.6. Pseudomonas ‘larda Biyofilm Oluşumu	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. İzolasyon Örnekleri	29
3.1.2. Besiyerleri	29
3.1.2.1. Pseudomonas Selective , CFC Agar Base (Merck 1.07620).....	29
3.1.2.2. Blood Agar (Merck 1.10886)	30
3.1.2.3. EMB Agar (Merck 1.01347)	30
3.1.2.4. Kongo Red Agar (CRA).....	30
3.1.2.5. Triple Sugar Iron Agar (Üç Şekerli Demirli Agar)	31
3.1.2.6. Tryptic Soy Agar	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Örneklerin Alınması	32
3.2.2. Pseudomonas Şüpheli Örneklerin Belirlenmesi	32
3.2.3. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi	33
3.2.3.1. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi	33
3.2.3.2. Biyofilm Üretiminin Genotipik Olarak Belirlenmesi.....	34
3.2.3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	34
4. BULGULAR	35
4.1. İzolasyon ve İdetifikasyon Bulguları	35
4.2. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak İncelenmesine Ait Bulgular	36
4.3. PCR Bulguları	36
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR.....	40
ÖZGEÇMİŞ	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

3-okso-C12-HSL	: 3 okso dodekanol homoserin lakton
ADP	: Adenozin di-fosfat
AHL	: Asil homoserin lakton
AIP	: Otoindüktör peptit
AI-2	: Otoindüktör-2
Asil-ACP	: Asil-asil taşıyıcı protein
BA	: Kanlı Agar
bp	: Baz Çifti
C	:Sitozin
°C	: Santigrat derece
CAI-1	: Cholera otoindüktör-1
c-di-GMP	: Siklik diguanilik asit
CdrA	: Biyofilm yapısındaki büyük salgı adhezini
CD14	: Farklılaşma kümesi 14
CFC	: Sentrimid, fusidin, seflosporin
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran regülatör
CMT	: Kaliforniya mastitis test
CO₂	: Karbon dioksit
CRA	: Kongo Red Agar
CSP	: Yeterlilik uyarıcı peptit
dNTP	: Deoksiribo nükleotid trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPD	: 4,5-dihidroksi-2,3-pentandion
eDNA	: Çevresel deoksinükleik asit
EMB	: Eozin Metilen Blue Agar
Ebp	: Enterococcal biyofilm pili
EF2	: Elongasyon faktörü
ExoS	: Ekzoenzim S
ExoY	: Ekzoenzim Y
ExoU	: Ekzoenzim U
ExoA	: Ekzotoksin A

EPS	: Ekstraseküler polimetik madde
FAO	: Gıda tarım örgütü
GeE	: Çinko metaloproteaz
G	: Guanin
g	: Gram
g/L	: Litre başına düşen gram miktarını gösterir.
GTP	: Guanozin trifosfat
GAP	: Guanozin trifosfat aktive edici protein
HAI-1	: Harveyi otoindüktör-1
IgG	: İmmunglobulin G
IL-8	: İnterlökin-8
Kbp	: Kilo baz çifti
K₃PO₄	: Tripotasyum fosfat
KDa	: Kilo dalton
LPS	: Lipopolisakkarit
MD2	: Lenfosit antijen 96
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MucR	: Diguanilat siklaz
MgSO₄	: Magnezyum sülfat
MnSO₄	: Manganez sülfat
ng	: Nanogram
NaCl	: Sodyum Klorür
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi.
pm	: Pikometre
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
RANTES	: T lenfositlerin ekspresyonunu ve sekresyonunu düzenleyici protein
SAM	: S-adenosilmetionin
TLR2	: Toll-benzeri reseptör 2
TLR4	: Toll-benzeri reseptör 4

TLR5	: Toll-benzeri reseptör 5
TCTSTS	: İki bileşenli transdüksiyon sistemi
TCR4	: Toll-benzeri reseptör 4
TSA	: Triptik soy agar
TSIA	: Triple şugar iron agar
TLR5	: Toll benzeri reseptör 5
TLR2	: Toll benzeri reseptör 2
TLR4	: Toll benzeri reseptör 4
SAM	: s-adenosilmetionin
SprE	: Serin proteaz
SHS	: Somatik hücre sayısı
U	: Ünite
UPEC	: Uropatojenik <i>Escherichia coli</i>
UV	: Ultra viole
XIP	: comX indükleyici peptit

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Pseudomonas Selective Agar'a yapılan ekim sonucu üreyen pozitif ve negatif koloniler	33
Resim 2. Kongo Red Agar'a ekim yapılan örneklerin inkübasyon sonrası biyofilm görünümü.	33



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Bakteriyel Quorum Sensing Sistemleri ve Kontrollü Sosyal Özelliklerin Örnekleri.	24
Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Oligonükleotid Primer Dizileri.	34
Tablo 3. Sütlerden İzole Edilen Suşlarda İdentifikasyon Bulguları.	35



ÖZET

MASTITİSLİ SÜTLERDEN İZOLE EDİLEN PSEUDOMONASLARIN BİYOFİLM ÜRETME YETENEĞİNİN İNCELENMESİ

Öztürk M. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Ana
Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2018

Bu araştırma ile mastitisli sütlerden izole edilen *Pseudomonas* türlerinin biyofilm üretme yeteneğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda *Pseudomonas* izolasyonu için Aydın Bölgesinden sağlıklı ve mastitisli sığırlardan alınan süt örnekleri kullanıldı. Alınan örnekler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Rutin Teşhis laboratuvarına getirilecek ve besiyerlerine ekimleri yapıldıktan sonra 37 °C’de 24 saat inkubasyona bırakıldı. İzole edilen bakterilerin biyokimyasal yöntemlere göre identifikasyonu yapıldı. Toplanan materyallerden izole edilen *Pseudomonas*’lardaki biyofilm üretme yeteneği fenotipik olarak Kongo Red Agar da incelendi. Genotipik değerlendirme için PCR tekniği uygulandı.

Anahtar Kelimeler: Mastitis, süt, *Pseudomonas spp.*, biyofilm

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SLIME PRODUCTION OF PSEUDOMONAS STRAINS ISOLATED FROM MASTITIS MILK

Öztürk M. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Department of Microbiology, Master Thesis, Aydın, 2018

This type of Pseudomonas isolated from mastitis milk study aims to investigate the ability to produce biofilm.

In our study, healthy for the District of Aydın Pseudomonas isolation and mastitis milk samples taken from cattle was used. Samples were prepared under cold chain Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Microbiology will be brought to the routine diagnostic laboratory and allowed to incubate for 24 hours at 37 ° C after the planting medium. The isolated bacteria was performed according to biochemical identification methods. The ability to produce biofilm formation in Pseudomonas isolated from the collected materials were also phenotypically Congo Red Agar. PCR techniques for genotypic evaluation was performed.

Key Words: Mastitis, milk, *Pseudomonas spp*, biofilm

1. GİRİŞ

Süt üretimi yemleri ve beslenmeyi süte dönüştüren biyolojik olarak verimli bir sistemdir (Yohannes, 2003). Süt karbonhidrat, protein, yağ, vitamin ve mineral açısından çok besleyici bir gıdadır. İnsan nüfusunun artışı teknolojinin ilerlemesi ve kentsel merkezde hayvan ürünlerine olan yüksek talep ve satın alma gücü kent dışında ve kırsal yerleşim yerlerinde süt üretiminin artışına teşvik etmiştir (Yoseph ve ark, 1998).

FAO (2003) özel işletmelerdeki toplam sığır sürülerinin % 42'sinin sağmal ineklerden oluştuğunu tahmin etmiştir. Ancak süt üretimi çok sayıda faktörün birbiriyle ilişkisi dolayısıyla ülkelerin süt ihtiyacını tatmin etmemektedir. Sığır mastitisi, son 50 yılda birçok farklı kontrol önlemi tavsiye edilen bir hastalıktır.

Mastitis, süt ineklerinin birbirleri ve çevreyle sağım makinaları ve mikroorganizmalarla ilişkilerinden dolayı oluşan karmaşık ve tedavisi oldukça masraflı bir hastalıktır (Azmi ve ark, 2008). Mastitis süt verimini ve kalitesini düşüren, aynı zamanda hayvanların damızlıktan çıkarılmasına sebebiyet veren bir hastalıktır (Vaarst ve Envoldsen, 1997). Üstelik hastalığın gizli formu ağır besinsel ve finansal kayıplar ile sonuçlanır. Çünkü sütte laktoz, yağ ve kazein gibi değerli komponentlerin azaldığı ve üretim teknolojisi için istenmeyen iyonlar ve enzimlerin sütte arttığı gözlemlenmiştir (Girma, 2001; Shitandi, 2004). Birçok enfeksiyöz etken, süt ineklerinde mastitise sebep olmaktadır. Bu etkenlerden en sık görülen mikroorganizmalar *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, çevresel mastitis etkenlerinden koliform ve çevresel Streptokoklar gösterilebilir (Quinn ve ark, 2002; Radostits ve ark, 2000). Çok sık izole edilmemesine karşı özellikle *Pseudomonas aeruginosa* klinik mastitisi salgınlarına sebep olmaktadır.

Pseudomonas cinsi bakteriler tüm dünyada yaygın olarak görülen mikroorganizmalardır. Toprakta, suda, bitkilerde ve çürüyen organik maddelerde bulunurlar. İnsan, hayvan ve bitkiler için fırsatçı patojen olarak kabul edilirler. İnek, köpek, at, mink, kanatlı, koyun, kafes hayvanları gibi birçok hayvan türünde hastalığa sebep olmaktadır. (Songer ve ark, 2011).

Pseudomonas mastitisleri enfeksiyonun alevlenmesi ile karakterize akut veya subakut sürekli bir enfeksiyon meydana getirmektedir. Organizma çiftliklerde ortak olarak toprak ve sulu ortamlarda görülür. Sürekli enfeksiyonlar, kirlenmiş yıkama suyu, meme başlığı gömlekleri sağımıcılar tarafından idare edilen meme içi tedavilerden sonra bildirilmiştir.

Başarısız aseptik uygulamalar, kirlemiş sağımlar ekipmanları, yetersiz dezenfeksiyon meme bezlerinde *Pseudomonas*ların yerleşmesine sebep olur. Enfeksiyon bazı ineklerde şiddetli toksemi ve yüksek mortalite ile seyrederken bazı ineklerde subklinik enfeksiyonlar görülür. Organizma meme bezleri içerisinde beş laktasyon dönemi boyunca kalabilir fakat spontan iyileşmeler de gözlenmektedir.

Pseudomonas enfeksiyonların böyle dalgalı ve sürekli bir şekilde görülmesinin sebeplerinden biri bakterinin kullanılan ekipmanlar veya meme bezi içerisinde biyofilm oluşturmasından kaynaklanmaktadır.

Bakteriyel biyofilm değişik mikrobial türlerin, kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları mikroekosistem olarak tanımlanır. Mikroorganizmalar savunma, adhezyon ve kolonizasyon, kendilerine yaşanabilir bir çevre oluşturmak ve yeni genetik özellikler kazanmak için biyofilm oluşturmaktadırlar.

Bu çalışmada; Aydın yöresinden toplanan süt örneklerinden izole edilen *Pseudomonas* suşlarında biyofilm yapımı ile biyofilm yapımında görev alan genlerin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mastitis

Meme dokusunun süt yapan bezlerinin (alveoller, meme paransimi) sütün depolanması ve dışarı çıkmasını sağlayan boşlukların, sebebi ne olursa olsun bütün hastalıklarına mastitis adı verilir. Her ne kadar dişi ve erkek her çeşit memeli türlerinde görülse de, bol süt veren hayvanlardan koyun, keçi ve özellikle ineklerde büyük ekonomik önem taşır (Deveci ve ark, 1991).

Mastitis seyrine göre klinik ve subklinik olmak üzere ikiye ayrılır. Klinik mastitis yangı, şişme, kızarıklık, ağrı ve buna bağlı fonksiyon bozuklukları ile baş gösterir. Subakut mastitis denilen hafif klinik olgular da sütteki flakon ve renk değişimleri göze çarpar. Klinik mastitisin perakut, akut, subakut ve kronik mastitis olmak üzere dört formu vardır. Akut mastitisler; memede ani kızarıklık, şişme, sertleşme, ağrı, anormal süt ve süt veriminde azalma ateş, depresyon ve kilo kaybı ile karakterizedir. Perakut mastitislerde akuta ek olarak yüksek pulzasyon ve solunum hızı, kaslarda inkordinasyon, ekstremiteler de soğukluk, pupillar refleksinde azalma ve ishal gibi ciddi genel bulgular mevcuttur. Kronik mastitis uzun süre seyreden mastitislerin sonucunda meme dokuda fibröz dokuların gelişmesi ile karakterizedir. Saha lezyonları görülmeksizin yangı varlığı durumunda subklinik mastitis görülmür. Subklinik mastitis tayini sütte yangı belirtileri (lökosit, fibrin, klot, serum) ve kandan süte sodyum klorür ve bikarbonat transferi ile pH'ın daha alkali olmasından kaynaklanan kimyasal kompozisyonundaki değişme ile teşhis edilir. Klinik olarak kolay tanı konabilen her bir klinik mastitise karşılık 40-50 subklinik mastitis olgusu ile karşılaşılır. Subklinik mastitis; meme dokusunu ve süt bileşimini etkilemekle birlikte, bu değişimlerin hiçbiri gözle ve klinik muayene ile saptanamadığı için sürüde yaygınlığı önemli derecede yüksek olmaktadır (Alaçam, 1997). Mastitis etkeni kaynağına göre, kontagiyöz ve çevresel mastitis olmak üzere *Pseudomonas spp.*, çevresel *Streptococcus spp.* (başlıca *Streptococcus uberis* daha seyrek *Streptococcus dysgalactia*) türleri ve *Enterococcus faecalis* rol oynar. Yaz mastitislerinden sorumlu ve sineklerin taşıyıcılığını yaptığı *Actinomyces pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*) ve mycoplasma türleri (*Mycoplasma bovis*) de bu tip mastitiste rol oynar. Mastitis etkeni olarak 130'dan fazla bakteri türü izole edilmesine rağmen mastitisli süt örneklerinden

sıklıkla *S. aureus*, *Streptococcus spp.* ve Enterobacteriaceae familyasında yer alan bakteriler izole edilmektedir.

Meme dokusunda infeksiyon oluştuğunda sütte lökositler ve epitel hücre (somatik hücre) sayısı artar. Çiğ sütlerde normal olarak düşük sayıda bulunan somatik hücre sayısının (SHS) normalin üzerine çıkması hayvanın mastitisli olduğunu gösterir. Mastitisli süt tüketiminin insan sağlığını tehdit etmesi nedeniyle 14 Şubat 2000 tarihinde yayınlanan Türk Gıda Kodeksinde çiğ ve ısıtılmış sütler ile ilgili olarak somatik hücre sayısının mililitrede 5×10^5 adetten az olması gerektiği bildirilmiştir (Kesenkaş ve ark, 2001). Subklinik mastitis klinik kimyasal testler ve bakteriyolojik muayenelerle teşhis edilebilmektedir. Bu testlerden California Mastitis Testi (CMT) ucuz olması ve her meme başına uygulama imkânı vermesinden dolayı en çok kullanılanıdır. Hastalıklı meme dokusu tedavi edilmediği takdirde atrofi meydana gelir. Hastalığın uzun süre fark edilmeden devam etmesi veya tedaviye cevap alınamaması, süt veriminde önemli ölçüde kayıp oluşturur (Deveci ve ark, 1994). Ayrıca infekte süt kullanılamaz. İlaç ve veteriner hekim masrafları ile ayıklama (hayvanın damızlıkta kullanılamaması) artar.

Süt endüstrisinin geliştiği ve işletme kayıtlarının düzenli olarak tutulduğu ülkelerde mastitisin yaygınlığı ve mastitisten kaynaklanan ekonomik kayıpların boyutları çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Kontagiyöz mastitis hayvandan hayvana veya bir meme lobundan diğerine bulaşma ile oluşur. *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium bovis* ve *Mycoplasma* türleri başlıca etkenlerdir. Çevresel mastitis hayvanın yaşadığı ortamda (su, toprak, gübre, ahır vs.) bulunan bakterilerin herhangi bir dönemde (kuru ve laktasyon) oluşturduğu infeksiyondur. Gram negatif bakterilerden Enterobacteriaceae familyası bakterileri (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*) daha çok klinik mastitise neden olur.

2.1.1. Mastitis Etiyolojisi

Mastitis meme ucundaki salgıdan patojenik bakterinin girerek iç bezleri etkilemesi sonucu gelişir. Meme iç bezlerdeki ortamda bakteri çoğalmasına çok uygun ise bakteri gelişimi ve metabolizması sonucu hassas dokular iltihaplanarak yangı şekillenir. Mastitisin ciddiyeti bakteri enfeksiyonunu oluşturan bakteri sayısına, sığır metabolizmasına ve meme bezlerindeki süt alveollerine ve çevre faktörlerinden kaynaklanan baskı derecelerine bağlıdır.

Meme dokusunda mastitise predispozisyon oluşturan başlıca etkenler şunlardır;

- 1-Yetersiz sağıım hijyeni
- 2-Sağıım yapılırken gerekli kurallara uyulmaması
- 3-Sağıımcının ellerine ve meme başı temizliğine yeterli özeni göstermemesi
- 4-Memedeki sütü tam sağımamak
- 5- Meme başına zarar verecek, onu gevşetecek şekilde sağımak
- 6-Sağıım süresinin tam ve düzenli olmaması
- 7-Sağıımda izlenmesi gereken sıraya uyulmaması (önce sağlıklı genç hayvanlar, sonra yaşlılar ve en son mastitis şüpheli hayvanlar)
- 8-Meme başı ve meme yaraları
- 9-Meme başı kanalında çeşitli ilaçların uygulanması sırasında kanalda meydana gelen yaralanmalar
- 10- Sağıım makinelerine bağlı hatalar
- 11-Makine parçalarının temizliğinin ihmal edilmesi
- 12-Makinelili sağıımda vakumun doğru ayarlanmaması
- 13-Çevresel patojenlerin popölasyonu

Mastitislerin ortaya çıkmasında önemli olan üç etken vardır; Bunlar inek, patojen ve çevredir. Hastalık bu üç önemli etkenden biri veya birbirleri ile etkileşmeleri sonucu ortaya çıkar.

1. İneğe Bağlı Faktörler

Genetik Dirençlilik ,

Fiziksel Faktörler; meme başları çapı, meme başları uzunluğu, ön meme başları arası mesafe, arka meme başları arası mesafe, yan meme başları arası mesafe, ön meme başlarının yerden yüksekliği, arka meme başlarının yerden yüksekliği ön meme bağlantısı, arka meme (süt aynası) yüksekliği, meme merkez bağı, meme derinliği ve meme başları yerleşimi gibi çeşitli özellikler mastitise predispozisyonu etkilemektedir.

Laktasyon dönemi, laktasyonun farklı aşamalarında farklı mikroorganizma tipine veya farklı klinik formlarda mastitise rastlanmaktadır.

Doğum sayısı, yaşlı hayvanlar mastitise daha çabuk yakalanır. Hayvanlar yaşlandıkça meme torbaları daha çok genişler ve fiziksel yara ihtimali artar.

Güç doğum, hipokalsemi, retentio secundinarum ve ketosis gibi peripartal hastalıklar doğumdan sonra mastitislere hazırlayıcı faktörlerdir.

Holstein fresian ırkı diğer ırklara göre mastitislere daha duyarlıdır.

2. Çevresel Faktörler

Mevsim ve iklim; sıcaklar mastitis görülme oranını artırır. Sıcaklıkla meydana gelen ani değişimler genel dolaşımdaki lökosit ve eritrosit miktarının azalmasına yol açarak mastitislere predispozisyon oluşturmaktadır. Sıcaklardan dolayı sineklerin artması ve kapalı ahırlarda mastitis oranı artmaktadır. Aşırı yağışlı iklimlerde çamur ve sulanmış dışkı yine mastitis görülme oranını arttırmaktadır. Soğuk havalar meme uçlarının çatlamasına yol açtığı için mastitis görülme oranını arttırmaktadır.

Ahır ve barınak; ahır ve barınakların yapısı, büyüklüğü, şekli, yataklık olarak kullanılan maddeler ve bu maddelerin uygun olmayan dezenfeksiyon uygulamaları mastitis riskini arttırmaktadır. Ahırda uygun olmayan havalandırma koşulları ve ahırda kullanılan diğer ekipmanların yetersiz dezenfeksiyonu mastitis riskini arttırmaktadır.

Beslenme, pamuk tohumu küspesi içerdiği fazla miktardaki gossipol alkaloidi sebebi ile eritrositlerde yapı ve fonksiyon bozukluğuna sebep olarak vücudun direncini kırmaktadır. Rasyonun fazla miktarda protein içermesi süt verimini arttırarak mastitislere duyarlılığı arttırmaktadır. Bahar aylarında meraya ilk çıktıklarında inekler mastitise daha duyarlı hale gelmektedirler.

2.1.2. Mastitise Sebep Olan Başlıca Mikrobiyel Ajanlar

Sahada görülen klinik mastitislerden en çok izole edilen mikroorganizmaları kaynağına göre iki grupta toplamak mümkündür. Bu gruplar; bulaşıcı (kontagiyöz) mastitise sebep olan mikroorganizmalar, çevre kaynaklı mikroorganizmalardır.

2.1.2.1. Bulaşıcı (Kontagiyöz) Mastitise Sebep Olan Mikroorganizmalar

Bu grupta incelenecek olan mikroorganizmalar memedeki yaşama iyi adapte olmuşlardır, meme bezinde çoğalırlar ve sıklıkla haftalık, aylık veya yıllık infeksiyonlara sebep olurlar. İnfekte meme bezi bu mikroorganizmaların temel kaynağıdır. *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium bovis* ve *Mycoplasma spp.* bu gruba örnektir.

2.1.2.1.1. Streptokok Kaynaklı Mastitis

Streptokoklar Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'e göre Deinococcaceae familyası içinde yer almaktadırlar. Bu familyada Streptococcus, Deinococcus, Aerococcus, Sarcina, Leuconostoc, Peptococcus, Ruminococcus, Gemella ve PeptoStreptococcus gibi cinsler yer almaktadır. İnsan ve hayvanlarda lokal ve genel birçok hastalığın nedeni olan ve onların mukoz membranlarında da normal olarak yaşayabilen bakterilerdir.

Streptokoklar, Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, yuvarlak veya oval yapılı mikroorganizmalardır. Tipik zincirler oluşturmakla karakterizedirler. Oluşan zincirler, 70-80 kottan meydana gelmiş uzun (*S. equi*, *S. agalactiae*) veya 10-15 kottan oluşmuş kısa (*S. dysgalactiae*, *S. uberis*) zincirler tarzında görülebilir. Genelde kapsülsüz olan Streptokoklarda, dokularda ve kan serumu ile zenginleştirilmiş besi yerlerinde üreyenlerde belirgin bir kapsül oluşumu saptanabilir.

Streptococcus agalactiae, *Streptococcus dysgalactiae* ve *Streptococcus uberis* süt ineklerinde akut ve kronik mastitis etkenidir. *Streptococcus uberis* memenin derin dokularına yerleşerek buradaki irinli apse odakları meydana getirir. Tedavisinde kullanılacak olan ilacın dokulara yeterli oranda geçmesi gerekmektedir. *Streptococcus epidermidis* ve *Streptococcus agalactia* mukoza yüzeyinde bulunurlar. Bu mikroorganizmalardan ileri gelen mastitisin tedavisinde kullanılacak olan ilacın dokuya yayılmasına gerek yoktur. Streptokokkal mastitisler sütün yavaş yavaş değişmesi, bazen hiç veya çok az anormalleşmesi ve bazı olgularda da süte parçacıkların, fibrin kümelerinin, kanın ve koyu purulent materyalin görülmesi ile karakterize bir enfeksiyondur.

2.1.2.1.2. Stafilokok Kaynaklı Mastitis

Stafilokoklar Micrococcaceae familyası içerisinde incelenir. Bu familyada Stafilokoklar dışında Micrococcus, Stomatococcus ve Planococcus cinsleri yer almaktadır.

Stafilokokkal mastitis özellikle inek, koyun ve keçilerde görülen akut veya kronik seyirli bir enfeksiyondur. Etken memenin derin dokularına yerleşerek burada apseli odaklar şekillendirir. *Staphylococcus aureus* hücre içi yerleşim gösterebilir ve toksin salgılayarak immun sistemi bozar. Hastalık sığırlarda sporadik ve koyunlarda ise enzootik karakterdedir. Akut seyirli stafilokokkal mastitisler ölümlere yol açarken, kronik seyirli olanlar ise oldukça hafif seyirlidir.

2.1.2.1.3. Korinebakteriyum Kaynaklı Mastitis

Corynebacteriaceae familyası içerisinde Corynebacterium genusu içerisinde yer alan bakteriler, düzensiz şekilli, sporsuz, hareketsiz ve Gram pozitif basillerdir. Coryneform bakteriler aside dirençli değildirler.

Corynebacterium Yunancadan alınma bir kelimedir ve topuz şeklinde anlamına gelmektedir. Hücre duvarları arabinoz, galaktoz, mezo-diaminopimerik asit ve bazılarında mikolik asit içerir. Gram ile boyandığında V ve Y gibi kısa zincirler şeklinde görülürler. Metakromik cisimcikleri olup özel boyalar ile boyandıklarında görülebilirler. Genellikle karbonhidratları fermente ederek laktik asit oluştururlar. Genel üretim besiyerlerinde kolaylıkla üremelerine karşın lipofilik olan bazı türler için besiyerinde lipid ilavesi yapılmalıdır.

Corynebacteria bitiki hayvanlarda sıklıkla bulunur. Patojenik olan *Corynebacterium bovis* süt ineklerinde bulaşıcı mastitis ve piyelonefrit etkenidir. Kötü sağım hijyeni ve sağım sırasında memenin yetersiz dezenfeksiyonu enfeksiyonu ortaya çıkarır ve enfeksiyon inekten ineğe genellikle sağım sırasında bulaşır.

Corynebacterium bovis genellikle somatik hücre sayısını yükselten hafif enfeksiyonlar ortaya çıkartır. Bazı çalışmalar bu sebep ile *Corynebacterium bovis*'in memenin kommensali ve az önem arz eden bir patojen olduğunu gösterirken (Pankey JW ve ark, 1985; Bexiga ve ark, 2011), bazı çalışmalarda *Corynebacterium bovis*'in önemli bir mastitis patojeni olduğunu tarif etmişlerdir (Langoni H ve ark, 2016; Costa EO ve ark, 1985). Bakteri penisilin, ampisilin, sefalosporin, kinolon, kloramfenikol, tetrasikilin, sefuroxime ve trimetoprim'e duyarlılık göstermektedir.

2.1.2.1.4. Mikoplazma Kaynaklı Mastitis

Mycoplasmataceae familyasına bağlı Mycoplasma genusu içerisinde incelenen bu bakterilerin hücre zarını çevreleyen bir hücre duvarları yoktur (Ryan KJ, 2004). Mycoplasma türleri keşfedilen en küçük bakteri türüdür (Richard ve ark, 2009). Mycoplasmataceae familyasını genel özelliklerini taşıyan bu etkenler hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüzdür. Gram negatif olmalarına rağmen anilin boyaları ile güç boyanırlar. Giemsa, Macchiavello ve Castaneda gibi boyama yöntemleri ile boyanabilen bu mikroorganizmalar hücre duvarları olmaması sebebi ile pleomorfik özelliğe sahiptirler. Süt ineklerinde mastitise sebep olan

Mikoplazma türleri *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum* ve *Mycoplasma canadense* 'dir. Fakat sahada en sık izole edilen *Mycoplasma bovis* 'tir.

Mycoplasma bovis diğer mikoplazmalar gibi küçük ve pleomorfik yapıdadır. 1,080 kbp lik bir genom bütüklüğüne sahiptir (Herman, 1992). Birçok mikoplazmanın çevresel kırılganlığına karşın *Mycoplasma bovis* 4 °C'de süte 2 ay ve sularda 2 haftadan fazla hayatta kalabilmektedir, yüksek sıcaklıklar hayatta kalma süresini düşürür (Pfutzner ve ark., 1996). Hastalık kısa zaman aralıklarda akut mastitis geçiren birkaç inekten veya geçmişinde *Mycoplasma bovis* enfeksiyonu çıkan işletmelerde hızlıca sürüye yayılır. Hayvanlar laktasyonun her döneminde mycoplasma ile infekte olabilirler, hatta aynı çiftlikte aynı anda halsizlik, üreme bozuklukları, buzağı pneumonisi ve yetişkinlerde respiratorik bozukluklar bir arada görülebilir (Henderson JP, 2003). İnfekte ineklerde süt üretimi dramatik bir şekilde azalmıştır. Palpasyonda meme paransimi sağlam veya ince nodüller dikkati çeker. Sağılan süt başlangıçta normal gözüktür fakat folüküler tortu ve temiz kısım birbirinden hızlıca ayrılır.

Akut mastitis, aralıklı olarak akut enflamasyon ve subklinik enfeksiyonu kronik mastitis izler. Subklinik infekte inekler normal süt üretimine dönebilir. Fakat süt ile *Mycoplasma spp.* etkenlerini ortama saçmaya devam ederler (Nicholas R, 2003). *Mycoplasma mastitisi* mekanik olarak el ile, sağım sırasında makinalar aracılığı ile ya da yıkama solusyonları aracılığı ile bir hayvandan diğer hayvana kolaylıkla taşınabilir. Mikoplazmadan kaynaklanan mastitislerin tedavisi oldukça zordur.

2.1.2.2. Çevre Kaynaklı Mikroorganizmalar

Çevre kaynaklı mastitisler hayvanın yaşadığı ortamda (su, toprak, gübre, ahır) bulunan bakterilerin herhangi bir dönemde (kuru veya laktasyon) oluşturdukları enfeksiyonlardır. Daha çok klinik mastitise sebep olur. Gram negatif bakterilerden *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, Gram pozitif bakterilerden *Enterococcus faecalis* rol oynar. Yaz mastitislerinden sorumlu sineklerin taşıyıcılığını yaptığı *Actinomyces pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*) bu grubun örneklerindendir.

2.1.2.2.1. *Escherichia coli* Kaynaklı Mastitis

Escherichia cinsi içinde mastitis vakalarından izole edilen en önemli tür *Escherichia coli* 'dir. Koliform bakteriler şiddetli mastitis vakalarının % 50-70 inden izole edilmiştir (Erskine ve ark, 2002). Enfekte meme lobu içinde *E. coli* hızla çoğalarak yangı hücrelerinin

meme lobuna akımına sebep olur. Nötrofillerine fagositik aktivitesi sebebiyle fagositoya uğrayan bakterinin endotoksini (LPS) ortaya çıkar ve diğer mediatörler ile birlikte ciddi lokal yangısal reaksiyona sebep olur. Bu yangısal cevap, vasküler permabilitenin ve sütün kompozisyonun değişmesi ve meme epitelinin zarar görmesi ile karakterizedir. Bütün bu etkilerin sonucunda karakteristik sulu veya seröz süt sekresyonu gerçekleşir.

Güçlü ve sağlam bağışıklık yanıtı sonucu klinik koliform vakalarının çoğunluğu hafif ve kısa süreli olmaktadır ve pek çok enfeksiyon tespit edilememektedir. Bununla birlikte klinik semptomlar enflamatuvar yanıtın bir sonucudur ve sık sık sıcak şişmiş ve sert bir meme lobu meydana gelir. Bu gibi durumlarda sistemik hastalık kana endotoksin salınmasına neden olur ve etkilenen inek başlangıçta yüksek ateş daha sonra normalin altında vücut sıcaklığına, depresyon, anoreksi, ishal, rumen stazi gibi semptomlar sonucu ilerleyen zamanda ölümler görülür. Bir çalışmada akut koliform mastitis vakalarının % 32'sinde etkenler kandan izole edilmiştir (Wenz ve ark, 2004).

En çok risk altındaki inekler erken laktasyon dönemindeki ve erken kuru döneme çıkartılmış ineklerdir. Ayrıca hastalığın yayılmasında zayıf çevresel hijyen, kontamine altlık ve sağım sırasında hijyen kurallarına uymamak önemli yer tutar. Çeşitli çalışmalar hafif ve orta şiddetli mastitis vakalarında yüksek oranda spontan iyileşmelerin olduğunu göstermiştir. Bunun anlamı ineğin bağışıklık sisteminin antimikrobiyel ilaçlara gerek duymadan enfeksiyonu temizlemesidir (Morin ve ark, 1998; Wilson ve ark, 1999). Bazı çalışmalarda *E. coli* mastitislerinin kronik ve tekrarlayan enfeksiyonlara sebep olduğunu göstermiştir (Schukken ve ark, 2004).

2.1.2.2.2. Klebsiella Kaynaklı Mastitis

Klebsiella cinsi polisakkarit bazlı bir kapsülle çevrili, Gram negatif, hareketsiz, oksidaz negatif, aerobik veya fakültatif aerobik çubuk şekilli bakterilerdir (Abbott S, 2007). Enterobacteriaceae ailesindeki diğer bakterilerden daha kısa ve daha kalınlardır. Uzun zincirler halinde, çiftler halinde, tek başına ya da uç uca bağlı şekilde görülebilirler. Klebsiella türlerinin diğer Enterobacteriaceae ailesini diğer üyeleri gibi özel büyüme faktörlerine gereksinimi yoktur. Sıradan laboratuvar medyumlarında üreyebilmektedir. Optimum üreme ısıları 35-37 °C ve ideal pH değeri yaklaşık 7.2 'dir (Burke, 1984). Klebsiella türleri doğada her yerde bulunabilirler. Bu belirli bir niche adaptasyonları ile ilişkili biyokimyasal adaptasyonları nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Su, toprak, bitki, böcek, insan ve

hayvanlarda bulunabilirler (Bagley S, 1985; Grimont F ve Grimont PD, 2006). *Klebsiella* cinsinin üyeleri insan ve hayvanların burun mukozasının normal flora bakterisidir.

Klinik olarak olarak önemli *Klebsiella* türleri insanlardan izole edilen *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca* ve *Klebsiella ozaenae*, hem insanlardan hem de hayvanlardan izole edilen *Klebsiella variicola*'dır. *Klebsiella variicola* sığırlarda mastitis vakalarından izole edilmiştir (Fraser WD ve ark, 2015).

2.1.2.2.3. *Enterococcus faecalis* Kaynaklı Mastitis

Enterococcus türleri, oval, çiftler halinde, kısa zincirler ya da sık sık uzatılmış zincirler halinde görülür. Gram pozitif, endosporsuz, hareketli olabilen, optimum üreme ısıları 35 °C olan kanlı agarda ve nutrient agarda S tipi koloniler oluşturan çoğu suşu hemolitik olmayan fakat bazı suşları beta hemolitik özellikteki bakterilerdir. Suşlar 10 ve 45 °C'de üreyebilmekte olup 60 °C'de 30 dakika hayatta kalabilmektedir. % 6,5 NaCl ve pH 9,6'da büyür, pirolidonil-pnaphthylamide hidrolize edebilir. Kemoorganotrofiktirler.

Nükleik asit hibridizasyonu çalışmaları özellikle DNA-RNA hibridizasyon çalışmaları *Enterococcus* genusunun *Streptococcus* genusuna çok yakın olduğunu ama *Streptococcus* genusu içinde olmadığını göstermektedir. *Enterococcus* % 6.5 NaCl ve pH 9.6 da üremesi ile *Streptococcus*'lardan ayrılır. Ayrıca *Streptokokların* aksine (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* ve *Streptococcus uberis* hariç) 10 °C'de üreyebilmektedirler (Thiercelin ve ark., 1903).

Enterococcus faecalis in vitro ortamda biyofilm oluşturan, fakültatif anaerobik kommensal bir bakteridir (Kristich ve ark, 2004). İneğin çevresinde, bademciklerinde, bağırsaklarında, derisinde ve gübrenin içinde bulunan önemli bir çevresel mastitis etkenidir (Bradly, 2002).

Konak dokudaki yapışma ve sonraki kolonizasyonu gibi önemli virülens faktörleri *Enterococcus faecalis* enfeksiyonu patogenezisindeki önemli kritik adımlardandır (Baldassarri ve ark, 2001; Sillanpaa ve ark, 2004). Bu durum proteinler, karbonhidratlar ve çeşitli yapışma fonksiyonlarının olduğu karışık bir süreçtir. Daha önceki çalışmalar *Enterococcus faecalis*'in enfeksiyon sırasında ev sahibi hücre dışı matriks bileşenlerine yapışan bir patogen olarak tanımlamıştır (Sillanpaa ve ark. 2004, 2009).

2.1.2.2.4. *Actinomyces pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*) 'den Kaynaklanan Mastitis

Arcanobacterium pyogenes Gram pozitif, hareketsiz, sporsuz, kısa, çubuk şeklinde bir bakteridir. Bu organizma önceleri *Actinomyces* genusu içerisinde yer almaktaydı daha sonra 16S RNA sekansına (Pascual Ramos ve ark, 1997) dayalı bir temelde *Arcanobacterium* genusu içerisinde yer almıştır ve bu genus içindeki en sık görülen patojendir. Aerobik veya anaerobik koşullarda üreyebilmektedir. Fakat en uygun büyüme CO₂ ile zenginleştirilmiş bir atmosferde gerçekleşir.

Domuz kaynaklı *Arcanobacterium pyogenes* genellikle daha hemolitik olmasına rağmen tüm *Arcanobacterium pyogenes* izolatları sığır ya da koyun kanı ihtiva eden agar ortamında β -hemoliz yaparak ürerler (Timoney ve ark, 1988).

Arcanobacterium pyogenes süt sığırları, domuz gibi ekonomik açıdan önemli çiftlik hayvanlarının fırsatçı bir patojenidir. Bu organizma aynı zamanda bu hayvan mukoz membranlarında flora bakterisidir ve sağlıklı hayvanlardan rutin olarak memeden, üst solunum mukozasından ve urogenital mukozadan izole edilir (Carter ve ark., 1991; Natterman ve Horsch, 1977; Queen ve ark, 1994; Timoney ve ark, 1988). Aynı zamanda sığır rumeninden (Narayanan ve ark, 1998) ve domuz midesinden de izole edilmiştir (Jost ve ark, 2002). Bir kommensal olarak, *A. pyogenes*'in enfeksiyon kaynağı genelde otojendir. *Arcanobacterium pyogenes* birincil patojen olarak etki edebilme yeteneğine sahip olmaklar beraber, enfeksiyon genelde mukoz membranların fiziksel veya mikrobiyel travma sonrasında organizmanın yayılması ile başlar.

Arcanobacterium pyogenes evcil ruminantların ve domuzların deri, eklem ve organlarında gözüken irinli enfeksiyonlardan en sık izole edilen fırsatçı patojenlerinden biridir. Evcil hayvanlar dışında antilop, bizon, deve, kedi, tavuk, geyik, köpek, fil, at, gazel ve hindi gibi geniş bir yelpazede hayvanlarda enfeksiyona yol açar.

2.1.2.2.5. *Pseudomonas*lardan Kaynaklanan Mastitis

Pseudomonas cinsi bakteriler *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alırlar. *Pseudomonas* cinsi içerisindeki bakterilerin sayısı çok fazla olduğundan dolayı görünümüne, pigment oluşturup oluşturmamalarına ve metabolizmalarına göre sınıflandırma yapılmıştır. RNA/DNA hibridizasyon deneylerine göre, bu iki nükleik asidin gösterdiği uyumlara bakarak, bu bakteriler rRNA gruplarına ayrılmışlardır. *Pseudomonas*lar doğada çok yaygın olarak bulunan, insan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan

mikroorganizmalardır (Pillay,1996). Katalaz ve oksidaz pozitif ve şekerleri oksidasyon yolu ile parçalayan fakat fermentasyon yapmayan bakterilerdir. *Pseudomonas* cinsi içerisinde enfeksiyonlardan en çok izole edilen tür *Pseudomonas aeruginosa*'dır.

P.aeruginosa, immun yetmezliği olan, uzun süre kemoterapi veya radyoterapi alan, metabolik veya malign hastalığı olan bireylerde, yaşlılarda, ağır yanıklı kişilerde meydana gelen enfeksiyonlarda sık karşılaşılan etkenlerdendir. Özellikle hastane enfeksiyonlarına yol açan patojenlerin basında yer almakta ve sepsis, peritonit, postoperatif enfeksiyonlar, kemik ve eklem enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları gibi yüksek mortalite ile seyreden klinik tablolara neden olmaktadır ve tedavi sırasında antibiyotiklere direnç geliştirmesi büyük problem oluşturmaktadır. Hastane enfeksiyonlarının % 10-25'inden *P.aeruginosa* sorumlu tutulmaktadır . Hayvanlarda mastitis, artiritis, enteritis, pneumonia, peritonitis ve ürogenital sistem enfeksiyonlarına neden olur.

P. aeruginosa sporsuz, kapsülsüz çomaklardır. Çoğu kez uçlarında bir veya nadiren iki veya üç adet flagellası ile çok hareketlidirler. Gram negatif, 1,5-3µm uzunluğunda ve 0.5µm genişliğinde, çiftli veya kısa zincirler halinde görülen bakterilerdir. Eski kültürlerinde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda kısa veya çok uzun deforme şekilleri hareketsizdir. Pigmentsiz olanları, R tipinde üreyenleri tanımlanmıştır. G+C oranı % 67,2'dir. Genellikle 37 °C'de üreyen bakterilerdir. 4 °C'de üreyemezler ve 42 °C'de üremesiyle *Pseudomonas fluorescens*'den ayrılır. Zorunlu aeroblardır. Çoğu izolatlar kanlı agarda beta hemolitiktir ve tipik yeşil metalik parlaklık oluşturmaz.

P. aeruginosa susları temelde 2 çeşit pigment yaparlar: Piyosiyenin ve piyoverdin (veya *fluorescein*). Piyosiyenin bir *phenazin* boyası olup suda ve özellikle kloroformda erir. Bu pigment alkali pH'da mavi veya yeşilimsi renk oluşturduğu için "aeruginosa" adı verilmiştir. Piyosiyenin sadece *P.aeruginosa* tarafından meydana getirilir. Bu pigmentin oluşması üreme ortamına sıkı sıkıya bağlıdır. Ortamda MgSO₄ , K₃ PO₄ ve demir bulunması pigment için gereklidir. Piyosiyenin varlığı *P.aeruginosa* için özgün ayırıcı bir özelliktir .Piyoverdin kloroformda erimemesi ve sadece suda erimesiyle piyosiyeninden ayrılır. UV ışınları ile yeşilimsi floresan verir. Bazı suslar ayrıca piyorubin (koyu kırmızı) ve piyomelanin gibi (kahverengi-siyah) pigmentler yapabilirler .

P. aeruginosa 'nın virülans faktörleri, hücre ile ilişkili ve hücre dışına salınan faktörler olarak incelenebilir. Bakteri hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörleri; flagella, pilli(fimbriae), lipopolisakkarit(LPS) ve aljinattır.

Flagella, *P. aeruginosa*'nın yüzme şeklindeki hareketinden sorumlu yapıdır. Epitel hücresi membranı bileşeni olan asialo-GM1'e bakterinini adhezyonunu sağlar. Flagella Toll-

benzeri reseptörler (TLR5 ve TLR2) ile birleşerek NFİB bağımlı inflamatuvar yanıtı uyarır ve kalsiyum bağımlı kinaz yolağının aktivasyonu ile İL-8 sentezinin başlamasına yol açar. Flagella güçlü immujendir (Mahenthiralingam E, 1994).

Pili (Fimbridae), bakterinin kısa, filamentöz yüzey yapılarıdır. Genelde prokaryot hücrelerde pili hareketten sorumlu değil iken *P. aeruginosa*'da pili seğirme şeklinde hareketten sorumludur. Hava yollarında hızla yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı olur. Flagella gibi pilus da kolonizasyonun adezyon fazında epitel hücre membranlarının asialo-GM1 bölgesine bağlanarak patogeneze kritik önem taşır (Pier GB, 2005; Kipnis E, 2006).

Lipopolisakkarit (LPS), bakteri duvarı dış membranının dış yüzeyinde yer alan fosfolipid ikili-katman içine yerleşen lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ve O-özgül polisakkaridi içeren hidrofilik kuyruktan oluşur. *P. aeruginosa* serotiplerinin antijenik özelliklerine dayanılarak tanımlanmasında O-özgül polisakkarid zincirleri tanısal özelliktedir. LPS'nin lipid A bileşeni birçok inflamatuvar öncü hücreyi aktive eder ve asialo-GM1'e bağlanarak adezyonda etkin rol oynar. TLR4/CD14 veya TLR4/MD-2 reseptörlerini tanıma özellikleri ile ve CFTR'ye bağlanarak virülansta önemli etki gösterir. Kistik fibroz hastalarında *P. aeruginosa*'nın farklı lipid A mutantları bulunur ve bunlardan bazıları konağın antimikrobiyal peptidlerine karşı direnç gösterir ve TLR4 aktivasyonunun artmasına neden olurlar (Slayer ve ark., 1994).

Aljinat mannuronik ve glukuronik asidin tekrarlayan polimerlerinden meydana gelen mukoid bir ekzopolisakkarittir. Her ne kadar aljinat hücre dışına salınan bir ekzopolisakkarit olsada, hücre ile ilişkili kalması sebebiyle bakteri hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörleri arasında incelenmiştir. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu solunum yolu infeksiyonlarında aljinat üretimi çok önemli rol oynar. Aljinat üretimi olmayan kökenlerin sıçan akciğerine verildiğinde hızla aljinat üreten kökenlere dönüşmesi bunun göstergesidir (Slayer ve ark., 1994). Aljinat da bakterinin adezyonunda rol oynar ve bakteriyi kolonize ettiği solunum yolu epiteli üzerine sabitler. Aljinat biyosentezinde görev alan genler kromozomun bir bölgesinde kümelenmiş ve operon olarak organize olmuşlardır.

Kistik fibroz hastalarının solunum yollarında gözlenen kökenler genellikle aljinat aşırı üretimine bağlı mukoid fenotipe kökenlerdir. Ortamda nitrojen miktarının azalması ve yüksek ozmolarite aljinat üretimini tetikleyen faktörlerdir. Mukoid fenotipten, mukoid olmayan fenotipe dönüşüm (genetik dönüşüm,faz değişimi) algS ve algT genleri yardımıyla gerçekleşir (Slayer ve ark., 1994). Fenotipik dönüşümün LPS yapısı üzerinde de etkileri bulunmaktadır. Mukoid olmayan kökenlerde LPS uzun O zincirine sahiptir ve negatif yüklüdür (B form), mukoid kökenlerde ise O zinciri kısadır ve yapısındaki şekerlerin

yerleşimi LPS'yi nötral hale getirir (A form). Aljinatın aşırı üretimi bakteriyi fagositozdan ve antibiyotiklerden koruduğu gibi konağın bakteriye karşı yanıtında zayıflatır. Her ne kadar kistik fibroz hastalarındaki biyofilm yapısında yer aldığı kabul edilse de yakın tarihli çalışmalarda aljinatın biyofilm gelişimi için şart olmadığı gösterilmiştir (Wozniak ve ark.,2003).

Pseudomonas aeruginosa'nın hücre dışına salgılan virülens faktörleri; elastaz, alkali proteaz, pyosiyenin, piyoverdin, proteaz IV, fosfolipaz C, ramnolipid, ekzotoksin A(ExoA) ve tip 3 salgı sistemidir.

Elastaz, elastin akciğerlerin genişleyip, daralmasına olanak sağlayan bir proteindir ve akciğerlerde bulunan proteinin yaklaşık %30'unu oluşturur. *Pseudomonas aeruginosa*'nın elastolitik etkisinden LasA proteaz ve LasB elastaz sorumludur. Enzimler sinerjistik etki göstererek elastini parçalar. LasA bir serin metalloproteinazdır ve *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarında bulunan pentaglisin-peptidoglikan köprüsünü yıkar. LasA proteaz, elastini yıkamaz ama lasB elastazın elastolitik etkisini artırır. LasB 33kDa ağırlığında bir çinko metalloproteinazdır. LasA elastazın proteolitik gücü oldukça fazladır (*Pseudomonas aeruginosa* alkali proteazın yaklaşık 10 katı). Hücre dışına 2 tip salgı sistemi ile salınan elastaz enfeksiyonun başlangıç fazında akciğerde hasara yol açarak, kompleman bileşenlerinin ve serum α 1-proteinaz inhibitörünü parçalayarak patogeneze önemli rol oynar (Slayer ve ark., 1994). Damar duvar yapısında da bol miktarda elastin bulunduğu için, elastinin parçalanması hemorajilere neden olur. IgG'yi, fibrini, kollajeni, sulfaktan protein A ve D'yi parçalar. Ayrıca solunum yolu epitellerindeki sıkı bağlantıları parçalayarak epitel geçirgenliğini artırır ve enfeksiyon bölgesine nötrofillerin sayısının çoğalmasına yol açar (Slayer ve ark., 1994). Elastaz IL-8 üretimini uyarak pro-inflamatuvar etki gösterir.

Alkali proteaz, *Pseudomonas aeruginosa* 'nın fibrinoliz etkili metalloproteazıdır. 49 kDa ağırlığındaki enzim apr geni tarafından kodlanır, enzim en iyi alkali pH değerlerinde etkinlik gösterir. Akut akciğer hasarında erken dönemde alveoller içinde oluşan yoğun fibrinin alkali proteaz ile eritilmesinin enfeksiyonun ilerlemesine yol açtığı gösterilmiştir (Kipnis E ve ark, 2004). Alkali proteazın doku invazyonu ve sistemik enfeksiyonlardaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, korneadaki enfeksiyonların patogenezinde önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Howe ve ark, 1984).

Piyosiyenin, *Pseudomonas aeruginosa*'nın mavi pigment metabolitidir. Öncü molekülü olan korizmik asitten, son hali olan üç halkalı piyosiyanine sentezlenirken phzABCDEFG operonu ve phzH, phzM, phzS genleri görev alır(Lau ve ark, 2004). Piyosiyenin akciğerde hücre solunumunu inhibe ettiği, siliyer fonksiyonları bozduğu,

epidermis çoğalmasını durdurduğu, prostasiklin salınımına yol açtığı, kalsiyum homeostazını bozduğu saptanmıştır. Piyosiyanin ayrıca α 1-proteaz inhibitörünü de etkisizleştirerek, proteaz-antiproteaz dengesini bozar ve akciğerlerde hasara sebep olur. Piyosiyanin ve ara metaboliti fenazin-1-karboksilik asit RANTES ve IL-8 seviyelerini değiştirerek konak bağışıklık yanıtını etkiler (Denning, 2003). Hem doğrudan etki ile katalaz aktivitesini engeller, hem de katalazı kodlayan genin transkripsiyonunu azaltır (O'Malley ve ark, 2003). $MnSO_4$ eklenmesiyle katalaz aktivitesinin geri kazanımı piyosiyaninin neden olduğu hasarda O_2^- radikallerinin rolünün büyük olduğunu gösterir. Piyosiyanin oksitlenmiş glutatyon seviyesini artırır, nötrofillerde apoptozisi uyarır (Usher ve ark, 2002).

Piyoverdin, bir siderofordur. Çevredeki demiri bağlayarak *Pseudomonas aeruginosa*'nın metabolizması için demir sağlar. Ekzotoksin A'nın üretimini düzenlediği gibi kendi üretiminide düzenleyerek patogeneze rol oynar (Meyer ve ark,1996; Lamont ve ark, 2002).

Proteaz IV, yakın zamana kadar özellikle *P. aeruginosa* keratiti patogenezindeki rolüyle bilinirken, son çalışmalar proteaz IV'ün sülfaktan proteinleri A, D ve B'yi yıktığı ve akciğer infeksiyonları patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Matsumoto ve ark.,2004; Malloy ve ark.,2005).

Fosfolipaz C, hemolitik aktiviteleri ile ayrılan iki tipe vardır. Hemolitik fosfolipaz C, fosfatidikolini ve sfingomyelini hidrolize eder. Fosfolipaz C hücre dışına iki tip salgı sistemi ile salınır. Ökaryotik hücre membranı bileşeni olan fosfolipidleri hedef alarak akut akciğer hasarı patogenezinde rol oynar (Wiener-Kronish ve ark, 1993). Elastazda olduğu gibi patojenik etkisinin bir kısmını sülfaktan inaktivasyonuna borçludur. Ek olarak konağın nötrofil oksidatif yanıtını baskılar.

Ramnofosfolipid, hemolitik etkisi olan bir hemolizindir. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosülfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisi ile akciğer sülfaktanı fosfolipidlerini çözülmüş hale getirerek fosfolipaz C 'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosilier taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (Slayer ve ark., 1994).

Ekzotoksin A(ExoA), enfeksiyon etkeni birçok *P. aeruginosa* kökeni ekzotoksin A sentezler. Hücre dışına tip2 salgı sistemi ile salgılanan bir toksindir. ExoA *P. aeruginosa*'nın virülensında önemli rol oynar. Etkisini difteri toksinine benzer şekilde ADP-riboziltransferaz özelliği ile elongasyon faktörü 2'yi (EF-2) ve dolayısıyla protein sentezini inhibe edip hücre ölümüne yol açarak gösterir (Wick ve ark, 1990). İnvazyondan ve bölgesel doku hasarından sorumludur (Woods, 1983). Konak yanıtını baskılayıcı özelliği de gösterilmiştir (Vidal ve ark, 1993).

Tip3 salgı sistemi, Yersinia, Salmonella, Shigella ve Pseudomonas türlerinde saptanmıştır. Bakterinin hedef hücre üzerinde por açarak, pilus benzeri bir oluşumla iki hücre arasında köprü oluşturduğu ve bu köprü yardımı ile efektör proteinlerini ökaryot hücre stoplazmasına ilettiği bir sistemdir. *P. aeruginosa*'nın tip 3 sekresyon sistemiyle salınan toksinleri ExoS, ExoT, ExoY ve ExoU'dur (Kipnis ve ark, 2006).

Ekzoenzim S (ExoS), iki aktif bölgesi [C-terminal ADP-riboziltransferaz bölgesi ve N-terminal Rho GTPaz aktive edici protein (GAP) bölgesi] bulunan iki fonksiyonlu bir sitotoksindir. ExoS'nin patojenik etkilerinden esas olarak hücre iskelet organizasyonunu bozan ADP-ribozil transferaz aktivitesi sorumludur. Ek olarak C-terminal bölgesinin TLR2'ye, N-terminal bölgesinde TLR4'e bağlandığı ve böylece konak bağışıklık yanıtını etkilediği ve inflamatuvar yanıtı düzenlediği gösterilmiştir. Akciğer infeksiyonlarında doğrudan doku hasarına yol açan ve bakterinin yayılmasında rol oynayan bir toksindir (Nicas ve ark, 1985).

Ekzoenzim T (ExoT), ExoT de ExoS gibi ikili etki gösterir. Pseudomonasın internalizasyonunu rol alan bir enzimdir. Yara iyileşmesini inhibe edici özelliği de gösterilmiş olan bu enzim minör virülans faktörleri arasında yer alır (Shaver ve ark, 2004).

Ekzoenzim Y (ExoY) bir adenilat siklazdır, konak sitozolüne verilince sitozolik cAMP'yi artırır. Bu artış pulmoner vaküler hücrelerde hücreler arası boşluk oluşumunun artmasına dolayısı ile geçirgenliğin artmasına neden olur (Sayner ve ark, 2004).

Ekzoenzim U (ExoU), tip 3 salgı sistemi ile konak hücresi içine salındığında fosfolipaz/ lizofosfolipaz aktiviteleriyle ökaryotik hücre membranını parçalar. ExoU majör virülans faktörü olarak kabul edilir. Hayvan deneylerinde tek başına ExoU salgılanmasının sepsise ilerleyen akciğer hasarına yol açtığı gösterilmiştir (Allewelt ve ark, 2000).

2.2. Biyofilm

2.2.1. Biyofilm Tanımı

Mikrobiyal biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeylere dönüşümsüz olarak tutunmaları, tutundukları bölgelerde çoğalmaları ve hücre dışı polimerler üretmeleri ile oluşmaktadır. Doğada mikroorganizmalar, bağımsız formlardan (planktonik) çok biyofilm formları (sesil) olarak bulunmaktadır. Biyofilm formları, biyofilmi oluşturan tek ya da birden fazla türün ürettiği hücre dışı polimerik madde (EPS, Extracellular Polymeric Substances,

biyofilm matriksi) içerisinde organize olmuş, çok hücreli form benzeri davranış gösteren mikroorganizma topluluklarıdır (Dongari-Bagtzoglou, 2008; Donlan, 2009).

Biyofilm, ilk kez Van Leeuwenhoek tarafından 17. yüzyılda kendi dışında oluşan plakta gösterilerek animalcules olarak adlandırılmıştır. Biyofilm teorisi 1976 yılında Marshall'ın 'bakteriyi yüzeye adeta demirleyen, oldukça iyi hücre dışı fibriller' olarak tanımlamasına kadar resmen duyulmamıştır (Donlan, 2002). Costerton ve arkadaşları, sıvı ile temas eden yüzeylere tutunan bakterilerin oldukça hidrate, aniyonik bir matriks olan glikokaliks ile kaplı olduğunu bildirmişlerdir (Costerton ve ark, 1976; Costerton ve ark, 1987). Daha sonra farklı araştırmacılar tarafından da yapılan biyofilm tanımlarında ortak temel faktörler; mikroorganizma, yüzey ve glikokaliks olarak görülmektedir (Carpentier ve ark, 1993; Elder ve ark, 1995). Bu faktörlerden birinin eksikliği durumunda biyofilm oluşamamaktadır (Dunne, 2002). Biyofilmlerin oluşumuna ve gelişmesine bakteri suşu (Borucki ve ark., 2003; Chae ve ark., 2000), yüzey özellikleri, pH, besin miktarı, sıcaklık (Donlan, 2002) gibi çeşitli çevresel faktörler de etkili olmaktadır.

2.2.2. Biyofilm Yapısı

Biyofilmlerin büyük bir çoğunluğunda mikroorganizmalar, toplam kuru ağırlığın yaklaşık % 10'unu, EPS ise % 90'ını oluşturmaktadır. EPS yapısında, esas olarak; ekzopolisakkaritler, hücre dışı yapısal ve fonksiyonel proteinler, hücre dışı DNA (eDNA), yüzey aktif maddeler ve lipitler gibi farklı biyopolimerler su fazında kümelenmiş halde bulunmaktadır. EPS öncelikle, biyofilmi oluşturan mikroorganizmaları immobilize ederek yakın ilişkide tutmak suretiyle hücre iletişiminin ve sinerjetik bir mikrokonsorsiyumun oluşumuna aracılık eder (Flemming ve ark.,2010). Diğer yandan yapısındaki polisakkaritler, proteinler, eDNA ve amfifilik moleküller sayesinde tutunmayı; polisakkaritler, proteinler ve eDNA sayesinde bakteriyel hücre agregasyonunu ya da nötral ve yüklü polisakkaritler, amiloitler, lektinler ve eDNA sayesinde biyofilmlerin birleşmesini sağlar. Ayrıca, EPS yapısındaki maddelerin biyofilm yapısındaki rollerini şu şekilde özetlemek mümkündür:

- 1- Hidrofilik polisakkaritler ve bazı olası proteinler: su birikimine
- 2-Polisakkaritler ve proteinler: antimikrobiyal ajanlara, fagositoza, spesifik ya da spesifik olmayan konakçı immün savunma sistemine dirençliliğe
- 3- Yüklü, hidrofobik polisakkaritler ve proteinler organik bileşiklerin alınımına
- 4- Yüklü polisakkaritler ve proteinler: inorganik iyonların alınımına

- 5- eDNA: genetik aktarımın stimülasyonu suretiyle genetik çeşitlenmeye
- 6- Hümk bileşikler ve proteinler: elektron verici ve alıcıları olarak enerjetik reaksiyonlara
- 7- Nükleik asitler, enzimler, lipopolisakkaritler ve fosfolipitler içeren membran vezikülleri: ve su kanalları ilkel bir boşaltım sisteminin oluşumuna yardımcı olmaktadır.

Bunlara ilave olarak EPS, hücre dışı enzimlerin bu yapıda kümelenmesini sağlamak suretiyle çok yönlü bir sindirim sistemi oluşumunu gerçekleştirir. Bu yolla EPS, bir yandan sulu faza alınan besin maddelerinin çözülmesini ve biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar için besin ve enerji kaynağı olarak kullanılmasını olanaklı hale getirirken, diğer yandan biyofilm içerisinde parçalanmış hücrelerin tüm elemanlarını tutarak geri dönüşüme sokar (Roberts ve ark, 1999; Reisner ve ark, 2006; Wen ve ark, 2010; Mitri ve ark, 2011).

2.2.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm tabakası çok farklı çevrelerde oluşabilir ve en basit biyofilm tabakası bile karmaşık bir dinamiğe sahiptir. Biyofilm gelişimi taze besiyeri sağlandıkça devam eder. Ancak, ortamdaki besin maddeleri tükenince yüzey bağlantıları zayıflar ve hücreler planktonik modlarına geri dönerler (Gün ve Ekinci, 2009). Biyofilm oluşumu beş basamakta incelenebilir. Bunlar:

- 1-Dönüşümlü tutunma
- 2-Dönüşümsüz tutunma
- 3- Koloni gelişimi
- 4- Olgun biyofilm oluşumu
- 5- Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması

Hücrel agregasyon ile başlayarak biyofilm olgunlaşması ile sonuçlanan süreçte çok sayıda spesifik ve korunmuş faktör devreye girmekte ve bu süreç geri dönüşebilen ve geri dönüşümü olmayan aşamaları içermektedir. Biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan tutunma çoğunlukla rastgele bir aşamadır. Bu süreçte Brown hareketi, yerçekimsel ve hidrostatik güçler önemli ölçüde etkin rol oynamaktadır. Diğer yandan herhangi bir nişte bakteriler; sıcaklık, iyonik akış, pH ve besin maddesi düzeylerine bağlı olarak, çekici ve itici güçleri algılayabilmektedir. Ortam özellikleri, hücre yüzey kompozisyonuna bağlı olarak temas yüzeyine doğru ya da aksi yönde gerçekleşecek olan vektörel hareketi belirlemektedir (Donlan, 2002). Hareketli bakteriler bu aşamada yarışmacı bir avantaja sahiptir. Zira flagella hareketi sayesinde, hidrodinamik ve itici güçlerin olumsuz etkisinin üstesinden

gelebilmektedirler. Flagella hareketi *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* gibi bakterilerin biyofilm oluşturmasında önemli bir rol oynamaktadır (Toutain ve ark, 2007). Bazı bakteri türlerinde kemotakside yüzeylere tutunmanın yönlendirilmesinde görev almaktadır. Örneğın; *P. aeruginosa*'nın cheR1 metil transferaz mutantlarında yüzeyde tutunmanın ve biyofilm olgunlaşmasının bozulduğı tespit edilmiştir. Bu ilk tutunma aşaması ortamdaki besinsel değışim, hidrodinamik ve itici güçler gibi etkilerle geri dönüşebilir olan dinamik bir süreçtir (Hadjifrangiskou ve ark, 2012).

Yüzey ile temas gerçekleştiğinde; hücre dışına salgılanan polisakkaritler, nukleik asitler, proteinler, amiloitler, hücre dışı adhezif uzantılar ve adhezinler gibi ilave elemanlar aracılığı ile tutunmanın "geri dönüşüz" yapışma aşaması gerçekleştirilmektedir (Schluter ve ark, 2015). Önemli bir biyofilm üreticisi ve patojen olan *P. aeruginosa*'da yüzeye geri dönüşümsüz tutunmada rol oynayan değışik tutunma organelleri tanımlanmıştır. Bunların en önemlileri tip IV ve UPEC benzeri CupA fimbriyalardır (Klebensberger ve ark, 2009). *Pseudomonas* ve UPEC'den farklı olarak, Gram-pozitif enterokoklar hareketsiz olup tutunma elemanı olarak pilus içermezler. Enterokoklarda ökaryotik hücre dışı matriks elemanlarına tutunmada rol oynayan SagA, Acm (*Enterococcus faecium*) ve Ace (*E. faecalis*) gibi kollajen tutunma proteinleri tanımlanmıştır. Yine bu cins üyelerinde tespit edilen Esp proteininin, *E. faecalis* suşlarının abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda rol oynadığı saptanmıştır. Diğeryandan son çalışmalarda *E. faecalis*'de tespit edilen enterokokkal biyofilm pilisinin (Ebp), biyofilm oluşumu yanında endokardit ve üriner sistem enfeksiyonlarında önem taşıdığı belirlenmiştir (Guiton ve ark, 2009; Kline ve ark, 2010; Widder ve ark, 2014; Dang ve ark, 2016).

Mikroorganizma ile yüzey teması, gen ifadesini değıştiren yanıtları teşvik ederek, sesil (bağlı, biyofilm) formların oluşumu ve olgunlaşması için gerekli gen ifadesini tetiklemektedir. Bu genetik regölasyonda ilk aşama, hücre dışı polimerik matrik materyalinin (EPS) oluşumunu ve dolayısı ile biyofilmin olgunlaşmasını sağlayan genlerin ifadesidir. EPS, *P. aeruginosa* suşlarında çevresel koşullara bağli olarak iki temel EPS elemanı (PeI ve PsI) sentezledikleri belirlenmiştir. Psl, *Pseudomonas* suşlarının solunum yolu epitel hücrelerine ve musine tutunmasını sağlar. Diğeryandan kistik fibrozis hastalığında ve solunum yollarında kalıcılıkta peI geninin ifade artışının önemli olduğı da tespit edilmiştir. Ayrıca 3,5-çevrimsel diguanilik asidin (c-di-GMP) yüksek düzeylerine yanıt olarak, biyofilm yapısında büyük bir salgı adhezini olan CdrA'nın ifade edildiğı bilinmektedir. CdrA biyofilm yapılarını stabilize etmektedir (Borlee ve ark, 2010). *P. aeruginosa* EPS yapısında bulunan bir diğeryapısal

bileşen olan aljinatın ise, antibiyotiklere ve kronik enfeksiyonlarda konakçı immün savunma mekanizmalarına karşı dirençlilikte rol oynadığı saptanmıştır. Pel ve Psl'de olduğu gibi aljinat üretiminde ,artan c-di-GMP düzeyi ile tetiklenmektedir. Zira yüzey bağlı bir protein olan diguanilat siklazın (MucR) aljinat sentezinin pozitif regülatörü olduğu tespit edilmiştir. *Pseudomonas* biyofilmlerinin ilişkilmesi ve stabilizasyonunda hücre dışı DNA'nın da önemli bir rol oynadığı deneysel olarak örneklenmiştir. Bu durum özellikle mantar benzeri biyofilmlerde yoğun bir şekilde çalışılmıştır (Yang ve ark, 2007). eDNA'nın biyofilm yapısında oynadığı rol; *E. faecalis* GelE (çinko metalloproteaz) ve SprE (serin proteaz) enzimlerinin hücresel otolizi indükleyerek biyofilm yapısına eDNA'nın salınımını sağladığının belirlenmesi suretiyle tespit edilmiştir. Ayrıca Atn otolizininin üretiminin engellenmesi halinde bu bakterilerde biyofilm oluşumunun, eDNA salınımının azalması yolu ile, % 30 oranında düştüğü saptanmıştır (Guiton ve ark, 2009).

Çevresel stres faktörlerine bağlı olarak, biyofilm içerisindeki hücreler, çok hücreli yaşam formlarındaki gibi, farklılaşma gösterirler. Bu farklılaşmayı biyofilm içerisinde farklı bölgelerde oluşan besin maddeleri, oksijen, antimikrobiyal maddeler ve elektron akseptörleri gibi çevresel koşulların yarattığı gradient tetiklemektedir. Bu sayede biyofilm içerisinde farklı fizyolojik koşullara sahip olan mikrokolonilerde farklı gen ifadesi meydana gelmekte ve fonksiyonel farklılaşma gerçekleşmektedir. Söz konusu farklılaşma üzerine etkili diğer bir önemli sistem ise bakteriyal popülasyonun ürettiği otoindüksiyon özelliğindeki hücre dışı sinyallerdir. Bu sinyaller sinyal transdüksiyonunu tetiklemekte (Quorum-sensing -çoğunluğu algılama- sistemi) ve biyofilm içerisinde çok hücreli yanıtlar oluşturulmaktadır (Lopez ve ark, 2010; Boano ve ark, 2014).

Biyofilm olgunlaşmasından sonraki aşama, biyofilm yapısından kaçış ya da dağılma olarak nitelendirilen son aşamadır. Dağılma ortam etkileri ile pasif bir şekilde meydana gelebilen ancak esasen biyofilmi oluşturan hücrelerin yönettiği aktif bir süreçtir. Bu aktif süreçte bakteriler, çevresel değişimleri algılayarak, biyofilm formu ile planktonik form arasında bir tercih yapmakta ve avantajlı formu seçmektedir. Biyofilm dağılımı ortamın besinsel değişimine, oksijen miktarına, toksik ürünlerin birikimine ve diğer stres faktörlerine bağlı olarak teşvik edilmektedir (Hong ve ark, 2010; Rowe ve ark, 2010). UPEC suşlarında hücre dışı demir, *P. aeruginosa* suşlarında ise karbon ve azot kaynaklarının ortamdaki artışı, biyofilm dağılımını tetikleyen ana faktörlerdir. Bakterilerde birçok sensör sistemler, çevredeki küçük moleküllerin düzeyini ölçmekte ve bu sinyaller aracılığı ile biyofilm dağılması için zorunlu gen ifadesini pozitif yönde etkilemektedir (Kaplan, 2010). Diğer sinyaller de rol almakla birlikte, evrensel c-di-GMP'nin biyofilm formundan planktonik forma geçişte anahtar

rol oynadığı belirlenmiştir. *P. aeruginosa* ve *E. coli* suşlarında c-di-GMP seviyesi arttıkça tercih edilen yaşam formunun, biyofilm formu olduğu saptanmıştır. Aksi durumda ise biyofilm formunun dağılması indüklenmektedir. c-di-GMP bağlanma proteini olan BdcA, biyofilm komünitelerinde c-di-GMP seviyesini düşürmek suretiyle biyofilmin dağılmasını tetiklemektedir. Bu durum *Pseudomonas spp.* ve *Rhizobium meliloti*'de örneklenmiştir (Ma ve ark, 2011; Zhang ve ark, 2013). *P. aeruginosa*'da aljinat liyaz gibi EPS parçalayan enzimler de bakterilerin matriksten ayrılmasını sağlamaktadır. *E. coli* 'de CsrA proteininin PGA sentezini bozduğu ve biyofilmin dağılmasını teşvik ettiği saptanmıştır (Wang ve ark, 2005). Buna ilave olarak *P. aeruginosa* biyofilmlerinde flagellalı formların mikrokoloniler oluşturarak biyofilm yapısından ayrıldığı belirlenmesi, flagella üretiminin hareketli bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin dağılmasında önem taşıdığına işaret etmektedir (Gupta ve ark, 2015; Harmsen ve ark, 2010).

2.2.4. Biyofilm Oluşumunun Önemi

Biyofilm içerisindeki bakterilerin büyüme hızlarının planktonik bakterilerden belirgin bir şekilde düşük olmasına karşın, bakterinin biyofilm oluşturmasını gerektiren durumlar vardır. Bunlar, savunma strese cevap olarak gelişir. Biyofilme sahip organizmalar, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Biyofilmin büyük bir kısmını oluşturan ekso polisakkaritler (EPS) savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. Ekso polisakkaritlerin bulunduğu bakteriyi yangı hücrelerinin fagositozundan korur.

Adhezyon ve kolonizasyon; İnsan ve hayvan vücudu mikroorganizmaları sürekli bir şekilde vücutlarında bulundurlar (flora). İmmun sistem ile bakteri arasında vücut istila etmesine karşı amansız bir yarış vardır. Bazı durumlarda uzlaşma olarak belli bölgelerde büyük miktarlarda kommensal olarak yaşamasına müsaade edilmektedir ve bu bakterilerin çoğu biyofilm oluşturmaktadırlar. Vücut bakterilerin yaşaması için çekici bir ortam olup, bakterilerin bu bölgede biyofilm oluşturarak yaşamasına primer motivasyon oluşturmaktadır.

Yaşanabilir çevre geliştirme: Özellikle ortamdaki glikozun bakteri tarafından kullanılabilir olması, bakterilerin EPS ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin şekilde arttırdığı göstermiştir. Karbon katabolitleri, konakçıya yapışmış bakterilerin regülasyonunu indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynar.

Yeni genetik özelliklerin kazanılması ; Biyofilm çoklu ilaç dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına sebep olur.

2.2.5. Quorum Sensing (Çoğunluğu Algılama)

Biyofilm, bakterilerin bir araya gelerek oluşturdıkları, rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Bakterilerin biyofilm oluşturmak için çeşitli kimyasal sinyal mekanizmaları kullandıkları gösterilmiştir (Wagner ve ark, 2008).

Bir komünite içindeki bakteriler, diğer bakterilere varlığını otoendüktör adı verilen küçük yayılabilir bir sinyal molekülü ile gerçekleştirir (Miller ve ark, 2001; Federle ve ark, 2003). Çoğunluğu algılama adı verilen bu hücre içi haberleşme prosesi, ilk olarak deniz kaynaklı biyoluminant bir bakteri olan *Vibrio fischeri*'de tanımlanmıştır (Miller ve ark, 2001; Federle ve ark, 2003; van Bodman ve ark, 2008; Schauder ve ark. 2001). *V. Fischeri* bir dizi deniz hayvanıyla simbiyotik yaşayan bir bakteridir. Bu ortaklıklarda ana konak eş bulma, avını kendine çekme ve avcılardan kaçmak gibi spesifik amaçlar için *Vibrio fischeri* tarafından üretilen ışığı kullanır (Miller ve ark, 2001; Federle ve ark, 2003; van Bodman ve ark, 2008; Schauder ve ark. 2001). Sağladığı ışığın karşılığında, *Vibrio fischeri* besin açısından zengin bir ortamda yaşamını sürdürmektedir. Bir lusiferaz enzim sisteminin *Vibrio fischeri* 'nini ışık üretiminde sorumlu olduğu bulunmuştur. *Vibrio fischeri* çekirdek algıma ile kontrol edilen yüksek hücre yoğunluğunda olduğu zaman biyoparlılık oluşturur (Schauder ve ark, 2001). Özellikle, minimum eşik konsantrasyonu geçen bir otoendüktörün üretilmesi ve birikmesi buna oluşan tepki *Vibrio fischeri*'nin yoğunluk bağımlı ışık üretimini kontrol eder ve biyoışıldama yapar (Miller ve ark, 2001; van Bodman ve ark, 2008; Schauder ve ark, 2001).

Belirgin bir şekilde, deniz bakteri tarafından ışık neşrine ilişkin böyle bir çekirdek algılama aracılı sosyal faaliyet küresel ölçekte bulunmuştur (Miller ve ark, 2001). Yüzyıllar boyunca denizciler tarafından denizin yüzeyin yüzlerce kilometre boyunca yatar olarak uzanan ‘‘sütlü deniz’’ olarak adlandırılan yoğun homojen ve sürekli parlaklık üreten gizemli gece ekranları rapor edilmiştir. Bir uydu algılayıcı sistemi kullanarak, Miller ve arkadaşları kuzeybatı Hint Okyanusu'nda bir ‘‘sütlü deniz’’ gibi büyük biyoluminesans emisyonunu tespit etmişlerdir (Miller ve ark, 2001). ‘‘Sütlü deniz’’ deniz yüzeyinde mikroalg kolonileri ile birlikte yaşayan ve yüksek konsantrasyonda üretilen çekirdek algılama aracılı biyoışıma yapan *Vibrio harveyi* için mükemmel bir tezahürüdür (Miller ve ark, 2001; Schauder ve ark, 2001 ; Miller ve ark, 2005). Son çalışmalar biyoluminans için sosyal etkinliklerden böyle küresel

ölçekli sıkıca karmaşık düzenleyici ağını oluşturan birden fazla çoğunluğu algılama yolunun olduğunu belgelemiştir. Şimdi birçok bakterinin sosyal aktivitelerini ve fizyolojik süreçlerini düzenleyen simbiyoz, spor veya meyve organlarının oluşumu da dahil olmak üzere, bakteriyosin üretimi, genetik yeterlilik, programlı hücre ölümü, virulans ve biyofilm oluşumunu yeterli sayıyı hissetme mekanizması yolu ile gerçekleştirdiği bilinmektedir. Belli bakteriyel topluluklar farkı ve özel ihtiyaçlarını çoğunluğu algılama ile yansıtır. Çoğu bakteride çoğunluğu algılama sosyal faaliyetlerinin düzenlemek ve tek hücre halindeyken kendine ulaşamaz olan maddelere ulaşmasını sağlayan merkezi bir mekanizmayı temsil eder (Miller ve ark, 2001; van Bodman ve ark, 2008; Schauder ve ark, 2001). Giderek artan sayıda kanıt çoğunluğu algılama aracılı sosyal faaliyetler mikrobiyal etkileşimlerini lehine ve bakterilerin popülasyon düzeyinde virülansının düzenleyen başlıca mekanizmalar olarak inanılan göstermektedir (Parsek ve ark, 2005; Cvitkovitch ve ark, 2003; Antunes ve ark, 2010; Fuqua ve ark, 2002; Claverys ve ark, 2006). Bu çalışmalar biyofilmlerde mikropların sosyal biyoloji içine ve bakteriyel enfeksiyonlarda önemli bilgiler ürettiler.

Tablo 1. Bakteriyel Çoğunluğu Algılama Sistemleri ve Kontrollü Sosyal Özelliklerin Örnekleri

Mikroorganizma	Başlıca Sinyal Molekülleri	Düzenleyici Sistem	Grup-Türetilmiş Faydaları	Referanslar
<i>Bacillus subtilis</i>	ComX CSF (PhrC) PhrA,-E, -F, -K, -H	ComP/ComA Rap proteins	Yeterlilik, sporulasyon, biyofilm oluşumu, antibiyotik üretimi	Miller ve ark.,2001; Dunny ve ark.,1997; Claverys ve ark.,2006
<i>Myxococcus xanthus</i>	A-signal C-signal	SasSRN	Meyve verme gövde oluşumu veya sporlanma	Miller ve ark.,2001; Dunny ve ark.,1997
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3O-C12-HSL C4-HSL	LasI/LasR RhlI/RhlR OscR (orphan)	Yapılandırılmış biyofilm oluşumu, virulens faktörleri	Miller ve ark.,2001; Dunny ve ark.,1997; Fuqua ve ark.,2002; Taga ve ark.2003
<i>Staphylococcus aureus</i>	AIP-I, AIP-II, AIP-III, AIP-IV	AgrC/AgrA	Biyofilm formasyonu, virulens faktörleri	Miller ve ark.,2001; van Bodman ve ark.,2008; Novick ve ark.,2003

Tablo 1. Bakteriyel oęunluęu Algılama Sistemleri ve Kontrollü Sosyal Özelliklerin Örnekleri (devamı)

Mikroorganizma	Başlıca Sinyal Molekülleri	Düzenleyici Sistem	Grup-Türetilmiş Faydaları	Referans
<i>Streptococcus mutans</i>	CSP (ComC) XIP (ComS)	ComD/ComE ComR	Bakteriosinler, biyofilm oluşumu, yeterlilik	Mashburn-Warren ve ark.,2010; Lemme ve ark.,2011
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	CSPs	ComD/ComE	Yeterlilik, kardeş katilliği, biyofilm oluşumu, virulens	Waters ve ark.,2005; Claverys ve ark.,2006
<i>Vibrio harveyi</i>	HAI-1, CAI-1 AI-2	LuxLM/LuxN LuxP/LuxQ	Biyoparlılık emisyon, ortak yaşam	Miller ve ark.,2001; van Bodman ve ark.,2008; Federle ve ark.,2003; Schauder ve ark.,2001

2.2.5.1. Bakteriyel oęunluęu Algılamada Ortak Temalar

oęunluęu algılama, koordine faaliyetler için, gen ekspresyonu başlatmak için bir algıyacı ya da kopyalama aktivatörü ile küçük yayılabilir sinyal molekölü etkileşimine dayanmaktadır (Miller ve ark, 2001; Federle ve ark, 2003; Schauder ve ark, 2001). Bakterilerde quorum sensing, genel olarak üç grupta incelenir;

1-Sinyal molekülleri olarak asil-homoserin laktonlar (AHL) kullanan Gram-negatif bakterilerde LuxI / LuxR tip çoğunluğu algılama

2-Gram pozitif bakterilerde sinyal molekölü olarak küçük peptidlerin kullanıldığı, içinde iki tip bileşenli oligopeptid çoğunluğu algılama mekanizması.

3-Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde görülen her ikisinde luxS otoindüse 2 (AI-2) kullanılan çoğunluğu algılama mekanizması, sinyal molekölü kesin bir algılama aparatı ve düzenleyici aę tarafından regüle edilir.

Gram negatif bakterilerde LuxI benzeri proteinlerin sentezine bağlı olan sinyal molekölü olan asil-homoserin laktonlar(AHL)dır (Fuqua ve ark, 2002; Taha ve ark, 2003).

Asil-homserin laktonlar hücre zarı boyunca yayılabilir ve hücre yoğunluğu ile orantılı olarak konsantrasyonu artar. Otak kökenli bir LuxR benzeri protein AHL 'nin tanınmasından sorumludur ve AHL ye bağlandığında, LuxR benzeri protein spesifik promotor DNA elementleri ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Luxl / LuxR çiftlerinin etkimenin biyokimyasal mekanizması muhafaza edilir. Luxl benzeri enzimler, S-adenosilmetionin (SAM) homosistein kısma yağ asidi biyosentez makinelerine asil-asil taşıyıcı protein (asil-ACP) ve asil yan zincir bağlayan belirli bir AHL üretir. Bu ara madde lactonizes metiltiyoadenozin serbest, asil-HSL oluşturmak üzere (Fuqua ve ark, 2002; Parsek ve ark, 1999).

Hücrel süreçlerin çeşitli kontrol etmek için Luxl / LuxR tip çekirdek algılama kullanımı tespit Gram-negatif bakteri tespit edilmiştir. Her bir tür sonuç olarak aynı türün sadece üyeleri tanıyacak ve kendi sinyal molekülüne karşılık, benzersiz AHL veya AHL benzersiz bir bileşimini üretecektir (Miller ve ark, 2001; Waters ve ark, 2005; de Kievit ve ark, 2000; Fuqua ve ark, 2002). Gram-negatif devrelerin çoğu, diğer örnekler, ek düzenleyici faktörler tabakalı edilmiş olan üzerine Luxl / LuxR tip yoğunluğu algılama mekanizması kullanır (Miller ve ark, 2001; van Bodman ve ark, 2008; de Kievit ve ark, 2000; Taga, ve ark, 2003).

Gram negatif bakterilerdekenden farklı olarak Gram pozitif bakterilerde iki tip yoğunluğu algılama mekanizması tespit edilmiştir (Dunny ve ark, 1997; Novick ve ark, 2003; Dufour ve ark, 2011). İlk tür, çekirdek-algılama sistemleri, genel olarak, üç bileşenden, autoinducing peptid (AIP) olarak bilinen bir sinyal peptid ve spesifik olarak algılar ve bir AIP yanıt veren bir iki-bileşenli sinyal transdüksiyon sistemi (TCSTS) oluşmaktadır (Miller ve ark, 2001; Dunny ve ark, 1997; Schauder ve ark, 2001; Novick ve ark, 2003; Claverys ve ark, 2006). AHL sinyallere daha aksine, hücre zarı AIP ama oldukça özel bir oligopeptid taşıyıcı, büyük ölçüde bir ABC taşıyıcısının geçirimli olmayan, hücre dışı ortama AIP salgılamak için gereklidir (Dunny ve ark, 1997; Novick ve ark, 2003; Claverys ve ark, 2006). Gram pozitif bakteriler, normal olarak çift glisin konsensüs dizisinden oluşan ve ortamlarında peptit spesifik ABC transportundan sorumlu aktif AIP kısmı olan olan bir sinyal öncü maddesi üretirler. Gram pozitif bakterilerin sinyalleşme peptitlerinin çoğu, tipik olarak 5-25 amino asitten oluşur ve bazı nadir yan zincirlerini ihtiva etmektedir (Novick ve ark, 2003; Claverys ve ark, 2006). Gram pozitif bakterilerin sinyal peptitleri hücre membran bağlantılı, histidin kinaz protein duyarlı AIP ve sitoplazmik yanıt düzenleyici protein aracılığı ile hücrenin gen ekspresyonu ile peptide cevap vermesini düzenler (Dunny ve ark, 1997; Schauder ve ark, 2001; Novick ve ark, 2003; Claverys ve ark, 2006).

Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde bir diğer otoindüktör tip 2 (AI-2) adlı otoindüktörün rol oynadığı yoğunluğu algılama mekanizması tespit edilmiştir (Miller ve ark, 2001; Waters ve ark, 2005; Federle ve ark, 2003). Tür içi sinyalla için özel olarak diğer quorum sensing mekanizmalarından farklı olarak, AI-2 türler arası iletişim sağlar, bu nedenle çapraz tür iletişim için kullanılan “evrensel dil” olarak adlandırılır (Federle ve ark, 2003; Schauder ve ark, 2001). AI-2, ilk olarak bir deniz bakterisi *V. harveyi*’de karakterize edilmiştir, hücre yoğunluğu, bağımlı ışıltaması regüle eden bir furanosil borattır (Chen ve ark, 2002; Vendeville ve ark, 2005). AI-2’nin sentezi homosistein ve 4,5-dihidroksi-2,3-pentandion (DPD) içine ribosil-homosistein dönüşümünü esas alan bir metabolik enzim olan bir luxS tarafından kodlanan AI-2 ön maddesine bağlıdır (Chen ve ark, 2002). LuxR proteininin bir sitoplazmik reseptördür ve aynı zamanda bir transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görür (Federle ve ark, 2003; Schauder ve ark, 2001; Vendeville ve ark, 2005). Bir luxS mutasyonu bütün metabolik yolu kesintiye ve ıdlayısı ile büyük bakterilerin metabolizmasının değişmesine yol açar. AI-2 tabanlı yoğunluğu algılama prokaryotlar arasında oldukça yaygındır ve luxS homologları bir çok bakteri türünde bulunmuştur (Federle ve ark, 2003; Vendeville ve ark, 2005). Bu kadar geniş dağılımı ile, luxS kodlanmış yoğunluğu algılama mekanizması mikrobik ekolojisi önemli rollere sahip olması şaşırtıcı değildir.

2.2.6. Pseudomonaslarda Biyofilm Oluşumu

1998 yılında, Greenberg ve arkadaşları, öldürücü sistemik enfeksiyonlara sebep olan Gram negatif ve en sık görülen bir fırsatçı patojen olan *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm Las quorum sensing rolünü tarif etmişlerdir (Davies ve ark, 1998; Singh ve ark, 2000; Smith ve ark, 2003). Bu patojenin biyofilm formu kistik fibrosis’li hastalarda oldukça yaygındır (Singh ve ark, 2000; Bjarnshoit ve ark, 2010). Bu organizmada, yoğunluğu algılama mekanizması oldukça karmaşıktır ve hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası seviyelerde etkili pek çok düzenleyici regölatör tarafından modüle edilen iki iç içe N-asil homoserin lakton bağımlı düzenleyici devre, oluşmaktadır (Davies ve ark, 1998; Withers ve ark, 2001). Bu araştırmacılar otoindüktör 3-okso-C12-HSL üretiminde hatalı LASI mutanı kullanıldığında vahşi tip biyofilm hücre kümeleri meydana getirdiği ve vahşi tip biyofilmlerin % 20’ sinin deterjanlara duyarlı olduğunu görmüşlerdir. 3-okso-C12-HSL sistemine ilave edildiği zaman, LASI mutanı yapısal biyofilm oluşturmakta bir kez daha başarılı olmuştur (Davies ve ark, 1998). Bu bulgu yoğunluğu algılamanın biyofilm

gelişiminde önemli bir rol oynadığı ve daha da önemlisi, çoğunluğu algılama ve biyofilm oluşumu arasındaki çıkılmaz bir bağlantı yaptığı düşündürmektedir. Daha sonra yapılan çalışmalarda çoğunluğu algılama mekanizmasının *Pseudomonas aeruginosa*’da ekzoproteazların, sideroforların, ekzotoksinlerin ve ramnolipidlerin (Singh ve ark, 2000; Smith ve ark, 2003) salınımın organize ettiği, özellikle virülans faktörlerini sentezleme hastalık patogenezisini kontrol etmesi in vivo ve in vitro modellemeler ile ortaya konmuştur (Davies ve ark, 1998; Bjarnshoit ve ark, 2010).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İzolasyon Örnekleri

Araştırma için 2017 Haziran ayında, Aydın ili ve çevresinde bulunan köylerden 162 ineğin her birinden süt Örnekleri tekniğine uygun olarak alınıp, soğuk zinciri kırılmadan Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına getirildi.

3.1.2. Besiyerleri

3.1.2.1. Pseudomonas Selective , CFC Agar Base (Merck 1.07620)

Peptone from gelatine	16,0 g/L
Casein hydrolysate	10,0 g/L
Potassium sulfate	10,0 g/L
Magnesium chloride	1,4 g/L
Agar-agar	11,0 g/L

500 mL damıtık su içinde 24,2 g dehidre besiyeri ve 5 mL gliserol (Merck 1.04091) kaynatılarak çözülür ve otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilir. Otoklav sonrası besiyeri 45-50 °C'ye soğutulur ve Pseudomonas CFC Agar için 1 şişe Pseudomonas CFC Selective Supplement (Merck 1.07627) eklenir ve petri kutularına dağıtılır. Besiyeri 45-50 °C 'da 4 saatten fazla tutulmamalıdır. Selektif katkı 2 mL eşit hacimde alkol/su karışımı içinde çözülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve renksiz olup, otoklav sonrası 25 °C'de, pH 7,1±0,2'dir.

3.1.2.2. Blood Agar (Merck 1.10886)

Blood Agar	40 g
Distile Su	1000 ml

Karışım yapıldıktan sonra pH 7,2-7,4'e ayarlanıp, 15 dakika otovlandıktan sonra, 50 °C'ye kadar soğultumuştur. Son olarak içine % 5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilmiştir.

3.1.2.3. EMB Agar (Merck 1.01347)

Peptone	10,0 g/L
K ₂ HPO ₄	42,0 g/L
Lactose	5,0 g/L
Sucrose	5,0 g/L
Eosin Y yellowish	0,4 g/L
Methylene Blue	0,07 g/L
Agar agar	13,5 g/L.

Dehidre besiyeri 36,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilir, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilir ve 45-50 °C'ye soğutulup steril petri kutularına 12,5 'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızımsı-kahve, menekşe-kahverenginde olup, 25 °C'da pH 7,1±0,2'dir.

3.1.2.4. Kongo Red Agar (CRA)

BHI broth	37 g
Sakkaroz	36 g
Kongo Kırmızısı	0,8g
Agar	10 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiş ve petrilere dağıtılmıştır.

3.1.2.5. Triple Sugar Iron Agar (Üç Şekerli Demirli Agar)

Poliipepton	20 gr
Laktoz	10 gr
Sukroz	10 gr
Dekstroz	1 gr
Sodyum klorid	5 gr
Ferrik amonyum sulfat	0.2 gr
Sodyum tiyosulfat	0.2 gr
Agar	13 gr
Fenol kırmızısı	0.025 gr
Distile Su	1000 ml
pH	7.3

Hazırlanan karışım sıcak su banyosunda eritildi ve tüplere 8-10 ml dağıtıldı. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi. Daha sonra tüplerde 2-3 cm dik kısım ve üstte yatık kısım olacak şekilde soğutuldu.

3.1.2.6. Tryptic Soy Agar

Peptone from casein	15,0 g/L
Peptone from soymeal	5,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
Agar-agar	15,0 g/L

Dehidre besiyeri, 40,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C 'da 15 dakika sterilize edilir ve steril Petri kutularına 12,5 'er mL dökülür. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsı kahve renktedir. Sterilizasyon sonrası 25 °C 'da pH'sı 7,3±0,2'dir.

3.2.Yöntem

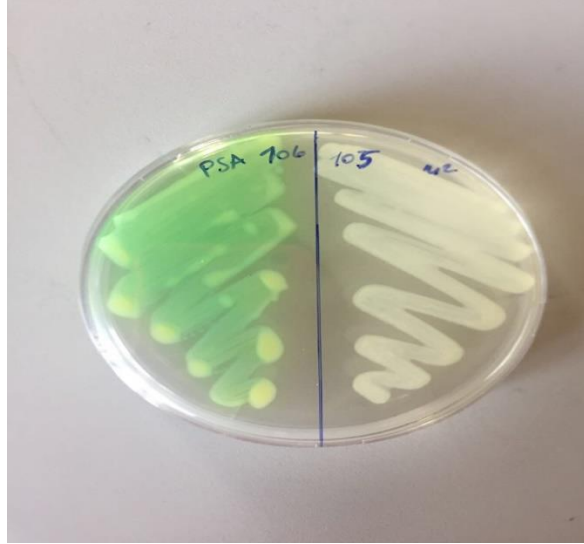
3.2.1. Örneklerin Alınması

Süt Örnekleri alınırken, dışkı ve çamur bulaşıklı meme başları ıslak mendil ile temizlendi ve daha sonra % 70'lik etil alkol emdirilmiş pamuk ile meme başları silindi, her meme başı için ayrı alkollü pamuk kullanıldı. İlk bir kaç çekimlik süt dışarıya atıldıktan sonra süt örnekleri steril petri kaplarına alındı.

3.2.2. Pseudomonas Şüpheli Örneklerin Belirlenmesi

Laboratuvara getirilen örneklerin kanlı agara ekimi yapılarak 37 °C' de 24-48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda oluşan kolonilere Gram boyaması yapıldı. Yapılan boyama sonucunda Gram negatif örnekler Eosin Metilen Blue Agar (EMB Agar)'a ekimi yapılarak 37 °C' de 24-48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda oluşan renksiz laktoz negatif koloniler Pseudomonas şüpheli olarak saflaştırılmak üzere tekrardan kanlı agara ekildi.

Saflaştırılmış Gram negatif koloniler steril öze ile alınıp hem Pseudomonas Selective , CFC Agar Base hem de Üçlü Tüplere geçilerek 37 °C'de 24-48 saat inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonucunda hem Pseudomonas Selective Agar'da yeşil renk veren koloniler hemde Üçlü Tüpler'de non-fermantatif, hareketli koloniler değerlendirmeye alındı.



Resim 1: Pseudomonas Selective Agar'a yapılan ekim sonucu üreyen pozitif ve negatif koloniler.

3.2.3. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi

3.2.3.1. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak Belirlenmesi

Biyofilm oluşumu Kongo Red Agar (CRA) yöntemi kullanılarak belirlendi. Daha sonra biyofilm araştırılacak suşların besiyerlerine ekimi yapıldı. 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucu siyah ve pürüzlü yüzey oluşturan örnekler biyofilm pozitif olarak değerlendirildi.



Resim 2: Kongo Red Agar'a ekim yapılan örneklerin inkübasyon sonrası biyofilm görünümü.

3.2.3.2. Biyofilm Üretiminin Genotipik Olarak Belirlenmesi

Bu aşamada biyofilm üretiminin genotipik tespiti için *bapA* geninin PCR yöntemi ile belirlenmesi hedeflenmiştir.

3.2.3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi

PCR çalışmalarında kullanılmak üzere tüm izolatların DNA eldesi için kaynatma yöntemi uygulandı. Bu amaçla *Pseudomonas* izolatlarının Trypticase Soy Agar (TSA)'a ekimi yapıp ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İzolatlar üretildikten sonra bir öze dolusu saf koloni alınarak 500 mikrolitrelik DNase-RNase ari ependorf tüplerinde deiyonize su ile süspanse edildi. Süspansiyon 100 derecede 10 dk kaynatıldı ve daha sonra 10 000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı alınarak PCR amplifikasyonlarında hedef DNA olarak kullanıldı (Çiftçi ve ark., 2009).

bapA geninin PCR ile belirlenmesi için Horton ve ark. (2016)'nın kullandıkları protokolün modifikasyonu ile gerçekleştirildi. Toplam 25 µl PCR karışımına; 50 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu, 3 mM MgCl₂, 5 pm her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 0,5 U *Taq* polimeraz ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 94 °C'de 2 dk ilk denatürasyon, 25 siklus 94 °C'de 1 dk, 63 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1 dk amplifikasyon ve 72 °C'de 7 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 814 bp'lik bant görülmesi *bapA* geni için pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo2: Çalışmada Kullanılan Oligonükleotid Primer Dizileri.

Primer	Oligonükleotid dizisi (5'-3')	Bant boyutu	Referans
bapAF	GCG CCG CAG ATC GTG TCA G	575	Horton ve ark.,2016
bapAR	CCG GCA GCG TCC AGG TG		

4.BULGULAR

4.1. İzolasyon ve İdetifikasyon Bulguları

Araştırma Aydın ili ve köylerinde yaşayan 162 ineğin her birinden tekniğine uygun olarak alınan süt örneklerinin Adnana Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Tehşis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilerek incelendi.

Besi yerlerine inokulasyonları yapılan numunelerin 37 °C’de 24-48 saat inkubasyonundan sonra *Pseudomonas* şüpheli kolonilerin identifikasyonu için önce Gram boyama yapıldı. Gram negatif koloniler *Pseudomonas* Selective Agar (PSA) ve Triple Sugar Iron Agar’a (TSI) ekimleri yapıldı. 13 adet *Pseudomonas spp.* pozitif olarak değerlendirildi.

Pseudomonas Selective Agar ve Triple Sugar Iron Agar’da pozitif sonuç veren 13(% 21,6)adet örnek koloniler saflaştırmak üzere kanlı agara ekimleri yapıldı. Saflaştırılan koloniler biyofilm oluşumunun fenotipik olarak gözlenmesi için Kongo Red Agar’a ekimi yapıldı.

Tablo 3: Sütlerden İzole Edilen Suşlarda İdetifikasyon Bulguları

Toplam Süt Örneği	Gram negatif basil	PSA Pozitif
162	60 (% 37,03)	13 (% 21,66)

Çalışma için toplanan 162 örneğin besi yerlerine ekimi yapıldıktan sonra hepsinde bakteriyolojik üreme gözlemlenmiştir. Üreme gerçekleştiren 162 örneğe gram boyama uygulanmış ve 60(% 37,03) örneğin Gram negatif olduğu gözlenmiştir. Gram negatif suşların EMB Agar’a ekimi yapıldığında, inkubasyon sonunda 13(% 21,66) örnekte renksiz koloniler gözlemlenmiştir. Oluşan renksiz kolonilerin hepsi PSA ve TSI besi yerlerinde pozitif sonuç vermiştir.

4.2. Biyofilm Üretiminin Fenotipik Olarak İncelenmesine Ait Bulgular

Çalışılan suşların biyofilm oluşturma durumları Kongo Red Agar ile araştırılmıştır. Kongo Red Agar besiyerine ekilen kültürlerin 37 °C'de 24-48 saat inkübasyonundan sonra kırmızımsı-siyah, pürüzlü ve kuru koloni oluşturanlar biyofilm pozitif, pembemsi-kırmızı ve düz koloni yapanlar biyofilm negatif olarak kabul edildi. 13 örnekte de biyofilm oluşumu 24 saatlik ve 48 saatlik inkubasyonlar sonucunda gözlenmemiştir.

4.3. PCR Bulguları

Hedef DNA'nın amplifikasyonu için toplam 25 µl PCR karışımına; 50 ng ekstrakte edilmiş DNA, 1X PCR tamponu, 3 mM MgCl₂, 5 pm her bir primer, 200 µM her bir dNTP, 0,5 U *Taq* polimeraz ilave edildi. Amplifikasyon koşulları 94 °C'de 2 dk ilk denatürasyon, 25 siklus 94 °C'de 1 dk, 63 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1 dk amplifikasyon ve 72 °C'de 7 dk son uzama aşaması olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren % 1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında 814 bp'lik bant görülmesi *bapA* geni için pozitif olarak değerlendirildi. Örneklerin hiçbirinde 814 bp lik bant görülmemiştir. Genotipik olarakta örneklerde biyofilm varlığı belirlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Mastitis vakalarından maya ve küflerde dahil çok geniş bir yelpazede farklı etiyolojik ajan izole edilmektedir ve enfeksiyonlara daha çok bakteriyel ajanların neden olduğu ortaya konmuştur. Bulaşıcı ve çevre kaynaklı mastitislere sebep olan mikroorganizmalar arasında sıklıkla stafilocok, streptokok ve *Escherichia coli* izole edilmektedir.

Mastitis tedavisinde uygun olmayan antibiyotik kullanımı, dirençli suşların gelişmesine ya da antimikrobiyal direncin ve virulens faktörlerinin bir bakteriden diğerine tranferi sonucu patojenik suşların ortaya çıkmasına ve yayılmasına katkıda bulunmaktadır. Ülkemizde mastitisle ilgili birçok çalışma yapılmasına rağmen mastitis hala süt sığırları işletmelerinin en büyük problemlerinden biridir.

Özellikle memede makroskopik bir yangının ve sitte gözle görülür bir değişikliğin gözlenmediği subklinik mastitisler akut ve kronik mastitislere göre daha sık görülmekle birlikte hayvanlarda süt veriminde azalma, tedavi masrafları ve yüksek verimli hayvanların sürüden ayıklanması gibi nedenlerle ülkemizde mastitislerin sebep olduğu kayıpların büyük çoğunluğunu oluşturur. Bartlett ve ark. (1991) ise, patojen türüne göre süt kaybı miktarının değiştiğini ifade etmiştir. Bu konuda yapılan araştırma sonuçlarına göre, *Streptococcus agalactia* hariç diğer streptokoklar 0-60 günlük laktasyon döneminde 146 kg; koliformlar 95 kg; koagülaz pozitif stafilocoklar 93 kg ve koagülaz negatif stafilocok mikroorganizmalarının oluşturduğu mastitis vakalarında ise süt kaybının 88 kg olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılara göre iki veya daha fazla patojenin birada olduğu enfeksiyonlarda ise kayıp daha da artmaktadır.

Bu çalışmada, inek sütlerinden izole edilen *Pseudomonas*'ların biyofilm üretim yetenekleri araştırıldı.

Ma ve ark (2011) ile Zhang ve ark (2013) yaptıkları çalışmalarda ortamdaki c-di-GMP seviyesi arttıkça bakterinin tercih ettiği yaşama formunun biyofilm olduğunu ortaya koymuşlardır. Yine aynı çalışmada ortamdaki c-di-GMP'nin azalmasının biyofilmden kopmaları indüklediği belirlenmiştir.

Wozniak ve ark (2003) yaptıkları çalışmada aljinatın *Pseudomonas*'larda mukozaya yapışmada ve bakterinin fagositozdan kaçmasında önemli bir rolü olduğunu fakat biyofilm oluşumu için başlangıçta çokta önemli olmadığını biyofilmin devamlılığındaki önemini ortaya koymuşlardır. Yine aljinat ile yapılan çalışmada VanDevanter ve ark (2005) yılında Aljinat

oluşturma özelliği *P.aeruginosa*'nın önemli bir virölans faktörü olup, biyofilm oluşturan suşların oluşturmayanlara göre daha ciddi doku hasarına neden olduklarını ortaya koymuşlardır.

Lee ve ark (2009) yılında yaptıkları çalışmada değişik bakteri türlerinin ürettiği olduğu AHL QS sinyaller doğal buğday rizosferindeki *Pseudomonas*'ın gen ekspresyonunu aktive ettiği dolayısı ile biyofilm oluşumunu uyardığı görülmüştür.

Davies ve ark. 1998 yılında yaptıkları çalışmada Las çoğunluğu algılama sisteminin *P. aeruginosa* biyofilmin farklılaşmasında rol oynadığını göstermiştir. Yaptıkları çalışmada 3-okso-C12-HSL üretimi olmayan mutant kökenin farklı yapıda biyofilm ürettiğini ve bu biyofilmin sodyum dodesil sülfatın düşük konsantrasyonunda etkilendiğini göstermiş, buna karşın besi yerine 3-okso-C12-HSL eklendiğinde farklılaşmış ve sodyum dodesil sülfata direnç kazandığını göstermiştir.

Shih ve ark. 2002'de biyofilm-çoğunluğu algılama ilişkisini tanımladıkları çalışmalarında, *P. aeruginosa* doğal suş (PA01) ile "QS yoksun" mutantların biyofilm oluşturma yönünden karşılaştırdıklarında hemen başlangıçta biyofilm yoğunluğu yönünden aralarında farklılık yokken, çoğunluğu algılama özelliğini taşıyan doğal suşla biyofilm oluşumunun daha hızlı ilerlediğini göstermiştir.

Bu çalışmada Aydın çevresinden toplanan 162 örnek üzerinde *Pseudomonas* 'lardaki biyofilm üretimini genotipik ve fenotipik olarak inceledik. Örneklerimizin 60 tanesi Gram negatif olup bunların içinden 13 tanesi *Pseudomonas* Selective Agar pozitif sonuç vermiştir. Örneklerimiz daha sonra Kongo Red Agar'a ekilerek biyofilm üretim yetenekleri gözlemlenmiştir. Besiyerine ekilen 13 örnekte biyofilm bakımından negatif olarak sonuçlandırılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Matitis, süt veriminin ve kalitesini olumsuz etkileyen, meme dokusunun fırsatçı bir enfeksiyonudur ve hijyen kurallarını yeterli olarak uyulmadığı işletmelerde çok büyük ekonomik kayıplara sebebiyet vermektedir. Pseudomonaslar, biyofilm yapısına katılan çeşitli virulens faktörler sayesinde insanları ve evcil hayvanlarında florasında bulunan fırsatçı bir patojendir. Pseudomonaslar birden fazla antibiyotiğe karşı direnç geliştirmişlerdir ve biyofilm yapısının bu dirence katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Biyofilm oluşturan bu türlerde meydana gelen yüksek dirençliliğin insan sağlığı için de risk teşkil edebileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada toplanan 162 örneğin hepsinde bakteriyolojik üreme gözlemlenmiştir. Bu 162 örneğin 60(%37,03) tanesi Gram boyama sonucunda Gram negatif olarak bulunmuştur. Gram negatif örnekler EMB Agara ekilerek laktoz negatif koloniler Pseudomonas şüpheli olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan koloniler Pseudomonas Selektif Agar'a ve TSI Agara ekimi yapılarak inkubasyonuna bırakılmıştır. İnkubasyon sonucu pozitif sonuç veren 13(%21,6) pseudomonas suşunun hiç birinde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Yapılan PCR'da 13(%21,6) örnek biyofilm oluşumu yönünden negatif sonuç vermiştir. Biyofilm oluşumu hem fenotipik hemde genotipik olarak gözlenmemiştir. Bu da her iki yönteminde biyofilm araştırmasında uygulanması gerektiğini göstermiştir.

Bu çalışmada Pseudomonas'ların sığır yetiştiriciliğinde önemli verim kayıplarına sebep olan patojenler arasında olduğunu göstermiştir. Çalışmamızda bulduğumuz örneklerimizde biyofilm oluşturma yeteneğinin olmaması farklı virulens faktörlerinin patojenitede rol oynadığını göstermiştir. Bunlarda insan sağlığı için risk teşkil etmektedir. Bu nedenle konu ile ilgili olarak daha detaylı araştırma ve denemelerin yapılması ve önlemlerin alınması gerekliliği ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

- Abbott S.** Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, and Serratia. In, Murray PR (Ed), Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. ASM Press, Washington DC, 2007.
- Alaçam, E.,** 1997. Meme Hastalıkları, ‘Sığır Hastalıkları’ Ed. E. Alaçam ve M. Şahal, Medisan Yay., Ankara, 389-425.
- Algun U, Arısoy A, Gündüz T, Özbakkaloglu B.** The resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains to fluoroquinolone group of antibiotics. *Indian J Med Microbiol* 2004; 22: 112-114.
- Allewelt M, Coleman FT, Grout M, Priebe GP, Pier GB.** Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 2000;68:3998–4004.
- Antunes, L.C.; Ferreira, R.B.; Buckner, M.M.; Finlay, B.B.** Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 2010, 156, 2271–2282.
- Azmi, D. Hawari, F. Dabbas, Al.** (2008): Prevalence and distribution of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Jordan. *American Journal of Animal and veterinary sciences*, 3 (1):36-39.
- Baldassarri, L., Cecchini, R., Bertuccini, L., Ammendolia, M.G., Iosi, F., Arciola, C.R., Montanaro, L., Di Rosa, R. et al.** (2001) Enterococcus spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol* 190, 113–120
- Bartlett, P. C., Van Wijk, J., Wilson, D. J., Gren, C. D., Miller, G. Y., Majewski, G. A., Heider, L. D.,** 1991. Temporal patterns of lost milk production following clinical mastitis in a large Michigan Holstein herd. *J. Dairy Sci.*, 74:1561-1572.
- Bagley S** (1985). "Habitat association of Klebsiella species". *Infect Control*. 6 (2): 52–8. PMID 3882590.
- Bexiga R, Koskinen MT, Holopainen J, Carneiro C, Pereira H, et al.** (2011) Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *J Dairy Res* 78(1): 49-55.

- Bjarnshoit, T.; Jensen, P.Q.; Jakobsen, T.H.; Phipps, R.; Nielsen, A.K.; Rybtke, M.T.; Tolker-Nielsen, T.; Givskov, M.; Haiby, N.; Ciofu, O.** Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PLoS One* 2010, 5, e10115.
- Boettcher, P.J., Dekkers, J.C.M., Kolstad, B.W.,** 1998. Development of an udder health index for sire selection based on somatic cell score, udder conformation, and milking speed. *J. Dairy Sci.* 81:1157–1091.
- Borlee, B. R., Goldman, A. D., Murakami, K., Samudrata, R., Wozniak, D. J., Parsek, M. R.** 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 75, 827–842
- Boano, F., Harvey, J. W., Marion, A., Packman, A. I., Revelli, R., Ridolfi, R., Wörmen, A.** 2014. Hyporheic flow and transport processes: mechanisms, models, and biogeochemical implications. *Reviews of Geophysics*, 52, 603–679.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., & White, D.** (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336–7342
- Bradley, A.** (2002) Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J* 164, 116–128
- Burke, Cunha** (July 1984). "Infection Control". 5. Cambridge University Press on behalf of The Society for Healthcare Epidemiology of America: 343–348. JSTOR 30144997.
- Carpentier B, Cerf O.** Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 1993;75:499-511.
- Carter G.R. and Chengappa M.M.** 1991. *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. Lea and Febiger, Philadelphia, PA.
- Chae, M. S., & Schraft, H.** (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1e2), 103-111.
- Chen, X.; Schauder, S.; Potier, N.; Van Dorssealaer, A.; Pelczar, I.; Bassler, B.L.; Hughson, F.M.** Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 2002, 415, 545–549.
- Çiftci A, Fındık A, Onuk EE, Savasan S.** Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Braz J Microbiol* 2009; 40: 254–261.
- Claverys, J.P.; Prudhomme, M.; Martin, B.** Induction of competence regulons as a general response to stress in Gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 2006, 60, 451–475.

- Costa EO, Carvalho VM, Coutinho SD, Castilho W, Caramori LFL** (1985) *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite bovina no Estado de São Paulo. *Pesqui Veterinária Bras* 5(4): 117-120.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng GK.** How bacteria stick. *Sci Am* 1976;238:86-956.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, et al.** Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-64.
- Cvitkovitch, D.G.; Li, Y.H.; Ellen, R.P.** Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1626–1632.
- Dang, H., Lovell, C. R.** 2016. Microbial colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, 91-138.
- Davies, D.G.; Parsek, M.R.; Pearson, J.P.; Iglewski, B.H.; Costerton, J.W.; Greenberg, E.P.** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998, 280,295–298.
- de Kievit, T.R.; Iglewski B.H.** Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* 2000, 68, 4839–4849.
- Denning, G.M, Iyer SS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT, Britigan BE.** Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L584–L592.
- Deveci, H., Apaydın, A. M., Kalkan, C., Öcal, H.,** 1994. Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları, Fırat Üniversitesi Basımevi, 1. Baskı, Elazığ.
- Dongari-Bagtzoglou, A.** 2008. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 6, 201-208.
- Donlan RM, Costerton WJ.** Biofilms: Survival mechanisms of clinical relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167-93.
- Donlan R. M.** 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiology*, 17, 66–72.
- Donlan, R. M.** 2002.Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881–890
- Dunne WM Jr.** Bacterial adhesion: Seen any good biofilm lately? *Clin Microbiol Rev* 2002;15:155-16.
- Dunny, G.M.; Leonard, B.A.** Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1997, 51, 527–564.

- Dufour, D.; Cordova, M.; Cvitkovitch, D.G.; Levesque, C.M.** Regulation of the competence pathway as a novel role associated with a streptococcal bacteriocin. *J. Bacteriol.* 2011, *193*, 6552–6559.
- Elder MJ,** Stapleton EE, Dart KG. Biyofilm related infections in ophthalmology. *Eye* 1995;9:102-9
- Erdem B.** Pseudomonaslar. Editör: Ustaçelebi S ve ark, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Günes Kitabevi, 1999: 551-566.
- Erskine et al.** 2002. Efficacy of Systemic Ceftiofur as a Therapy for Severe Clinical Mastitis in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 85(10):2571-2575
- Federle, M.J.; Bassler, B.L.** Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* 2003, *112*, 1291–1299.
- Flemming, H. C., Wingender, J.** 2010. The biyofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, *8*, 623-633.
- Fraser W.D, Hugh G.W., Kapil T** (2015). "Genome Sequences of Klebsiella variicola Isolates from Dairy Animals with Bovine Mastitis from Newfoundland, Canada". *Genome Announcements*. 3 (5): e00938–15. doi:10.1128/genomeA.00938-15. ISSN 2169-8287. PMC 4566169 Freely accessible. PMID 26358587.
- Fuqua, C.; Greenberg, E.P.** Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, *3*, 685–695.
- Girma T.** (2001): Prevalence of mastitis at Alemaya University dairy farm. *Journal Ethiopian Veterinary Association*, *5*, 17–21.
- Guiton, P. S., Hung, C. S., Kline, K. A., Roth, R., Kau, A. L., Hayes, E., Heuser, J., Dodson, K. W., Cuperon, M. G., Hultgren, S. J.** 2009. Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biyofilm development. *Infection and Immunity*, *77*, 3626–3638
- Gün İ.; Ekinci F.** (2009). Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyel Yaşam. *Gıda* *34* (3): 165-173
- Gupta, P., Sankar, S., Das, P., Battacharjee, S., Tribedi, B.** 2015. Biyofilm, pathogenesisi and prevention: a journey to break the wall. *Archives of Microbiology*, *10*, 1148-1160.
- Grimont F, Grimont PD** (2006). *Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York. pp. 159–196.
- Hadjifrangiskou, M., Go, A. P., Pinker, J., Kostakioti, M., Zhang, E. W., Greene, S. E., Hultgren, S. J.** 2012. Transposon mutagenesis identifies uropathogenic *Escherichia coli* biyofilm factors. *Journal of Bacteriology*, *194*, 6195–6205.

- Harmsen, M., Yang, M., Pamp, S. J., Tolker-Nielsen, T.** 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59, 253–268.
- HendersonJP, Ball, HJ:** 1999. Polyarthritis due to *Mycoplasma bovis* infection in adult dairy cattle in Northern Ireland. *Vet Record* 145,13: 374-376.
- Hermann, R.,** 1992. Genome structure and organization. In: Maniloff, J. (Ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. American Society of Microbiology, Washington DC, USA, pp. 157–168.
- Hong, S. H., Lee, J., Wood, T. K.** 2010. Engineering global regulator Hha of *Escherichia coli* to control biofilm dispersal. *Microbial Biotechnology*, 3, 717–72.
- Horton RA, Card R. R, Randall R. Teale CJ.** Differentiation of UK endemic strains of *Salmonella enterica* serovar Newport from epidemic North American strains by PCR detection of a truncated *bapA* chromosomal gene. *Research in Veterinary Science* 2016. 104; 113-116
- Howe TR, Iglewski BH.** Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun* 1984;43:1058-1063.
- Jost B.H., Post K.W., Songer J.G. and Billington S.J.** 2002a. Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from the porcine gastric mucosa. *Vet. Res. Comm.* 26: 419–425.
- Kaplan, J. B.** 2010. Biofilm dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, 89, 205–218.
- Kesenkaş, H., Karagözlü, C., Akbulut, N.,** 2001. Kaliteli süt üretiminde somatik hücre sayım yöntemleri ve önemi. GAP II. Tarım Kongresi, 24-26 Ekim, I. Kitap, 287-296, Şanlıurfa.
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J.** Targeting Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* 2006;36:78-91.
- Kipnis E, Guery BP, Tournoy A, et al.** Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa* – induced acute lung injury. *Shock* 2004;21(5):444–451.
- Kristich, C.J., Li, Y.H., Cvitkovitch, D.G. and Dunny, G.M.** (2004) Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 186, 154–163.
- Klebensberger, J., Birkenmaier, A., Geffers, R., Kjelleberg, S., Philipp, B.** 2009. SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 11, 3073–3086.

- Kline, K. A., Dodson, K. W., Caparon, M. G., Hultgren, S. J.** 2010. A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiology*, 18, 224–232.
- Langoni H, Guimarães FF, Salina A, Ribeiro MG, Baio PVP** (2016) Molecular Characterization of *Corynebacterium bovis* causing Clinical Mastitis and Increasing Somatic-Cell Count. *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology* 5(2): 248-255.
- Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML** Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7072–7077
- Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F.** The Role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 2004;10(12):599-606.
- Lemme, A.; Grobe, L.; Reck, M.; Tomasch, J.; Wagner-Dobler, I.** Subpopulation-specific transcriptome analysis of competence-stimulating peptide-induced *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 2011, 193, 1863–1877.
- Lee, J. , Atilla, C. , Cirillo, L. G. , Cirillo D. J. , Wood, K.** (2009) . Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microbial Biotechnology* 80, 75–90.
- Lopez, D., Wlamakis, H., Kolter, R.** 2010. Biofilms. *CSH Perspectives in Microbiology*, 12, 354-365
- Ma, Q., Zhang, Q., Wood, T. K.** 2011a. *Escherichia coli* BdcA controls biofilm dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* and *Rhizobium meliloti*. *BMC Research Notes*, 4, 447-451.
- Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP.** Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 1994;62:596–605.
- 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:L409–L418.
- Mashburn-Warren, L.; Morrison, D.A.; Federie, M.J.** A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Mol. Microbiol.* 2010, 78, 589–606.
- Matsumoto K.** Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biol Chem* 2004;385(11):1007–1016.
- Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA.** Pyoverdine is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1996;64:518–523.

- Miller, M.B.; Bassler, B.L.** Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55, 165–199.
- Miller, S.D.; Haddock, S.D.; Elvidge, C.D.; Lee, T.F.** Detection of a bioluminescent milky sea from space. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 14181–14184.
- Mitri, S., Xavier, J. B., Foster, K. R.** 2011. Social evolution in multispecies biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 10839–10846.
- Morin et al.** 1998. Comparison of antibiotic administration in conjunction with supportive measures versus supportive measures alone for treatment of dairy cows with clinical mastitis. *J Am Vet Med Assoc.* 213(5):676–84.
- Narayanan S., Nagaraja T.G., Wallace N., Staats J., Chengappa M.M. and Oberst R.D.** 1998. Biochemical and ribotypic comparison of *Actinomyces pyogenes* and *A. pyogenes*-like organisms from liver abscesses, ruminal wall, and ruminal contents of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 59: 271–276.
- Natterman H. and Horsch F.** 1977. The *Corynebacterium pyogenes* infection in cattle. 1. Incidence of the pathogen. *Arch. Exp. Veterinarmed.* 31: 405–413.
- 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.
- Nicholas R, Baker, R, Rayling, R et al:** 2000. Mycoplasma infections in growing cattle. *Cattle Practice* 8,2: 115-118
- Novick, R.P.** Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* **2003**, 48, 1429–1449.
- O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, Abdalla MY, Denning GM, Britigan BE.** The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285(3):L1077–L1086
- Pascual Ramos C., Foster G. and Collins M.D.** 1997. Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocaesp.* nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 46–53.
- Pankey JW, Nickerson SC, Boddie RL, Hogan JS** (1985) Effects of *Corynebacterium bovis* infection on susceptibility to major mastitis pathogens. *J Dairy Sci* 68(10): 2684-2693.
- Parsek, M.R.; Greenberg, E.P.** Sociomicrobiology: The connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 2005, 13, 27–33.

- Parsek, M.R.; Val, D.L.; Hanzelka, B.L.; Cronan, J.E., Jr.; Greenberg, E.P.** Acyl homoserinelactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 4360–4365.
- Pier GB, Ramphal R.** *Pseudomonas aeruginosa*. Ed:Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Edition, pp. 2587-2615 Elsevier Inc., Philadelphia, Pennsylvania, USA, 200533.
- Pillay, T. V. R.,** 1996. Aquaculture principles and practices. Fishing News Boks, pp 20194-
- Pfutzner, H., Sachse, K.,** 1996. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders. Scientific and Technical Review. Offices International Des Epizooties 15, 1477–1494. Pinnow, C.
- Queen C., Ward A.C.S. and Hunter D.L.** 1994. Bacteria isolated from nasal and tonsillar samples of clinically healthy Rocky Mountain bighorn and domestic sheep. *J. Wildl. Dis.* 30: 1–7.
- Quinn, P.J. Carter, M.E. Markey, B. K. and Carter, G. R.** (2002): Veterinary Microbiology Microbial Diseases, Bacterial Causes of Bovine Mastitis, 8th Edition, MosbyInternational Limited, London, pp 465-475.
- Radostits, O.M. Gay, G. C.Blood, D. C. and Hinchillif, K..** (2000): Veterinary Medicine, 9th Edition, Harcourt Limited, London,pp..603-700.
- Reisner, A., Höller, B. M., Molin, S., Zechner, E. L.,** 2006. Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion. *Journal of Bacteriology*, 180, 3582-3588.
- Richard L. Sweet; Ronald S. Gibbs.** Infectious Diseases of the Female Genital Tract. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
- Roberts, A. P., Wilson, P., Mullany, P.** 1999.Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiology Letters*, 177, 63-66.
- Rowe, M. C.,Withers, H. L., Swift, S.** 2010. Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. *FEMS Microbiology Letters*, 307, 102–109.
- Ryan KJ, Ray CG** (editors) (2004). Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 409–12. ISBN 0-8385-8529-9.
- Sayner SL, Frank DW, King J, Chen H, VandeWaa J,Stevens T.** Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res* 2004;95(2):196-203.

- Schukken et al.** 2004. Chronic and Recurrent Coliforms: Implication for Lactation Therapy. NMC Annual Meeting Proceedings, pp35-40
- Schluter, P., Nadell, C. D., Bassler, B. C., Foster, K. R.** 2015. Adhesion as a weapon in microbial competition. *The ISME Journal*, 9, 139-149.
- Schauder, S.; Bassler, B.L.** The languages of bacteria. *Genes Dev.* 2001, 15, 1468–1480.
- 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.
- Shih PC, Huang CT.** Effect of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 309-314.
- Sillanpaa, J., Xu, Y., Nallapareddy, S.R., Murray, B.E. and Hook, M.** (2004) A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology* 150, 2069–2078.
- Sillanpaa, J., Nallapareddy, S.R., Houston, J., Ganesh, V.K., Bourgogne, A., Singh, K.V., Murray, B.E. and Hook, M.** (2009) A family of fibrinogen-binding MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology* 155, 2390–2400
- Singh, P.K.; Schaefer, A.L.; Parsek, M.R.; Moninger, T.O.; Welsh, M.J.; Greenberg, E.P.** Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000, 407, 762–764.
- Salyers AA, and D. D. Whitt.** Bacterial pathogenesis: a molecular approach. pp. 260-268, ASM Press, Washington, D.C., USA, 1994.
- Smith, R.S.; Iglewski, B.H.** *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J. Clin. Investig.* 2003, 112, 1460–1465.
- Songer JG, Post KW.** *Pseudomonas* ve *Burkholderia* Cinsleri ‘ Anđ Ö, Özgür EY(eds); Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi Hayvan Sağlığı Etkeni Olan Bakteriler Ve Mantarlar’ kitabında s.154-155, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2011.
- Taga, M.E.; Bassler, B.L.** Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 14549–14554.
- Thiercelin, E., and L. Jouhaud.** 1903. Reproduction de l’enterocoque: taches centrales; granulations peripheriques et microblastes. *C. R. Seances SOC. Biol. Paris* 5686-688
- Timoney J.F., Gillespie J.H., Scott F.W. and Barlough J.E.** 1988. Hagan and Bruner’s Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Toutain, C. M., Caizza, C. M., Zegans, M. E., O’Toole, G. A.** 2007. Roles for flagellar stators in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, 158, 471–477.

- Usher, LR, Lawson RA, Geary I, et al .** Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* 2002;168(4):1861–186
- Vaarst, M. and Envoldsen, C.,** 1997. Patterns of clinical mastitis in Danish organic dairy herd. *J. Dairy Sci.* 64: 23.
- Vidal DR, Garrone P, Banchereau J.** Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human Blymphocytes. *Toxicon* 1993;31:27-34.
- van Bodman, S.B.; Willey, J.M.; Diggle, S.P.** Cell-cell communication in bacteria: United westand. *J. Bacteriol.* 2008, 190, 4377–4391.
- VanDevanter DR, Van Dalfsen JM.** How much do *Pseudomonas* biyofilms contribute to symptoms of pulmonary exacerbation in cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol* 2005; 39: 504-6.
- Vendeville, A.; Winzer, K.; Heurlier, K.; Tang, C.M.; Hardie, K.R.** Making ‘sense’ of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3, 383–396.
- Wagner VE, Iglewski BH.** *P.aeruginosa* biyofilms in CF infection. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2008; 10: 8079-8090.
- Wang, X., Dubey, A. K., Suzuki, K., Buken, C. S., Babitzke, P., Romeo, T.** 2005. CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a Biyofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 56, 1648–1663.
- Waters, C.M.; Bassler, B.L.** Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005, 21, 319–346.
- Wenz et al.** 2004. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 219(7):976-981
- Wilson et al.** 1999. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 82:1664-1670.
- Wen, Z. T., Yates, D., Song-Joon, A., Burne, R. A.,**2010. Biyofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered When Grown in Dual-Species Model, *BMC Microbiology*, 10, 111-118.
- Wick MJ, Hamood AN, Iglewski BH.** Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol Microbiol* 1990;4(4):527-535.
- Widder, S., Bessemer, K., Singer, G. A., Ceola, S., Bertuzzo, E., Qince, C., Sloan, W. T., Rinaldo, A., Battin, T. J.** 2014. Fluvial network organization imprints on microbial co-occurrence networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 12799–12804.

- Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, et al.** Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1993;75(4):1661–1669.
- Withers, H.; Swift, S.; Williams, P.** Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001, 4, 186–193.
- Woods DE, Iglewski BH.** Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Rev Infect Dis* 1983;5(Suppl4):S715-722.
- Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, et al.** Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7907-7912.
- Yang, L., Borken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Tolker-Nielsen, T.** 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153, 1318–1328.
- Yohannes, A.** (2003): Clinical and sub-clinical mastitis: Faculty of Agricultural technology, Al-Salt University College, Al-salt
- Yoseph, M. Azage, T. Alemu, Y. and Umunna, N.N.** (1998): Reproductive management and reproductive performance of dairy herds in urban and peri-urban dairy production systems in Addis Ababa milk shed. In: proceeding of the 6th annual conference of ESAP, Addis Ababa, Ethiopia, 312-315.
- Zhang, W., Sikleika, T., Packman, A. L.,** 2013. Effects of fluid flow conditions on interactions between species in biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 84, 344–354

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı: Öztürk Melih
Uyruk: T.C
Doğum yeri ve tarihi: İzmir 12.11.1991
Telefon : +90 536 965 20 80
E-mail: melih.ozturk_@hotmail.com
Yabancı Dil: İngilizce, Almanca (Orta Seviye)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Devam ediyor
Lisans	ADÜ Veteriner Fakültesi	06/2015
Lise	İzmir Karşıyaka Merkez Anadolu Lisesi	06/2009

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2015 - 2016	Simurg İlaç ve Kimya San. ve Tic.Ltd. Şti.	Veteriner Hekim
2016 - 2017	Bostanlı Veteriner Kliniği	Veteriner Hekim
2017 -(2018 Halen çalışıyor)	Martı Veteriner Kliniği	Veteriner Hekim