

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Vitreoscilla* HEMOGLOBİN GENİ TAŞIYAN STRES ALTINDAKİ
REKOMBİNANT *Pseudomonas aeruginosa*'DA PİYOSİYANİN ÜRETİMİ**

DUYGU ÖZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
HAZİRAN 2011

Tezin Başlığı: *Vitreoscilla* Hemoglobin Geni Taşıyan Stres Altındaki Rekombinant *Pseudomonas aeruginosa*'da Piyosiyenin Üretimi

Tezi Hazırlayan: Duygu ÖZCAN

Sınav Tarihi: 27.06.2011

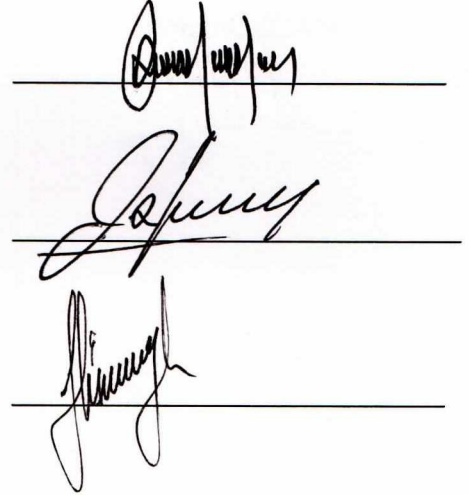
Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet Ümit ERDEMLİ (İnönü Üniv.)
(Jüri Başkanı)

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA (İnönü Üniv.)
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN (İnönü Üniv.)
(Danışman)



İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Asım KÜNKÜL
Enstitü Müdürü

Onur Sözü

Yüksek Lisans olarak sunduğum "***Vitreoscilla* Hemoglobin Geni Taşıyan Stres Altındaki Rekombinant *Pseudomonas aeruginosa*'da Piyosiyanin Üretimi**" başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Duygu ÖZCAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Vitreoscilla HEMOGLOBİN GENİ TAŞIYAN STRES ALTINDAKİ
REKOMBİNANT *Pseudomonas aeruginosa*'DA PİYOSİYANİN ÜRETİMİ

Duygu ÖZCAN

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

91 + ix sayfa

2011

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN

Bu tez çalışmasında, *Pseudomonas aeruginosa* ve onun *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) geni (*vgb*) klonlanmış rekombinant suşu kullanılmıştır. *P. aeruginosa*; bakteriler arasında bilinen en etkin pigment üreten bakteridir (özellikle piyosiyanın gibi). Rekombinant suş, *vgb*'yi tek kopya halinde (homolog rekombinasyon ile) taşımaktadır. Bu bakterilerin virülens faktör olan piyosiyanın üretimi; çeşitli karbon kaynakları, farklı çalkalama koşulları ve ağır metal varlığında araştırılmıştır. Ortam koşulları ve sıcaklık her iki bakterinin ürettiği piyosiyanın miktarını etkilemektedir. Ayrıca bu suşların; yüzme, titreme ve kayma hareketleri gibi çevreyi algılama sistemi tarafından gerçekleştirilen özellikleri de analiz edilmiştir. En aktif hareketin kayma hareketi olduğu ve VHb/*vgb* sisteminin flagella ile yapılan bütün bu hareketleri arttırdığı görülmektedir. Stres koşullarında önemli bir sekonder metabolit olan piyosiyanın üretiminde, özellikle bakterilerde VHb/*vgb* sisteminin solunumu ve büyümeyi de arttırmasından dolayı, çeşitli stres koşullarında bakteri için bir avantaj sağladığı görülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: *Pseudomonas aeruginosa*, *Vitreoscilla* Hemoglobini, Stres, Piyosiyanın.

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

PIYOCYANIN PRODUCTION UNDER STRESS IN RECOMBINANT *Pseudomonas aeruginosa* CARRYING *Vitreoscilla* HEMOGLOBIN GENE

DUYGU ÖZCAN

Inonu University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Institute of Natural Sciences

91 + ix pp

2011

Supervisor: Hüseyin KAHRAMAN, Assist. Prof.

In this study, we used *P. aeruginosa* and its recombinant strain which *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) gene (*vgb*) was cloned. *P. aeruginosa* is known to be the most efficient pigment-producing bacteria (especially pigments like pyocyanin). The recombinant strain carries a single copy of *vgb*. Production of virulence factor pyocyanin in these bacteria was investigated under different conditions including various carbon sources, different agitation conditions and the presence of heavy metals. Temperature and the other conditions effect the amount of pyocyanin production in both bacteria. In addition, characteristics of these strains such as swimming, tremor and slip movements performed by the sensory systems were analyzed. We saw that the most active movement was sliding and VHb/*vgb* system increases all those movements performed by flagella. Pyocyanin is an important secondary metabolite especially bacteria under stress conditions. VHb/*vgb* system which increases the respiration and growth was found to provide an advantage to the bacteria for pyocyanin production.

KEY WORDS: *Pseudomonas aeruginosa*, *Vitreoscilla* Hemoglobin, Stress, Pyocyanin

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında yardımını, önerilerini ve desteğini esirgemedi beni yönlendiren danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN'a,

Tez yazımı döneminde desteklerini esirgemeyen Biyoloji Bölümü Doktora öğrencileri arkadaşlarım Emel AYTAN ve Aslı Giray KURT'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

2010/106 nolu proje kapsamında bu çalışmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine,

Ayrıca beni maddi ve manevi açıdan destekleyen ve bugüne gelmemi sağlayan canım AİLEM'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Bakterilerde Pigmentasyon	2
1.2. Sekonder Metabolitler	4
1.3. Sekonder Metabolitlerin Temel Özellikleri	5
1.4. <i>Pseudomonas</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri	5
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Genel Özellikleri	8
1.6. <i>Pseudomonas</i> Cinsi Bakterilerin Sekonder Metabolitleri	11
1.7. Piyosiyenin Özelliği	12
1.8. <i>Pseudomonas</i> 'larda Metal Direnci	14
1.9. Bakteriyel (<i>Vitreoscilla</i>) Hemoglobin (VHb)	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayırıcılar	22
3.2. Araştırmada Kullanılan Bakteriler ve Saklanma Koşulları	22
3.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri	23
3.4. Kullanılan Karbon Kaynakları	23
3.5. Kullanılan Ağır Metal	24
3.6. Çalışmada Kullanılan Tuzlar	24
3.7. Kültür Koşulları	24
3.8. Piyosiyenin Analizi	24
3.9. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın Hareket Testleri	25
3.9.1. Kayma Testi	25
3.9.2. Yüzme Testi	25
3.9.3. Titreme Testi	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	26
4.1. Pa ve PaJC'nın ve <i>Pseudomonas</i> Broth P besiyerinde 37 °C'de piyosiyenin üretimi	26
4.1.1. Pa ve PaJC'ın karbon kaynağı olarak glikoz ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyenin üretim	27
4.1.1.1. Farklı miktarlarda glikoz içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	27
4.1.1.2. Glikoz ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	29
4.1.1.3. Glikoz ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	31
4.1.1.4. Glikoz ve CaCl ₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	33
4.1.2. Pa ve PaJC'ın karbon kaynağı olarak gliserol ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	35

4.1.2.1.	Farklı miktarlarda gliserol içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	35
4.1.2.2.	Gliserol ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	37
4.1.2.3.	Gliserol ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	39
4.1.2.4.	Gliserol ve CaCl ₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	41
4.1.3.	Pa ve PaJC'ın karbon kaynağı olarak sükroz ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	43
4.1.3.1.	Farklı miktarlarda sükroz içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	43
4.1.3.2.	Sükroz ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	45
4.1.3.3.	Sükroz ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	47
4.1.3.4.	Sükroz ve CaCl ₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	49
4.1.4.	Cd(NO ₃) ₂ içeren ortamda piyosiyenin üretimi	51
4.2.	Pa ve PaJC'ın 30 °C'de Piyosiyenin Üretimi	53
4.2.1.	Pa ve PaJC'ın karbon kaynağı olarak glikoz ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	53
4.2.1.1.	Glikoz ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	53
4.2.1.2.	Glikoz ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	55
4.2.1.3.	Glikoz ve CaCl ₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	57
4.2.2.	Pa ve PaJC'ın karbon kaynağı olarak gliserol ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	59
4.2.2.1.	Gliserol ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	59
4.2.2.2.	Gliserol ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	61
4.2.2.3.	Gliserol ve CaCl ₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	63
4.2.3.	Pa ve PaJC'ın karbon kaynağı olarak sükroz ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	65
4.2.3.1.	Sükroz ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	65
4.2.3.2.	Sükroz ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	67
4.2.3.3.	Sükroz ve CaCl ₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	69
4.3.	Pa ve PaJC'ın Yüzme, Titreme ve Kayma Hareketlerinin Analizi	71
4.3.1.	Kayma Testi Analizi	71
4.3.2.	Titreme Testi Analizi	72
4.3.3.	Yüzme Testi Analizi	73
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	74
5.1.	37 °C'de Farklı Karbon Kaynakları (glikoz, gliserol, sükroz) ve Tuz Koşullarındaki Piyosiyenin Üretimi	75
5.1.1.	Glikoz ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	75
5.1.2.	Gliserol ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	76
5.1.3.	Sükroz ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	77
5.2.	30 °C'de Farklı Karbon Kaynakları (glikoz, gliserol, sükroz) ve Tuz Koşullarındaki Piyosiyenin Üretimi	78

5.2.1.	Glikoz ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	78
5.2.2.	Gliserol ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	79
5.2.3.	Sükroz ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi	80
5.3.	Ağır Metal $[Cd(NO_3)_2]$ Varlığında Piyosiyenin Üretimi	80
6.	KAYNAKLAR	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	<i>P. aeruginosa</i> 'nın genom dizisi	7
Şekil 1.2	<i>P. aeruginosa</i> bakterisinin genel görüntüsü	8
Şekil 1.3	<i>P. aeruginosa</i> a) Şematik gösterim b) Elektron mikroskop görüntüsü	9
Şekil 1.4	<i>P. aeruginosa</i> 'nın ürettiği piyosiyanın molekülü	13
Şekil 1.5	Bakteriyel hemoglobin geni taşıyan bakteri <i>Vitreoscilla</i> 'nın taksonomik konumu	16
Şekil 3.1	pUT-miniTn5:vgb-Cm transpozaz sistemi	22
Şekil 4.1	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın <i>Pseudomonas</i> Broth P besiyeri içeren ortamda piyosiyanın düzeyleri	26
Şekil 4.2	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) % 1 glikoz (b) % 0.1 glikoz içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	28
Şekil 4.3	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	30
Şekil 4.4	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz KCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	32
Şekil 4.5	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz CaCl ₂ içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	34
Şekil 4.6	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) % 1 gliserol (b) % 0.1 gliserol içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	36
Şekil 4.7	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	38
Şekil 4.8	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol KCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	40
Şekil 4.9	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol CaCl ₂ içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	42
Şekil 4.10	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) % 1 süktroz (b) % 0.1 süktroz içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	44
Şekil 4.11	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 süktroz NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	46

Şekil 4.12	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 sükröz KCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	48
Şekil 4.13	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 sükröz CaCl ₂ içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	50
Şekil 4.14	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 100 ppm (b) 200 ppm Cd(NO ₃) ₂ içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	52
Şekil 4.15	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	54
Şekil 4.16	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz KCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	56
Şekil 4.17	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz CaCl ₂ içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	58
Şekil 4.18	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	60
Şekil 4.19	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol KCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	62
Şekil 4.20	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol CaCl ₂ içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	64
Şekil 4.21	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 sükröz NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	66
Şekil 4.22	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 sükröz KCl içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	68
Şekil 4.23	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 sükröz CaCl ₂ içeren besiyerlerinde piyosiyanın düzeyleri	70
Şekil 4.24	a) Pa'nın kayma hareketi b) PaJC'nın kayma hareketi	71
Şekil 4.25	a) Pa'nın titreme hareketi b) PaJC'nın titreme hareketi	72
Şekil 4.26	a) Pa'nın yüzme hareketi b) PaJC'nın yüzme hareketi	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PaJC	Kromozoma <i>vgb</i> entegre edilmiş rekombinant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Hb	Hemoglobin
VHb	<i>Vitreoscilla</i> hemoglobini
<i>vgb</i>	Bakteriyel hemoglobin sentezleyen gen
DNA	Deoksiribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
EPS	Ekzopolisakkarit
YYA	Yeterli yoğunluk algılaması
PA	<i>Pseudomonas</i> agar
PGA	<i>Pseudomonas</i> gliserollü agar
PBP	<i>Pseudomonas</i> Broth P besiyeri
mM	Milimolar
nm	Nanometre
μ M	Mikromolar
g	Gram
μ l	Mikrolitre
rpm	Dakikadaki dönme hızı (Dakikadaki çalkalama hızı)
L	Litre
mg	Miligram
OD	Optik dansitite

1. GİRİŞ

“Mikroorganizma” terimi bakteri, fungus, alg ve protozoaları da içeren mikro boyutlardaki geniş yelpazede birçok canlıyı tanımlamak için kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar insanların sahip olduğu birçok gene sahip olmalarının yanı sıra bizde olmayan bazı genleri de barındırırlar. Bakteriler, bunlar arasında ve hatta tüm canlılar arasında yerküre üzerinde en çok sayı ve çeşit içeren mikroorganizmalardır. Yapılan çalışmalar, dünyamızda 10^7 – 10^9 kadar farklı bakteri türünün olabileceğini göstermektedir. Bu bakterilerin bazıları patojenik özellik gösterirken, bazıları ise bu özelliği göstermezler.

Patojen bakterilerden biri olan *Pseudomonas aeruginosa* doğada, toprakta ve sulu ortamlarda yaşayabilen gram-negatif, aerobik hareketli bir bakteridir. *P. aeruginosa* ilk kez Fransız eczacı Carle Gessard tarafından mavi yara akıntılarında 1882 yılında tanımlanmıştır. 19. yüzyılın sonlarında ise hastanın tüm anatomik bölgelerinde enfeksiyon etkeni olarak belirlenmiştir. *P. aeruginosa* etkenli hastane kökenli ilk enfeksiyon, 1960 yılında anlaşılmış ve bu tarihten günümüze kadar nazokomiyal enfeksiyonlardan daha sık izole edilmiştir. Bu bakteri fırsatçı insan patojeni olup insanlarda nazokomiyal enfeksiyonlara neden olması, güçlü adaptasyon yeteneklerinin olması gibi sebeplerden dolayı çalışma konusu olmuştur. Bu fırsatçı patojen, çeşitli ciddi enfeksiyonlar (şiddetli yanık, AIDS, kanser) sonucu bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda veya kistik fibrozisli hastaların akciğerinde enfeksiyonlara neden olmaktadır [1-3]. *P. aeruginosa* enfeksiyonuna maruz kalmış kistik fibrozisli hastalarda, bu enfeksiyona sebep olan bakteri yüksek morbitide ve mortalitenin sebebi durumundadır [4].

P. aeruginosa aynı zamanda kataterler, kalp kapakları ve diş protezleri gibi vücut içi tıbbi cihazlarda da kolonize olmaktadır [1]. *P. aeruginosa*, virülanslığın ortaya çıkmasında rolü olan çok çeşitli hücre dışı ürün sentezler. Bu virülans faktörlerinin sentezlenmesi, hücre yoğunluğuna bağlı olarak düzenlenir ve pek çoğunun sentezlenmesi sürekli değildir [5].

Yeryüzünde birçok canlı, özellikle de mikroorganizmalardan *Pseudomonas* cinsi üyeleri, üreme ve çoğalmak için farklı karbon kaynakları (glukoz, gliserol, sükröz)

kullanarak ikincil metabolitler (ekzopolisakkarit, piyosiyenin ve ramnolipid gibi) sentezlemektedirler [6]. Biyodegradasyon yeteneği yüksek olan ve yüksek oranda EPS, ramnolipid ve özellikle piyosiyenin üretme yeteneğine sahip olan *Pseudomonas* sp. suşu bu çalışmada kullanımı amaçlanmıştır. Sekonder metabolitler, organizmanın herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyet gösteren özelleşmiş metabolik yollarla üretilirler. Sekonder metabolit olan piyosiyenin *P. aeruginosa* tarafından üretilen, suda ve kloroformda eriyen, mavi-yeşil pigment özelliğinde olan fenazin grubu kimyasal bir maddedir [7]. Bu çalışmada, bakterinin değişik ortam koşullarındaki ürettiği piyosiyenin spektroskopik analizi hedeflenmiştir.

Vitreoscilla hemoglobini (VHb) bakteriyel orjinli prokaryotik bir hemoglobindir. VHb geni (*vgb*) klonlanmış bütün yabancı organizmalarda, bu proteinin organizmalar üzerinde pozitif etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu etkinin özellikle belli oksijen seviyesi gerektiren işlemlerde daha gözle görülür olduğu belirlenmiştir. Bakterinin aerobik solunum yaptığı fakat düşük oksijen koşullarında daha aktif rol aldığı gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda VHb geni (*vgb*) klonlanmış *P. aeruginosa* suşu (PaJC) kullanılmıştır [8].

1.1. Bakterilerde Pigmentasyon

Gerek saprofit ve gerekse patojen mikroorganizmalar arasında pigment adı verilen renkli maddeler oluşturabilen türler vardır. Bunlar katı ortamlarda üretildikleri zaman cinslerine ve türlerine özel renkte koloniler oluştururlar. Pigmentler; “Fotosentetik Olanlar” ve “Fotosentetik Olmayanlar” olmak üzere ikiye ayrılırlar. Fotosentetik olmayan suda erimeyen bu pigmentler; koloni içerisinde kalırlar ve kolonilerin renkli görünmelerine yol açarlar. Kolonilerden dışarı çıkmadıkları için ortama yayılamazlar. Suda eriyebilen pigmentler mikroorganizmalar tarafından sıvı veya katı besi yerinde üretildiklerinde ortama geçebilir ve bunların renkli bir görünüm almasına sebep olurlar [9].

Bakteriler kendi hücreleri içerisinde kalan veya bulundukları ortama salgıladıkları bazı renkli maddeler üretirler. Çoğu mikroorganizmalardan özellikle *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Microbispora*, *Sorangium* ve *Brevibacterium* cinsi üyelerinin pigment ürettiği bildirilmiştir [10]. *Pseudomonas* cinsi bakteriler çeşitli

fenazin türevi olan pigmentler üretirler. *Pseudomonas* türlerinin piyoverdin, piyosiyanin, piyorubin ve piyomelanin adı verilen çeşitli pigmentler oluşturdıkları ve bu pigmentler sayesinde seçici bir özellik kazandıkları bildirilmiştir [11] Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, fluoresens *Pseudomonas* cinsinden özellikle de besiyeri içerisinde mavi-yeşil piyosiyanin pigmentini üreten *P. aeruginosa* ile çalışılmıştır. Şimdiye kadar çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen yaklaşık olarak 30 farklı fenazin bileşiği tanımlanmıştır. Fenazin, aynı zamanda *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından üretilen antifungal antibiyotik benzeri maddelerdir [3]. Fenazinler, kültürlerden organik çözücüler yardımıyla izole edilmişlerdir. Sonuçta, çeşitli fenazin pigmentlerinin üretimi ve biyosentetik yolları bilinmektedir [12-13]. *Pseudomonas* sp.'leri arasında fluoresens *Pseudomonas*'lara ait birçok suşla ve *P. cepecia* grubunun bazı üyeleri tarafından fenazin üretilmektedir. Özellikle, fenazin pigmentlerinden piyosiyanin sadece *P. aeruginosa* tarafından üretilmektedir.

Kısaca bakteriyel pigmentler yapılarına göre 6 sınıfta toplanır:

Karotenoidler: Bu tür pigmentler isimlerini doymamış bir hidrokarbon olan karotenden alırlar. Bunlar; sarı, kırmızı ve turuncu renkte olup suda erimezler. Buna karşılık alkol, eter, kloroform ve karbon sülfürde erirler. Vitamin ağının öncülü olan karoten yağı yumurta sarısı ve havuçta bulunur.

Antosiyaninler: Su ve alkolde eriyen buna karşılık eterde erimeyen meyve ve bitkilerde sıkça rastlanan glikozit karakterde kırmızı, mavi renkte pigmentlerdir. Bu grup pigmentler en fazla *Streptomyces* ve *Actinomyces* türlerinde bulunur.

Melaninler: Melaninler solventlerde erimeyen bir yapı gösterirler. Genellikle siyah, esmer ve kırmızı renkte olan pigmentlerdir.

Fenazin Perivatları: Bu tür pigmentler suda ve alkolde erirler. *P. aeruginosa*'nın piyosiyanini bu gruptandır.

Kinonlar: *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Mycobacteri*'lerde rastlanan kinonlar suda erimezler.

Piroller: *Sarcina marcesens*'teki pigmentlerdir [9].

Pigmentli bakteriler laboratuvarında uzun zaman pasaj yapılırsa veya anaerobik koşullarda üretilirse pigment formasyonunu kaybetmektedirler. Pigment yoğunluğu ve miktarı türler arasında farklılıklar gösterir.

1.2. Sekonder Metabolitler

Doğada yaygın olarak bulunan birçok mikroorganizma ticari olarak önemli primer (aminoasit, proteinler, karbohidratlar, vitaminler, aseton, etanol, organik asitler v.s) ve sekonder metabolitler (antibiyotikler, toksinler, alkoloitler v.s) üretirler. Primer metabolitler, bakteri gelişimine paralel olarak mikroorganizmanın gelişme fazının başlangıcında oluşurken bakterilerin gelişimi ve üremesi için gerekli olmayan sekonder metabolitler ise gelişme fazının sonuna doğru ya da durağan fazda sadece bazı mikroorganizmalar tarafından üretilir [7]. Sekonder metabolitler; organizmanın hayatta kalmasını, yumurta veriminin artmasını tetikleyebilir ancak nadiren hiçbir değişikliğe sebep olmayabilir [9]. Tipik bir mikrobiyal üretimde, primer büyüme fazı esnasında alkol fermentasyonunda olduğu gibi ürün (etanol) oluşur. Sekonder metabolit denilen ikincil metabolitlerin birçoğu önemli metabolitler olup, biyolojik olarak aktif bileşiklerin zengin bir kaynağını sunarlar ve bu metabolitler endüstriyel alanda oldukça önem taşırlar. Sekonder metabolitler prokaryot, alg, mantar, böcek ve çeşitli bitki türlerinde büyük çeşitlilik gösterirler. Bu canlılarda ikincil metabolit üretimi benzer biyokimyasal yollar ve genlerle kontrol edilir [14].

Mikrobiyal sekonder metabolitler, insanlar, hayvanlar ve bitkiler için önemli olan ajanlar, reseptör antagonistleri ve agonistleri, pestisitler, antitümör maddeleri, hayvan ve bitkilerin büyüme hızlandırıcı immünmodülatör antibiyotikler, pigmentler, toksinler, feromonlar, enzim inhibitörlerini içerir. Genel olarak sıradışı yapılara sahip olan sekonder metabolitler; sağlık, beslenme ve toplumun ekonomisi üzerinde büyük bir etkisi vardır. Sık sık ve alışılmadık yapılara sahip olan sekonder metabolitler; besinler, büyüme hızı, geri beslemeli kontrol, enzim inaktivasyonu ve enzim indüksiyon tarafından düzenlenir. Sekonder metabolitlerin sentezi genellikle kromozal DNA ve nadiren plasmid DNA'sındaki genler tarafından kodlanmıştır [15]. Primer metabolizmadan farklı olarak sekonder metabolizma süreçleri hala tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Bu yüzden sekonder metabolitler enzimoloji, kontrol ve farklılaşma üzerine temel araştırmalar için fırsatlar sağlar. Sekonder metabolizma; besin, biyosentez, indükleyicilerin ilavesi ile veya gelişim oranındaki azalmayla ortaya çıkar [7].

Ayrıca sekonder metabolitlerin çoğu tedavi edici, yem ilavesi gibi amaçlar için kullanılmaktadır. Bu şekilde endüstriyel açıdan önemli olan metabolitler daha ekonomik

ve kolay olarak elde edilebilir. Bu bağlamda sekonder metabolitlerden en iyi bilinenlerden birisi antibiyotiklerdir [16-17]. Antibiyotikler ve diğer sekonder metabolitler mikroorganizmaların ticari önemini arttırmaktadır. Sekonder metabolizma üzerinde yapılacak çalışmalar için yüksek üretim kapasitesi ile endüstriyel önemi olan suşlarının sekonder metabolitlerini seçmek önemlidir [12]. 1995 yılında, yaklaşık % 55 bakteriler tarafından üretilen 12,000 antibiyotik tanımlanmıştır [18]. Sekonder metabolitlerin çoğu DNA ve protein sentezi, sinir sistemi, kalp aktivitesi ve mikrotübül yapısı modülasyonun inhibisyonu gibi güçlü biyolojik etkilere sahiptir [14].

1.3. Sekonder Metabolitlerin Temel Özellikleri

- Sekonder metabolitler, çoğalma ve üreme için gerekli olmayan bir özelliktedirler.
- Sekonder metabolitlerin oluşumu, özellikle ortamın kompozisyonu olmak üzere üreme koşullarına son derece bağlıdır. Sekonder metabolit oluşumunun baskılanması sıklıkla gerçekleşir.
- Sekonder metabolitler çoğu kez yakın ilişkili bileşiklerin bir grubu olarak üretilirler. Örneğin, *Streptomyces*'in bir türünün tek bir suşunun, 30'un üzerinde ürünle ilişkili olduğu bulunmuştur. Fakat bunlar, farklı antraksilin antibiyotikleridir.
- Sekonder metabolitlerin aşırı üretimi çoğu kez mümkün olurken, primer metabolizmaya bağlantılı olduklarından primer metabolitler, genelde yüksek oranda üretilmeleri mümkün değildir [19].

1.4. *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Pseudomonas cinsi, *Pseudomonadaceae* ailesine ait olup, düz veya hafif kıvrık çubuk şeklindedir. *Pseudomonas* ilk kez Fransız eczacı Carle Gessard tarafından mavi yara akıntılarında 1882 yılında tanımlanmıştır [3]. *Pseudomonas*lar gram negatif, zorunlu aerob ve tek flagellalı mikroorganizmalardır. *P. mallei* hariç bütün türlerde flagella vardır. Buna rağmen flagellasız suşlar zaman zaman izole edilebilmektedir [20]. Hareket, bir veya birkaç polar flagella ile sağlanır, bazı türleri farklı uzunlukta lateral flagellaya sahiptir, nadiren hareketsizdirler [21]. Polar flagellaların sayısı önemli bir taksonomik karakterdir. Sahip olduğu flagella ve pilileri sayesinde kayma, titreme, yüzme hareketini gerçekleştirirler. *P. aeruginosa* suşlarının hareketli olmaları, besin

ortamından yeterince yararlanmalarını sağlar. Ayrıca *Pseudomonas* cinsi üyeleri, karbon kaynağı olarak kullandıkları şeker gibi ilgi duyduğu moleküllere kemotaksisini flagellası aracılığıyla sağlar. İnsanlarda hastalıklara neden olan *Pseudomonas*'lar, enfeksiyonun erken safhalarında konak canlıya tutunma ve dokuda yayılmak için flagellalarını kullanırlar. *Pseudomonas* sp., oksidaz pozitif veya negatif, katalaz pozitiflerdir [7].

rRNA/DNA oranına ve karakteristik testlere göre *Pseudomonadaceae* familyası birbiriyle ilişkili 5 grupta sınıflandırılır. Gruplar arasındaki farklılıklar 7 tip teste dayanır. Bu testler:

- a) Koloni Yapısı,
- b) Koku,
- c) Fenazin Pigmentlerinin Üretimi,
- d) 42 °C'de Üreyebilme Yeteneği,
- e) Jelatin Sıvılaştırma,
- f) Denitrifikasyon,
- g) Özel Karbon bileşiklerini kullanarak farklılaşmış büyüme örnekleri gösterme olarak sayılır [22].

Pigmentasyon, *Pseudomonas* cinsi üyelerinin genel bir özelliğidir, ancak pigment oluşturmeyen türlere de sahiptir. Pigmentasyon yapan türleri morfolojik olarak ayırt etmekte kolaydır [23].

Pseudomonas cinsinin bazı türleri 4 °C'de üreyebilirken, ancak çoğu 30-37 °C arası optimal gelişim sıcaklığına sahip mezofilik bakterilerdir. Bazı türleri 42 °C'de üreyebilir. Bir çok türü, asidik şartlarda (pH 4.5) gelişemezler. *Pseudomonas* grubu bakteriler, toprak bakterileridir [24-25].

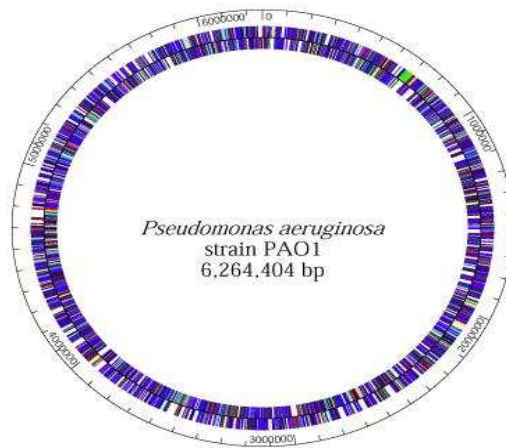
Birçok *Pseudomonas* türü amonyum tuzlarının ve tek bir karbon kaynağının bulunduğu ortamlarda gelişebilirler. Ancak bu gruba dahil olan bakteriler, fermentatif ve fotosentetik değildir [7]. *Pseudomonas* cinsi bakteriler doğada özellikle havada, toprakta ve sularda yaygın bulunmalarından dolayı çoğunun direkt izolasyonu yapılabilmektedir [26].

Cins üyelerinin bir kısmı bitkiler, hayvanlar ve insanlar üzerinde patojenik özellikler gösterirler. *Pseudomonas* cinsi üyeleri sahip olduğu virülans faktörlerinden dolayı insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde enfeksiyona sebep olurlar [27]. Bu virülans

faktörlerden en iyi bilinenleri; ekzotoksin A, fosfolipaz C, proteaz, pili, ekzopolisakkaritler, pigmentler ve ramnolipidlerdir [2, 28]. Bu virulans faktörlerden ekzopolisakkarit kapsül, pigmentler ve ramnolipidler *Pseudomonas*' lar tarafından üretilen sekonder metabolitler olarak adlandırılmaktadırlar [18, 29]. Bu metabolitler bakterilerin hayatta kalmasını ve diğer bakterilerle rekabet etmelerini sağlamaktadır. Örneğin, suda çözünebilen bir sekonder metabolit olan piyosiyenin, ökaryot hücrelerin de bulunduğu çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir [30].

Bakterilerdeki dış membran, bazı enterik bakterilerde olduğu gibi hücreyi konakçının hidrolitik enzimlerinden korumaktadır. Membran üzerindeki protein yapısındaki porlar küçük molekül ağırlığına sahip maddelerin geçmesine izin verirken, antibiyotik gibi büyük moleküller dış membrana yavaş penetre olmaktadır. Gram negatif bakterilerin antibiyotiklere yüksek oranda direnç göstermelerinin sebebi bununla izah edilebilir [31].

Pseudomonas cinsi bakterileri genetik çalışmalarda da yaygın olarak tercih edilmektedir. Bunun nedenleri; hava, su ve toprakta yayılım göstermesi, medikal açıdan önemi, beslenme ve biyokimyasal çok yönlülüğe sahip olmaları ile laboratuvar ortamlarında minimum şartlarda çok kolay bir şekilde üreyebilmesi ve izolasyonun kolay olmasıdır. Genetik araştırmalar yönünden çeşitli fonksiyona sahip *P. aeruginosa* PAO1 suşu oldukça detaylı çalışılmıştır ve bu suşun genom dizisi belirtilmiştir. Bakterinin genom büyüklüğünün 6, 264, 403 bp olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.1)[32].

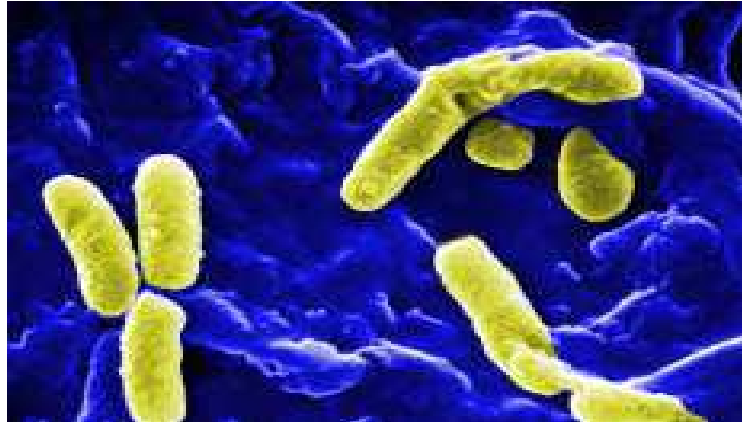


Şekil 1.1. *P. aeruginosa*'nın genom dizisi (İnternet sitesi).

Birçok organik bileşik *Pseudomonas* türleri tarafından mineralize edilebilir. Bu bakterilerin biyolojik iyileştirme ve biyolojik yıkım yetenekleri oldukça gelişmiştir. Bakteriler bu bileşikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar [16].

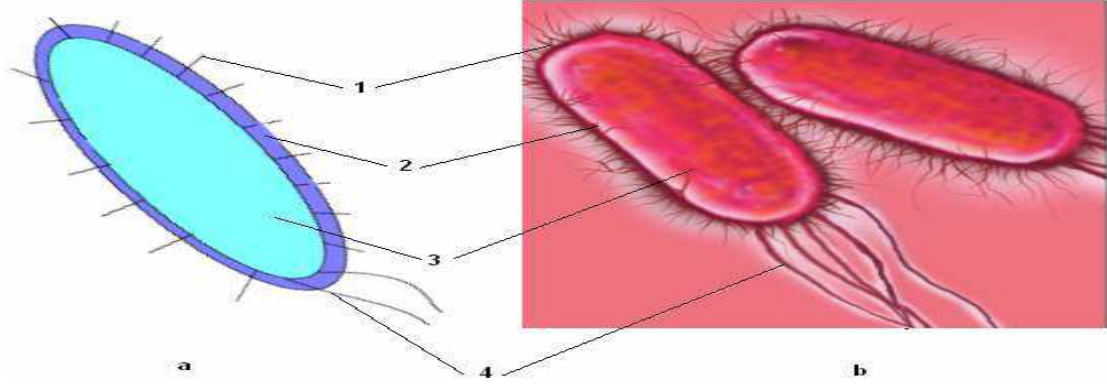
1.5. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Genel Özellikleri

P. aeruginosa, toprakta, bataklık ve sahil deniz habitatları, bitki ve hayvan dokuları gibi ortamlarda yaşayabilen gram-negatif, çubuk şeklinde hareketli bir bakteridir. Bu mikroorganizmaların boyları ortalama 0.5-1 µm (en) ile 1.5-4 µm (boy) arasındadır. (Şekil 1.2). *P.aeruginosa*'nın genom büyüklüğü, bileşimi % 65 G + C olmak üzere 5.9Mb'dır [20].



Şekil 1.2. *P. aeruginosa* bakterisinin genel görüntüsü (Wikipedia, İnternet sitesi)

P. aeruginosa, tek bir kutupta birkaç flagellaya sahiptir (Şekil 1.3). Flagella bakterinin katı besi yerine yerleşmelerine yardımcı olur. Sıvı besi yerindeki hareketleri olan yüzme hareketini de flagella ile gerçekleştirirler. *Pseudomonas* pilusları, tip IV olarak adlandırılan sınıfa aittir. Piluslar epitel hücrelere ve mukozal yüzeylere tutunmasında önemli role sahiptir. Pilusların ucu konak hücre yüzeyine tutunmadan sorumludur. Flagellin ve pili, yapısına, fonksiyonuna ve genetik organizasyonuna göre değişik çeşitlilik gösterirler.



Şekil 1.3. *P. aeruginosa* a) Şematik gösterim b) Elektron mikroskop görüntüsü (Roche, İnternet sitesi).
1- Pilus, 2- Lipopolisakkarit, 3- Hücre içi, 4- Flagella

En iyi üreme ısıları 37 °C dir. *P. aeruginosa* ve bazı türleri 42 °C 'de de üreyebilirler, fakat 4 °C de üremezler. Besiyerlerinde rahatlıkla ürediklerinden dolayı kolayca izole edilebilirler. *P. aeruginosa* fermentasyon yapmaz, tipik floresans pigmentlerine sahiptirler. MacConkey Agar'da mavi-yeşil rölfe vererek ürerler. Bu görünüm piyosyanin pigmentinden kaynaklanmaktadır. Adi agarda ve sıvı besi ortamında mavi-yeşil renk oluşur. *P. aeruginosa* tipik olarak; piyosyanin, elastaz, proteaz, ramnolipid, ekzotoksin A, ekzoenzim S, aljinat, lipopolisakkarit, ekzopolisakkarit, lipaz adı verilen virülans faktörleri üretirler. Ayrıca *P. aeruginosa* piyosin adı verilen ve diğer bakterileri öldüren bakteriyosinleri de üretir [13].

P. aeruginosa birçok çeşit pigment üretebilme kapasitesine sahiptir. Piyosyanin, suda ve kloroformda eriyen, fluoresans vermeyen fenazin grubundan mavi-yeşil pigment özelliğinde olan kimyasal bir maddedir. Piyoverdin, fluoresans grupta yer alan suda eriyen, kloroformda erimeyen, ultraviyole ışığında fluoresans veren, sarı-yeşil renkte bir pigment grubunu ifade eder. Piyosyaninin türevi olan piyoselin, *P. aeruginosa*' ların sideroforlarından biridir. Biyogenetik olarak, salisilik asit ve sisteinin iki molekülünün kondensasyon ürünüdür. Piyorubin, bazı *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilen parlak kırmızı renkte, kloroformda çözünmeyen ancak suda çözünen bir fenazin pigmentidir. Düşük oksijen konsantrasyonunda geri dönüşümsüz olarak rengini yitirir. Tüm pH derecelerinde kırmızı renktedir. Piyomelanin, *P. aeruginosa* kökenlilerin % 2-3' ü tarafından oluşturulan ve başka hiçbir bakteri tarafından sentezlenmeyen, suda eriyen, kahverengimsi-siyah renkte bir pigmenttir [13].

P. aeruginosa, insanlarda hem akut hemde kronik akciğer hastalıklarına sebep olan gram (-) bir bakteridir. Özellikle immün sistemi baskılanmış bronşit ve kistik fibrozisli hastaların solunum yolu hücrelerinde kolonize olup doku hasarına neden olurlar [1, 6, 12]. Bu bakteri sayısız protein ve sekonder metabolite sahiptir. Bunların çoğu insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde ve çeşitli mikroorganizmalarda patolojik etkiye sahiptir [5]. *P. aeruginosa*'nın patojenliği insanda çeşitli enfeksiyonlara neden olan virülans faktörlerinden kaynaklanmaktadır.

P. aeruginosa çoğu doğal yaşam alanında katı ve sıvı yüzeylerde biyofilm adı verilen yapılar içerisinde canlılıklarını sürdürürler. Bakteriyel biyofilmler doğal olarak çoğu ıslak yüzeyde yaygındır ve bunlar çevresel sorunlara yol açabilirler. Çoğu inatçı enfeksiyonların sebebi olan biyofilmlerin genel özelliği antimikrobiyal direnç göstermeleridir. Bu bakterinin oluşturduğu biyofilmler, bütün bakteriyel enfeksiyonların % 65'den sorumludur. Kronik olarak bu bakteri ile enfekte olmuş kistik fibrozis hastalarda en iyi biyofilm örneği görülmektedir [1]. Bakteriyel komünitenin gerçekleşmesi için de biyofilm gereklidir. Hücreler arasında iletişimin olması için bakterilerin çeşitli hareketleri gerçekleştirmeleri gerekir [11, 33] *P. aeruginosa*'da hareket mikrobiyolojik fizyolojisinde en etkili özelliklerden biridir. Bu bakteriler yüzme, titreme ve kayma şeklinde üç çeşit hareket gösterirler [21]. Kayma, yüzme ve titreme hareketi tek bir azot kaynağı olmak şartıyla, düşük miktarda agar (% 0.5-0.7) ilavesiyle gerçekleşir [26].

Yeterli yoğunluk algılaması (YYA); bakterilerin salgıladıkları kimyasal maddeler aracılığı ile birbirleri ile haberleşmeleri ve iletişim kurmalarıdır. Hücrenin bireysel davranış yerine, organize bir topluluk olarak davranış göstermesi YYA olarak tarif edilir. YYA kümeleşme, hareket, biyofilm oluşturma, antibiyotik sentezi, virülans faktörler gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynar [34]. YYA sistemi iki gen tarafından kontrol edilir. Bunlar otoindükleyiciler tarafından düzenlenen *las* ve *rhl* gen sistemleridir. Bunlardan *las* sistemi; LasA proteaz, LasB proteaz (elastaz), alkalın proteaz, ekzotoksin A ve LasI gibi virülans faktörlerinin ifadesini kontrol ederken, *rhl* sistemi; LasA proteaz, LasB proteaz, RhlI ve piyosiyenin ifadesini düzenlemektedir [35-36].

P. aeruginosa toprak, rizosfer, tatlısu ve denizdeki çevresel kirliliği yüksek oranda giderebilme yeteneğine sahiptir. Bu kirliliği gidermek için pili, aljinat ve lipopolisakkarit gibi hücre ilişkili faktörler ile toksinler (ekzotoksin A ve ekzoenzim S),

proteazlar (elastaz, LasA proteaz ve alkalın proteaz), hemolizinler (fosfolipaz ve ramnolipid) gibi virölans faktörler görev almaktadır [36].

P. aeruginosa salgıladığı bir diğer virölans olan ekzotoksin ile ökaryotik hücrelerdeki protein sentezini inhibe etmektedir [37]. *P. aeruginosa* tarafından üretilen fenazinler, insan solunum yolu epitel hücrelerindeki immünomodilatör proteinlerin ifadesini de değiştirebilmektedir [5].

1.6. *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Sekonder Metabolitleri

Pseudomonas sp.' ların sekonder metabolitleri hakkındaki araştırmaların bir çoğu saf ürünlerin izolasyonu sonrasında terk edilmiştir. Fenazin ve piyrolnitritin sentezinin haricinde sekonder metabolitlerin biyosentezi, genetiği ve regölasyonu hakkındaki mevcut bilgiler çok azdır. Yine de *Pseudomonas* sp.' ların biyokimyası ve genetiği üzerine yapılan araştırmalara sekonder metabolitler ile ilgili olan araştırmaların katılması, sekonder metabolizmanın aydınlatılması açısından önemlidir [12]. Bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilen molekül ağırlığı 2500 kDa' dan az 100,000 sekonder metabolit tanımlanmıştır [18]. Son yıllardaki çalışmalar yabancı tip *Pseudomonas*' ların pigmentlerinin, bu *Pseudomonas*' ların pigment oluşturmayan mutant suşları arasındaki gelişim ve rekabete odaklandığını göstermiştir. Pigment oluşturan yabancı tip *Pseudomonas*' ların mutantlarına göre çevrede canlı kalabilme şansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [7]. Floresens *Pseudomonas* sp.'lerin ürettiği metabolitlerin tedavi amaçlı kullanımına dayalı ilk araştırmalar 80 yıl öncesine dayanmaktadır. O zamandan bu yana izole edilen önemli miktarlardaki antibiyotik bileşikler arasında piyosiyenin ve piyrolnitritin, nadiren de pseudomonik asit pratik olarak uygulamalarda kullanılmıştır. *Pseudomonas* sp.'ların biyokimyası ve genetiği üzerine yapılan araştırmalara sekonder metabolitler ile ilgili olan araştırmaların katılması, sekonder metabolizmanın aydınlatılması açısından önemlidir [12]. Bundan dolayı antibiyotik üreten *Pseudomonas*' ların etkin bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanımı ön görölmektedir.

P. aeruginosa son yıllarda artan insidansı, ürettiği virölans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli yükselen antibiyotik direnç oranlarıyla sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek, tedavisi güç infeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakterinin

virölans faktörlerini hücre ile ilişkili ve hücre dışına salınan faktörler olarak inceleyebiliriz [38].

P. aeruginosa çeşitli virölans faktörleri üretmektedir. Endüstriyel alanda birçok kullanıma sahip olan bu faktörler;

piyosiyanin,
elastaz,
proteaz,
ramnolipid,
ekzotoksin A,
ekzoenzim S,
aljinat,
lipopolisakkarit,
ekzopolisakkarit,
ve lipazdır.

Bu virölans faktörlerden olan ekzopolisakkaritler, pigmentler ve ramnolipidler *Pseudomonas*' lar tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir [7].

EPS' nin yüzey gerilimini azaltarak kirli alanların temizlenmesi (biyoremediasyonu) ve birçok endüstriyel uygulamalarda kullanılan biyoemülsülfiye aktivitesini bildirmişlerdir. EPS'nin ticari biyosüpfektanlardan daha yüksek emülsülfiye yeteneği olduğu birçok çalışmada test edilmiştir [39].

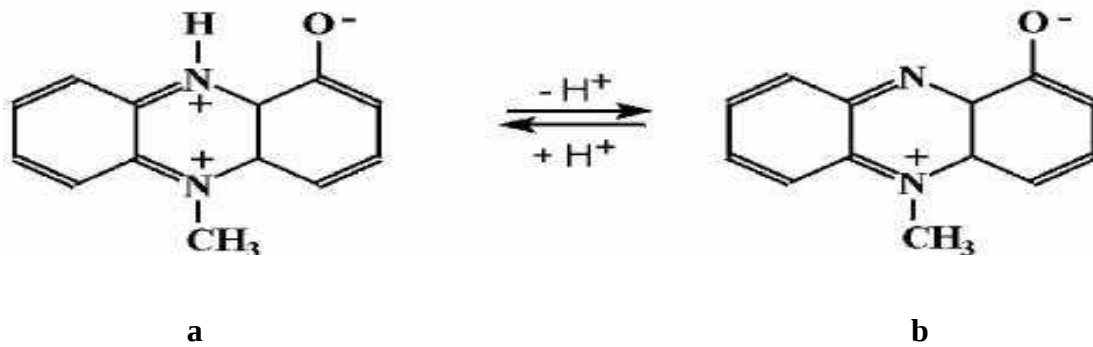
Ramnolipid biyosüpfektanlar, çevrenin kendi kendisini yenilemesini sağlayan bileşiklerdir. *P. aeruginosa* suşının ramnolipid bileşikleri ile biyolojik yıkım yeteneği oldukça fazladır. Yapısındaki ramnoz içeren glikolipid sayesinde biyosüpfaktan etki gösterir. Deterjan benzeri etkisiyle akciğer süpfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirerek fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosiliyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder [38].

1.7. Piyosiyanin Özelliği

Fenazin pigmentleri 19. yy.'ın sonlarından itibaren tanımlanmaya başlanmıştır. *Pseudomonas* cinsi üyelerinin ürettiği bu pigmentler aynı basit yapılara sahiptir. Bu fenazin pigmentlerinin çoğu suda veya kloroformda eriyebilme ve gelişim boyunca birikebilme yeteneğine sahiptir [40]. Fenazin pigmentlerinden önemli olan ve en çok

çalışılanlarından bir tanesi piyosiyandır. Piyosiyanın fenazin pigmentlerinin ilk tanımlanmasından bu yana çoğu çalışmada araştırma konusu olmuştur. Pigmenti ilk olarak Gessard (1890) kompleks bir ortamda *P. aeruginosa*'nın çoğalmasını takiben izole etmiştir. Jordan (1899) ise piyosiyanın üretimine ilişkin kimyasal ortamları tanımlamıştır. Laktik, asetik veya sitrik asitin amonyum tuzları ilavesiyle ya da asparajin ile tuz karışımı bir ortamda pigmentin miktarı artmaktadır. Karbon kaynağı olarak genelde gliserol kullanılır. Çeşitli besi ortamlarında piyosiyanın miktarı da farklı olmaktadır. Pigmentin orjinal yapısı Wrede ve Strack (1929) tarafından gösterilirken, son kabul edilen çift halkalı yapısı Hilleman (1938) tarafından ifade edilmiştir [3]. Bu pigment bakterinin hem patojenite hem de fizyolojisinin belirlenmesinde kullanılan önemli faktörlerden birisidir [41].

Pek çok *P. aeruginosa* suşu bakteriyal kolonilere mavi-yeşil renk veren piyosiyanın (N-metil-1-hidroksifenazin) pigmentini üretirler. Piyosiyanın, suda ve kloroformda eriyen, fluoresans vermeyen fenazin grubundan mavi-yeşil pigment özelliğinde olan öncü molekülü korizmik asitten son hali üç halkalı piyosiyanine sentezlenen kimyasal bir maddedir (Şekil 1.4). Sıvı besiyerlerinden yapılmış bakteri kültürlerine eşit miktarda kloroform eklenir ve çalkalanırsa bu pigment besiyerinin içinde çökmüş halde bulunan kloroform içerisinde kristalize olarak mavi-yeşil renkte gözlenir [16, 41].



Şekil 1.4. *P. aeruginosa*'nın ürettiği piyosiyanın molekülü a) nötr veya bazik pH'ta zwitteriyon olarak davranır ve mavi renklidir b) asidik ortamda ise kırmızı renklidir [42].

P. aeruginosa tarafından üretilen düşük molekül ağırlığına sahip olan piyosiyanin molekülü, insan, hayvan ve çeşitli mikrobiyolojik canlılar üzerinde önemli derecede patojenite gösteririr [43]. Bu pigmentin üretimi çevreyi algılama sisteminin kontrolu altındadır. QS sisteminin kontrol geni olan *rhl* sistemi, piyosiyanin üretimi için kontrol basamağını oluşturmaktadır [36].

Sadece *P. aeruginosa* tarafından üretilen bu pigment oksijenin toksik şekilleri olan süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerinin üretimini katalizler [43-44]. Bir demir bağlayıcı siderofor olan piyoselin varlığında doku hasarına yol açabilen daha toksik hidroksil radikallerini üretir. Piyosiyanin, inflamatuvar cevabı uyardığı, hücre solunumunu inhibe ettiği, siliyer fonksiyonları bozduğu, epidermis çoğalmasını durdurduğu, prostasiklin salgınımına yol açtığı, kalsiyum homeostazını bozduğu saptanmıştır [38]. *P. aeruginosa* ile enfekte olan kistik fibrozisli hastaların pulmoner sekresyonlarında tespit edilmiştir ve akciğerlerde hasara sebep olduğu kanıtlanmıştır [45]. Piyosiyanin ayrıca oksitlenmiş glutatyon seviyesini arttırmaktadır [46]. Bunun dışında, nötrofillerde apopitozisi uyarır [47-48]. Piyosiyanin aynı zamanda pek çok mikroorganizmaya karşı antibiyotik aktivite göstermektedir [43]. Bu özellik *P. aeruginosa* 'nın bulunduğu ortamda mikroorganizmalara karşı rekabet şansını artırır.

1.8. *Pseudomonas* ' larda Metal Direnci

Pseudomonas civa, arsenik, kadmiyum, telluriyum, krom ve gümüş gibi bir çok toksik metal iyonuna dirençlidir. Bu direnç genlerinin pek çoğu plazmit tarafından kodlanır. Nadiren kromozom üzerindeki regulatör genlerce kodlanır.

Civa: Bu toksik bir ağır metaldir. *Pseudomonas* 'taki çeşitli proteinler civanın taşınmasında rol oynarlar. MerA isimli protein, Hg^{2+} 'yı Hg^0 'a dönüştürür bu da bakteride direnç oluşumunu sağlar.

Bakır: Bu bir major mikrobeseleyicidir. Elektron transportu ve redoks reaksiyonlarında rol alan protein ve metalloenzimlerin bileşiminde bulunur. Bakteride normal olarak bakırın Cu (I) ve Cu (II) formları bulunur. Bakır aynı zamanda toksik olmayan radikal oluşumunda da rol oynar.

Kadmiyum: Bu metal bakteriler için oldukça toksiktir. *P. putida* kadmiyumla şelat oluşturarak onun toksisitesini azaltan düşük molekül ağırlıklı protein üretmektedir.

Ayrıca kadmiyumun effluks sistemiyle hücreye alınımını azaltarak, bakteride kadmiyum direncinin oluşmasına katkıda bulunur.

Arsenik: *Pseudomonas* grubu bakteriler, ürettikleri redüktazlar ile toksik olan As (III)'u, daha az toksik olan As (IV)'e dönüştürerek direnç sağlarlar.

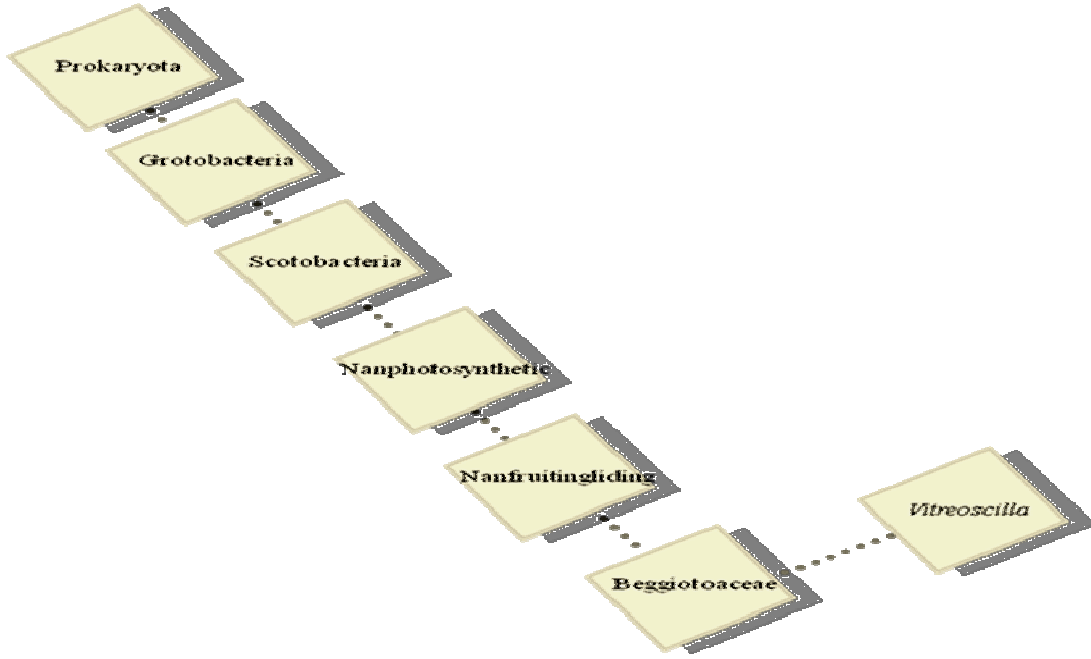
Krom: Toprak kökenli pek çok *Pseudomonas* suşu, toksik olan Cr (VI)'yı daha az toksik olan Cr (III)'e ürettikleri redüktazlar ile çevirirler [22].

1.9. Bakteriyel (*Vitreoscilla*) Hemoglobin (VHb)

Zorunlu aerobik bakteri *Vitreoscilla* bir homodimerik hemoglobin (VHb) sentezler. Sınıflandırmada mor fotosentetik bakterilerin bir alt bölümünde yer alan *Vitreoscilla*, *Beggiatoaceae* familyasının kayarak hareket eden bir üyesidir (Şekil 1.5). Bu bakteri gram-negatif zorunlu aerob olmasına rağmen oksijence fakir ortamlarda büyüme eğilimine sahiptir.

Başlangıçta sitokrom *o* denilen, VHb'nin *Vitreoscilla* bakterisi tarafından çözünür bir terminal oksidaz olduğuna inanılırdı. Ancak kinetik, spektral ve yapısal özellikleri bu proteinin Hb karakter olduğunu kanıtladı. İlk bakteriyel hemoglobin, oksijenin düşük olduğu ortamlarda yaşayan *Vitreoscilla* cinsi bakterilerden izole edilmiştir. VHb; bakteriyel hemoglobin protein grubunun en iyi karakterize üyesidir. *Vitreoscilla* hemoglobini olarak adlandırılmıştır. VHb geni, 500 baz çifti uzunluğunda olup 15,7 kDa molekül ağırlığında izole edilmiş oksijen bağlayıcı protein kodlayan bir genidir. Genin promotörü, düşük oksijen ile indüklenmekte ve % 20 oksijen varlığında inaktif hale gelmektedir [49]. Webster ve ark. 1986 yılında yaptığı araştırmada hemoglobinlerin ökaryotik orjinli proteinler olmadığını, gram negatif bir bakteri olan *Vitreoscilla stercoraria*'nın doğal hemoglobin içerdiğini tespit etmişlerdir. VHb bilinen en iyi prokaryotik hemoglobindir [50]. VHb; bakteri, mantar, bitki ve memeli hücrelerde üretkenlik ve büyüme üzerinde pozitif etki sağlar [51]. VHb geni, özellikle bakteri ve mantarların büyümesinin yanı sıra protein ve metabolit sentezini artırır [52]. *Vitreoscilla* mikraerofilik çevrede büyüme ve yaşamını sürdürme eğilimi gösterir [53]. Bundan dolayı, VHb teknolojisi genel olarak oksijence fakir şartların bulunduğu alanlarda ve oluşumları belli kritik seviyede oksijen gerektiren bütün biyoproseslerde uygulama alanı bulabilir. Oksijen sınırının altında büyüme koşullarında, VHb protein üreten hücreler daha yüksek hücre yoğunluklarına ve daha fazla protein sentezleme

yeteneğine sahiptirler [54]. VHb'in, *Pseudomonas*'larda, biyoremediasyonu güçlendirmeye yönelik bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir [55].



Şekil 1.5. Bakteriyel hemoglobin geni taşıyan yegane bakteri *Vitreoscilla*'nın taksonomik konumu [56].

Bu gen prokaryotik bir yapıya sahip olmasına rağmen çeşitli ökaryotik hücrelere aktarılmıştır. Bu bakterinin klonlanmış olduğu tüm organizmalarda, regülasyonu oksijenle olan bir çok metabolit ve rekombinant proteinin sentezinde önemli artış gözlenmiştir [56].

Bu tezin kapsamında, kromozomuna transpozon temelli bir rekombinasyon sistemi ile *vgb* geni aktarılmış [57]. *P. aeruginosa* (PaJC) ile gen aktarılmamış yabancı tip suşun (Pa) farklı koşullarda piyosiyenin üretim kapasiteleri karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Bu açıdan ilk kez araştırılmıştır. Çalışmamızda *P. aeruginosa* kullanmamızın en önemli nedeni bu bakterinin bilinen en iyi piyosiyenin üreten bakteri olmasıdır [41].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Genel olarak toprakta bulunan *Pseudomonas* cinsi bakteriler, özellikle çevre kirliliği bakımından ciddi risk oluşturan kirlilik faktörlerini önemli oranda yıkabilme kabiliyetine sahiptir. Toprağı doğal yolla temizlenmesinden dolayı çevre biyoteknolojisine yönelik çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu özelliğinin yanı sıra bu bakteriler tarafından birçok alanda önemli olan biyoteknolojik metabolitlerin üretimi biyoteknoloji alanındaki araştırmalara yeni bir boyut getireceği düşünülmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, atık su ve toprak örneklerinden izole edilmiş olan *Pseudomonas* sp. suşları kullanılarak bu suşların çeşitli çevrelerde diğer mikroorganizmalara oranla canlı kalabilme şansını artıran ve onları üstün kılan bazı metabolitleri (ekzopolisakkarit (EPS), ramnolipid ve özellikle piyosiyanın) üretebilme yetenekleri araştırılmaktadır. Ayrıca *Pseudomonas* sp. suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde bazı organik bileşikler (2,4-D, benzin, BTX) hücre gelişimlerine bağlı olarak biyolojik yıkım kapasiteleri ve EPS, piyosiyanın ve ramnolipid üretim yetenekleri spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Yapılan araştırmalarda biyolojik yıkım yeteneği yüksek olan ve yüksek oranda EPS, piyosiyanın ve ramnolipid üretme kapasitesine sahip *Pseudomonas* sp. suşların seçimi amaçlanmıştır. Araştırmada 20 tane *Pseudomonas* cinsine ait bakteri suşları kullanılmıştır. *Pseudomonas* sp. suşlarının oluşturduğu ikincil metabolit üretimleri araştırılmıştır. Bu amaçla 24 saatlik aktif kültürlerden *Pseudomonas* Agar (PA), *Pseudomonas* Gliserollü Agar (PGA), King's B Agar, Muller Hinton Agar, *Pseudomonas* Agar-P ve *Pseudomonas* Agar Base CN Selective Supplement Agar besiyortamlarına çizgi ekim yapılmış ve 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mavi-yeşil renk oluşturan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının piyosiyanın miktarları Essar ve ark. (1986)' nın metoduna göre belirlenmiştir. Suşlar 5 mL NB besiyortamında 37° C' de 72 saat geliştirilmiştir. Bu suşların oluşturdukları pigment (örn; piyosiyanın), EPS ve ramnolipid üretimleri spektrofotometrik olarak ölçülüp bu üç maddenin ölçüm sonuçları karşılaştırılmıştır. 2,4-D herbisitinde en yüksek piyosiyanın üretiminin 72. saatte *P. aeruginosa* B1 suşu tarafından gerçekleşmiştir. Yapılan spektroskopik ölçümlerin sonucunda pigment üretimlerinin 2,11-10,10 µg/L arasında değiştiği bulunmuştur [7].

Bir diğerk çalışmada, Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Yoğun Bakım Servisi hastalarından izole edilmiş 100 adet *P. aeruginosa* klinik izolatu kullanılmıştır. Bu isolatlar proteaz, ramnolipid, piyosiyanin, elastaz, *lasA* gibi virulans faktörleri ayrıca; yüzme, titreme ve kayma hareketleri gibi kontrolü çevreyi algılama sistemi tarafından gerçekleştirilen özellikler bakımından analiz edilmiş ve bu *P. aeruginosa* isolatları çevreyi algılama sistemlerinde bozukluk bulunmasına rağmen, yukarıda adı geçen farklı metabolitleri oluşturabileceği sonucuna varılmıştır [22].

Diğerk bir çalışmada hastaların değişik bölgelerinden elde edilen 97 adet *P. aeruginosa* suşu kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiş ve piyosiyanin, elastaz üretimi ve LasA aktivitesi A_{520} nm’de YYA (+) $1,27 \pm 0,7$ ve YYA (-) $1,25 \pm 0,7$ olan örneklerde birbirine yakın değerlerde olduğu görülmüştür. Piyosiyanin ölçümü için Gliserollü Agar kullanılmıştır. 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve ölçüm yapılmıştır. Bakterilerin izole edildikleri kaynağa göre yapılan karşılaştırmada ise yara örnekleri diğerk tüm örneklerden anlamlı olarak daha az piyosiyanin üretirken, kan örnekleri kateter ve trakea aspirat sıvısı örneklerine göre anlamlı olarak daha fazla piyosiyanin oluşturduğu ve diğerk örnekler arasındaki farklılığın ise anlamlı bulunmadığı sonucuna varılmıştır. YYA (+) bulunan suşlarda motilite YYA (-) olanlara göre anlamlı derecede daha fazla gözlenmiştir. Sonuçlar A_{520} nm’de YYA (+) suşlarda yüzme $0,73 \pm 0,2$, kayma $0,32 \pm 0,2$, titreme $0,75 \pm 0,3$ iken YYA (-) olanlarda sırasıyla $0,59 \pm 0,2$, $0,25 \pm 0,1$ ve $0,63 \pm 0,2$ olarak bulunmuştur. ($P=0,0002$, $0,03$ ve $0,009$) İdrar örnekleri her üç motilite şeklinde diğerk örneklerle göre daha fazla değere ulaşmıştır [58].

Yapılan başka bir çalışmada, doğadan ve klinik örneklerden izole edilen 155 *Pseudomonas* spp.de, biofilm, elastaz, alkali proteaz, pigment (örn. Piyosiyanin) ekzotoksin A, fosfolipaz C ve adezyon kuvvet gibi virülans faktörleri araştırılmıştır ve toplam 100 *P. aeruginosa* klinik izolatında, % 35’inde piyosiyanin üretimi bulunurken, % 63’ünde ise piyoverdin üretimi bulunmuştur [59].

Takahashi ve ark. (2007) tarafından yürütölen çalışmada, *P. aeruginosa* PAQ1 ‘in sahip olduğu polar flagellalar ile % 1.5 agar içeren ortamda iki günde geniş kayma hareketleri gözlemişlerdir. *P. aeruginosa* PAQ1’in suşları Luria-Bertani % 1.5 agar ortamında böyle bir kayma hareketinin olmadığını fakat Davis minimal sentetik agar ortamında 37 °C oksijen varlığında (özellikle % 0.8 sodyum sitrat ve % 1.5 Eiken agar içeren) kaydadeğer bir yayılmanın olduğunu araştırmışlar ve sonuçta; % 0.1 sodyum

sitrat varlığında $21,9 \pm 1,3$ mm, Luria–Bertani $15,9 \pm 2,7$ mm kaymanın olduğu sonucuna varmışlardır [60].

Long ve ark. (2008) bir çalışmada, ölümcül bağırsak kaynaklı sepsise neden olan *P. aeruginosa* virülansının operatif yaralanmadan sonra bağırsaktaki fosfat tüketimi çalışmasında yüksek ve düşük fosfat varlığında 24 saat inkübasyon sonunda piyosiyanın miktarı araştırılmıştır. Çalışma üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Fosfat solüsyonunda bakterinin üremediği, fakat spektroskopik ölçümde OD₅₂₀; 15 mM fosfat içeren ortamda $0,16 \pm 0,02$; 0,1 mM fosfat içeren ortamda ise $1,6 \pm 0,02$ absorbans olduğu sonucuna varılmıştır [61].

Ramalho ve ark. (2001), mineral sularda *P. aeruginosa*'nın varlığının modifiye *Pseudomonas* Agar Base (PAB) ortamlarında $41,5$ °C'de 24-48 saat arası renk değişimini çalışmışlardır. Bu çalışmada PAB ortamında koyu kahverengın piyosiyanın ile ilişkisi çalışılmış ve sonuçta K_2HPO_4 'ün ortamda bulunması piyosiyanın miktarını artırırken renk olarak hiçbir değişikliğin gözlenmediğini, $FeSO_4$ varlığında ise; piyosiyanın ortamda demir olduğu için kolonilerin koyu kahve renkli görünümünden sorumlu olduğunu göstermektedir. Sonuçta *P. aeruginosa* (piyosiyanın (+))'nın mineral sularda varlığı PAB $FeSO_4$ eklenmesiyle tespit edileceği kanıtlanmıştır. Sonuçlar 0,1-0,2 (log10) cfu/ml olarak yorumlanmıştır [62].

Atatürk Üniversitesi, Erzurum Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Bölümü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa* suşlarının antikandidal aktiviteleri çalışılmış ve sonuç olarak *P. aeruginosa* suşlarının çoğu incelendiğinde *Candida* türleri üzerine antikandidal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçta *Candida* türleri üzerine % 16-18 arasında kısmi inhibisyon oranları tespit edilmiştir. *Pseudomonas* infeksiyonlarının tedavisi sonrasında olası antifungal etkinin ortadan kalkması ile oluşabilecek, özellikle *Candida* ve diğer mantar infeksiyonlarına karşı dikkatli olunması gerektiği, ayrıca *Pseudomonas*'ların ürettiği maddelerden yeni antifungallerin geliştirilmesinin mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır [63].

Le Berre ve ark. 2007'de *P. aeruginosa*'nın YYA aktivitesi ve virülans faktörlerinin varlığına ilişkin çalışmışlardır. Las ve rhl sistemleri ve özellikle piyosiyanın üretimi için rhl sisteminin önemi araştırılmıştır. Las sistem LasA proteaz, LasB proteaz (elastaz), alkalın proteaz, ekzotoksin A ve LasI virülans faktörlerini kontrol ederken, rhl ramnolipid, LasA proteaz, LasB proteaz, RhII and piyosiyanın

kontrol etmektedir. Klinik patolojik izolatlarda PAQ1 suşunun daha fazla piyosiyanın ürettiği PA 103 suşunun ise daha az piyosiyanın ürettiği sonucuna varılmıştır. Değer olarak, PA103 suşu yaklaşık 0,25 OD₅₂₀₋₆₀₀ PAQ1 suşu ise 2,0 OD₅₂₀₋₆₀₀ olduğu tespit edilmiştir [64].

Onbasli ve ark. (2008) şeker pancarı atığında *P. aeruginosa* B1 ve B2 tarafından üretilen bazı metabolitler arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yapılan araştırmada NB ortamı kontrol grubu için kullanılmıştır. Melas ortamında üretilen metabolitleri (EPS, ramnolipid, piyosiyanın) % 1-5 konsantrasyon arasında 24, 48 ve 72 saat değişen farklı periyotlarda çalışmışlardır. *P. aeruginosa* B1 en yüksek % 5 melas konsantrasyonunda sırasıyla 72 saat sonra piyosiyanın 17.1±0.0 µg/mL değerini alırken, en az % 1 konsantrasyonda son 24 saatte 10.6±0.2 µg/mL değerini almıştır. *P. aeruginosa* B2 ise %5 melas konsantrasyonunda sırasıyla 72 saat sonra piyosiyanın 5.8±0.0 µg/mL değerini alırken, en az %1 konsantrasyonda son 24 saatte 0.3±0.3 µg/mL değerini almıştır [65].

Bir başka çalışmada, ev hayvanlarından alınan *P. aeruginosa*'nın 1740 suşundaki virülans faktörleri araştırmışlar ve sonuçta 1-13 µg/ml arasında piyosiyanın varlığı tespit edilmiştir [66].

Yates ve ark. *P. aeruginosa* tarafından üretilen piyosiyanın üzerine demir iyonunun etkisi araştırılmış ve sonuçta 37 °C'de 18-24 saatleri arasında demir iyonu içeren gliserol alanin (GA) ortamında 520 nm de yaklaşık 0,280 absorbans olduğu sonucuna varmışlardır [67].

Yapılan diğer bir çalışmada piyosiyanın üretimi ve *P. aeruginosa*'nın hareket yetenekleri test edilmiştir. Piyosiyanın üretimi için King A besi oratmına urasil ve gentamisin ilave edilip 37 °C'de inkübasyona bırakılmış ve Kurachi 1958, MacDonald 1966 'nın yöntemini kullanarak OD₆₀₀ de absorbans değerlerine bakılmıştır. Sonuçta 0,600±0,020 ile en yüksek absorbans değeri gözlemlenmiştir. Kayma (swarming), yüzme (swimming), titreme (twitching) hareket testleri için ayrı ayrı uygun besi oratmı hazırlanıp içerisine urasil ilave edilmiş ve ortamda urasil (+) ve urasil (-) karşılaştırılmıştır. Twitching testi sonucunda urasil (+) için titreme 24,75 mm iken, urasil (-) 19,75 mm ölçülmüştür. Sonuç olarak bu üç hareket testi için urasil (+) hareketi artırıcı etki göstermiştir [68].

Diğer bir çalışmada, *P. aeruginosa*'nın virülans faktörleri ve hareket testleri çalışılmıştır. Piyosiyanın üretimi için King A ortamı kullanılmış, bu ortama 40 µg/ml

urasil ve orotat ilave edilmiş ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Piyosiyanın miktarları; orotat ilavesinde yaklaşık $3\pm0,5$ µg/5 ml iken, urasil ilavesinde $1,25\pm0,25$ µg/5 ml ve King A ortamında ise $1,26\pm0,18$ µg/5 ml değerini almıştır. Hareket testleri için karbon kaynağı olarak % 0,2 glikoz kullanılmış ve üç hareket testi için uygun besi ortamı, sıcaklık koşulları ayarlanmıştır. Besi ortamına 40 µg/ml urasil ve orotat ilave edilip inkübasyona bırakılmıştır. Yüzme testi için 30 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve sonuçta King A ortamı ve orotat ilave edilen ortamda belirgin bir hareketin olduğu gözlemlenmiştir. Kayma hareketi için 37 °C’de 14 saat inkübasyona bırakılmış ve sonuçta King A ortamı ve orotat ilave edilen ortamda çok daha belirgin bir hareketin olduğu gözlemlenmiştir. Titreme hareketi için 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve sonuçta King A ortamı ve urasil ilave edilen ortamda çok az bir hareketin olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlar nicel olarak değerlendirilmiştir [69].

Bu tez çalışmasında, stres koşulları altında *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) ve onun *Vitreoscilla* hemoglobin geni taşıyan rekombinant suşunun (PaJC) piyosiyanın üretimi ve hareketliliği karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır. Bu çalışma kapsamındaki başlıca hedefimiz, bakteri üremesinin sekonder safhasında etkin olduğu VHb’nin piyosiyanın üretimine katkısını araştırmaktır.

Ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve kültürün ileri fazlarında onu membran transferazlarına aktararak yaşlı hücreler için daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma karakteristiği sağlayan VHb/*vgb* sisteminin, bu amaç için önemli avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

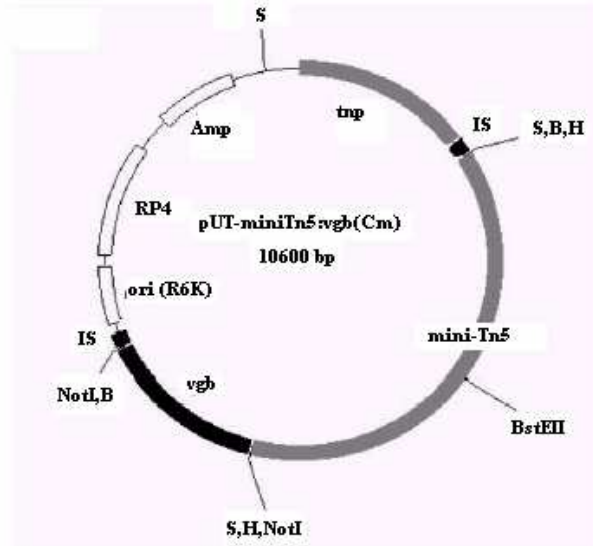
3.1. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar ve Ayıraçlar

Bu çalışmada besiyeri hazırlamasında kullanılan kimyasallar; $MgCl_2$, K_2SO_4 , NaCl, KCl, $CaCl_2$, $Cd(NO_3)_2$, HCl, glikoz, gliserol, süktroz, tripton, nütrient broth, agar, pepton, yeast extract, kloroform, analitik saflık derecesinde olup Sigma şirketinden temin edilmiştir.

3.2. Araştırmada Kullanılan Bakteriler ve Saklanma Koşulları

Çalışmada *P. aeruginosa* ATCC 10145 (NRRL B- 771)(Pa) ve bu bakterinin kromozomuna homolog rekombinasyon ile tek kopya halinde *vgb* entegre edilmiş rekombinant *P. aeruginosa* (PaJC) (Şekil 3.1) kullanılmıştır [57].

Bu bakterilerin devamlılığını sağlamak için *P. aeruginosa* ve PaJC ana stok olarak -20 °C’de gliserolde saklanmıştır. Araştırmalarımız için kullandığımız *P. aeruginosa*, her 20 günde bir LB plaklarına öze ile pasaj yapılarak gece boyu üretilmiş ve ertesi gün parafilmle etrafı sarılıp 4 °C’de saklanmıştır. Deneyler esnasında bu stoklar kullanılmıştır.



Şekil 3.1. pUT- miniTn5:vgb-Cm transpozaz sistemi [57]

3.3. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Aşağıda deneysel çalışmalar sırasında kullanılan besiyeri ve çözeltiler verilmiştir.

Besiyeri ve Çözeltiler	Gram/Litre
<i>Pseudomonas</i> Broth P, Base (Modifiye)	20 g Pepton 1.4 g MgCl 10 g K ₂ SO ₄ 10 ml Gliserol
Kayma Testi	8 g Nutrient broth 5 g Agar 5 g Glikoz
Yüzme Testi	10 g Tripton 3 g Agar 5 g NaCl
Titreme Testi	10 g Tripton 5 g Maya Özütü 5 g NaCl 10 g Agar

Besi yeri olarak kullanılan tüm kimyasallar otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır. Daha sonra besi ortamları pH 7.0 olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.4. Kullanılan Karbon Kaynakları

Glikoz ve gliserol % 25'lik, sükroz ise % 20'lik stok solüsyon olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kaynaklar 121 °C'de 20 dk otoklavda steril edilmiştir. Stok çözeltiler, 4 °C muhafaza edilerek kullanılmıştır. Bu karbon kaynakları besiyerlerine steril koşullarda % 1 ve % 0,1'lik olacak şekilde eklenerek kullanılmıştır.

3.5. Kullanılan Ağır Metal

Çalışmamızda ağır metal stresi için kullanılacak $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ stok olarak hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözelti 121 °C’de 20 dk otoklavda steril edilmiş ve 4 °C muhafaza edilmiştir. Çalışma amacına bağlı olarak, *Pseudomonas* Broth P besi ortamı bulunan erlenlere 100 ve 200 ppm olacak şekilde steril koşullarda stoktan eklenmiştir.

3.6. Çalışmada Kullanılan Tuzlar

Çalışmamızda stres kaynağı olarak kullanılan tuzlar; NaCl, KCl ve CaCl_2 ’ dir. Kullanılan tuzlar stok olarak hazırlanmış ve her biri ayrı ayrı son konsantrasyonda 50 mM ve 250 mM olacak şekilde besi yerine eklenmiştir.

3.7. Kültür Koşulları

Bir gece üretilen kültürler, öze yardımıyla 10 ml/100 ml Luria-Bertani besiyerine eklenerek deney koşullarına göre 30 veya 37 °C’de 15 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün O/N kültürlerden 250 µl alınarak 50 ml/150 ml *Pseudomonas* Broth P besiyerine bulunan erlenlere eklenmiştir. Çalışma 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Kültürlerden 24, 48, 72 ve 96. saatlerde örnek alınmıştır. Kültür üretimi 200 rpm 30 veya 37 °C’de sürdürülmüştür.

3.8. Piyosiyanın Analizi

Piyosiyanın miktarının tayini Essar (1990) yöntemine göre yapılmıştır. Yöntem asidik solüsyonda OD_{520} nm’de piyosiyanın absorbansına dayanmaktadır. Piyosiyanın üretiminin maksimum olduğu *Pseudomonas* Broth ortamında üretilen 5 ml kültür örneği santrifüj edilmiş süpernatant üzerine 3 ml kloroform eklenmiş ve daha sonra 1 ml 0,2 N HCl ilave edilmiştir. Oluşan mavi-yeşil rengin izlenmesi 520 nm de ölçülmüştür. OD_{520} ’de 17,072 ile çarpım sonucunda ml’deki konsantrasyonu hesaplanmış ve µg/ml olarak ifade edilmiştir [16, 70-71].

3.9. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Hareket Testleri

3.9.1. Kayma Testi

Test edilecek *P.aeruginosa* ve PaJC bir gece Luria-Bertani (LB) besiyerinde 30 °C 'de üretilmiştir. Her bir kültürden 2 µl daha önce belirtilmiş olan kayma besiyerlerini içeren petrilere eklenmiştir. Kùltürler 37 °C'de 16-18 saat inkübe edilmiş [72] ve kayma hareketi, inokùlasyonun yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılmanın çapının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Yabanıl ve rekombinant suşun kayma hareketi karşılaştırılmıştır.

3.9.2. Yüzme Testi

Yüzme testi için *P. aeruginosa* suşları, 37 °C'de bir gece LB besiyerinde üretilmiştir. Yüzme testi besiyeri içeren petrilere steril kürdanlarla ekim yapılmış ve 25 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır [73]. Yüzme hareketi, ekimin yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılan bulanıklığın çapının ölçülmesiyle saptanmıştır.

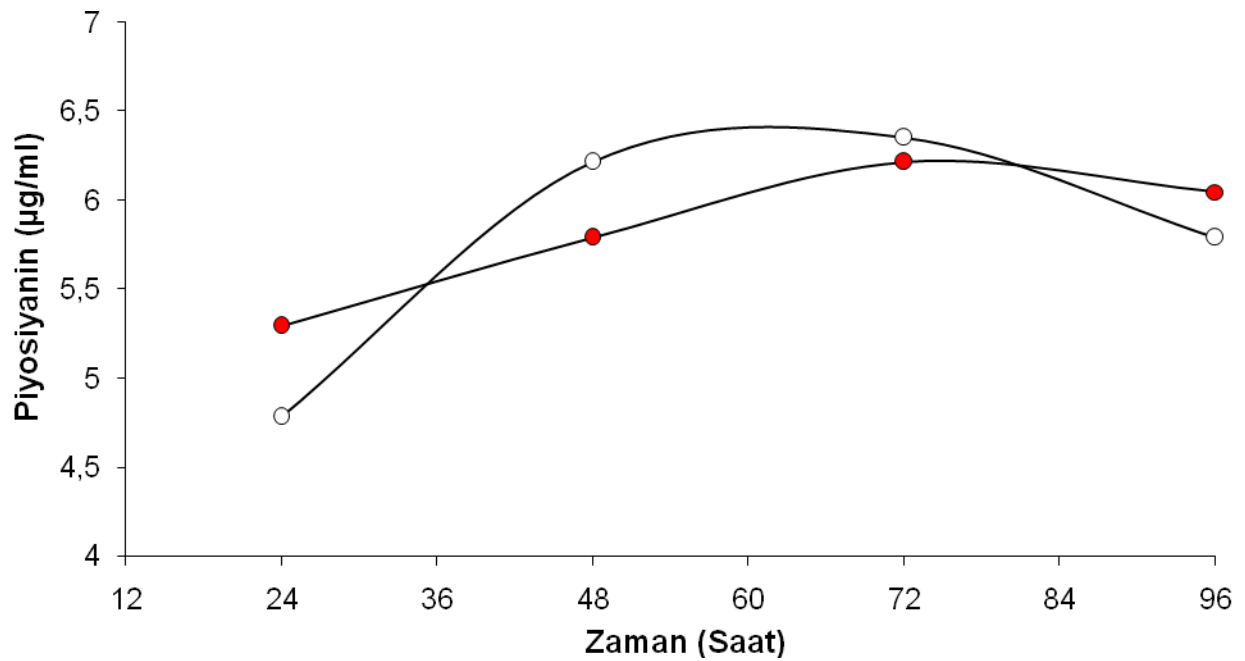
3.9.3. Titreme Testi

Titreme testi için test edilecek *P. aeruginosa* suşlarının her birinden titreme testi besiyeri içeren petrilere steril kürdanlarla ilave edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Titreme hareketi, ekimin yapıldığı noktadan çevreye doğru yayılan zikzakların durumuna göre belirlenmiştir [73].

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Pa ve PaJC'nın ve *Pseudomonas* Broth P besiyerinde 37 °C'de piyosiyanın üretimi

Pseudomonas Broth P besiyeri bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyanın üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 4,78 µg/ml piyosiyanın üretirken, 72. saatte 6,35 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise 24. saatte 5,29 µg/ml ve 72. saatte 6,21 µg/ml ulaşmıştır (Şekil 4.1).

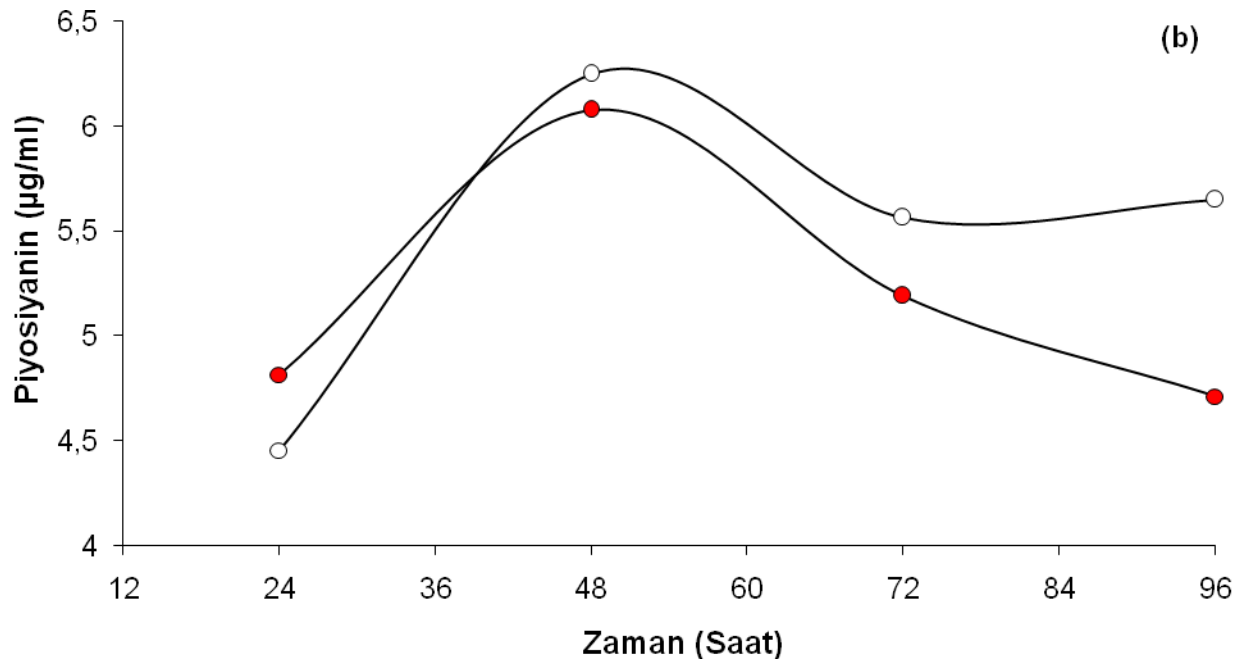
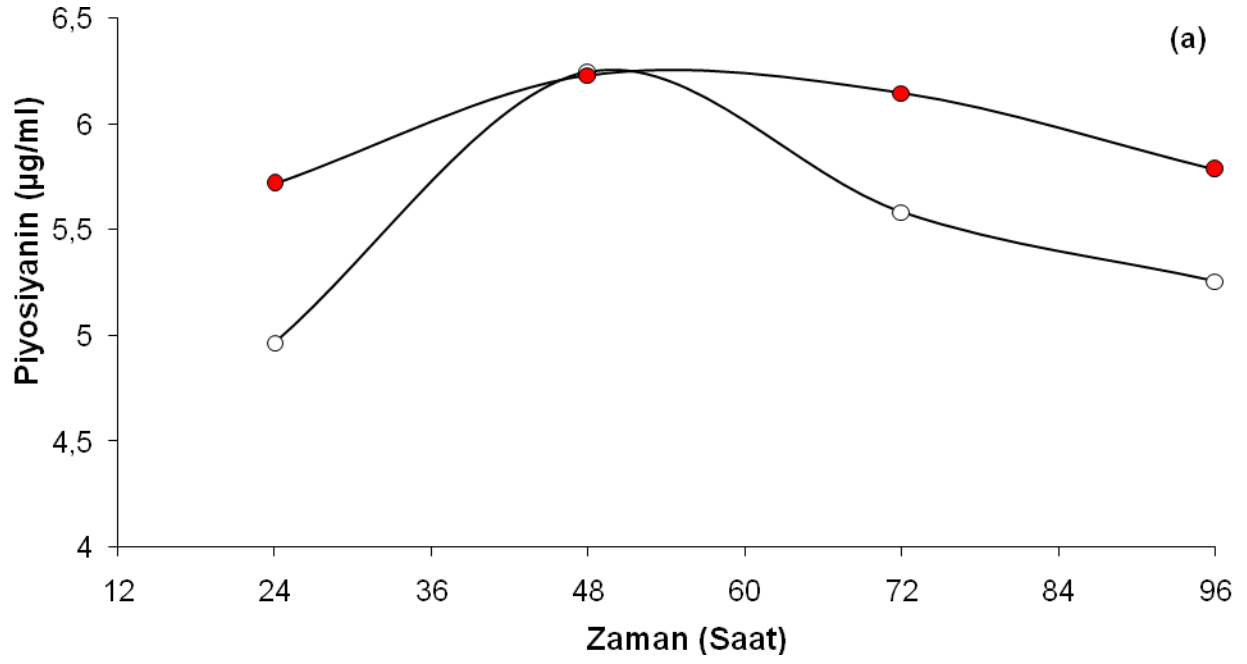


Şekil 4.1. *P. aeruginosa* (Pa) (○) ve PaJC (●)'ın *Pseudomonas* Broth P besiyeri içeren ortamda piyosiyanın düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.1. Pa ve PaJC'nın karbon kaynağı olarak glikoz ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyanın üretimi

4.1.1.1. Farklı miktarlarda glikoz içeren ortamlarda piyosiyanın üretimi

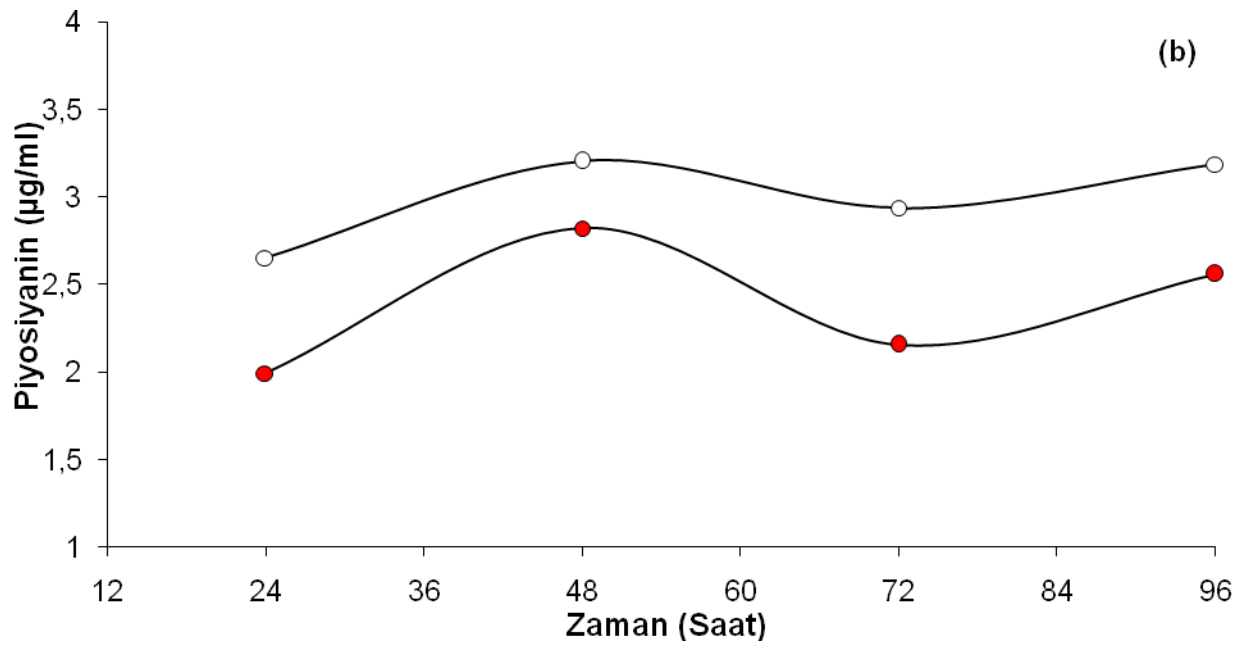
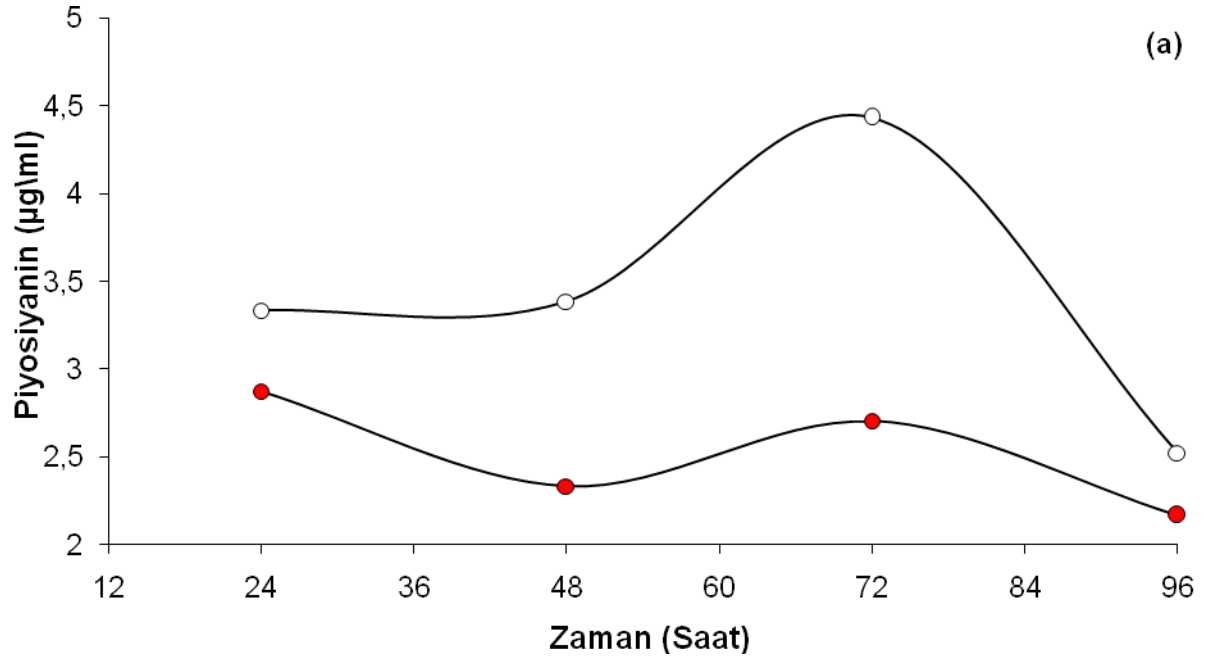
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 glikoz bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyanın üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 4,96 µg/ml piyosiyanın üretirken, 48. saatte 6,23 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise 24. saatte 5,71 µg/ml piyosiyanın üretirken, 48. saatte 6,23 µg/ml en yüksek değerini almıştır, fakat PaJC 72. saatte yabanıl suşa göre 1,10 kat daha fazla piyosiyanın üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.2 a). % 0,1 glikoz bulunan ortamlarda ise; Pa 24. saatte 4,45 µg/ml piyosiyanın üretirken, 48. saatte 6,24 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise 96. saatte 4,71 µg/ml ve 48. saatte 6,07 µg/ml ulaşmıştır. Sonuçta; Pa 96. saatte PaJC'dan 1,19 kat daha fazla piyosiyanın üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.2 b).



Şekil 4.2. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve *PaJC*(●)'ın (a) % 1 glikoz (b) % 0.1 glikoz içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.1.2. Glikoz ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

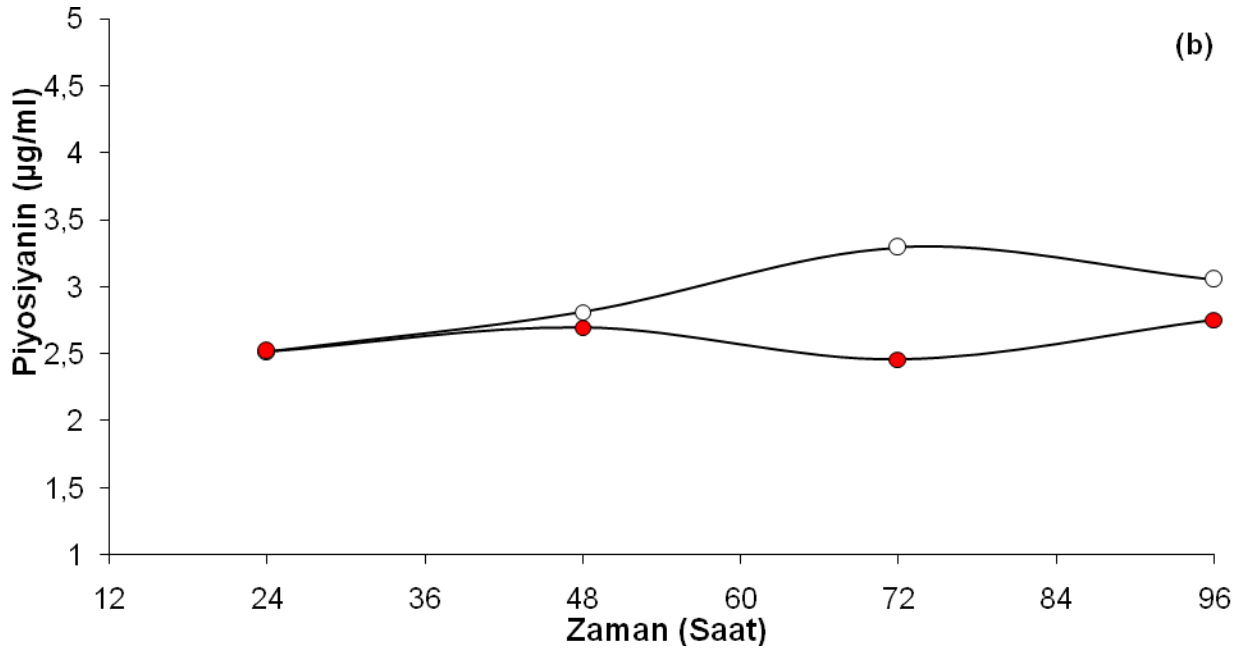
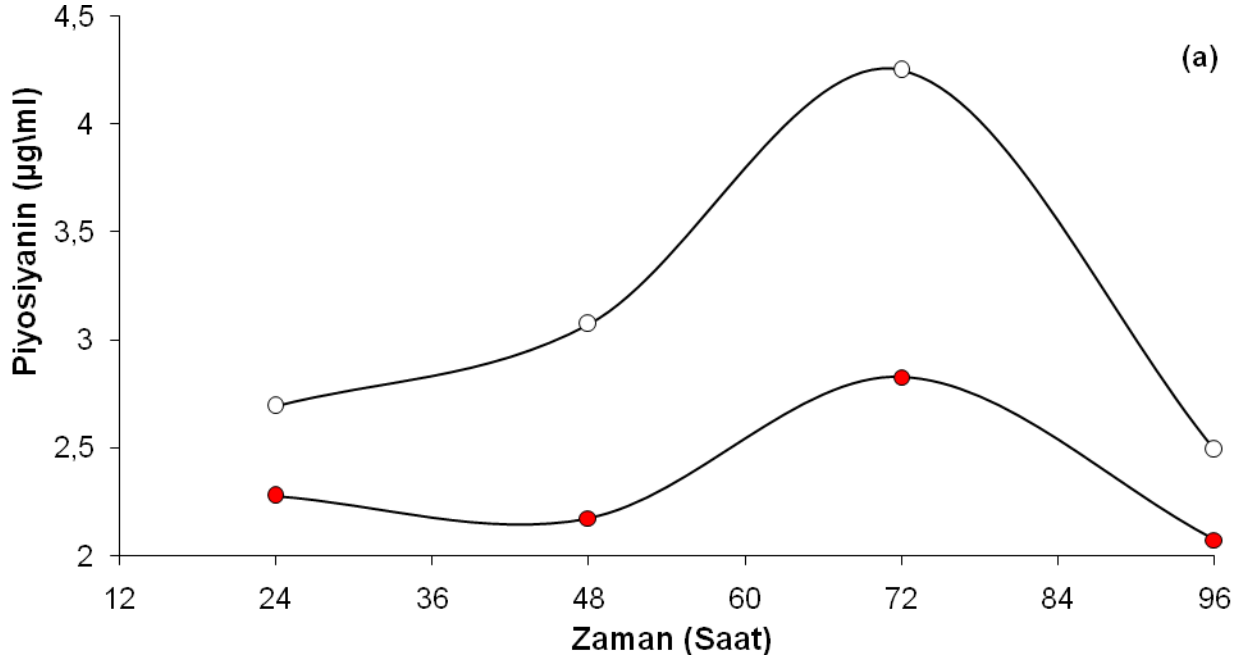
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 glikoz 50 mM NaCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 96. saatte 2,52 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 4,43 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ise 96. saatte 2,16 µg/ml ve 24. saatte 2,87 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece Pa 72. saatte PaJC'dan 1,64 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.3 a). 250 mM NaCl bulunan ortamlarda ise; 24. saatte Pa'nın piyosiyenin miktarı PaJC'ın piyosiyenin miktarından fazla olduğu gözlenmiştir. Pa 24. saatte 2,65 µg/ml piyosiyenin üretirken, 48. saatte 3,20 µg/ml ile en yüksek değerini almıştır. PaJC ise 24. saatte 1,99 µg/ml ve 48. saatte 2,82 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; Pa 48. saatte PaJC'dan 1,13 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.3 b).



Şekil 4.3. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.1.3. Glikoz ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

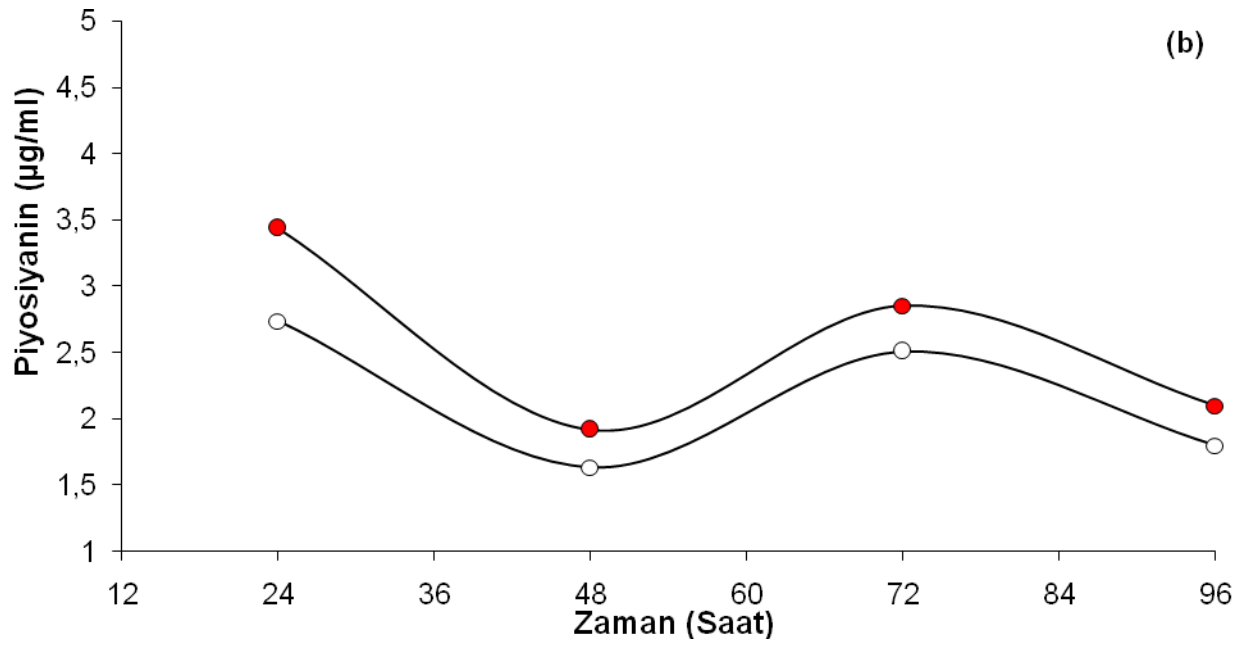
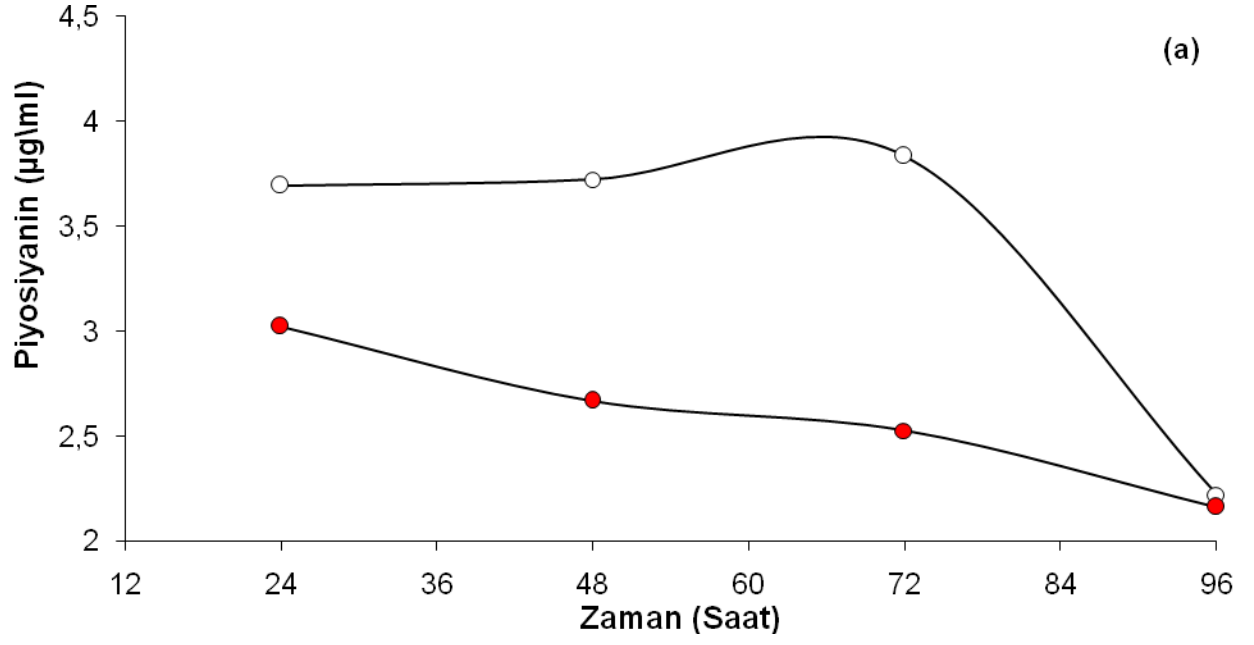
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 glikoz 50 mM KCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 96. saatte 2,49 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 4,25 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise 96. saatte 2,07 µg/ml ve 72. saatte 2,82 µg/ml ulaşmıştır. Böylece Pa 72. saatte PaJC'dan 1,5 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.4 a). 250 mM KCl bulunan ortamlarda ise; Pa 24. saatte 2,52 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 3,29 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ise 72. saatte 2,45 µg/ml ve 96. saatte 2,75 µg/ml ulaşmıştır. Sonuçta; Pa 72. saatte PaJC'dan 1,34 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.4 b).



Şekil 4.4. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz KCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.1.4. Glikoz ve CaCl₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 glikoz 50 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 96. saatte 2,21 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 3,83 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ise 96. saatte 2,16 µg/ml ve 24. saatte 3,02 µg/ml ulaşmıştır. Böylece Pa 72. saatte PaJC'dan 1,51 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.5 a). 250 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda ise; Pa 48. saatte 1,63 µg/ml piyosiyenin üretirken, 24. saatte 2,73 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ise 48. saatte 1,91 µg/ml ve 24. saatte 3,43 µg/ml ulaşmıştır. Sonuçta; PaJC 24. saatte Pa'dan 1,25 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçerken, grafik genelinde Pa'nın ise PaJC'a paralel fakat daha düşük miktarda piyosiyenin üretimi yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4.5 b).

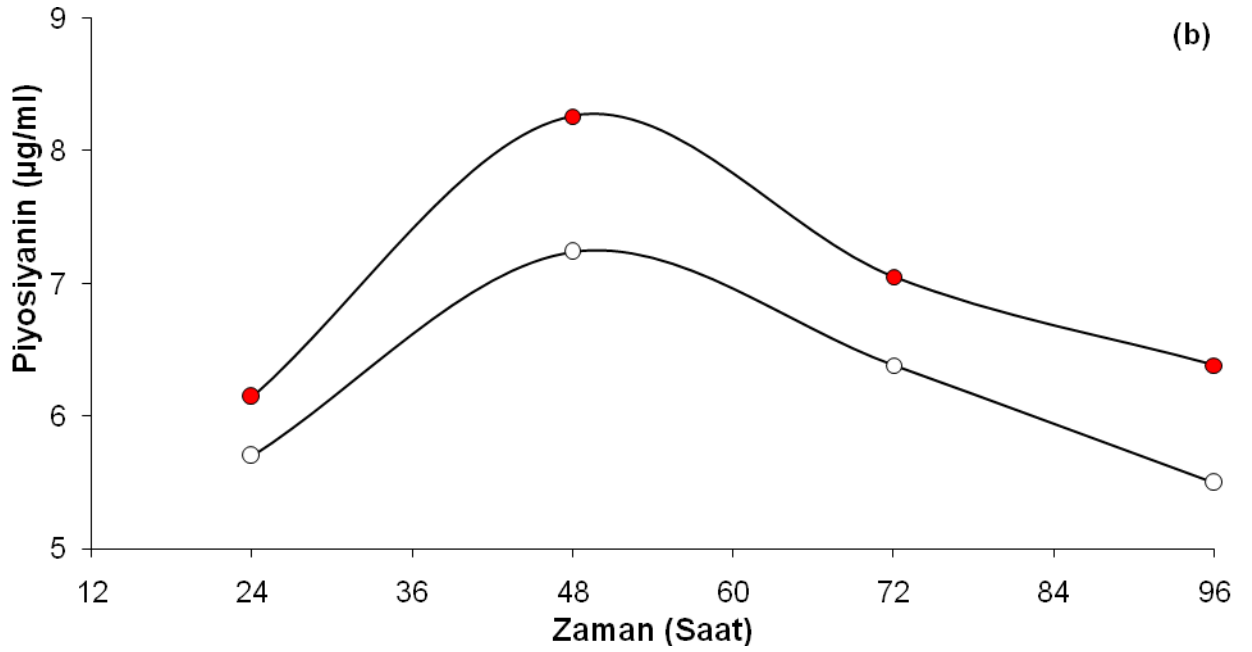
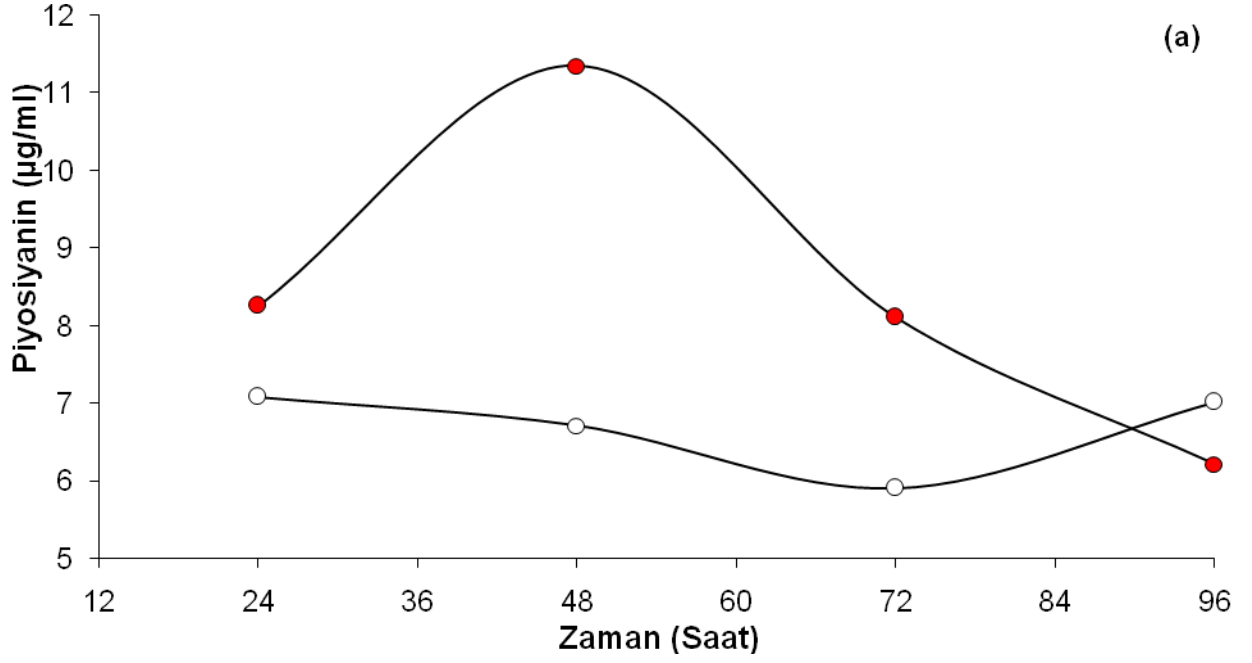


Şekil 4.5. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz CaCl_2 içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.2. Pa ve PaJC'in karbon kaynağı olarak gliserol ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

4.1.2.1. Farklı miktarlarda gliserol içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

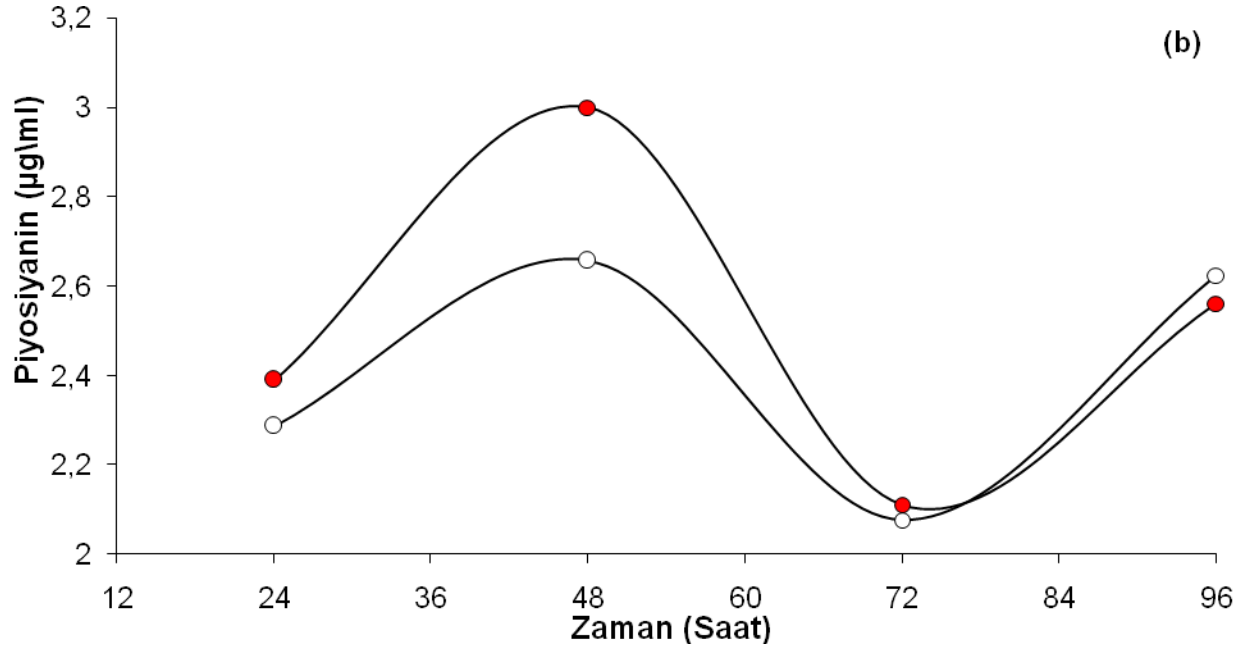
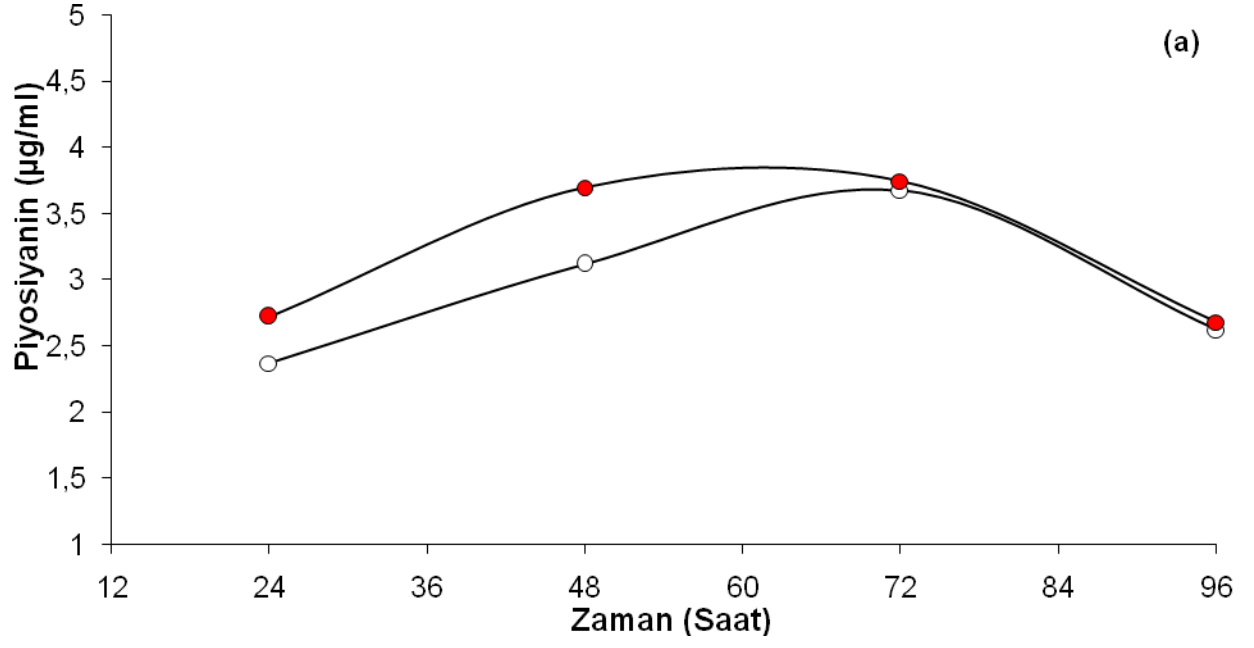
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 gliserol bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 72. saatte 5,90 µg/ml piyosiyenin üretirken, 24. saatte 7,08 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile, 96. saatte 6,21 µg/ml ve 48. saatte 11,35 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece PaJC 48. saatte Pa'dan 1,6 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.6 a). % 0,1 gliserol bulunan ortamlarda ise; Pa 96. saatte 5,49 µg/ml piyosiyenin üretirken, 48. saatte 7,23 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 24. saatte 6,14 µg/ml ve 48. saatte 8,26 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; PaJC 48. saatte Pa'dan 1,14 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçerken, Pa'nın piyosiyenin miktarı ise PaJC'a paralel fakat daha düşük miktarda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6 b).



Şekil 4.6. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) % 1 gliserol (b) % 0.1 gliserol içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.2.2. Gliserol ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

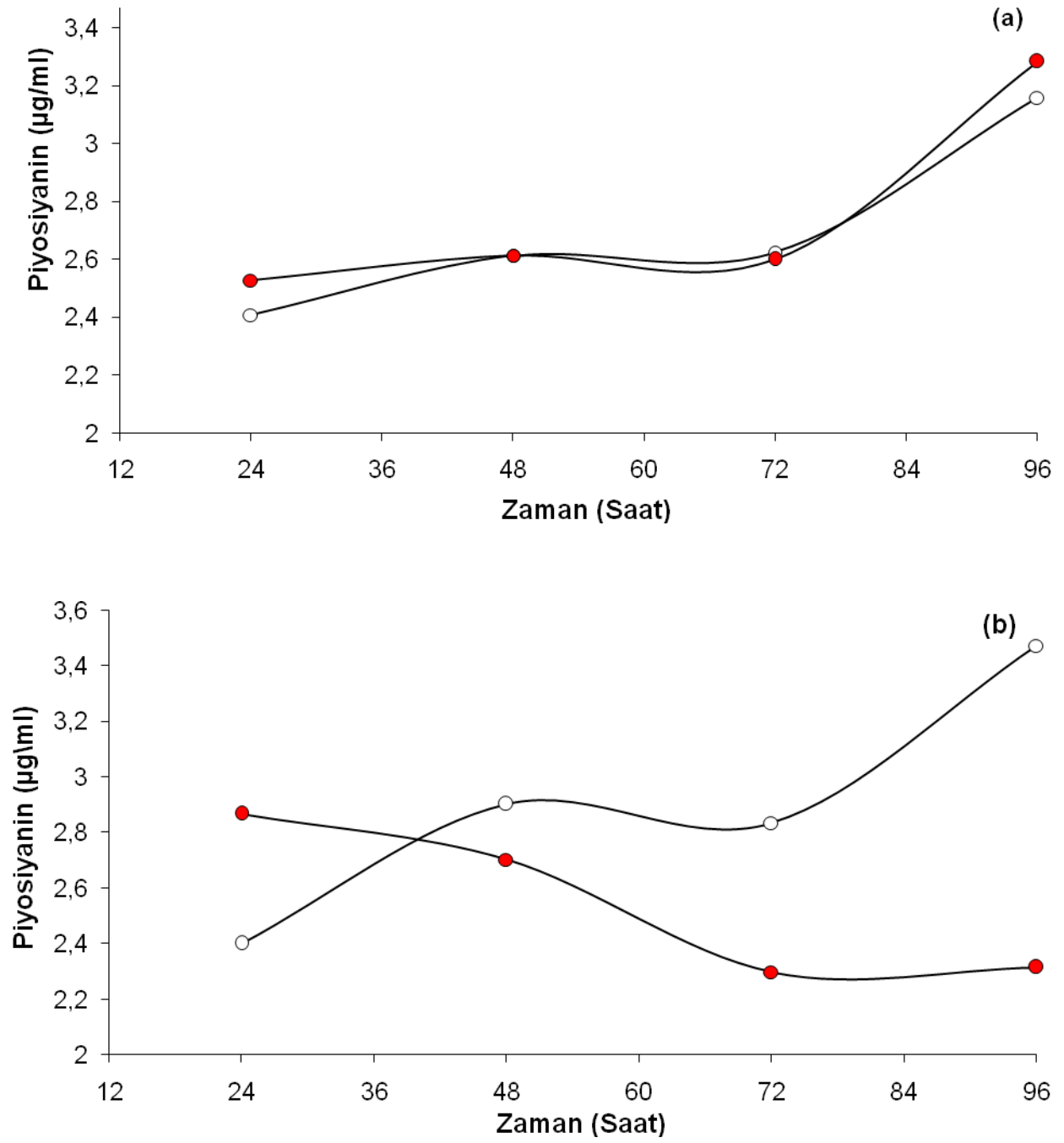
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 gliserol 50 mM NaCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 2,36 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 3,67 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 96. saatte 2,68 µg/ml ve 72. saatte 3,74 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece PaJC 48. saatte Pa'dan 1,18 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.7 a). 250 mM NaCl bulunan ortamlarda ise; Pa 72. saatte 2,07 µg/ml piyosiyenin üretirken, 48. saatte 2,65 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 72. saatte 2,11 µg/ml ve 48. saatte 2,99 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; PaJC 48. saatte Pa'dan 1,12 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.7 b).



Şekil 4.7. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.2.3. Gliserol ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

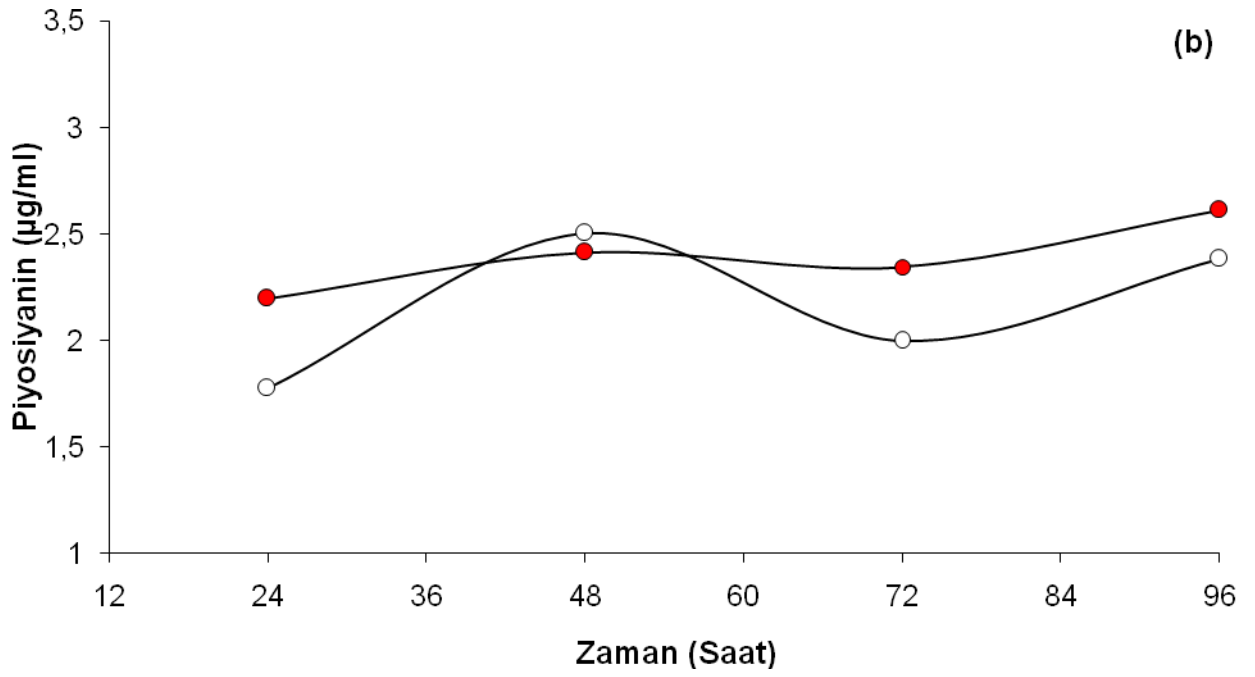
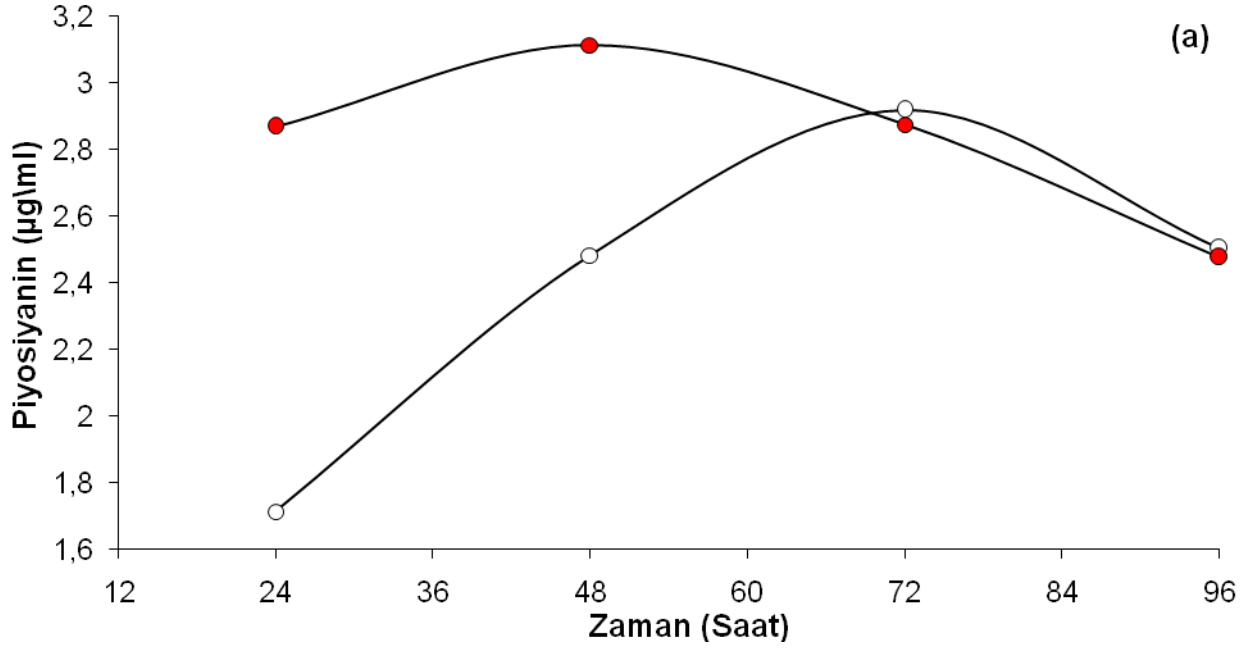
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 gliserol 50 mM KCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 2,40 µg/ml piyosiyenin üretirken, 96. saatte 3,15 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 24. saatte 2,52 µg/ml ve 96. saatte 3,28 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece PaJC 96. saatte Pa'dan 1,04 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.8 a). 250 mM KCl bulunan ortamlarda ise; Pa 24. saatte 2,40 µg/ml piyosiyenin üretirken, 96. saatte 3,47 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 72. saatte 2,29 µg/ml ve 24. saatte 2,86 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; PaJC 24. saatte 2,86 µg/ml ile avantajlı durumdayken, Pa 96. saatte PaJC'dan 1,5 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.8 b).



Şekil 4.8. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol KCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.2.4. Gliserol ve CaCl₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 gliserol 50 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 1,71 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 2,91 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 96. saatte 2,47 µg/ml ve 48. saatte 3,11 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece PaJC 48. saatte Pa'dan 1,25 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.9 a). 250 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda ise; Pa 24. saatte 1,77 µg/ml piyosiyenin üretirken, 48. saatte 2,50 µg/ml ile en yüksek değerini almıştır. PaJC ile 24. saatte 2,19 µg/ml ve 96. saatte 2,61 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; PaJC 72. saatte Pa'dan 1,17 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.9 b).

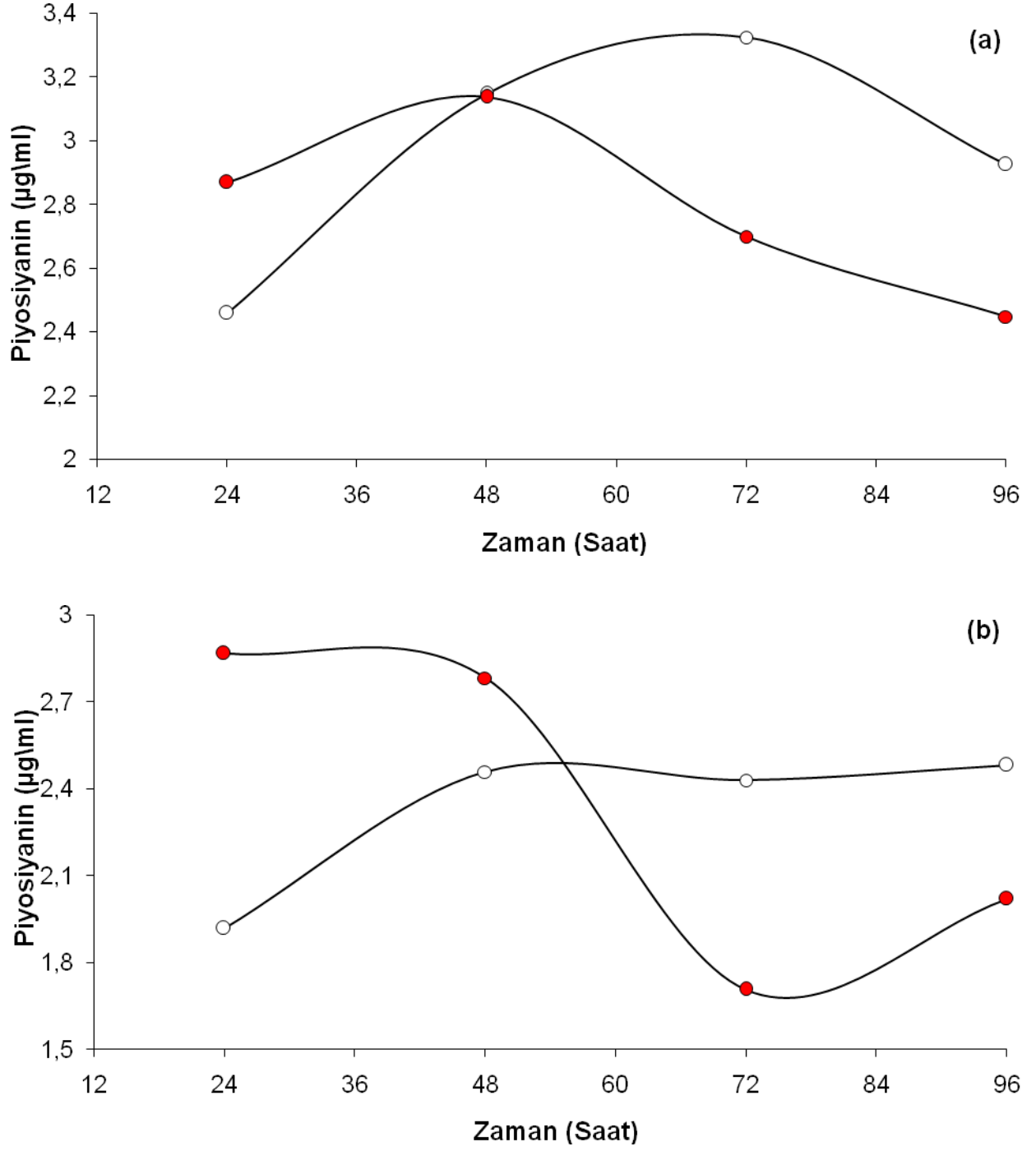


Şekil 4.9. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol CaCl₂ içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.3. Pa ve PaJC'in karbon kaynağı olarak süktroz ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

4.1.3.1. Farklı miktarlarda süktroz içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

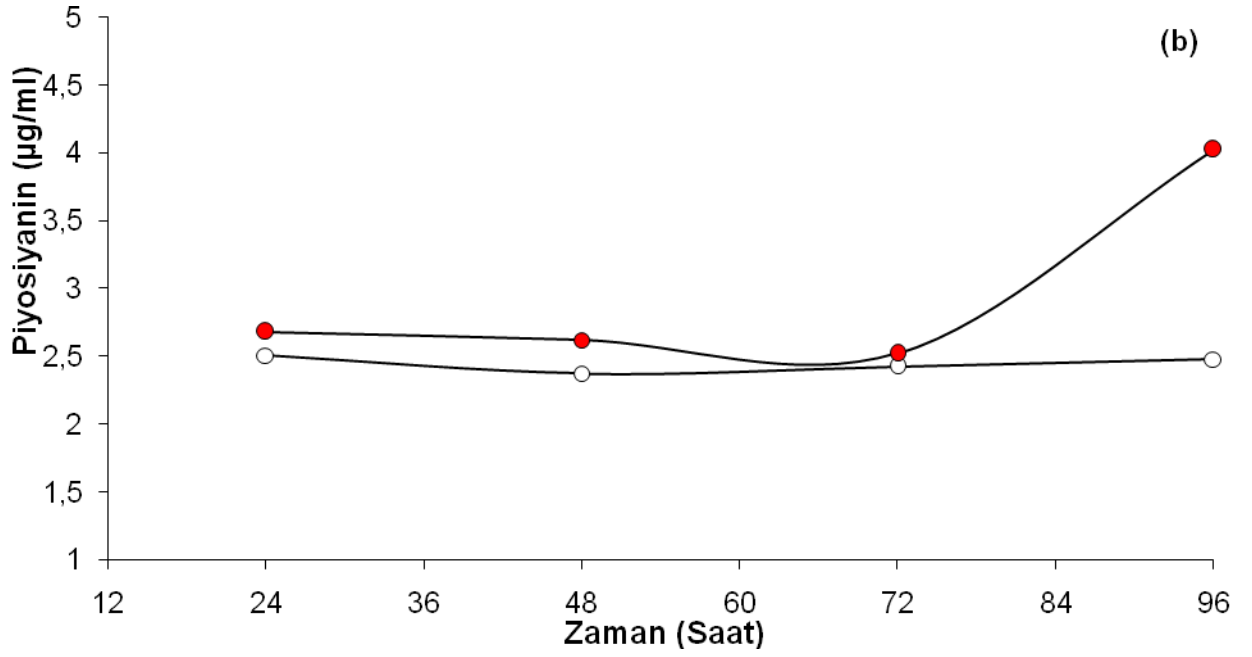
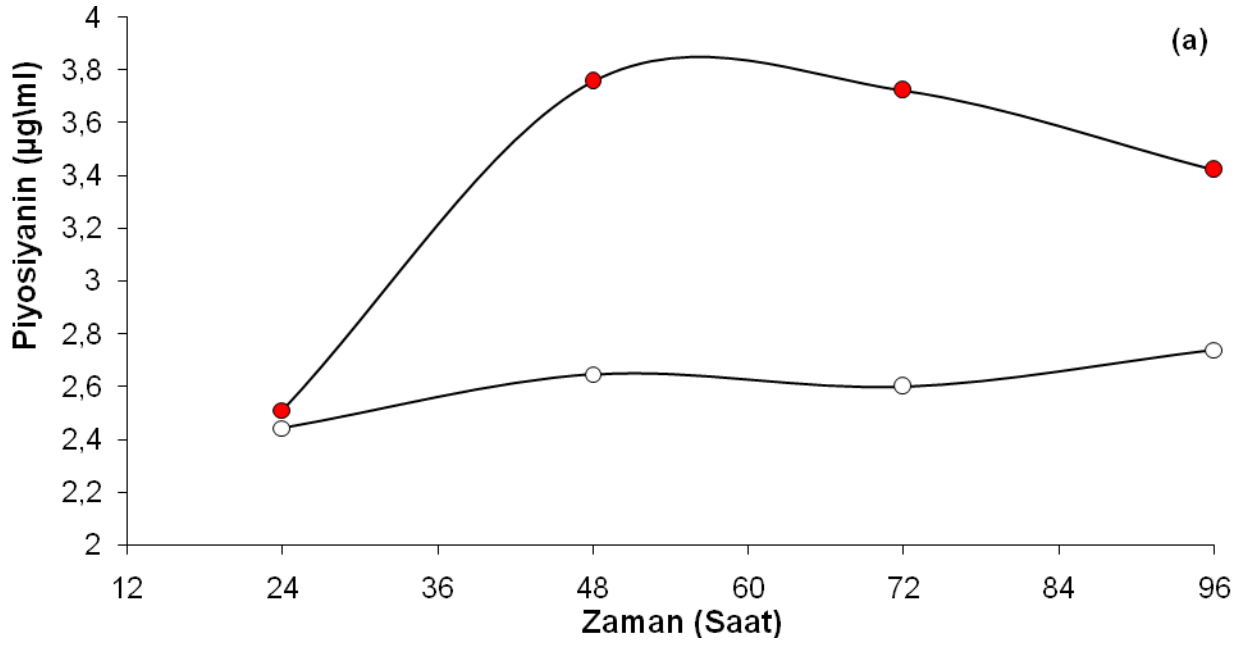
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 süktroz bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 2,45 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 3,32 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 96. saatte 2,44 µg/ml ve 48. saatte 3,13 µg/ml ulaşmıştır. Böylece PaJC 24. saatte 2,86 µg/ml ile avantajlı durumdayken, Pa 72. saatte PaJC'dan 1,23 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.10 a). % 0,1 süktroz bulunan ortamlarda ise; Pa 24. saatte 1,91 µg/ml piyosiyenin üretirken, 96. saatte 2,48 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 72. saatte 1,70 µg/ml ve 24. saatte 2,86 µg/ml ulaşmıştır. Sonuçta; PaJC 24. saatte 2,86 µg/ml ile avantajlı durumdayken, Pa 72. saatte PaJC'dan 1,42 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.10 b).



Şekil 4.10. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) % 1 sükroz (b) % 0.1 sükroz içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.3.2. Sükroz ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

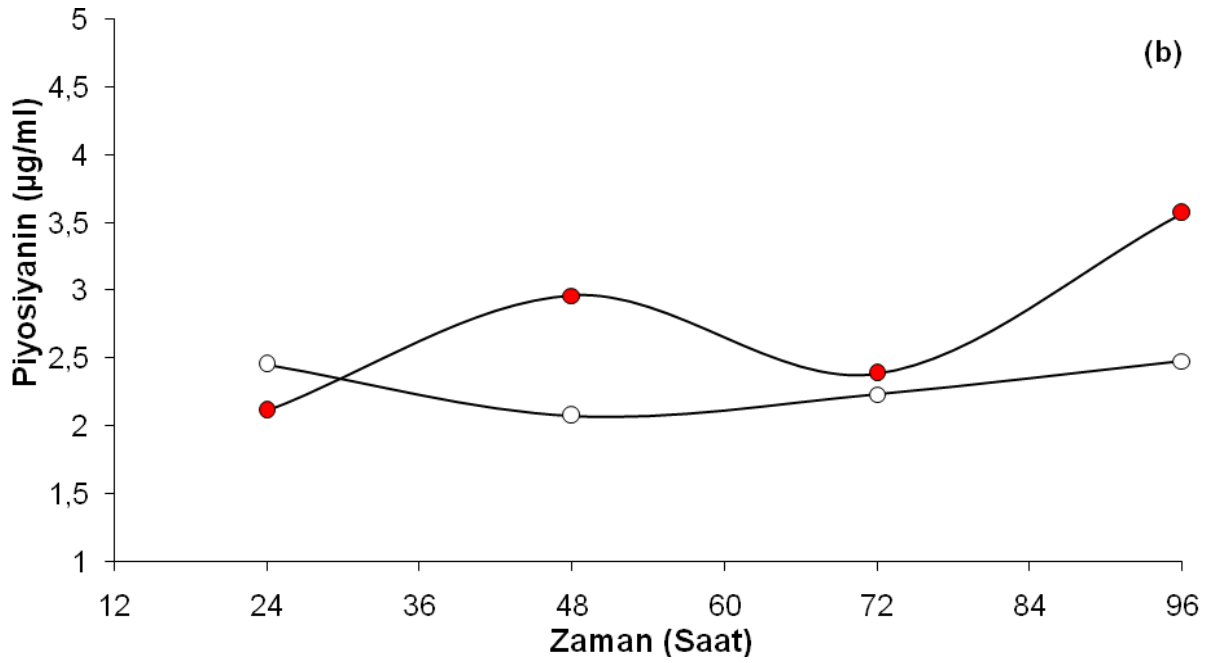
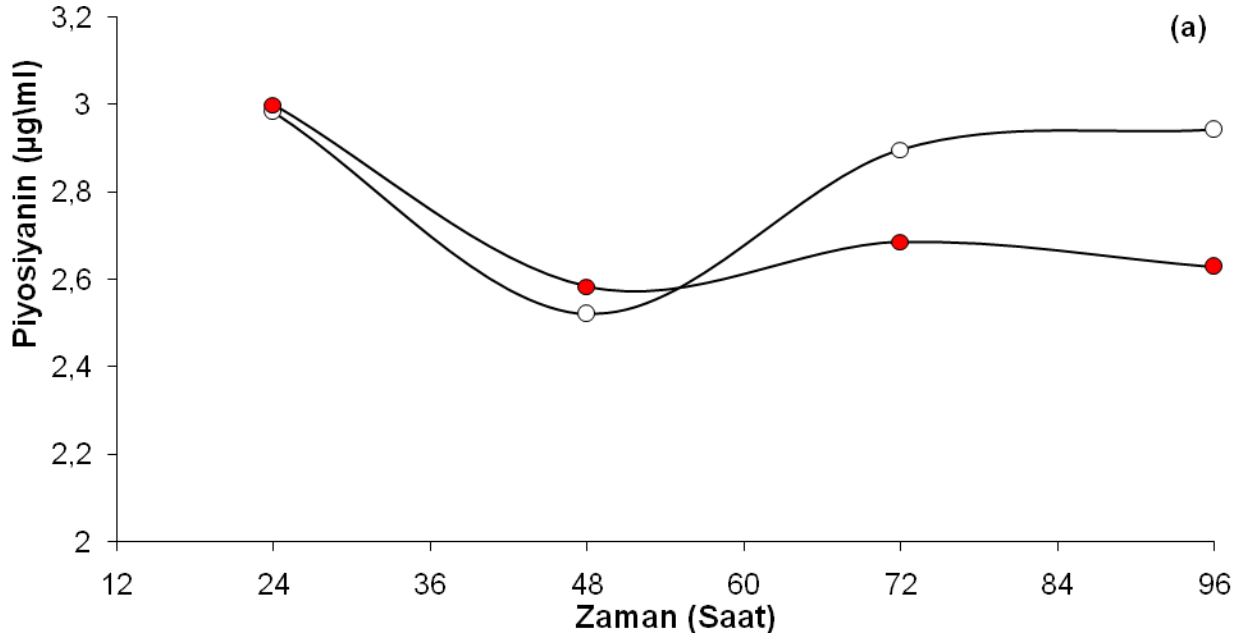
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 sükroz 50 mM NaCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 2,44 µg/ml piyosiyenin üretirken, 96. saatte 2,73 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 24. saatte 2,50 µg/ml ve 48. saatte 3,75 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece PaJC 48. saatte Pa'dan 1,42 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.11 a). 250 mM NaCl bulunan ortamlarda ise; Pa 48. saatte 2,37 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 2,42 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 72. saatte 2,52 µg/ml ve 96. saatte 4,02 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; PaJC 96. saatte Pa'dan 1,62 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.11 b).



Şekil 4.11. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 sükröz NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.3.3. Sükroz ve KCl içeren ortamlarda piyosiyanin üretimi

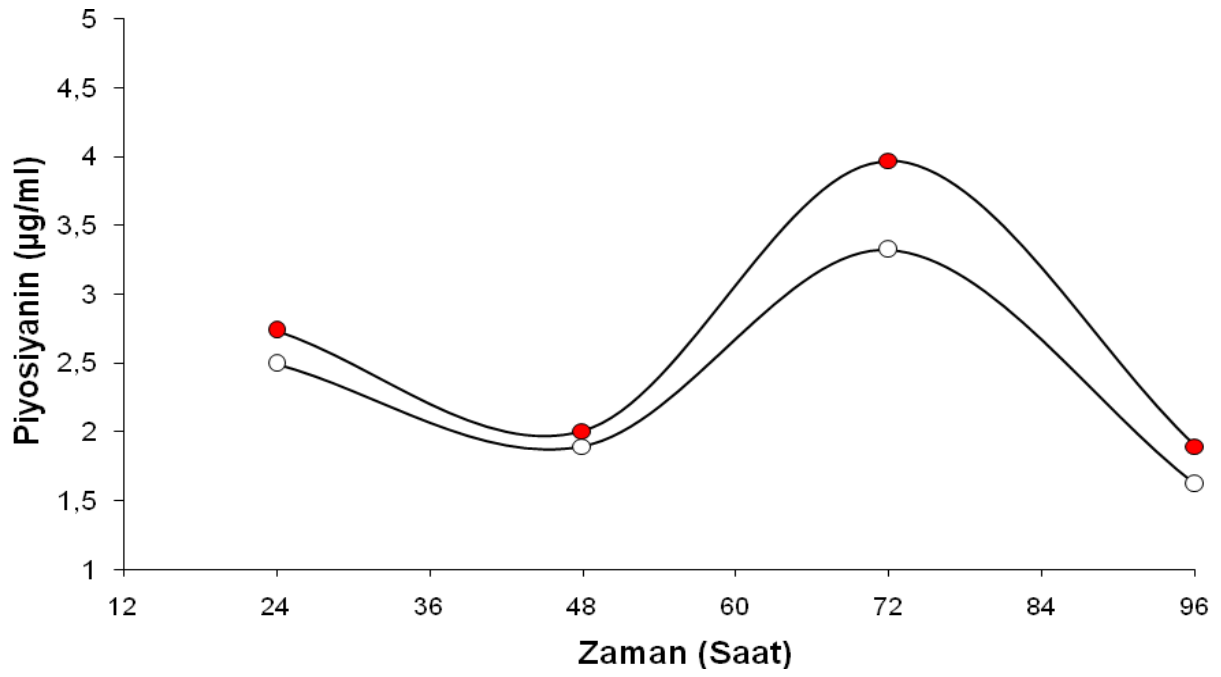
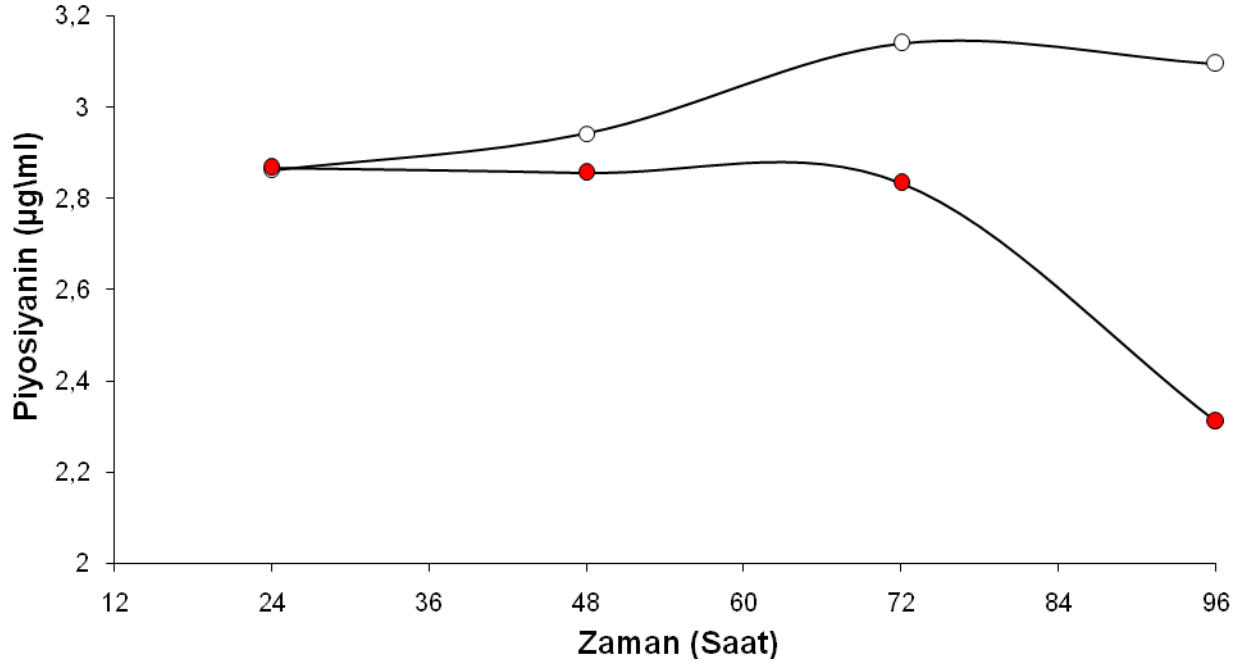
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 sükroz 50 mM KCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyanin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 48. saatte 2,52 µg/ml piyosiyanin üretirken, 24. saatte 2,99 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 48. saatte 2,58 µg/ml ve 24. saatte 3 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece Pa 96. saatte PaJC'dan 1,12 kat daha fazla piyosiyanin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.12 a). 250 mM KCl bulunan ortamlarda ise; Pa 48. saatte 2,07 µg/ml piyosiyanin üretirken, 96. saatte 2,48 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 24. saatte 2,11 µg/ml ve 96. saatte 3,57 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; Pa 24. saatte 2,45 µg/ml ile avantajlı durumdayken, PaJC 96. saatte Pa'dan 1,43 kat daha fazla piyosiyanin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.12 b).



Şekil 4.12. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 sükröz KCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.3.4. Sükroz ve CaCl₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

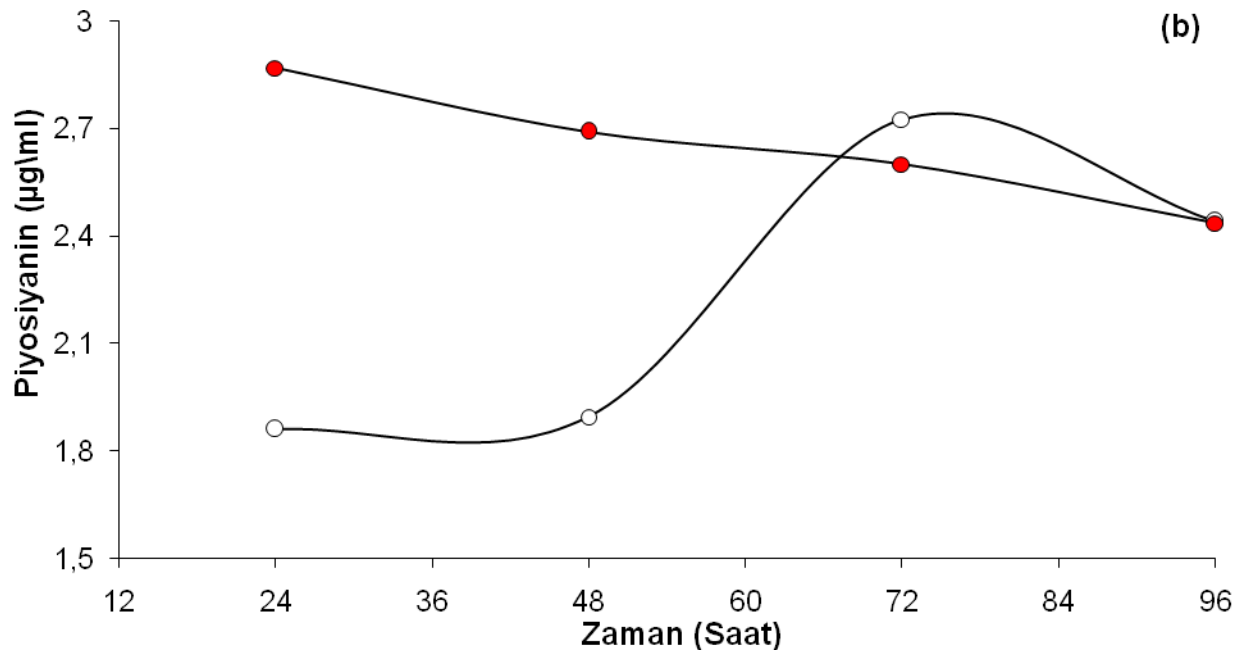
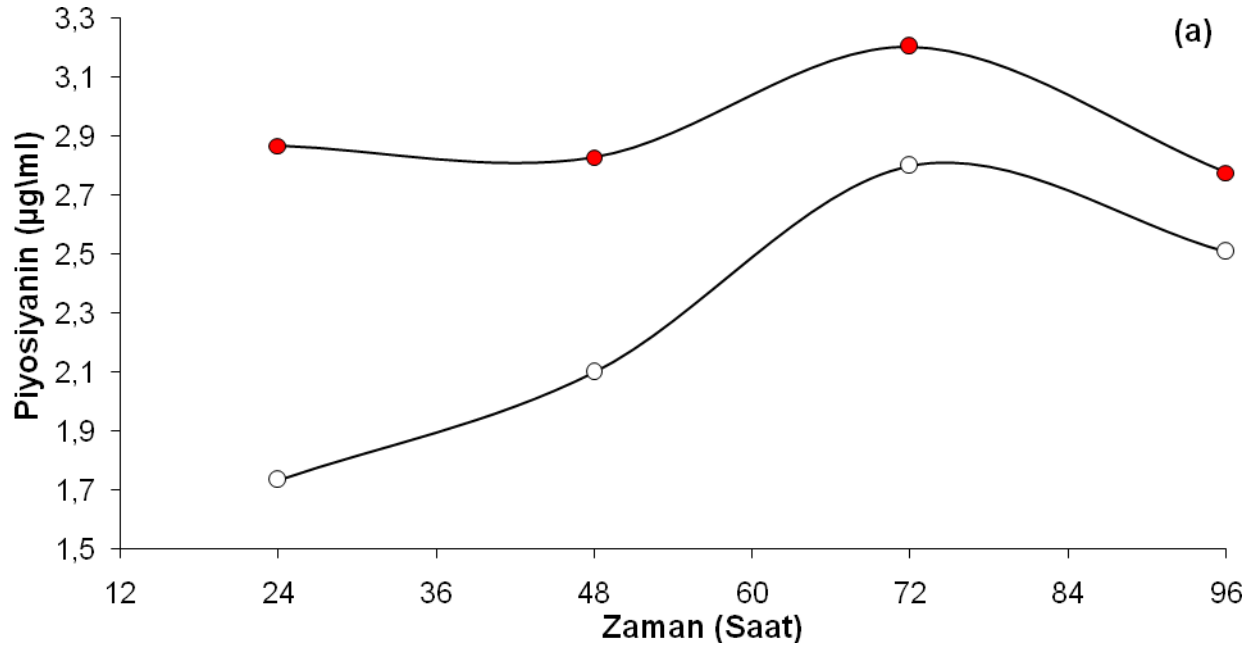
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 sükroz 50 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 2,86 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 3,14 µg/ml ile en yüksek değeri almıştır. PaJC ile 96. saatte 2,31 µg/ml ve 24. saatte 2,86 µg/ml ulaşılmıştır. Pa 96. saatte PaJC'dan 1,33 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma gelmiştir (Şekil 4.13 a). 250 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda ise; Pa 96. saatte 1,61 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 3,32 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 96. saatte 1,89 µg/ml ve 72. saatte 3,96 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; PaJC 72. saatte Pa'dan 1,19 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.13 b).



Şekil 4.13. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'in (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 sükröz CaCl₂ içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.1.4. Cd(NO₃)₂ içeren ortamda piyosiyenin üretimi

Pseudomonas Broth P besiyeri ve 100 ppm Cd(NO₃)₂ bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 1,73 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 2,79 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 96. saatte 2,77 µg/ml ve 72. saatte 3,20 µg/ml ulaşmıştır. Böylece PaJC 72. saatte Pa'dan 1,14 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.14 a). 200 ppm Cd(NO₃)₂ bulunan ortamlarda ise; Pa 24. saatte 1,86 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 2,72 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 96. saatte 2,43 µg/ml ve 24. saatte 2,86 µg/ml ulaşmıştır. Sonuçta; PaJC 48. saatte Pa'dan 1,42 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.14 b).



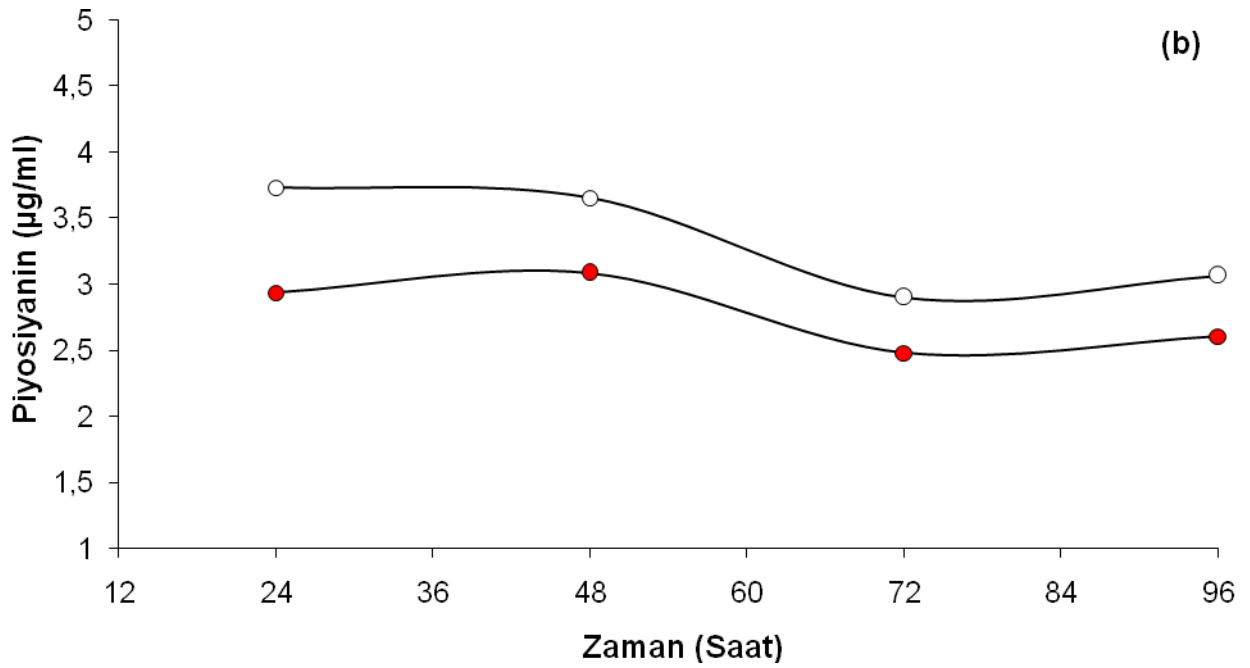
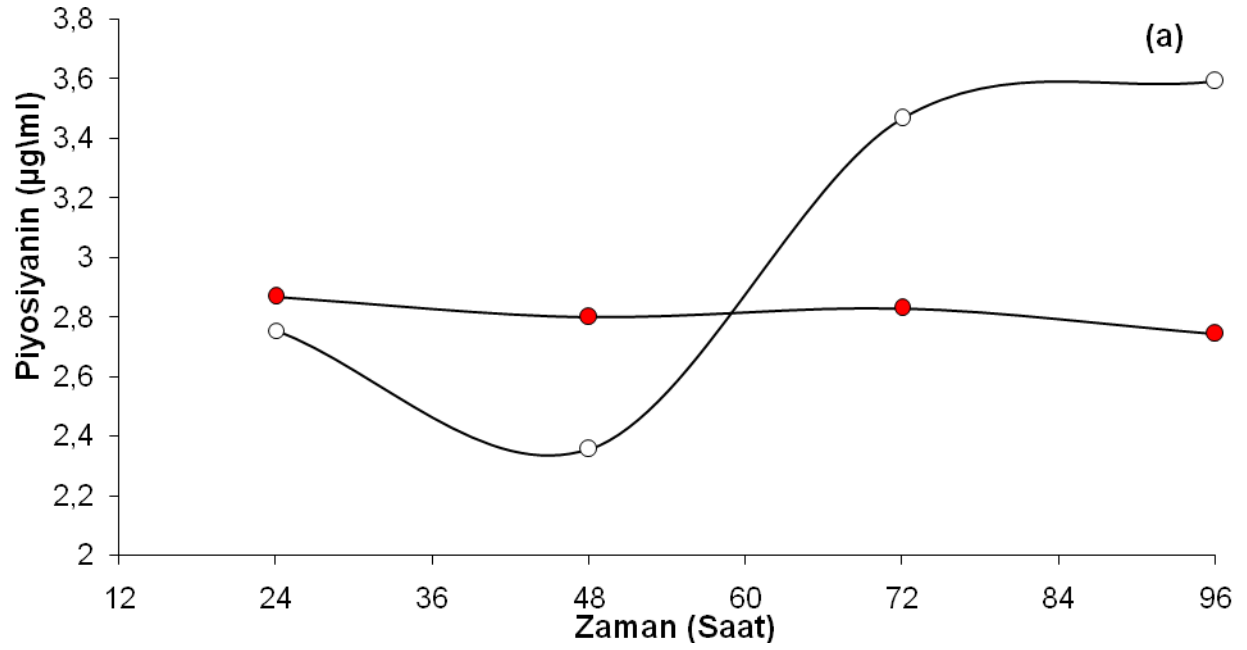
Şekil 4.14. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 100 ppm (b) 200 ppm $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 37 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.2. Pa ve PaJC'nın 30 °C'de Piyosiyanın Üretimi

4.2.1. Pa ve PaJC'nın karbon kaynağı olarak glikoz ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyanın üretimi

4.2.1.1. Glikoz ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyanın üretimi

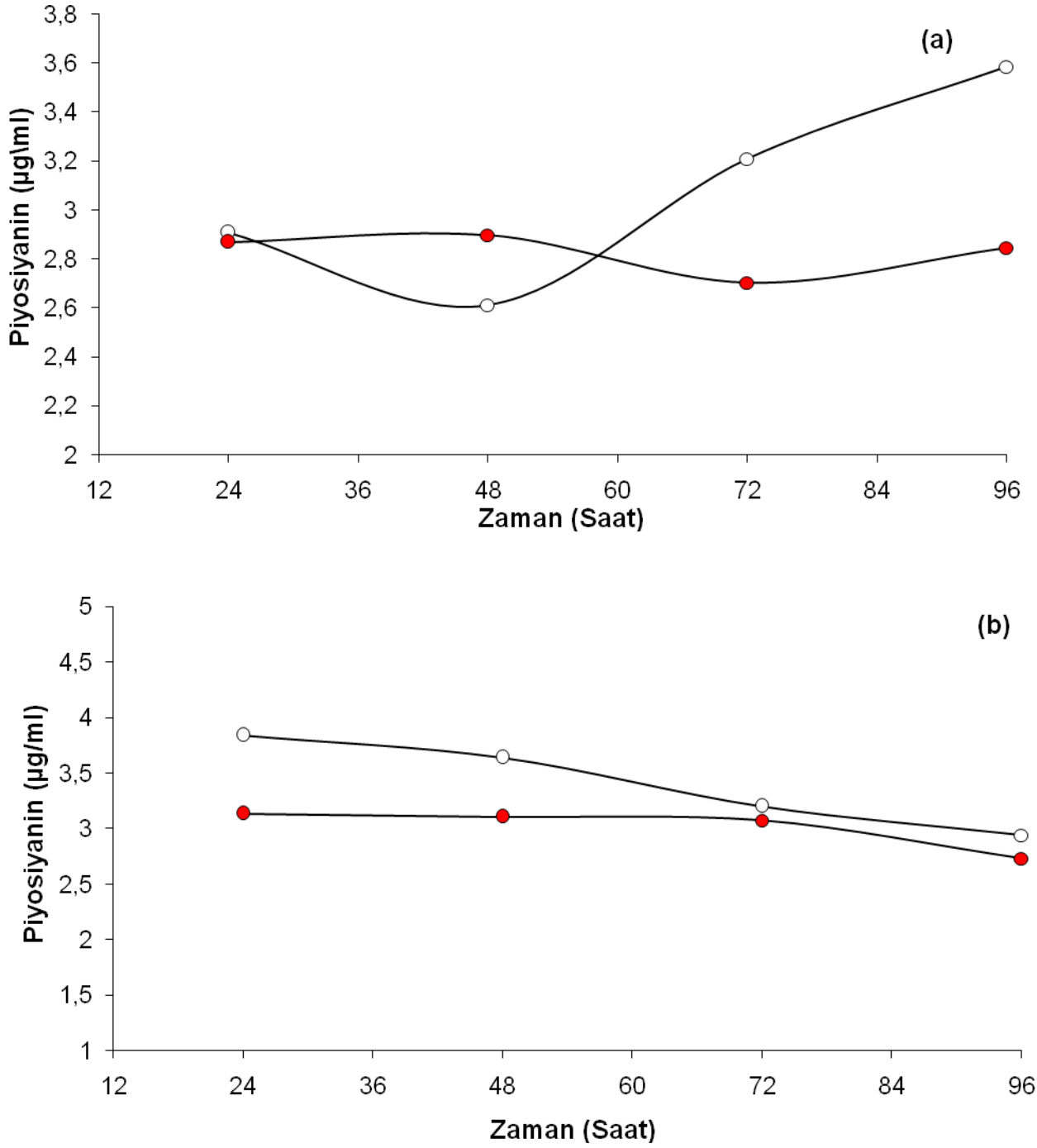
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 glikoz 50 mM NaCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyanın üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 48. saatte 2,35 µg/ml piyosiyanın üretirken, 96. saatte 3,59 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 96. saatte 2,74 µg/ml ve 24. saatte 2,86 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece PaJC 24. saatte 2,86 µg/ml ile avantajlı durumdayken, Pa 96. saatte PaJC'dan 1,31 kat daha fazla piyosiyanın üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.15 a). 250 mM NaCl bulunan ortamlarda ise; Pa 72. saatte 2,90 µg/ml piyosiyanın üretirken, 24. saatte 3,73 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 72. saatte 2,48 µg/ml ve 48. saatte 3,08 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; Pa 48. saatte PaJC'dan 1,18 kat daha fazla piyosiyanın üreterek avantajlı duruma geçmiştir. Grafik geneline bakıldığında da Pa'nın avantajlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.15 b).



Şekil 4.15. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.2.1.2. Glikoz ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

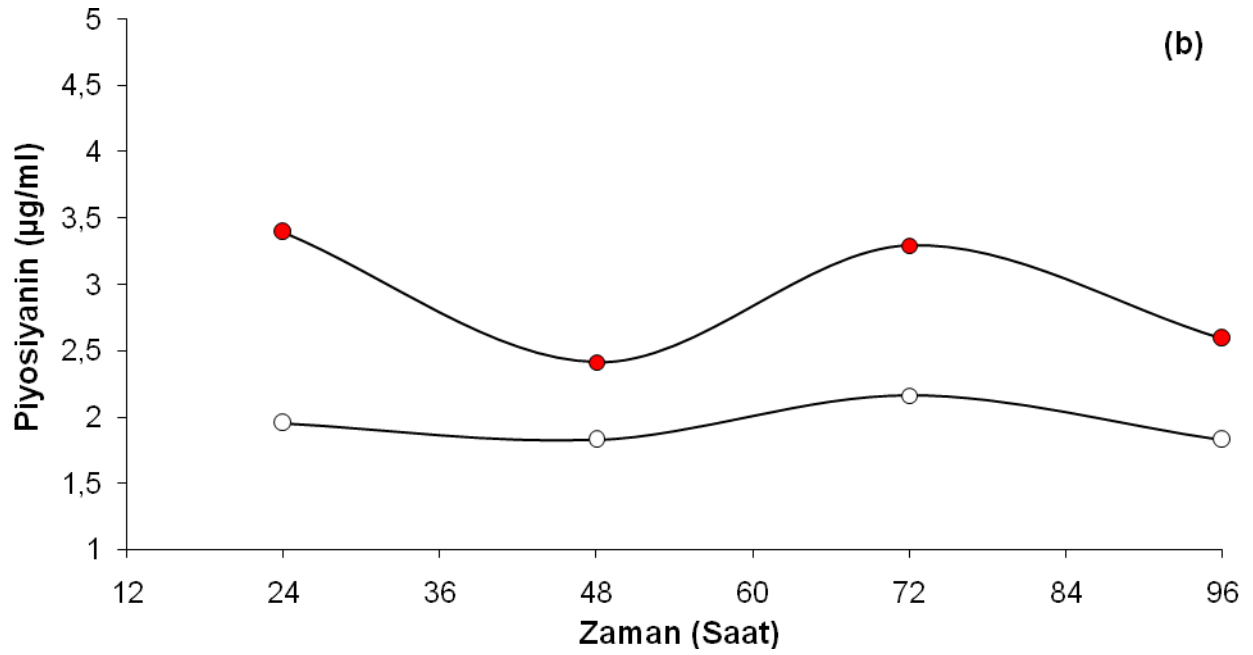
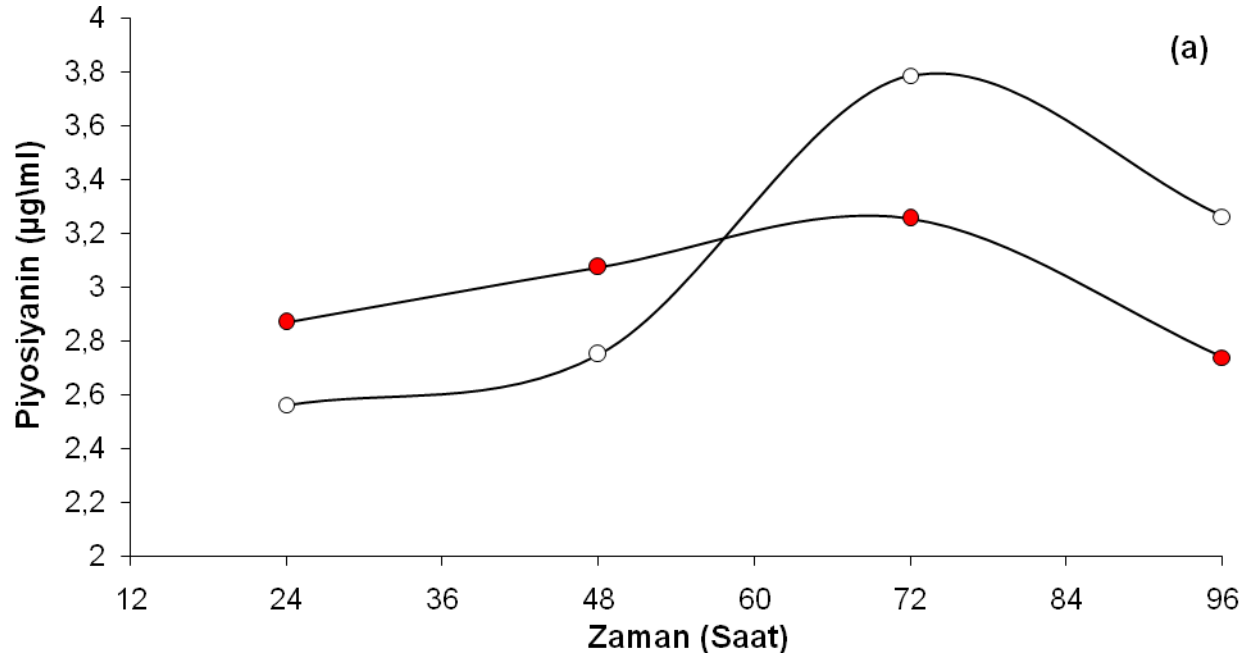
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 glikoz 50 mM KCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 48. saatte 2,61 µg/ml piyosiyenin üretirken, 96. saatte 3,58 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 72. saatte 2,70 µg/ml ve 48. saatte 2,89 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece Pa 96. saatte PaJC'dan 1,26 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.16 a). 250 mM KCl bulunan ortamlarda ise; Pa 96. saatte 2,94 µg/ml piyosiyenin üretirken, 24. saatte 3,84 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 96. saatte 2,73 µg/ml ve 24. saatte 3,13 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; Pa 48. saatte PaJC'dan 1,17 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.16 b).



Şekil 4.16. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz KCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.2.1.3. Glikoz ve CaCl₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 glikoz 50 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 2,56 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 3,78 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 96. saatte 2,73 µg/ml ve 72. saatte 3,25 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece PaJC 48. saatte 3,07 µg/ml ile avantajlı durumdayken, Pa 72. saatte PaJC'dan 1,16 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.17 a). 250 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda ise; Pa 48. saatte 1,82 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 2,15 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 48. saatte 2,41 µg/ml ve 24. saatte 3,39 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; PaJC 72. saatte Pa'dan 1,52 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.17 b).

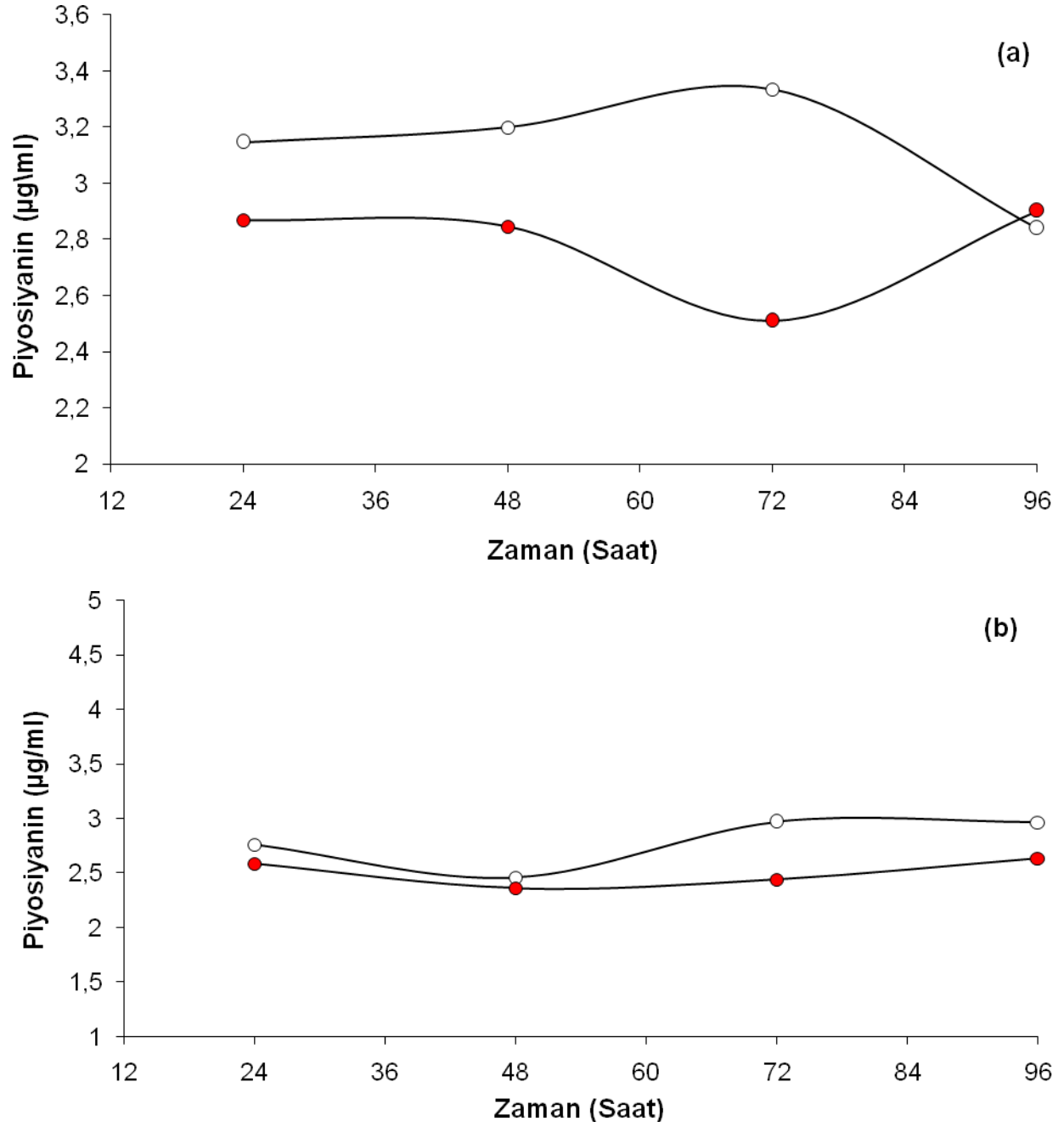


Şekil 4.17. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 glikoz CaCl_2 içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.2.2. Pa ve PaJC'in karbon kaynağı olarak gliserol ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyanin üretimi

4.2.2.1. Gliserol ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyanin üretimi

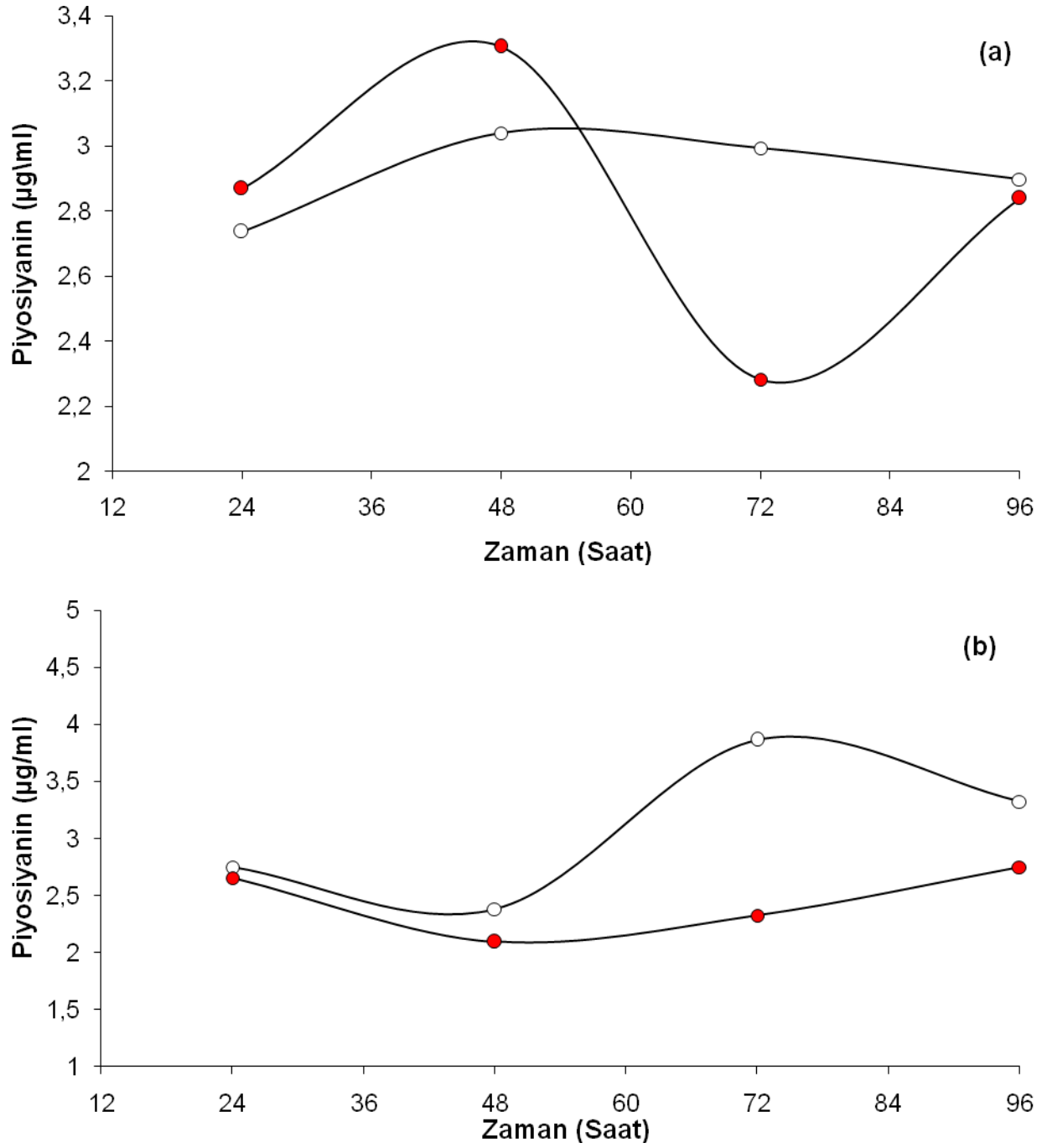
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 gliserol 50 mM NaCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyanin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 96. saatte 2,83 µg/ml piyosiyanin üretirken, 72. saatte 3,33 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 72. saatte 2,50 µg/ml ve 96. saatte 2,90 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece Pa 72. saatte PaJC'dan 1,33 kat daha fazla piyosiyanin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.18 a). 250 mM NaCl bulunan ortamlarda ise; Pa 48. saatte 2,45 µg/ml piyosiyanin üretirken, 72. saatte 2,97 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 48. saatte 2,36 µg/ml ve 96. saatte 2,63 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; Pa 72. saatte PaJC'dan 1,21 kat daha fazla piyosiyanin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.18 b).



Şekil 4.18. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.2.2.2. Gliserol ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

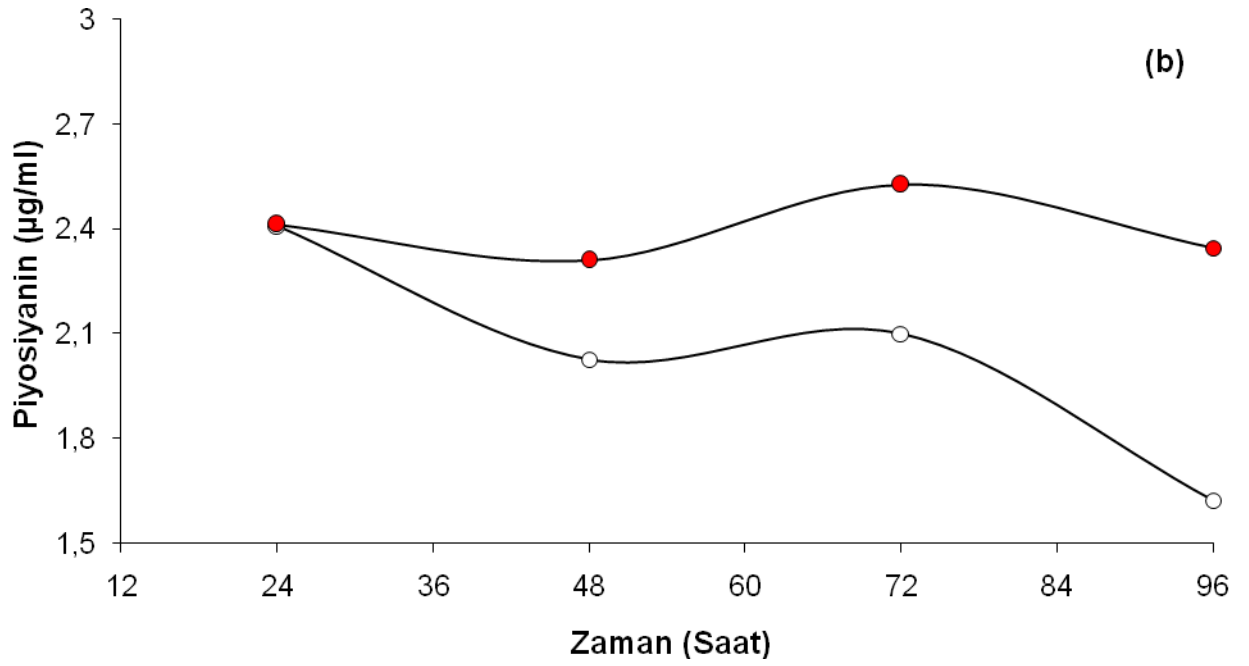
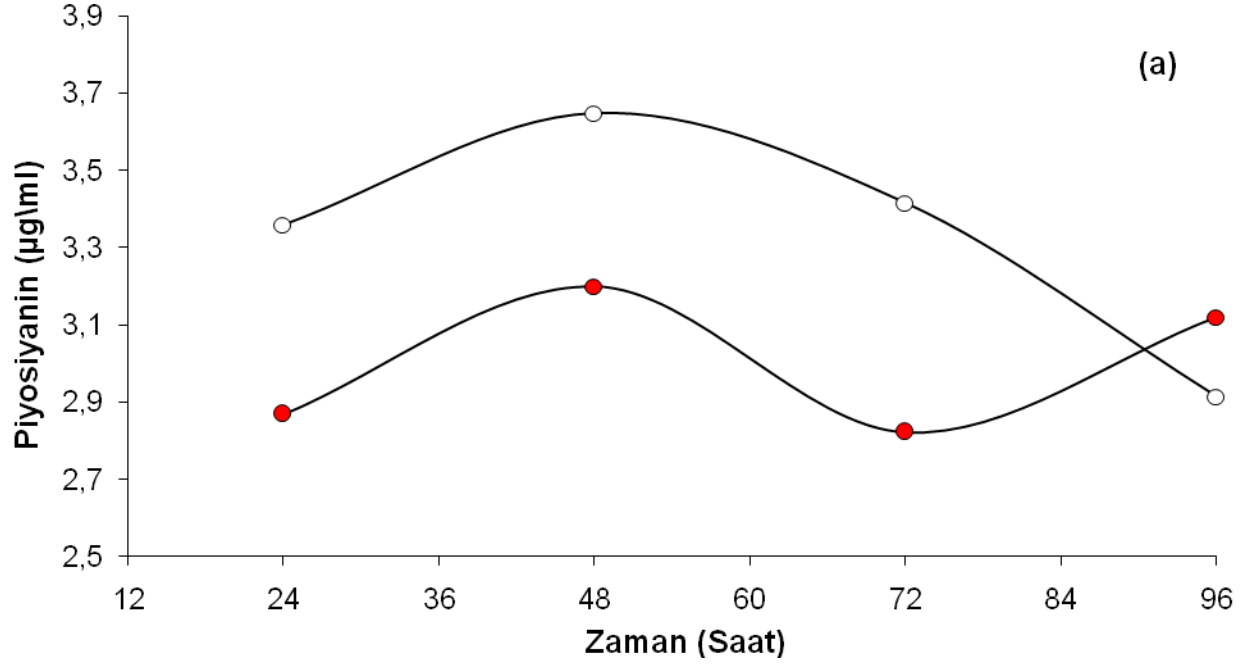
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 gliserol 50 mM KCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 2,73 piyosiyenin üretirken, 48. saatte 3,03 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 72. saatte 2,28 µg/ml ve 48. saatte 3,30 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece PaJC 48. saatte 3,30 µg/ml ile avantajlı durumdayken, Pa 72. saatte PaJC'dan 1,31 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.19 a). 250 mM KCl bulunan ortamlarda ise; Pa 48. saatte 2,37 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 3,86 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 48. saatte 2,09 µg/ml ve 96. saatte 2,74 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; Pa 72. saatte PaJC'dan 1,66 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.19 b).



Şekil 4.19. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol KCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.2.2.3. Gliserol ve CaCl₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 gliserol 50 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 96. saatte 2,91 µg/ml piyosiyenin üretirken, 48. saatte 3,64 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 72. saatte 2,82 µg/ml ve 48. saatte 3,19 µg/ml ulaşmıştır. Böylece Pa 72. saatte PaJC'dan 1,20 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.20 a). 250 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda ise; Pa 96. saatte 1,62 µg/ml piyosiyenin üretirken, 24. saatte 2,41 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 48. saatte 2,31 µg/ml ve 72. saatte 2,52 µg/ml ulaşmıştır. Sonuçta; PaJC 72. saatte Pa'dan 1,20 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.20 b).

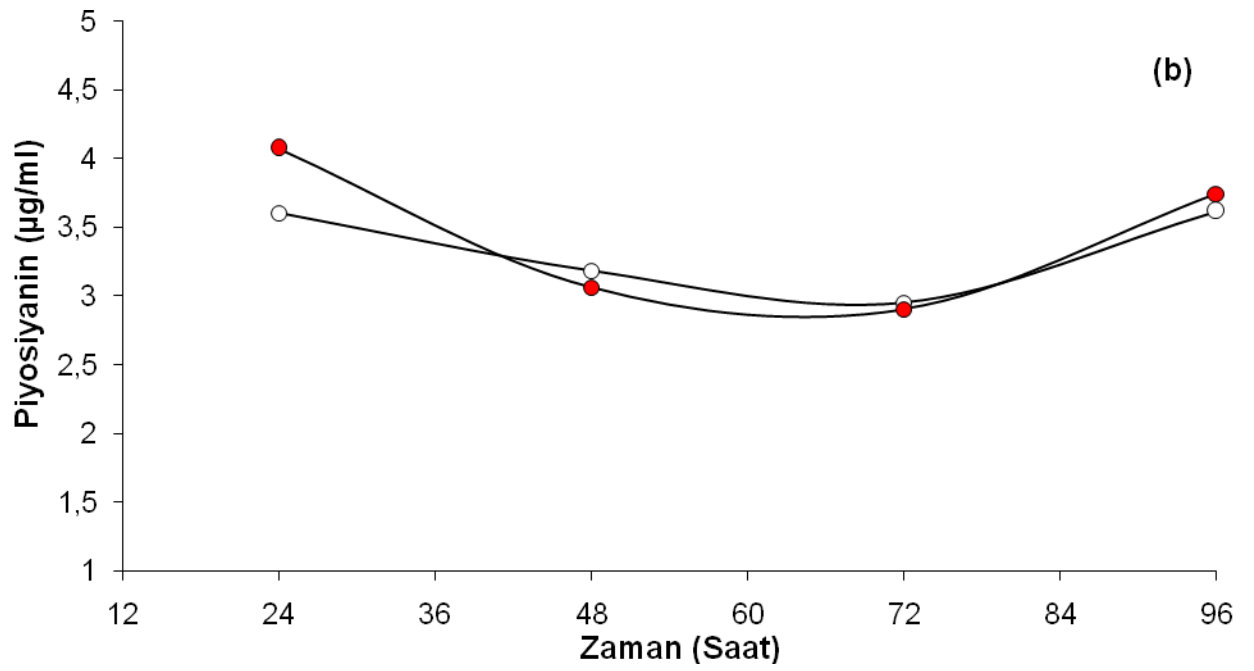
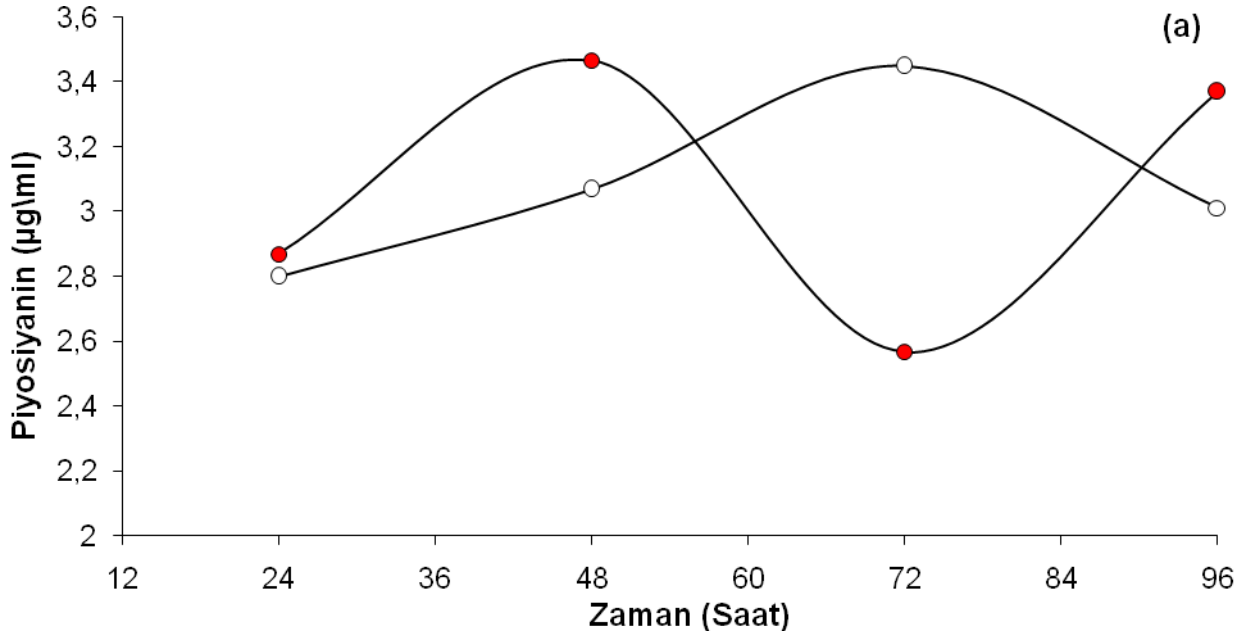


Şekil 4.20. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 gliserol CaCl₂ içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.2.3. Pa ve PaJC'in karbon kaynağı olarak sükroz ve çeşitli tuzları içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

4.2.3.1. Sükroz ve NaCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

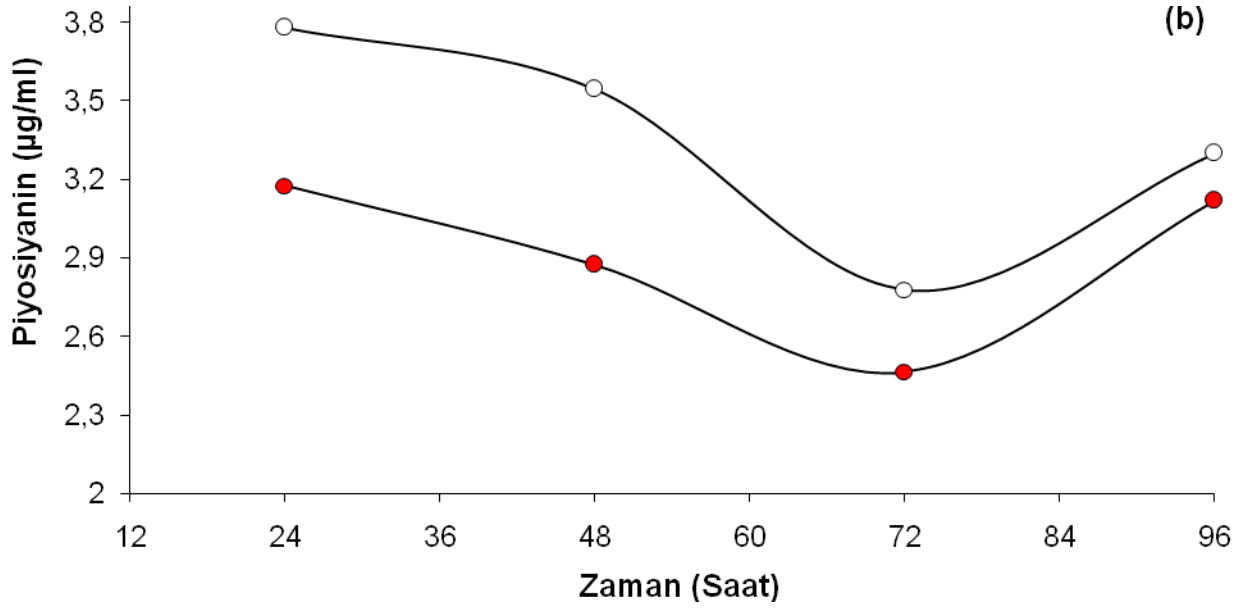
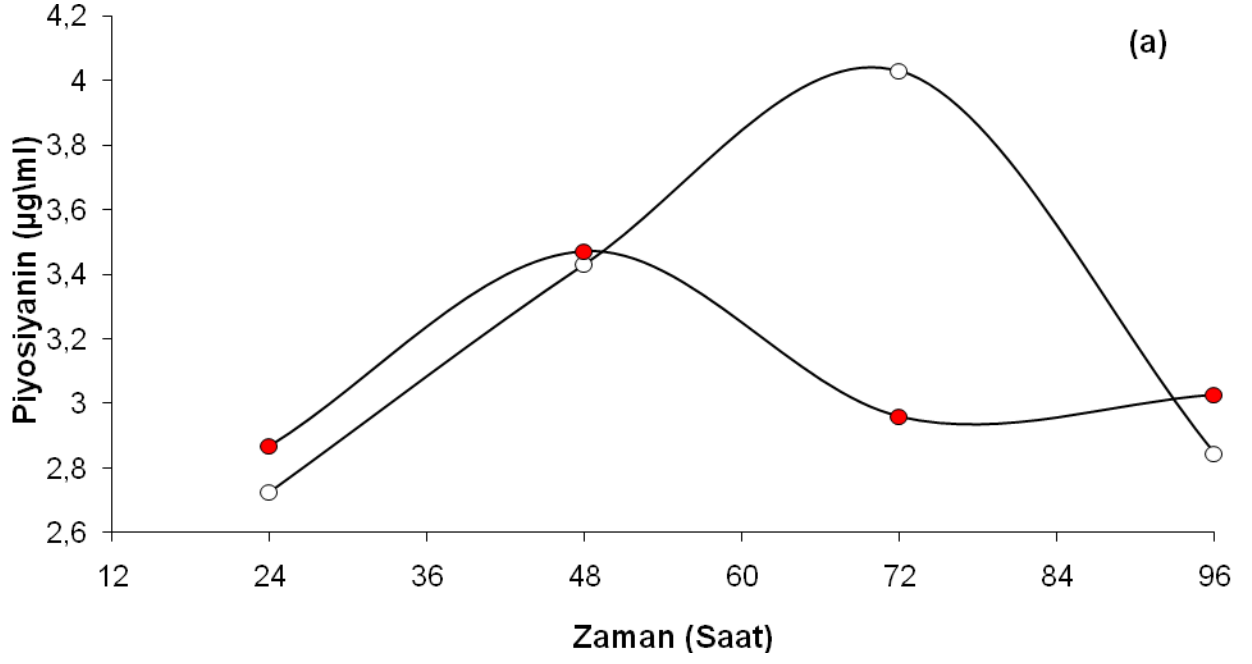
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 sükroz 50 mM NaCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 2,79 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 3,44 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 72. saatte 2,56 µg/ml ve 48. saatte 3,46 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece PaJC 48. saatte 3,46 µg/ml ile avantajlı durumdayken, Pa 72. saatte PaJC'dan 1,34 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.21 a). 250 mM NaCl bulunan ortamlarda ise; Pa 72. saatte 2,94 µg/ml piyosiyenin üretirken, 96. saatte 3,61 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 72. saatte 2,90 µg/ml ve 24. saatte 4,07 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; PaJC 24. saatte Pa'dan 1,13 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.21 b).



Şekil 4.21. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 süktroz NaCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.2.3.2. Sükroz ve KCl içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

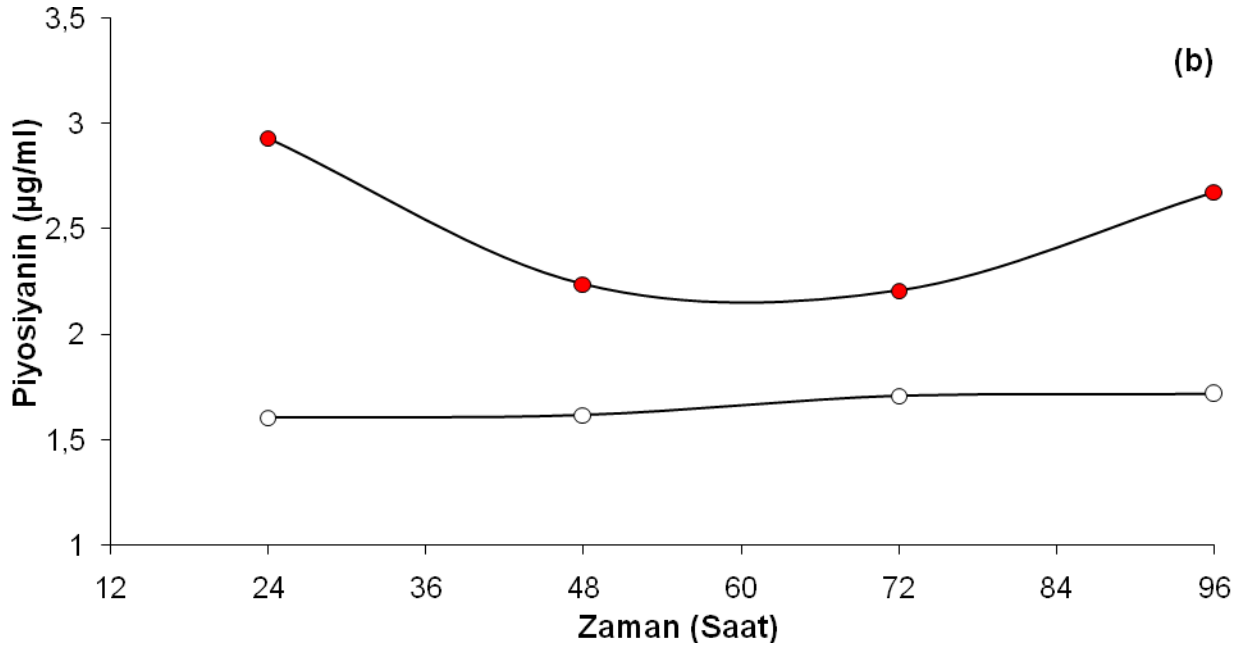
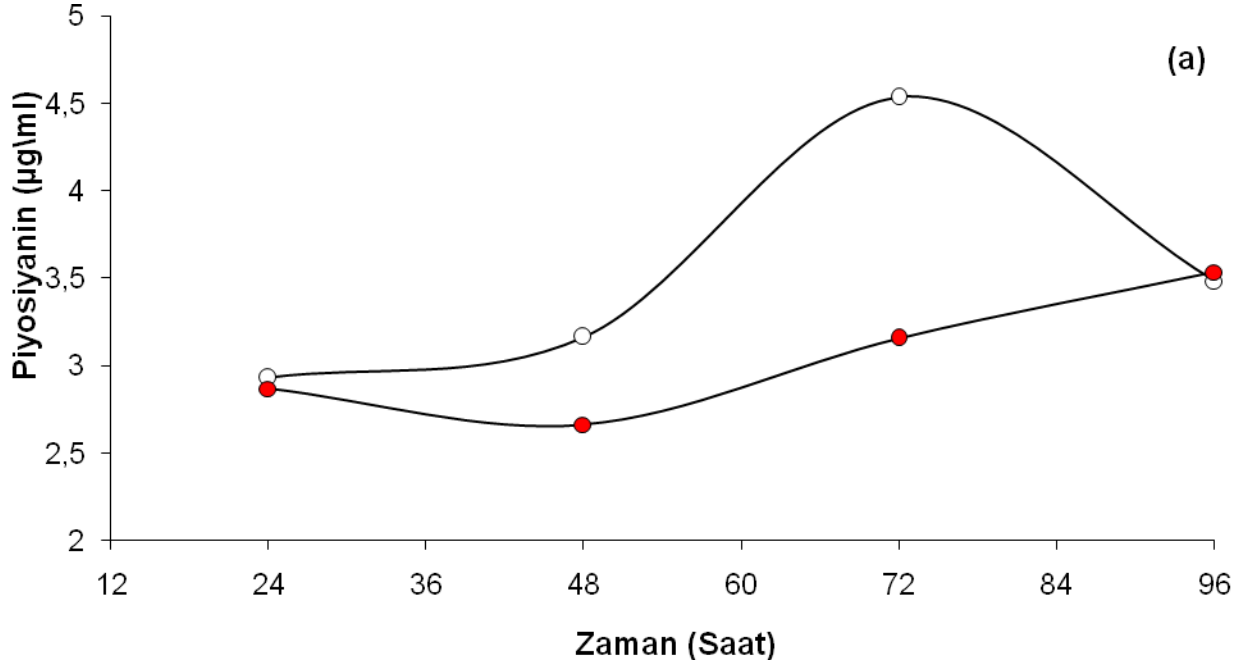
Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 sükroz 50 mM KCl bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 2,72 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 4,02 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 24. saatte 2,86 µg/ml ve 48. saatte 3,47 µg/ml ulaşılmıştır. Böylece Pa 72. saatte PaJC'dan 1,36 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.22 a). 250 mM KCl bulunan ortamlarda ise; Pa 72. saatte 2,77 µg/ml piyosiyenin üretirken, 24. saatte 3,77 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 72. saatte 2,46 µg/ml ve 24. saatte 3,17 µg/ml ulaşılmıştır. Sonuçta; Pa 48. saatte PaJC'dan 1,23 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.22 b).



Şekil 4.22. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 sükröz KCl içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

4.2.3.3. Sükroz ve CaCl₂ içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

Pseudomonas Broth P besiyeri ve % 1 sükroz 50 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda, Pa ve PaJC bakterilerinin piyosiyenin üretimi 24, 48, 72, 96. saatlerde saptanmıştır. Pa 24. saatte 2,93 µg/ml piyosiyenin üretirken, 72. saatte 4,53 µg/ml ile en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC ile 48. saatte 2,66 µg/ml ve 96. saatte 3,53 µg/ml ulaşmıştır. Böylece Pa 72. saatte PaJC'dan 1,43 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.23 a). 250 mM CaCl₂ bulunan ortamlarda ise; Pa 24. saatte 1,60 µg/ml piyosiyenin üretirken, 96. saatte 1,71 µg/ml ile en yüksek değer almıştır. PaJC ile 72. saatte 2,20 µg/ml ve 24. saatte 2,93 µg/ml ulaşmıştır. Sonuçta; PaJC 96. saatte Pa'dan 1,56 kat daha fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir (Şekil 4.23 b).



Şekil 4.23. *P. aeruginosa* (Pa)(○) ve PaJC(●)'ın (a) 50 mM (b) 250 mM % 1 süktroz CaCl₂ içeren besiyerlerinde piyosiyenin düzeyleri. Hücreler, 50 ml *Pseudomonas* Broth P besiyeri / 150 ml erlen olacak şekilde 30 °C'de ve 200 rpm'de üretilmiştir. Hata çubuklarının değeri % 10'un altındadır.

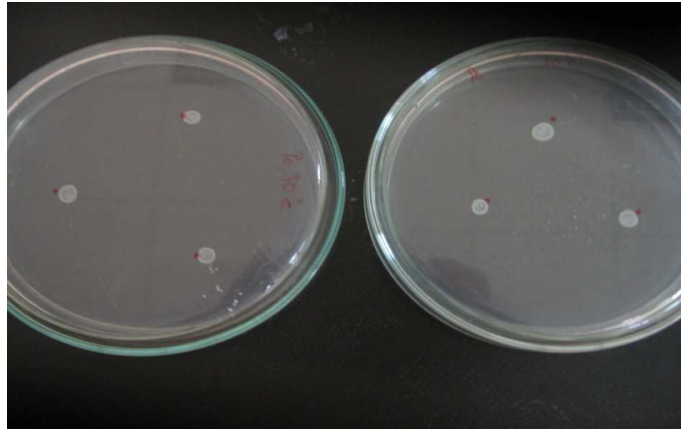
4.3. Pa ve PaJC'nın Yüzme, Titreme ve Kayma Hareketlerinin Analizi

P. aeruginosa'da çevreyi algılama sistemi, sadece virulans faktörlerinin üretiminde değil aynı zamanda yüzme, titreme ve kayma hareketlerinin gerçekleştirilmesinde de önemli rol oynamaktadır. *P. aeruginosa*'da flagella yüzme hareketinin gerçekleştirilmesini sağlarken, tip IV pilus ise kayma hareketinin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır [74].

4.3.1. Kayma Testi Analizi

P. aeruginosa ve PaJC bakterilerinde 30 °C'de kayma hareketi gözlenmiştir. Pa'da 0,2-0,3 mm'lik anlamlı belirgin bir kayma hareketi gözlenmezken (Şekil 4.24 a), PaJC da yaklaşık 2–9 mm arasında belirgin bir hareketin olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.24 b). Aradaki fark 30 kata kadar PaJC'nın lehine olacak şekilde gerçekleşmiştir.

(a)



(b)

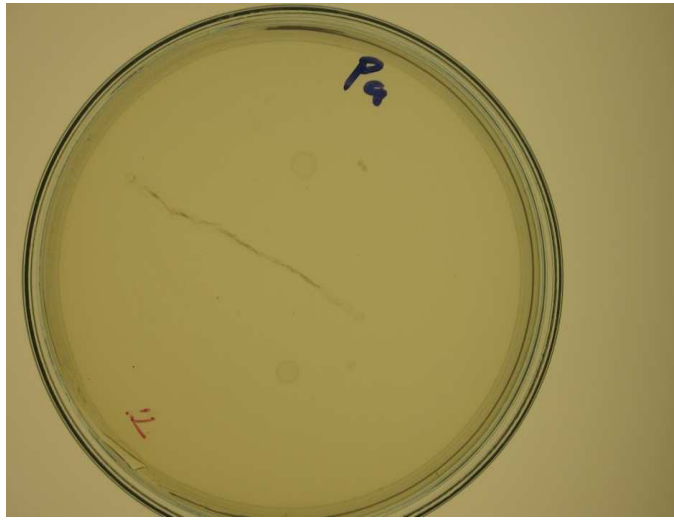


Şekil 4.24. a) Pa'nın kayma hareketi b) PaJC'nın kayma hareketi

4.3.2. Titreme Testi Analizi

P. aeruginosa ve PaJC bakterilerinde 37 °C’de titreme hareketi gözlenmiştir. Pa’da anlamlı bir titreme hareketi gözlenmezken (Şekil 4.25 a), PaJC da belirgin bir hareketin olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.25 b). Pa’lar yaklaşık 0,2 mm’lik titreme hareketi gösterirken, PaJC ‘lar ise, 0,4-0,5 mm’lik titreme hareketi göstermiştir. Sonuçta 2-2,5 kat PaJC daha fazla hareket göstermiştir.

(a)



(b)

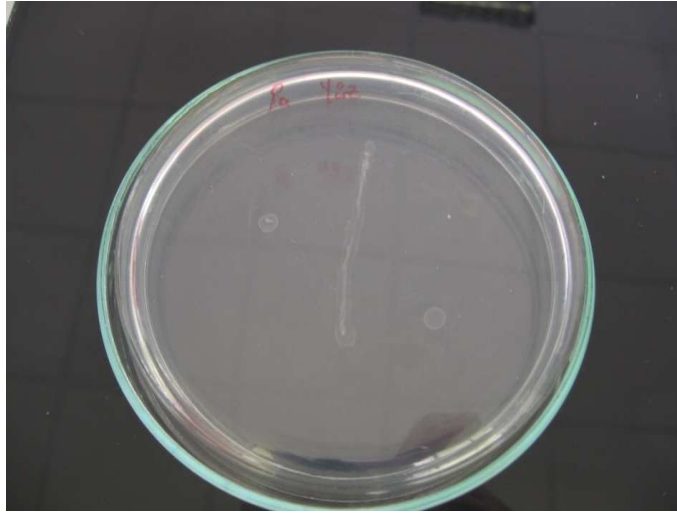


Şekil 4.25. a) Pa’nın titreme hareketi b) PaJC’in titreme hareketi

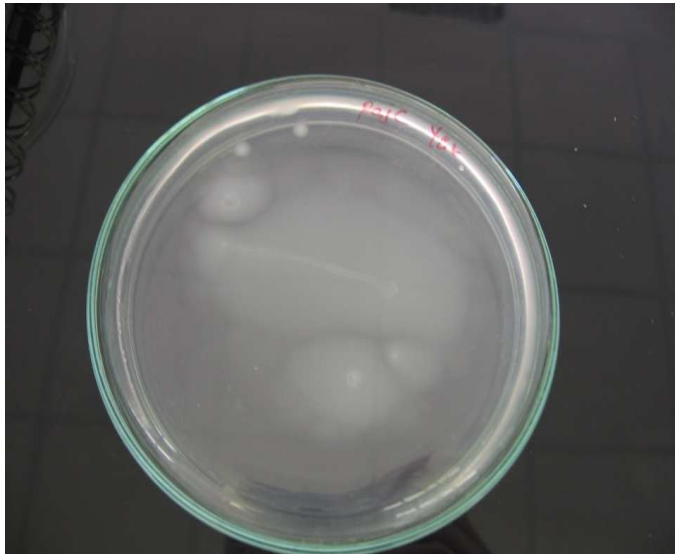
4.3.3. Yüzme Testi Analizi

P. aeruginosa ve PaJC bakterilerinde 37 °C’de yüzme hareketi gözlenmiştir. Pa’da yaklaşık 0,2 mm’lik az miktarda belirgin bir yüzme hareketi gözlenirken (Şekil 4.26 a), PaJC da 1,1-2,2 mm’lik çok daha belirgin bir hareketin olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.26 b). Aradaki fark 10 kat PaJC’ın lehine olacak şekilde gerçekleşmiştir.

(a)



(b)



Şekil 4.26. a) Pa’nın yüzme hareketi b) PaJC’ın yüzme hareketi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, *P. aeruginosa* ve onun kromozomuna *vgb* geni aktarılmış rekombinant suşunun önemli bir sekonder metabolit olan piyosiyaninin üretimi çeşitli stres koşullarında araştırılmıştır. Çalışmamızda bilinen en iyi piyosiyanin üreten bakteri olması nedeniyle *P. aeruginosa* tercih edilmiştir [41].

P. aeruginosa geniş bir habitat da gelişebilme yeteneğine sahip bir bakteridir. Aynı zamanda bu bakteri metabolik yeteneği ve çevresel çok yönlülüğü nedeni ile de geniş oranda çalışılmaktadır [31].

Vgb geninin aktarıldığı suşun yabani tip suşa göre piyosiyanin üretimi stres koşulları altında karşılaştırılmalı olarak araştırılmıştır. Ayrıca bu genin bakteri hareketine olan etkisi de karşılaştırılmıştır.

P. aeruginosa'nın kromozomu üzerine *vgb* geninin entegrasyonu, transpozon/transpozaz sistemi (Şekil 3.1) yardımıyla yapılmıştır. Bu kromozomal entegrasyon bu genin hücrelerin çoğalması sırasında hücreden hücreye aktarılması sırasında bir kaybın olmasını da engellemektedir [31].

Çalışmamızın ilk kısmında, herhangi bir madde eklenmeden sadece besi ortamında zamana bağlı olarak 37 °C'de her iki bakterinin piyosiyanin üretimine bakılarak en yüksek piyosiyanin üretim zamanı tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Sonuçta, zamana bağlı olarak özellikle 96. saatte PaJC'nin 6,21 µg/ml ulaştığı görülmektedir.

Çalışmamızın diğer parametreleri incelendiğinde; 37 °C'de farklı karbon kaynaklarının (glikoz, gliserol, sükroz) farklı yüzdelerdeki (% 1 ve % 0,1) piyosiyanin üretimleri incelenmiş ve sonuçta; glikoz bulunan ortamlarda Pa ve PaJC'nin 48. saatte yaklaşık 6,23 µg/ml ulaştığı görülmektedir. Gliserol varlığında PaJC'nin 48. saatte 11,35 µg/ml ulaştığı ve her iki yüzdede avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır. Sükroz bulunan ortamlarda ise; 24. saatlerde PaJC'nin piyosiyanin üretiminde daha avantajlı durumda olduğu gözlenirken, Pa'nın piyosiyanin miktarının giderek arttığı 96. saatte ise piyosiyanin miktarı açısından avantajlı duruma geçtiği görülmektedir (Şekil 4.2,4.6,4.10).

5.1. 37 °C’de Farklı Karbon Kaynakları (glikoz, gliserol, sükroz) ve Tuz Koşullarındaki Piyosiyanin Üretimi

5.1.1. Glikoz ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyanin üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin % 1 glikoz ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda (NaCl, KCl, CaCl₂) piyosiyanin üretimi açısından incelediğimizde; 50 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda şekil incelendiğinde 96. saatte en düşük değer alırken, 72. saatte en yüksek değere ulaşılmıştır (Şekil 4.3 a). Pa’nın 72. saat örnekleri PaJC’nın örnekleriyle kıyaslandığında 1,64 kat daha fazla piyosiyanin ürettiği belirlenmiştir. Diğer bir deyimle, grafik geneli incelendiğinde Pa’nın piyosiyanin üretimi açısından avantajlı durumda olduğu görülmektedir. 250 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda ise; 24. saatte en düşük değerini alırken, en yüksek değerini ise 48. saatte aldığı görülmektedir. Pa’nın 48 saat kültür örneklerinde rekombinantına göre 1,13 kat fazla piyosiyanin ürettiği gözlemlenmiş ve sonuç olarak Pa’nın piyosiyanin üretimi açısından önemli bir avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.3 b).

50 µg/ml KCl bulunan ortamlarda şekil incelendiğinde, hem Pa hem de *vgb* geni taşıyan rekombinant suşu 72. saatte en yüksek değer alırken, 96. saatte en düşük değer almışlardır (Şekil 4.4 a). Piyosiyanin üretimi Pa’da önemli derecede avantaj sağlamaktadır. 250 µg/ml bulunan ortamlarda ise; 24. saatte en düşük değer alırken, 72. saatte en yüksek değere ulaşılmıştır. Pa’nın piyosiyanin üretimi, 72. saat örneklerinde rekombinantına göre 1,34 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak, şekil incelendiğinde, ilk 48. saatte her iki bakteri eşit miktarda piyosiyanin üretirken, Pa’nın (72. ve 96. saatlerde) rekombinantına göre daha yüksek miktarda piyosiyanin ürettiği saptanmıştır (Şekil 4.4 b).

50 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda en yüksek piyosiyanin üretimi 72. saatte olurken, 96. saatte ise en düşük değer aldığı görülmektedir (Şekil 4.5 a). Şekil incelendiğinde, Pa’nın 96. saate kadar piyosiyanin üretimi açısından avantajlı durumda olduğu gözlenmiştir. Diğer bir deyimle Pa, 96. saatte 2,21 µg/ml piyosiyanin üreterek en düşük değerini alırken, 72. saatte ise 3,83 µg/ml ile en yüksek değere ulaşılmıştır. 250 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda ise 48. saatte en düşük değer alırken, 24. saatte en yüksek değere ulaşılmıştır. Şekil incelendiğinde, bu yüksek konsantrasyonda PaJC’nın

avantajlı durumda olduğu ve VHb/*vgb* sisteminin bakteriye avantaj sağladığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.5 b).

5.1.2. Gliserol ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin % 1 gliserol ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda (NaCl, KCl, CaCl₂) piyosiyenin üretimi açısından incelediğimizde, 50 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda 96. saatte en düşük değerini alırken, 72. saatte ise en yüksek değere ulaşılmıştır (Şekil 4.7 a). Şekil incelendiğinde, PaJC'ın 96. saatte kadar piyosiyenin üretimi açısından avantajlı durumda olduğu sonucuna varılmıştır. 250 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda ise; 72. saatte en düşük değerini alırken, en yüksek değere ise 48. saatte ulaşıldığı görülmektedir. Buna bağlı olarak, 48. saatte en yüksek değere ulaşan her iki bakteride, rekombinantların yabanıl suşa göre ortalama 1,15 kat fazla piyosiyenin ürettiği saptanmıştır (Şekil 4.7 b).

50 µg/ml KCl bulunan ortamlarda 24. saatte en düşük değer alırken, 96. saatte en yüksek değere ulaşılmıştır (Şekil 4.8 a). Grafikte her iki bakterinin hemen hemen eşit miktarda piyosiyenin ürettiği görülmektedir. 250 µg/ml KCl bulunan ortamlarda ise; 72. saatte en düşük değerini alırken, 96. saatte en yüksek değere ulaşılmıştır. Grafik geneline bakıldığında, ilk 48 saatte PaJC'ın avantajlı durumda olduğu görülürken, Pa'nın piyosiyenin miktarını giderek arttırdığı ve PaJC'dan daha avantajlı duruma geçtiği belirlenmiştir. Sonuç olarak Pa, 96. saatte rekombinant suştan 1,5 kat fazla piyosiyenin üretmiştir (Şekil 4.8 b).

Stres koşulu olarak, 50 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda şekil incelendiğinde, yabanıl ve rekombinant suşların en yüksek değerlerine 72. saatte ulaşıldığı görülürken, 24. saatte en düşük değer almışlardır (Şekil 4.9 a). Şekil incelendiğinde, rekombinant bakterinin yabanıl suştan 1,25 kat fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçtiği fakat son saatlere (96. saat) doğru piyosiyenin miktarında bir azalışın olduğu sonucuna varılmıştır. 250 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda ise; 24. saatte en düşük değer alırken, 96. saatte en yüksek değere ulaşılmıştır. Rekombinant bakterinin 72. saatte 1,17 kat fazla piyosiyenin üretimi yaptığı belirlenmiştir. Bunun sebebi ise; VHb/*vgb* sisteminin bakteriye avantaj sağlamış olmasıdır (Şekil 4.9 b).

5.1.3. Sükroz ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

Pa ve PaJC bakterilerinin % 1 sükroz ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda (NaCl, KCl, CaCl₂) piyosiyenin üretimi açısından incelediğimizde, 50 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda 24. saatte en düşük değerini alırken, 48. saatte en yüksek değere ulaşılmıştır. 48. ve 72. saatler arasında rekombinant suşun sekonder metabolit olan piyosiyenin üretiminin yabanıl suştan 1,42 kat fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11 a). Şekilde, PaJC'nın piyosiyenin üretimi açısından oldukça avantajlı durumda olduğu görülmektedir. Stres koşulu olarak 250 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda ise; 24. ve 72. saatler arasında her iki bakterinin piyosiyenin miktarlarında bariz bir değişikliğin olmadığı ancak rekombinant suşun sahip olduğu VHB/*vgb* sisteminin bakteriye sağladığı avantajdan dolayı piyosiyenin miktarında artışın olduğu düşünülmektedir. (Şekil 4.11 b).

50 µg/ml KCl bulunan ortamlarda 48. saatte en düşük değerini alırken, genç hücrelerin olduğu 24. saatte en yüksek değere ulaşılmıştır (Şekil 4.12 a). Pa, 96. saatte rekombinant suştan 1,12 kat fazla piyosiyenin üreterek avantajlı duruma geçmiştir. 250 µg/ml KCl bulunan ortamlarda, yabanıl suşun çalışılan süre içerisinde piyosiyenin miktarı bakımından bariz bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir. Grafik incelendiğinde, ilk 48. saatte Pa, piyosiyenin üretimi açısından avantajlı durumdayken, son saatlere (96. saatte) doğru PaJC'nın sahip olduğu VHB/*vgb* sisteminin piyosiyenin miktarını giderek arttırdığı ve yabanıl tipe göre daha avantajlı durumda olduğu görülmektedir (Şekil 4.12 b).

Stres koşulu olarak 50 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda şekil incelendiğinde 96. saatte en düşük değerini alırken, en yüksek değere 72. saatte ulaşıldığı görülmektedir. Pa, 96. saatte rekombinant suştan 1,33 kat fazla piyosiyenin üreterek avantajlı konuma gelmiştir (Şekil 4.13 a). 250 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda ise; her iki suşta 96. saatte en düşük değerlerini alırken, rekombinant suş yabanıl suştan 72. saatte 1,19 kat fazla piyosiyenin üretimi yapmıştır. Şekil incelendiğinde, PaJC'nın *vgb* gen sistemi sayesinde yabanıl suştan daha fazla piyosiyenin ürettiği gözlenmiştir (Şekil 4.13 b).

5.2. 30 °C’de Farklı Karbon Kaynakları (glukoz, gliserol, sükröz) ve Tuz Koşullarındaki Piyosiyanın Üretimi

Çalışmamızın diğer bir parametresi olan 30 °C’de Pa ve PaJC bakterilerinin çeşitli karbon kaynaklarının (glukoz, gliserol, sükröz) ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda (NaCl, KCl, CaCl₂) piyosiyanın üretimleri incelenmiştir.

5.2.1. Glukoz ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyanın üretimi

Stres koşulu olarak 50 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda rekombinant suşun çalışılan süre içerisinde piyosiyanın üretimi bakımından bariz bir değişikliğin olmadığı sonucuna varılmıştır. Yabanıl suşun ise 48. saatte en düşük değerini aldığı, 96. saatte ise en yüksek değere ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.15 a). 48. saatten itibaren Pa’nın, piyosiyanın üretimini giderek arttırdığı ve PaJC’dan piyosiyanın üretimi açısından daha avantajlı duruma geçtiği görülmektedir. Stres koşulu olarak 250 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda ise; 72. saatte en düşük değerini alırken, en yüksek değere ise 24. saatte ulaşıldığı görülmektedir. Yabanıl suşun piyosiyanın üretimi açısından rekombinant suştan daha avantajlı durumda olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.15 b).

Stres koşulu olarak 50 µg/ml KCl bulunan ortamlarda yabanıl suş 96. saatte rekombinant suştan 1,26 kat fazla piyosiyanın üreterek en yüksek değere ulaşırken, en düşük değere ise 48. saatte ulaşmıştır (Şekil 4.16 a). 250 µg/ml KCl bulunan ortamlarda ise; rekombinant suşun piyosiyanın üretiminde bariz bir fark gözlenmezken, yabanıl suşun 24. saatten itibaren piyosiyanın üretiminde bir azalışın olduğu saptanmıştır. Şekil incelendiğinde, her iki ortam için Pa’nın piyosiyanın üretimi açısından avantajlı durumda olduğu görülmektedir. (Şekil 4.16 b).

50 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda şekil incelendiğinde, 24. saatte en düşük değer alırken, 72. saatte en yüksek değere ulaşılmıştır. Özellikle Pa’nın 72. saatte PaJC’dan 1,16 kat fazla üretim yaptığı dikkat çekmektedir (Şekil 4.17 a). Yabanıl suşun avantajlı durumda olduğu ancak çalışmamızın son saatlerine (96. saatte) doğru piyosiyanın miktarında azalışın olduğu şekilde gözlenmektedir. Stres koşulu olarak 250 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda ise; 48. saatte en düşük değerini alırken, 72. saatte en

yüksek değere ulaşmıştır. Rekombinant suşun 72. saatte 1,52 kat kadar üretimini arttırdığı ve yabancı suştan avantajlı durumda olduğu saptanmıştır (Şekil 4.17 b).

5.2.2. Gliserol ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyenin üretimi

Stres koşulu olarak 50 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda, 72. saatte Pa en yüksek değere ulaşırken, PaJC ise en düşük değerini almıştır. (Şekil 4.18 a). Grafik geneline bakıldığında, Pa 72. saatte rekombinant suştan 1,33 kat fazla piyosiyenin üreterek avantajlı durumdayken, son saatlerde piyosiyenin miktarında azalış görülmektedir. 250 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda ise; 48. saatte en düşük değerini alırken, en yüksek değere 72. saatte ulaştığı görülmektedir. Yabancı suşun 1,21 kat fazla piyosiyenin üreterek avantajlı durumda olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.18 b).

50 µg/ml KCl bulunan ortamlarda 72. saatte en düşük değerini alırken, 48. saatte en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir. Rekombinant suş 48. ve 72. saatte yaklaşık 10 kat kadar bir düşüş göstererek dezavantajlı konuma geçmiştir (Şekil 4.19 a). İlk 48. saatte PaJC'nın piyosiyenin üretimi açısından avantajlı durumda olduğu görülürken, 96. saate doğru Pa'nın piyosiyenin üretimini arttırdığı ve PaJC'dan piyosiyenin üretimi açısından daha avantajlı duruma geçtiği görülmektedir. Stres koşulu olarak 250 µg/ml KCl bulunan ortamlarda ise; 48. saatte en düşük değerini alırken, 72. saatte en yüksek değere ulaşmıştır. Buna bağlı olarak, yabancı suş rekombinant suştan 1,66 kat fazla piyosiyenin üreterek avantajlı durumda olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.19 b).

50 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda şekil incelendiğinde, en yüksek değere 48. saatte ulaşırken, 72. saatte ise en düşük değere ulaşmıştır (Şekil 4.20 a). Grafikte, Pa'nın 72. saatte rekombinant suştan 1,20 kat fazla piyosiyenin ürettiği fakat son saatlere doğru piyosiyenin miktarında azalışın olduğu sonucuna varılmıştır. Stres koşulu olarak 250 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda ise, her iki bakteri 24. saatte aynı miktarda piyosiyenin üretirken, rekombinant suş 72. saatte en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC suşu hem konsantrasyon miktarındaki artış hem de sahip olduğu *vgb* sistemi sayesinde yabancı suştan daha avantajlı durumda olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.20 b).

5.2.3. Sükroz ve farklı tuz stresi içeren ortamlarda piyosiyanin üretimi

Stres koşulu olarak 50 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda, PaJC 96. saatte en yüksek değere ulaşırken, Pa ise 72. saatte en yüksek değere ulaşmıştır (Şekil 4.21 a). Pa'ın, 1,34 kat fazla piyosiyanin üreterek daha avantajlı durumda olduğu görülmektedir. 250 µg/ml NaCl bulunan ortamlarda ise; her iki bakteri ilk 48. saatte hemen hemen aynı paralellikte bir üretim görülürken, daha sonraki saatlerde rekombinant suş 1,13 kat daha fazla piyosiyanin üretimi gerçekleştirerek yabancı suşa göre avantaj kazanmıştır (Şekil 4.21 b).

50 µg/ml KCl bulunan ortamlarda 24. saatte en düşük değerini alırken, 72. saatte en yüksek değere ulaşmıştır. Yabancı suş 24. saatten itibaren piyosiyanin üretimi açısından rekombinant suştan daha avantajlı konuma geçerken, 96. saatte hücrelerin yaşlanması ve ortam koşullarının olumsuzluğu nedeniyle miktarında azalma görülmüştür (Şekil 4.22 a). Stres koşulu olarak 250 µg/ml KCl bulunan ortamlarda ise, her iki bakteri birbirine paralel bir değişim göstermektedir. 24. saatte en yüksek piyosiyanin üretimine ulaşırken, 72. saatte en düşük değerini aldığı görülmektedir (Şekil 4.22 b).

50 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda şekil incelendiğinde, her iki bakteri 24. saatte aynı miktarda piyosiyanin üretimiyle en düşük değerini alırken Pa, 72. saatte en yüksek değerini almıştır (Şekil 4.23 a). Pa, piyosiyanin üretimi açısından PaJC ile karşılaştırıldığında 1,43 kat daha fazla üretim yaptığı sonucuna varılmıştır. 250 µg/ml CaCl₂ bulunan ortamlarda ise; PaJC 48. saatte ise en düşük değerini alırken, 24. saatte en yüksek değere ulaşmıştır. PaJC, sahip olduğu *vgb* gen sisteminden dolayı 96. saatte tekrar artış göstermektedir. Pa'nın piyosiyanin miktarında ise PaJC'a göre bariz bir artışın olmadığı tespit edilmiştir. Şekilde, PaJC'ın piyosiyanin üretimi açısından yabancı tipten daha avantajlı durumda olduğu görülmektedir (Şekil 4.23 b).

5.3. Ağır Metal [Cd(NO₃)₂] Varlığında Piyosiyanin Üretimi

Stres koşulu olarak 37 °C'de 100 ppm ve 200 ppm Cd(NO₃)₂ varlığında piyosiyanin üretimi incelendiği zaman, rekombinant suş PaJC'ın avantajlı olduğu ve yaklaşık olarak 1,15 kat daha fazla piyosiyanin ürettiği gözlenmektedir. Ancak 72. saatten sonra her iki konsantrasyonda hem Pa hem de rekombinant suş olan PaJC'ın

piyosiyanin üretiminde bariz bir azalışın olduğu görülmektedir. Sonuçta, ağır metalin fizyolojik etkilerinden dolayı bu azalışın olduğu tahmin edilmektedir (Şekil 4.7 a-b).

Yine çalışmamızın bir farklı aşaması olarak 30 ve 37 °C’lerde piyosiyanin üretimlerine bakılmış ve sonuçta; şekil 4.22 (a-b) incelendiğinde 30 °C’de Pa’nın, şekil 4.6 (a-b) bakıldığında ise 37 °C’de PaJC’nin daha yüksek miktarda piyosiyanin üretimi yaptığı gözlenmiştir.

Çalışmamızın temelini oluşturan zaman açısından baktığımızda, diğer ortam koşulları dikkate alınmaksızın özellikle, şekil 4.13 (b) incelendiğinde 24. ve 96. saatlerde en düşük üretimin, şekil 4.6 (a-b)’de ise 48. saatlerde en yüksek piyosiyanin üretimin olduğu sonucuna varılmıştır. 48. ve 72. saatler arasında rekombinant suş olan PaJC’larda piyosiyanin üretimi açısından azalışın olduğu, Pa’nın ise farklı tuz ortamlarında piyosiyanin üretiminde bazen azalış bazen de artış gösterdiği görülmektedir. 72. ve 96. saatler arasında ise; yabancı suşun hücrelerin yaşlanması ve ortam koşullarının giderek kötüleşmesi nedeniyle azalış gösterdiği, rekombinantın VHb/vgb sisteminin, ortam oksijenini tamponlamadaki rolü ve kültürün ileri fazlarında membran transferazlarına aktararak yaşlı hücrelere daha iyi bir solunum, büyüme ve çoğalma yeteneği sağlaması nedeniyle genelde artışın olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuçları yalnız karbon kaynakları açısından karşılaştırdığımızda, glikoz varlığında yabancı suşların (Şekil 4.2 b), gliserol ve süktroz bulunan ortamlarda ise; rekombinant suşun (Şekil 4.6, 4.11) daha yüksek miktarda piyosiyanin ürettiği tespit edilmiştir. Çalışmamızı konsantrasyon bakımından kıyasladığımızda, 50 mM ya da 250 mM konsantrasyonun hangisinde daha iyi bir üretimin yapıldığı hakkında genel bir yargıya varılamaz. Çünkü ortam koşulları ve ısı dereceleri değiştikçe her iki bakterinin ürettiği piyosiyanin miktarı da değişmektedir.

Essar ve ark. yaptığı çalışmada, *Pseudomonas* Broth ortamında 37 °C’de 20 saat sonunda *P. aeruginosa*’nın çeşitli suşlarında piyosiyanin miktarlarını; 6,30 µg/ml, 5,44 µg/ml, 2,13 µg/ml, 1,45 µg/ml ve 0,02 µg/ml olarak tespit etmişlerdir [16].

Diğer bir çalışmamız ise *P. aeruginosa* ve rekombinantının; yüzme, titreme ve kayma hareketlerinin karşılaştırılmasıdır. Çalışmamızda; 24 saatlik süre sonunda kayma hareketi incelendiği zaman rekombinant suş olan PaJC’nin yabancı tipe göre 30 kata varan bariz bir hareketin olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.24 a-b). Bakteriler titreme hareketi açısından incelendiğinde, 24 saatlik süre sonunda rekombinant suş PaJC’nin yabancı tipe göre yaklaşık 2,5 kat daha fazla titreme hareketi gösterdiği tespit edilmiştir

(Şekil 4.25 a-b). Bakteriler yüzme testi açısından gözlemlendiğinde, 24 saatlik süre sonunda rekombinant suş olan PaJC'ın yabancıl tipe göre yaklaşık 10 kat fazla yüzme hareketi yaptığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.26 a-b).

Bizim çalışmamızda, kayma testinde 2-9 mm kadar bir kaymanın, 0,4-0,5 mm kadar titremenin ve 1,1-2,2 mm kadar yüzme hareketinin olduğu görülürken, Takahashi ve ark. *P. aeruginosa* PAQ1'in suşları Davis minimal sentetik agar ortamında 37 °C oksijen varlığında (özellikle % 0.8 sodyum sitrat ve % 1.5 Eiken agar içeren) kaydadeğer bir yayılmanın olduğunu araştırmışlar ve sonuçta; % 0.1 sodyum sitrat varlığında 21,9±1,3 mm, Luria–Bertani 15,9±2,7 mm kaymanın olduğu sonucuna varmışlardır [60].

Bu sonuçlara göre, en aktif hareketin kayma hareketi olduğu ve VHb/*vgb* sisteminin flagella ile yapılan bütün bu hareketleri arttırdığı tespit edilmiştir. Besi ortamlarına ilave edilen kaynaklar dikkate alınmaksızın, yaptığımız çalışmadaki sonuçlarda bu çalışmalardaki bulgularla örtüşmektedir.

Sonuç olarak, özellikle bakteri ve funguslarda VHb/*vgb* sisteminin solunumu-büyümeyi arttırmasından dolayı, çeşitli stres koşullarında önemli bir sekonder metabolit olan piyosiyenin üretiminde bakteriye bir avantaj sağladığı düşünülmektedir. Bundan dolayı, VHb teknolojisi genel olarak oksijence fakir şartların bulunduğu alanlarda ve oluşumları belli kritik seviyede oksijen gerektiren bütün biyoproseslerde (biyolojik iyileştirmeden (sekonder metabolitleri de kapsayan) rekombinant protein üretimine kadar) uygulama alanı bulabilmektedir [53, 55, 75-76].

6. KAYNAKLAR

- [1] Alexei Brooun, Songhua Liu, and K. Lewis, *A Dose-Response Study of Antibiotic Resistance in Pseudomonas aeruginosa Biofilms*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 44 (2000) 640–646.
- [2] Yuuka Chieda, Kazuhiro Iiyama, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, Chisa Yasunaga-Aoki, *Inactivation of pyocyanin synthesis genes has no effect on the virulence of Pseudomonas aeruginosa PAO1 toward the silkworm, Bombyx mori*. (2008) 278. 101–107.
- [3] Ingram, J.M. and A.C. Blackwood, *Microbial production of phenazines*. **Adv. Appl. Microbiol**, 13 (1970) 267-282.
- [4] Jeffrey B. Lyczak, Carolyn L. Cannon, and Gerald B. Pier, *Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis*. **Clinical Microbiology Reviews**, 15 (2002) 194–222.
- [5] Gerene M. Denning, Shankar S. Iyer, Krzysztof J. Reszka, Yunxia O'Malley, George T. Rasmussen and Bradley E. Britigan, *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**, 285 (2003) 584-592.
- [6] Steinberger, R.E. and P.A. Holden, *Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms*. **Appl. Environ Microbiol**, 71(9) (2005) 5404-10.
- [7] Onbaşılı, D., *Çevredeki Organik Kirleticilerden Biyoteknolojik Olarak Bazı İkincil Metabolitlerin Üretimi*. Doktora Tezi, (2006).
- [8] Aytan, E., *Vitreoscilla Hemoglobin Geninin Erwinia herbicola'ya Klonlanması Ve L-Dopa Üretimi Üzerine Etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, (2009).
- [9] Wu, J.M., T.A. Hsu, and C.K. Lee, *Expression of the gene coding for bacterial hemoglobin improves beta-galactosidase production in a recombinant Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, 25(17) (2003). 1457-1462.
- [10] Budzikiewicz, H., *Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads*. **FEMS Microbiol Rev**, 10(3-4) (1993) 209-28.
- [11] Daly, J.A., R. Boshard, and J.M. Matsen, *Differential primary plating medium for enhancement of pigment production by Pseudomonas aeruginosa*. **J. Clin. Microbiol**, 19(6) (1984) 742-3.

- [12] Leisinger, T. and R. Margraff, *Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads*. **Microbiol Rev**, 43(3) (1979) 422-42.
- [13] Töreci, G.Ü., *Pseudomonas aeruginosa'nın pigmentleri toksinleri ve enzimleri*. II. Ulusal Kükem Kongresi, (1981) 76-91.
- [14] Supriya Baïkar and Nutan Malpathak, *Secondary metabolites as DNA topoisomerase inhibitors: A new era towards designing of anticancer drugs*. **Pharmacognosy**, 4(7) (2010) 12-26.
- [15] Demain, Arnold L., *Induction of microbial secondary metabolism*. **International Microbiol**, 1 (1998) 259-264.
- [16] Essar, D.W., Eberly, L., Hadero, A., and Crawford, I. P., *Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in Pseudomonas aeruginosa: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications*. **J. Bacteriology**, 172 (1990) 884-900.
- [17] Barrios- Gonzalez J., Fernandez F.J., Tomasini, A., Mejia, A., *Secondary Metabolites Production by Solid-State Fermentation*. **Malaysian Journal of Microbiology**, 1(1) (2005) 1-6.
- [18] Demain, Arnold L., *Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 52 (1999) 455-463.
- [19] Madigan M.T. and Martinko J. M., **Brock Biology of Microorganism** Eleventh edition chapter 30, (2010).
- [20] Stover, C.K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner et. al., *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. **Nature**, 406(6799) (2000) 959-964.
- [21] Rashid, Harunur M. and A. Kornberg, *Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of Pseudomonas aeruginosa*. **PNAS**, 97 (2000) 4885-4890.
- [22] Ulusoy, S., *Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretiminin Araştırılması*. Doktora Tezi, 2007.
- [23] Murray, P.R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Tenover, R. H., **Manual of Clinical Microbiology**, 6th Edition. ASM Pres, (1995) 1327-1341.
- [24] *The Good, the Bad, and the Deadly*. Web Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology, 304 (2004) 1421.

- [25] Collier, L., A. Balow, and M. Sussman, *Topley & Wilson's Microbiology and Microbiol Infections. Systematic Bacteriology*, 2 (1998) 1091-1118.
- [26] Kohler, T., Curty L. K., Barja F., Delden C. and Pechere J. C., *Swarming of Pseudomonas aeruginosa is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J. Bacteriol*, 182(21) (2000) 5990-6.
- [27] Mavrodi, D.V., Bonsall R. F., Delaney S. M., Soule M. J., Phillips G. and Thomashow L. S., *Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from Pseudomonas aeruginosa PAO1. J. Bacteriol*, 183(21) (2001) 6454-65.
- [28] Schwarzer, C., Fu Z., Fischer H., Machen T. E., *Redox-independent activation of NF-kappaB by Pseudomonas aeruginosa pyocyanin in a cystic fibrosis airway epithelial cell line. J. Biol. Chem.*, 283(40) (2008) 27144-53.
- [29] Norman, R.S., Moeller P., McDonald T. J. and Morris P.J., *Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community. Appl. Environ. Microbiol*, 70 (2004) 4004-4011.
- [30] Gee W. Lau, Daniel J. Hassett, Huimin Ran and Fansheng Kong, *The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. Trends in Molecular Medicine*, 10 (2004) 599-606.
- [31] Kahraman, H., *Bakteriyel Hemoglobin Geni Klonlanmış Pseudomonas sp.'lerinin Çeşitli Zararlı Aromatik Madde Yıkım Potansiyellerinin Araştırılması. Doktora Tezi*, (2004).
- [32] Mandelbaum, R.T., D.L. Allan and L.P. Wackett, *Isolation and Characterization of a Pseudomonas sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine. Appl. Environ. Microbiol*, 61(1995) 1451–1457.
- [33] Heydorn, A., Ersbøll B., Kato J., Hentzer M., Parsek M. R., Nielsen T. T., Givskov M. and Molin S., *Statistical analysis of Pseudomonas aeruginosa biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. Appl. Environ Microbiol*, 68(4) (2002) 2008-17.
- [34] Sakuragi, Y. and R. Kolter, *Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology*, 189(14) (2007) 5383-5386.

- [35] Cabrol, S., Olliver, A., Pier, G. B., Andreumont, A. and Ruimy, R., *Transcription of quorum-sensing system genes in clinical and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol**, 185(24) (2003) 7222-30.
- [36] Glessner, A., Smith, R.S., Iglewski, B. H. and Robinson, J.B., *Roles of Pseudomonas aeruginosa las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility*. **J. Bacteriol**, 181(5) (1999) 1623-9.
- [37] U. Sıdal and N. Kolonkaya, *Silver sülfadiyazin ve cephalosparinlerin Pseudomonas aeruginosa üremesine etkisi*. **Tr. J. Biol**, 19 (1995) 231-240.
- [38] Onur Karatuna and A. Yağcı, *Pseudomonas aeruginosa’da virülans faktörleri ve quorum sensing*. **Türk Mikrobiyol Cem Dergisi**, 38 (2008) 42-51.
- [39] Calvo, C., F. Martinez-Checa, F.L. Toledo, J. Porcel, E. Quesada, *Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by Halomonas eurihalina and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 60(3) (2002) 347-351.
- [40] Carson, M. And R.A. Jensen, *Phenotypic Recognition of Pyocyanine Mutants in Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, 117 (1974) 312-314.
- [41] Cox, C.D., *Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin*. **Infect Immun**, 52(1) (1986) 263-70.
- [42] Yunxia Q. O’Malley, Krzysztof J. Reszka, Douglas R. Spitz, Gerene M. Denning and Bradley E. Britigan, *Pseudomonas aeruginosa pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells*. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, 287(1) (2004) L94-L103.
- [43] Baron, S.S. and J.J. Rowe, *Antibiotic action of pyocyanin*. **Antimicrob. Agents Chemother**, 20(6) (1981) 814-20.
- [44] Daniel J. Hassett, Larry Charniga, Karen Bean, Dennis E. Ohman and Myron S. Cohen, *Response of Pseudomonas aeruginosa to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase*. **Infect Immun**, 60(2) (1992) 328-36.
- [45] Prithiviraj, B., H. P. Bais, T. Weir, B. Suresh, E. H. Najarro, B. V. Dayakar, H. P. Schweizer and J. M. Vivanco, *Down regulation of virulence factors of Pseudomonas aeruginosa by salicylic acid attenuates its virulence on*

- Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. **Infect Immun**, 73(9) (2005) 5319-28.
- [46] Cheluvappa, R., Shimmon R., Dawson M., Hilmer S.N. and David Couteur G.L., *Reactions of Pseudomonas aeruginosa pyocyanin with reduced glutathione*. **Acta Biochimica Polonica**, 55(3) (2008) 571-580.
- [47] Usher, L.R., Lawson Roderick A., Geary I., Taylor C.J., Bingle C.D., Taylor G. W. and Moira K. B. Whyte, *Induction of neutrophil apoptosis by the Pseudomonas aeruginosa exotoxin pyocyanin: A potential mechanism of persistent infection*. **Journal of Immunology**, 168(4) (2002) 1861-1868.
- [48] Lucy Allen, David H. Dockrell, Theresa Pattery, Daniel G. Lee, Pierre Cornelis, Paul G. Hellewell and Moira K. B. Whyte, *Pyocyanin production by Pseudomonas aeruginosa induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo*. **Journal of Immunology**, 174(6) (2005) 3643-9.
- [49] Frey, A.D. and P.T. Kallio, *Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology*. **FEMS Microbiol Rev**, 27(4) (2003) 525-45.
- [50] Geckil, H., B.C. Stark, and D.A. Webster, *Cell growth and oxygen uptake of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa are differently effected by the genetically engineered Vitreoscilla hemoglobin gene*. **Journal of Biotechnology**, 85(1) (2001) 57-66.
- [51] Lin, J.M., B.C. Stark, and D.A. Webster, *Effects of Vitreoscilla hemoglobin on the 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT) dioxygenase activity of Burkholderia and on 2,4-DNT degradation in two-phase bioreactors*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 30(6) (2003) 362-368.
- [52] Aydin, S., *Menadione knocks out Vitreoscilla haemoglobin (VHb): the current evidence for the role of VHb in recombinant Escherichia coli*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 38 (2003) 71-76.
- [53] Liu, S.C., D.A. Webster, and B.C. Stark, *Cloning and expression of the Vitreoscilla hemoglobin gene in pseudomonads: Effects on cell growth*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 44(3-4) (1995) 419-424.
- [54] Demodena, J.A., et al., *Intracellular Expression of Vitreoscilla Hemoglobin Improves Cephalosporin-C Production by Acremonium-Chrysogenum*. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, 205 (1993). 13-Biot.

- [55] Patel, S.M., et al., *Cloning and expression of Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia sp strain DNT for enhancement of 2,4-dinitrotoluene degradation. Biotechnology Progress*, 16(1) (2000) 26-30.
- [56] Khosla, C. and J.E. Bailey, *Heterologous Expression of a Bacterial Hemoglobin Improves the Growth-Properties of Recombinant Escherichia-Coli. Nature*, 331(6157) (1988) 633-635.
- [57] Chung, J.W., Webster D.A., Pagilla K.R. and Stark B.C., *Chromosomal integration of the Vitreoscilla hemoglobin gene in Burkholderia and Pseudomonas for the purpose of producing stable engineered strains with enhanced bioremediating ability. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27(1) (2001) 27-33.
- [58] Düzgün, D., *Değişik Kaynaklardan İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Virulans Faktörleri, Biyofilm Formasyonu Ve Quorum Sensing Yönünden Değerlendirilmesi. Doktora Tezi*, (2009).
- [59] Çelik, B., *Doğadan Ve Klinik Örneklerden İzole Edilen Pseudomonas Bakterilerinin Değişik Fenotipik Özelliklerinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması. Doktora Tezi*, (2009).
- [60] Takahashi, C., Nozawa T., Tanikawa T., Nakagawa Y., Wakita J., Matsushita M. & Matsuyama T., *Swarming of Pseudomonas aeruginosa PAO1 without differentiation into elongated hyperflagellates on hard agar minimal medium. FEMS Microbiol Lett*, 280(2) (2008) 169-75.
- [61] Long, J., Zaborina O., PhD, Holbrook C., MD, Zaborin,A., PhD, and Alverdy J., MD, *Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of P aeruginosa causing lethal gut-derived sepsis. Surgery*, 144(2) (2008) 189-197.
- [62] Ramalho, R., Cunha J., Teixeira P., Gibbs Paul A., *Modified Pseudomonas agar: new differential medium for the detection/enumeration of Pseudomonas aeruginosa in mineral water. Journal of Microbiological Methods*, 49(1) (2002) 69-74.
- [63] Yiğit, N. and A.E. Aktaş *Pseudomonas aeruginosa Suşlarının Antikandidal Aktiviteleri. Turkish Journal of Infection*, 22(4) (2008) 215-218.
- [64] Le Berre, R., S. Nguyen, E. Nowak, E. Kipnis, M. Pierre, F. Ader, R. Courcol, B. P. Guery, K. Faure and the Pyopneumagen Group, *Quorum-sensing activity*

- and related virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Microbiology and Infection**, 14(4) (2008) 337-343.
- [65] Onbasli, D. and B. Aslim, *Determination of antimicrobial activity and production of some metabolites by Pseudomonas aeruginosa B1 and B2 in sugar beet molasses*. **African Journal of Biotechnology**, 7(24) (2008) 4614-4619.
- [66] Manuela Avila and Abdul N Hamood, *Analysis of Pseudomonas aeruginosa Veterinary Isolates*.
- [67] Sean G. Yates, Landon W. Westfall, and A.N. Hamood*, *The Effect of Iron on Pyocyanin production by Pseudomonas aeruginosa*.
- [68] Hammerstein, H.C., *Isolation of A Pseudomonas aeruginosa Aspartate Transcarbamoylase Mutant and The Investigation of Its Growth Characteristics, Pyrimidine Biosynthetic Enzyme Activities, and Virulence Factor Production*. M. Sc. Thesis, (2004).
- [69] Pooja Ralli, *Impaired Virulence Factor Production In A Dihydroorotate Dehydrogenase Mutant (Pyrd) of Pseudomonas aeruginosa*. Ph.D. Thesis, (2005).
- [70] Schaber, J.A., et al., *Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa*. **J. Med. Microbiol**, 53(Pt 9) (2004) 841-53.
- [71] Wa'ad Mahmood Ra'oof and I.A.R. Latif, *In Vitro Study of the Swarming Phenomena and Antimicrobial Activity of Pyocyanin Produced by Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Different Human Infections*. **European Journal of Scientific Research**, 47 (2010) 405-421.
- [72] Rashid, M.H., N.N. Rao, and A. Kornberg, *Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens*. **Journal of Bacteriology**, 182(1) (2000) 225-227.
- [73] Deziel, E., Y. Comeau, and R. Villemur, *Initiation of biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities*. **Journal of Bacteriology**, 183(4) (2001) 1195-204.
- [74] Semmler, A.B.T., C.B. Whitchurch, and J.S. Mattick, *A re-examination of twitching motility in Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology-Uk**, 145 (1999) 2863-2873.

- [75] Bülow L., et al., *The metabolic effect of native and transgenic hemoglobins on plants*. **TIBTECH**, 17 (1999) 21-24.
- [76] Fish, P.A., D.A. Webster, and B.C. Stark, *Vitreoscilla hemoglobin enhances the first step in 2,4-dinitrotoluene degradation in vitro and at low aeration in vivo*. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, 9(1-3) (2000) 75-82.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : DUYGU ÖZCAN
Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya - 11.06.1985

EĞİTİM DURUMU

İlkokul : Rahmi Akıncı İlköğretim Okulu (Malatya, 1991–1996)
Ortaokul : Rahmi Akıncı İlköğretim Okulu (Malatya, 1996–1999)
Lise : Y.D.A.Hacı Ahmet Akıncı Lisesi (Malatya, 1999–2003)
Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, (Malatya, 2005–2009)
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı, (Malatya, 2009–2011)

BİLİMSEL FAALİYETLER

1. Suç ve Genetik (Seminer, 2010)
2. Duygu ÖZCAN, Hüseyin KAHRAMAN, Tuz Stresi Altında *Pseudomonas aeruginosa* ve onun *Vitreoscilla* Hemoglobinin Geni Taşıyan Rekombinant Suşunun Piyosiyanın Üretimi, Uluslararası Katılımlı 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, 21–25 Haziran 2010, **DENİZLİ**