



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA
SİSTEMİ VE VİRULANS FAKTÖRLERİ ÜZERİNE
POTANSİYEL PROBİYOTİK BİR SUŞUN
ORGANİK ASİTLERİNİN ETKİSİ**

Merve Eylül KIYMACI

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet AKIN**

ANKARA

2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ÇOĞUNLUĞU ALGILAMA
SİSTEMİ VE VİRULANS FAKTÖRLERİ ÜZERİNE
POTANSİYEL PROBİYOTİK BİR SUŞUN
ORGANİK ASİTLERİNİN ETKİSİ**

Merve Eylül KIYMACI

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahmet AKIN

Prof. Dr. Nurten ALTANLAR (İkinci Danışman)

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
14L0237003 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2017

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Pseudomonas aeruginosa* Çoğunluğu Algılama Sistemi ve Virulans Faktörleri Üzerine Potansiyel Probiyotik Bir Suşun Organik Asitlerinin Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanlarım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Merve Eylül KIYMACI

Tarih: 23 Ocak 2017

İmza: 

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında
Merve Eylül KIYMACI tarafından hazırlanan
“*Pseudomonas aeruginosa* Çoğunluğu Algılama Sistemi ve Virulans Faktörleri
Üzerine Potansiyel Probiyotik Bir Suşun Organik Asitlerinin Etkisi”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul/~~ret~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23 Ocak 2017



İmza
Prof.Dr. Ahmet AKIN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



İmza
Prof.Dr. Teoman Murat ÖZSAN
Ankara Üniversitesi
Raportör



İmza
Prof.Dr. Sulhiye YILDIZ
Ankara Üniversitesi
Üye



İmza
Prof.Dr. Meral SAĞIROĞLU
Hacettepe Üniversitesi
Üye



İmza
Prof.Dr. Jülide Sedef GÖÇMEN
TOBB Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. K. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Gram Negatif Bakterilerde LuxI/LuxR Tipi Çoğunluğu Algılama Sistemi	4
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve Çoğunluğu Algılama Sistemi	5
1.2.1. Mikrobiyolojik Özellikleri	5
1.2.2. Çoğunluğu Algılama Sistemi	8
1.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Virulans Faktörleri	9
1.2.3.1. Kirpik	10
1.2.3.2. Pilus	11
1.2.3.3. Lipopolisakkarit Tabakası	12
1.2.3.4. Alginat (Polisakkarit Kapsül)	12
1.2.3.5. Elastaz	12
1.2.3.6. Las A (Stafilolitik Proteaz)	13
1.2.3.7. Alkalen Proteaz	13
1.2.3.8. Proteaz IV	14
1.2.3.9. Piyosiyenin	14
1.2.3.10. Piyoverdin	14
1.2.3.11. Fosfolipaz C ve Ramnolipid	15
1.2.3.12. Ekzotoksin A	15
1.2.3.13. Sekresyon Sistemi, Ekzotoksin S ve T	16
1.2.3.14. Biyofilm	17
1.3. Yeni Bir Tedavi Yaklaşımı, Probiyotikler	20
1.3.1. Probiyotik Mikroorganizmada Aranılan Kriterler	21
1.3.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar	23
1.3.3. <i>Pediococcus</i> Cinsinin Temel Özellikleri	25
1.3.3.1. Laktik asit	26
1.3.3.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	26
1.3.3.3. Bakteriyosin – Pediosin	27
2. GEREÇ ve YÖNTEM	29
2.1. GEREÇ	29
2.1.1. Bakteriyel Suşlar	29
2.1.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatları	29
2.1.1.2. <i>Pediococcus acidilactici</i> Suşları	29
2.1.2. Araştırmada Kullanılan Besiyeri, Ayıraç ve Ekipmanlar	30
2.1.2.1. Besiyeri ve Ayıraçlar	30

2.1.2.2.	Ekipmanlar	39
2.2.	YÖNTEM	40
2.2.1.	Yenidoğanlardan Gaita Örneklerinin Toplanması	40
2.2.2.	Yenidoğan Gaita Örneklerinden Pediokokların İzolasyonu ve Tanımlanması	41
2.2.2.1.	Gram Boyama	41
2.2.2.2.	Katalaz Testi	41
2.2.2.3.	Pediokokların Karakterizasyonu	42
2.2.4.	İzole Edilen Pediokok Suşlarının Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	42
2.2.4.1.	Suşların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	42
2.2.4.2.	Suşların Düşük pH Değerlerine Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi	43
2.2.4.3.	Suşların Pepsine Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi	44
2.2.4.4.	Suşların Pankreatine Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi	44
2.2.4.5.	Suşların Safra Tuzuna Karşı Direnç Özelliğinin Belirlenmesi	45
2.2.4.6.	Suşların Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi	45
2.2.4.7.	Suşların Metabolit Üretiminin Araştırılması ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi	46
2.2.5.	<i>Pediococcus acidilactici</i> Suşları Tarafından Üretilen Laktik Asitin Miktar Tayini İçin Yüksek Başarımli Sıvı Kromatografi Metodunun Optimizasyonu	47
2.2.6.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Klinik İzolatlarının Açıl Homoserin Lakton Üretiminin Belirlenmesi ve Laktik Asitin Sinyal Molekülü Üretimine Etkisi	48
2.2.7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının ÇA Sistemi Tarafından Kontrol Edilen Bazı Virulans Faktörleri Üzerine Laktik Asitin Etkisinin Araştırılması	49
2.2.7.1.	Yüzme (Swimming) Testi	49
2.2.7.2.	Kayma (Swarming) Testi	49
2.2.7.3.	Titreme (Twitching) Testi	50
2.2.7.4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi	50
2.2.7.5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Elastaz Aktivitesinin Belirlenmesi	51
2.2.7.6.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Piyosiyenin Oluşumunun Belirlenmesi	52
2.2.7.7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi	53
2.2.7.8.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Ramnolipid Üretiminin Belirlenmesi	53
2.2.7.9.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları	54
2.3.	Verilerin Değerlendirilmesi	54
3.	BULGULAR	55
3.1.	Yenidoğan Gaita Örneklerinden Bakterilerin İzolasyonu	55
3.2.	Pediokokların Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi	56
3.2.1.	Suşların Antibiyotik Duyarlılıkları	56

3.2.2.	Suşların Düşük pH, Pepsin, Pankreatin ve Safra Tuzuna Karşı Dirençleri	57
3.2.3.	Suşların Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi	59
3.2.4.	Suşların Metabolit Üretimini Araştırılması ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi	60
3.3.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Suşu Tarafından Üretilen Laktik Asitin Yüksek Başarımli Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini	61
3.3.1.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Numunesine Uygulama	62
3.4.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Suşunun 16S rRNA Sekans Analizi	63
3.5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının AHL Üretimi ve Virulans Faktörleri	64
3.6.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Virulans Faktörleri Üzerine İnhibitör Etkisinin Araştırılması	66
3.6.1.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatları İçin Belirlenen MİK ve subMİK Değerleri	66
3.6.2.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının AHL Üretimine Etkisi	67
3.6.3.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Kayma-Yüzme-Titrete Hareketi Üzerine Etkisi	68
3.6.4.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	70
3.6.5.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Ramnolipid Üretimi Üzerine Etkisi	74
3.6.6.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Elastaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	74
3.6.7.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Piyosiyenin Aktivitesi Üzerine Etkisi	78
3.6.8.	<i>Pediococcus acidilactici</i> M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Biyofilm Üretimi Üzerine Etkisi	82
4. TARTIşMA		86
5. SONUÇ ve ÖNERİLER		98
ÖZET		100
SUMMARY		101
KAYNAKLAR		102
EKLER		
Ek-1. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Karar Formu		122
Ek-2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu		124
Ek-3. BAP Proje Kapanış Raporu Kabul Yazısı		128
ÖZGEÇMİş		129

ÖNSÖZ

Son zamanlarda yapılan çalışmalar bakterilerin kendi aralarında iletişim kurarak bulunduğu ortam koşullarına uyum sağlamak amacıyla değişen populasyon yoğunluğuna göre davranışlarını düzenlediğine dayanmaktadır. Çoğunluğu algılama olarak adlandırılan bu iletişim sistemi ile bakteri; hareket, antibiyotik biyosentezi, biyofilm oluşumu, plazmid konjugasyonu ve virulans faktörlerinin üretimi gibi birçok faaliyetini düzenlemektedir. Bu çalışma kapsamında yenidoğan gaitasından izole edilen potansiyel probiyotik *Pediococcus acidilactici* suşunun ürettiği organik asitten yararlanarak *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatlarının çoğunluğu algılama sistemi ve bu sistem tarafından kontrol edilen ve bakteri patojenitesinde büyük öneme sahip virulans faktörleri üzerine inhibitör etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14L0237003 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana yardımcı olup desteklerini daima hissettiren değerli danışmanlarım Prof. Dr. Ahmet AKIN ve Prof. Dr. Nurten ALTANLAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım sırasında bilgileriyle yol gösteren Prof. Dr. Sulhiye YILDIZ'a, benimle birlikte gece gündüz demeden çalışan Arş. Gör. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ ve Ayşen GÜMÜŞTAŞ'a, yol gösteren Arş. Gör. Dr. Banu KAŞKATEPE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte elimi hiç bırakmayan, sözleriyle beni cesaretlendiren sevgili eşime, sevgilerini hep üzerimde hissettiğim canım annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AHL	Açıl homoserin lakton
API	Analitik profil indeksi
ATCC	American type culture collection
β	Beta
BSS	Bağıl standart sapma
CDC	Centers for disease control
CF	Kistik fibrozis
CFS	Hücre bağımsız supernatant
cm	Santimetre
ÇA	Çoğunluğu algılama
Dc	Bakteri koloni çapı
dk	Dakika
ECR	Elastin congo red
EF-2	Uzama faktörü-2
EFSA	European food safety authority
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing
Exo	Ekzoenzim
FAO	Food and agriculture organization
g	Gram
γ	Gama

GIS	Gastrointestinal sistem
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H ₂ SO ₄	Süfûrik asit
HCl	Hidroklorik asit
HSL	Homoserin lakton
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobûlin
kDa	Kilo dalton
kob	Koloni oluşturan birim
LAB	Laktik asit bakterileri
LB	Luria bertani
Log	Logaritma
LPS	Lipopolisakkarit
M	Molar
MDR	Çoklu ilaç dirençli
mg	Miligram
MIK	Minimal inhibisyon konsantrasyonu
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MRS	De man rogosa sharpe
N	Normal

NaCl	Sodyum klorür
NCDC	National collection of dairy cultures
nm	Nanometre
°C	Derece santrigrat
OD	Optik densite
PBS	Fosfat tamponlu salin
pH	Power of hydrogen
QS	Quorum sensing
Rp	Bakteri kolonisi etrafında oluşan zon çapı
rpm	Revolutions per minute
SF	Serum fizyolojik
subMİK	Subminimal inhibisyon konsantrasyonu
SUT	Sistem uygunluk testi
TAS	Tayin alt sınırı
TGE	Trypton glukoz ekstrakt
TNF	Tümör nekroz faktör
WHO	World health organization
YBSK	Yüksek başarımlı sıvı kromatografisi
YS	Yakalama sınırı
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	<i>V. fischeri</i> (sağda) Hawaii Kısa kuyruk mürekkep balığı (solda) ışık organında bulunan biyoluminesans simbiyoz	3
Şekil 1.2.	<i>V. fischeri</i> 'de ÇA modeli.	3
Şekil 1.3.	N-(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton (3O-C12-HSL)	4
Şekil 1.4.	N- bütanoil-L-homoserin lakton (C4-HSL)	4
Şekil 1.5.	N-hekzanoil-L- homoserin lakton (BHL)	4
Şekil 1.6.	Gram negatif bakterilerde ÇA işleyiş mekanizmasının şematik gösterimi	5
Şekil 2.1.	a) Elastin kongo kırmızısı tartımı, b) elastin kongo kırmızısı testi mikropalak sonucu	51
Şekil 2.2.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının piyosiyenin pigmentinin elde edilme aşamaları	52
Şekil 2.3.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının biyofilm aktivite sonuçlarının mikropalak görünümü	53
Şekil 3.1.	<i>Ped.acidilactici</i> suşunun mikroskopik ve MRS agar görünümü	55
Şekil 3.2.	<i>Ped. acidilactici</i> suşunun API 50 CH kiti sonuçları	55
Şekil 3.3.	<i>Ped. acidilactici</i> M7 suşunun disk difüzyon yöntemi ile belirlenen duyarlılık sonuçları	56
Şekil 3.4.	<i>Ped. acidilactici</i> M7'nin % 0,5 safra tuzuna dayanıklılığının MRS agar görünümü (10^{-5} konsantrasyon)	59
Şekil 3.5.	<i>Ped. acidilactici</i> M7'nin kanlı agarda görünümü	60
Şekil 3.6.	İndikatör mikroorganizmalar üzerine laktik asit ve kontrol supernatantlarının antimikrobiyal aktivite sonuçları	61
Şekil 3.7.	Laktik asite ait kalibrasyon grafiği ve denklemi	62
Şekil 3.8.	16S rRNA sekans analizi sonucunda belirlenen <i>Ped. acidilactici</i> M7 suşunun filogenetik ağacı	63

Şekil 3.9.	Kısa-uzun zincirli AHL molekülleri araştırılan <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında pozitif ve negatif deney sonuçları. a. Kısa zincirli AHL molekülü araştırılan izolatlar, mor renk pozitif sonucu göstermektedir. b. Uzun zincirli AHL molekülü araştırılan izolatlar, mavi renk pozitif sonucu göstermektedir.	65
Şekil 3.10.	<i>Ped. acidilactici</i> M7'nin ürettiği laktik asitin PAO-1 suşuna karşı belirlenen MİK sonuçları	67
Şekil 3.11.	Kısa zincirli AHL üretimi inhibe edilen <i>P. aeruginosa</i> izolatları	68
Şekil 3.12.	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatlarının kayma hareketi sonuçları a-c) kontrol (pozitif sonuç), b-d) laktik asit etkisi altında gösterdiği negatif sonuç	69
Şekil 3.13.	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatının a) kontrol (pozitif sonuç), b) laktik asit etkisi altında gösterdiği (negatif sonuç) yüzme hareketi sonuçları	69
Şekil 3.14.	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatlarının titreme hareketi sonuçları a-b) pozitif sonuç, c) laktik asit etkisi altında gösterdiği negatif sonuç	69
Şekil 3.15.	<i>P.aeruginosa</i> izolatlarının laktik asit etkisinde proteoliz azalma yüzdesi	70
Şekil 3.16.	PAO-1 suşunun proteaz aktivitesinin a) kontrol, b) laktik asit etkisi altında skim milk LB agarda oluşturduğu zonlar	71
Şekil 3.17.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının proteaz aktivitesi ve laktik asitin subMİK etkisinde aktivite sonuçları	72
Şekil 3.18.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının proteaz aktivitesi ve laktik asitin subMİK etkisinde aktivite sonuçları (devam)	73
Şekil 3.19.	<i>P. aeruginosa</i> izolatının ramnolipid üretimi	74
Şekil 3.20.	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1 ve <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında elastaz üretimi	74
Şekil 3.21.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının laktik asit etkisinde elastaz aktivitesi azalma yüzdesi	75
Şekil 3.22.	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatlarının elastaz üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları	76
Şekil 3.23.	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatlarının elastaz üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları (devam)	77

Şekil 3.24.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının laktik asit etkisinde piosiyenin aktivitesi azalma yüzdesi	78
Şekil 3.25.	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatlarının piosiyenin üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları	80
Şekil 3.26.	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatlarının piosiyenin üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları (devam)	81
Şekil 3.27.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının laktik asit etkisinde biyofilm aktivitesi azalma yüzdeleri	82
Şekil 3.28.	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatlarının biyofilm üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları	84
Şekil 3.29.	<i>P. aeruginosa</i> klinik izolatlarının biyofilm üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları (devam)	85

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterileri	24
Çizelge 3.1.	<i>Ped. acidilactici</i> olarak tanımlanan 3 suşun disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlıkları	56
Çizelge 3.2.	<i>Ped. acidilactici</i> suşlarının belirlenen MİK sonuçları ve EFSA standartları	57
Çizelge 3.3.	<i>Ped. acidilactici</i> M7 suşunun düşük pH değerlerine, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına karşı hayatta kalma ^a oranı (log kob ^b /mL)	59
Çizelge 3.4.	<i>Ped. acidilactici</i> M7 suşu tarafından üretilen metabolitlerin indikatör suşlar üzerine antimikrobiyal aktivite sonuçları	60
Çizelge 3.5.	SUT parametreleri	61
Çizelge 3.6.	Laktik asitin YBSK yöntemi ile analizine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n= 5)	62
Çizelge 3.7.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının izolasyon bölgelerine göre dağılımı	64
Çizelge 3.8.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının (n:141) kısa zincirli AHL üretimi ve bazı virulans faktörleri yönünden pozitif sonuçları	65
Çizelge 3.9.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarında (n:141) AHL moleküllerinin varlığı ve incelenen virulans faktörleri arasındaki ilişki	65
Çizelge 3.10.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık yüzdeleri	66

1. GİRİŞ

Uzun yıllardır hücreler arası iletişim yeteneğinin yalnızca yüksek yapılı canlılara özgü bir davranış olduğu, bakteriler gibi tek hücrelilerin ise bölünerek çoğalmaktan ibaret basit bir yaşam tarzına sahip oldukları düşünülmekteydi. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar, bakterilerin asosyal varlıklar olmadığını, değişen ortam koşullarına uyum sağlamak amacıyla hücreler arası iletişim sistemlerini kullanan topluluklar halinde bulunduklarını kabul etmektedir. Quorum sensing (QS) olarak tanımlanan bu mekanizma; bakterilerin salgıladıkları kimyasal maddeler aracılığıyla ortamdaki hücre yoğunluğunu algılayarak iletişim kurmalarını sağlamaktadır (Bosgelmez-Tinaz, 2013 ve Sakuragi ve Kolter, 2007). Kelime olarak quorum; yeterli çoğunluk, sensing; hissetme anlamına gelmekte ve günümüz literatürlerinde quorum sensing terimi çoğunluğu algılama (ÇA) olarak türkçeleştirilmektedir (Düzgün, 2009).

Bakteriler arasındaki bu iletişimin temeli, bakterinin otouyarıcılar olarak bilinen ekstraselüler sinyal moleküllerini tek ya da grup genelinde sentezleyerek, çevresinde bulunan diğer bakterilerin yoğunluğunu algılamasına dayanmaktadır. Bakteriyel populasyon yoğunluğu arttıkça otouyarıcılar ortamda birikmektedir. Bu birikim, bakterinin ortamdaki otouyarıcı miktarını algılaması ile ortamdaki diğer bakteri sayısı hakkında bilgi sahibi olmasını sağlamaktadır. Bakteriler kendi hücre sayılarındaki değişikliği izleyerek, değişen yoğunluğa göre toplu olarak gen ekspresyonunun genel düzenini değiştirirler ve bu değişim topluluk içinde her bakteri hücresinin bir diğeriyle koordine davranması sonucunu doğurur (Papenfort ve Bassler, 2016). ÇA sinyal moleküllerinin otouyarıcı olarak ifade edilmelerinin sebebi, üretildikleri hücrenin metabolizmasını düzenleyici etki göstermelerinden kaynaklanmaktadır (De Kievit ve Iglewski, 2000 ve Önal, 2005).

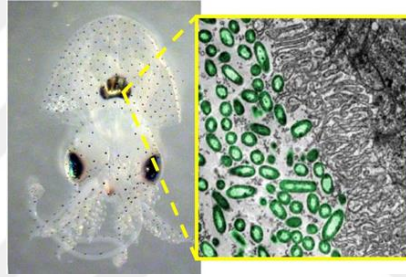
ÇA, bakterilerde hareket, antibiyotik biyosentezi, biyofilm oluşumu, bakteri plazmid konjugasyonu, diğer virulans faktörlerinin üretimi gibi birçok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu düzenlenme sayesinde bakteri, bulunduğu ortama uyum sağlama, çevresel faktörlerden korunma, konak savunma

sistemi ile mücadele etme ve ortamdaki diğer bakterilerle yarışma gibi fonksiyonları daha kolay yerine getirme olanağı bulmaktadır (Sakuragi ve Kolter, 2007).

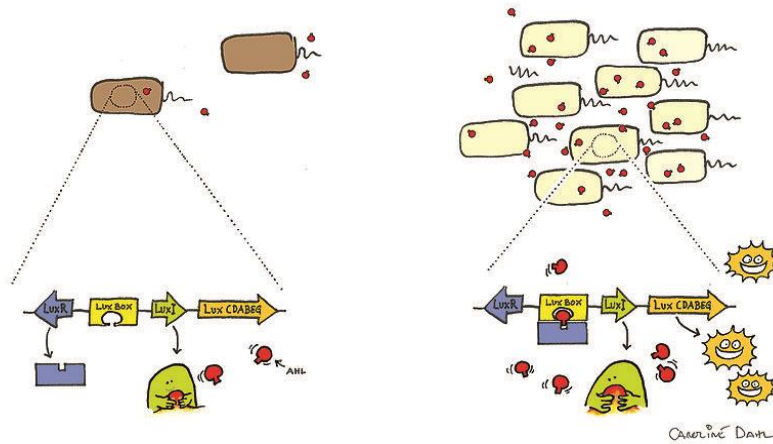
ÇA sistemi birçok Gram pozitif ve Gram negatif bakteride tanımlanmıştır. Farklı mikroorganizma türlerinin iletişim amacıyla farklı sinyal molekülleri kullandıkları bilinmektedir. Gram pozitif bakterilerde ÇA sisteminin sinyal molekülleri oligopeptitler (oligopeptit sistemi) (Fuqua ve ark., 1996) iken, Gram negatif bakterilerde N-açıl homoserin lakton (AHL)'lar, otouyarıcıların en yaygın sınıfıdır. Çekirdek, AHL halkası ve modifikasyonlar içeren 4-18 karbonlu açıl zinciri ihtiva eder. Yüzlerce bakteri türü bu AHL'leri üreten LuxI tip sentaz içerirler. Açıl zincirinin uzunluğu dayanıklılığı etkiler (Galloway ve ark., 2011). Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasındaki iletişim ise otouyarıcı-2 denilen furanosil borat diester molekülleriyle (hibrit sistem) sağlanmaktadır (Yu ve ark., 2012). Sentezlenen sinyal molekülleri hücrenin dışına salgılanarak birikirler. Atım pompaları, pasif difüzyon veya özgül taşıyıcılar ile hücre zarından geçerler. Yeterli yoğunlukta sinyal molekülü ortamda biriktiğinde ilgili genler uyarılarak cevap ürünleri ortaya çıkmaktadır. Hücre dışında birikimleri, kendilerine özgü reseptörlerce tanınmaları, yeterli sinyal molekülü yoğunluğu sonucunda planlanmış bir cevap ortaya çıkarmaları vb. özellikler, ÇA sistemi moleküllerini, hücresel metabolitlerden ayıran en önemli özelliklerdir (Önem, 2013).

Bakteriyel iletişim sistemine ilişkin ilk gözlemler 1970'li yıllarda Gram negatif bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*) ile yapılan çalışmalarla belirlenmiş (Donabedian, 2003) ve bakterilerde kimyasal sürecin işleyişine bir model oluşturmuştur. Belirlenen bu sistem tüm Gram negatif bakterilerde LuxI/LuxR sistemi olarak adlandırılmıştır. Bu bakteriler, mürekkep balığı vb. bazı deniz hayvanlarının ışık üreten (biyoluminesan) organlarına yerleşerek yüksek yoğunluğa kadar ürediklerinde (Şekil 1.1.), lusiferaz enziminin sentezlenmesi aracılığıyla hepsinin aynı anda ışık ürettiği belirlenmiştir (Akova, 2005).

V. fischeri'de saptanan ÇA sistemine göre LuxI operonu, ışık üretimi için LuxI genini takip eden 6 gen (LuxI CDABEG) içermektedir. Belirli bir eşik değere ulaşan bakteri yoğunluğunda LuxI tarafından kodlanan sinyal molekülü, LuxR ile bir kompleks oluşturur ve LuxI CDABEG operonunun transkripsiyonunu teşvik eder (Fuqua ve Greenberg, 2002 ve Önem, 2013). Bu genler ile şifrelenen lusiferaz enziminin üretimi sağlanır (Boşgelmez-Tınaz, 2003) ve sonuç olarak bir ışıma gerçekleşir (Şekil 1.2.). Bu enzimin aktivitesi düşük konsantrasyon yoğunluğunda baskılandığından, ışık üretimi ancak belli bir populasyon yoğunluğunda gözlenmiştir (Kaper ve Sperandio, 2005). Bu bakteriler deniz suyunda 10^2 bakteri/mL yoğunluğunda saptanırken, ışık organlarında 10^{10} - 10^{11} bakteri/mL yoğunlukta bulunmaktadırlar (Akova, 2005).



Şekil 1.1. *V. fischeri* (sağda) Hawaii Kısa kuyruk mürekkep balığı (solda) ışık organında bulunan biyoluminesans simbiyoz (Stab, 2010).



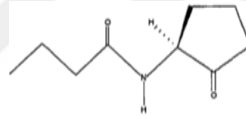
Şekil 1.2. *V. fischeri*'de ÇA modeli. LuxI, LuxR'nin DNA "Lux kutusu"na bağlanmasını mümkün kılan AHL'yi üretir. LuxR-Lux kutusu bağlanması için yüksek konsantrasyonda AHL gerekmektedir. Mürekkep balığının ışık organında bulunan *V. fischeri* ile bu durum saptanmıştır. LuxR-Lux kutusu bağlanması biyoluminesans ve daha çok AHL üreten lusiferaz genlerini aktive eder (luxI CDABEG), (Dahl, 2011).

1.1. Gram Negatif Bakterilerde LuxI/LuxR Tipi Yoğunluğu Algılama Sistemi

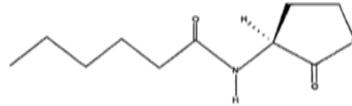
ÇA sistemi; AHL sinyal molekülü, LuxI tip sentaz, LuxR tip regülatör protein ve hedef genin sirkülasyonu ile gerçekleşir (Hentzer ve Givskov, 2003). Lakton siklik bir moleküldür, karboksil grubu ve hidroksil grubunun ester oluşturması ile meydana gelir. Yağ asidi biyosentezi sonucu oluşan homoserin lakton halkasına amid bağıyla S-adenosilmetiyonin (SAM)'den oluşan açıl zincirinin eklenmesiyle AHL molekülleri oluşur. AHL'lerdeki yan zincirin ucu değişken olup 4-18 karbon uzunluğunda olan moleküller tanımlanmıştır (Williams ve Cámara, 2009). Şekil 1.3., 1.4. ve 1.5.'te Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bazı sinyal molekülleri gösterilmektedir.



Şekil 1.3. N-(3-oksododekanoil)-L-homoserin lakton (3O-C₁₂-HSL), (Önal, 2005).

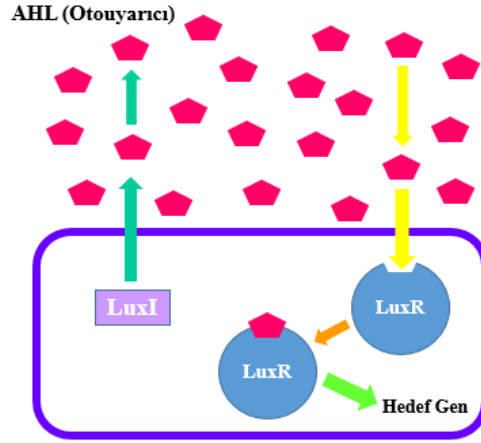


Şekil 1.4. N- bütanoil-L-homoserin lakton (C4-HSL), (Önal, 2005).



Şekil 1.5. N-hekzanoil-L- homoserin lakton (BHL), (Önal, 2005).

LuxI tip sentaz, AHL sentezini uyarır. Sentezlenen AHL bakteri hücresinin dışına çıkar ve hücre yoğunluğu eşik değere ulaştıktan sonra tekrar hücre membranından girerek regülatör bir protein olan LuxR'ye bağlanır ve hedef genlerin ekspresyonları tetiklenir (virulans faktörleri oluşur). Diğer yandan AHL sentezi hücre içinde yapılarak (LuxI) ortama salınır (Rumbaugh ve ark., 1999).



Şekil 1.6. Gram negatif bakterilerde ÇA işleyiş mekanizmasının şematik gösterimi (Czajkowski ve Jafra, 2009).

Birçok Gram negatif bakteride AHL aracılı ÇA sistemi görülmektedir. Bu sistemin görüldüğü bazı bakteri cinslerine örnek olarak *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Nitromonas*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Obesumbacterium*, *Serratia*, *Rahnella*, *Rhodobacter*, *Xenorhabdus*, *Ralstonia*, *Yersinia*, *Vibrio* ve *Rhizobium* verilebilir (Hentzer ve Givskov, 2003 ve Önem, 2013).

1.2. *Pseudomonas aeruginosa* ve Çoğunluğu Algılama Sistemi

ÇA sisteminin en çok araştırıldığı bakterilerden biri *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)'dır. *P. aeruginosa*, *Pseudomonadaceae* ailesine ait *Pseudomonas* cinsinin en çok izole edilen ve insanlarda enfeksiyona neden olan üyesidir (Mah ve O'Toole, 2001).

1.2.1. Mikrobiyolojik Özellikleri

P. aeruginosa genellikle toprakta, suda ve bitkilerde yaşayan bir mikroorganizmadır. Çoğunlukla tek tek görülen, 0,5 - 0,8 µm eninde, 1,5 - 3 µm

boyunda, sporsuz, uç kısmında tek, nadiren 2-3 kirpik bulunan, çok hareketli, Gram negatif bir basildir (Bilgehan, 2002).

P. aeruginosa, enerjisini oksidasyon ile sağlayan non fermentatif bir mikroorganizmadır. Zorunlu aerob olmasına rağmen nitrati elektron alıcısı gibi kullanarak anaerobik şartlarda da gelişebilmektedir. Farklı ve çok sayıda organik bileşikten yararlanarak üreyebilme yeteneğine sahiptir. Distile su içinde bile üreyebilmesi, ne kadar az besin ile yetinebildiğinin bir göstergesidir ve ortamda tek bir karbon kaynağı bulunduğunda bu mikroorganizma gelişebilmektedir (Iglewski, 1996).

Optimum gelişme sıcaklığı 25°C - 37°C arasında değişmektedir, daha yüksek ve düşük sıcaklıklarda zor hayatta kalır. 4°C’de üreyemez, 42°C’de üreme yeteneğindedir ve bu özelliği ile diğer *Pseudomonas* türlerinden ayrılmaktadır (Iglewski, 1996).

Doğal çevrelerden izole edilen bakteriler küçük, kaba koloni oluştururken; klinik materyallerden izole edilenler düz ve kalkık (non-mukoid) ya da virulansı daha yüksek olan suşlar mukoid koloni oluştururlar (Palleroni, 2003). Laktoz içeren besiyerlerinde laktoz negatif sonuç verirler. Oksidaz testi güçlü pozitif olması ve glikozu fermente etmemesiyle diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden ayrılırlar. Genellikle beta hemolitiklerdir. Besiyeri ortamında aromatik meyve, tatlı üzüm ya da trimetilamin kokusuna benzer, kendine has bir kokuları bulunmaktadır. Bu kokunun kaynağı 2-aminoasetofenon’a aittir ve tanı değeri yüksektir (Deretic ve ark., 1995).

P. aeruginosa’nın farklı pigmentleri mevcuttur. Piyosiyanin, sadece *P.aeruginosa* suşları tarafından meydana getirilen mavi-yeşil renkli ekstraselüler bir pigmenttir ve bu pigmentin varlığı bakterinin tanısında ayırt edici kriterlerden birini oluşturmaktadır. Bakteriye “aeruginosa” adı bu pigmentten dolayı verilmiştir. Yalnızca aerob ortamda oluşan bu pigment bir fenazin boyasıdır, suda ve kloroformda erir (Bilgehan, 2002).

Floresein, piyoverdin yapısında soluk sarı renkli bir pigmenttir, UV ışığı altında daha rahat gözlenebilmektedir. Daha az rastlanmakla beraber piyorubin; kırmızı, piyomelanin; kahverengi-siyah renkte pigment üreten suşlar da saptanmıştır ancak diğer pigmentlerin varlığı durumunda piyosiyanınin baskılanmasının söz konusu olduğu belirtilmiştir (Meyer, 2000).

P. aeruginosa, karbonhidratları fermente etmez, oksidaz, sitrat, L-arginin dihidrolaz pozitif; L-lizin ve L-ornitin dekarboksilaz negatiftir. Nitrattan gaz oluşturur. Üç şekerli demirli besiyerinde hidrojen sülfür oluşturmaz (Mesaros ve ark., 2007).

Besinsel çok yönlülüğüne ek olarak, *P. aeruginosa* yüksek konsantrasyonda tuza, boyalara, zayıf antiseptiklere ve yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere dirençlidir. Ürettiği beta laktamaz enzimleri ile penisilinleri, karbapenemleri ve sefalosporinleri inaktive etme yeteneğindedir. Bu özellikler onun her yerde yaygın olarak bulunabilen doğasını açıklamaya yardımcıdır ve nozokomiyal enfeksiyona yol açmada üstünlüğüne katkı sağlar (Iglewski, 1996).

İmmüsupresifler, kistik fibrozisli (CF) bireyler ve diğer akciğer hastalıklı kişiler, travmatik kornea hastaları, yanıklı hastalar, açık kırıklı bireyler, uzun dönem entübe edilen hastalar ve HIV'li bireyler *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyon riski taşımaktadırlar (Lee ve Zhang, 2015). Nemli ortamlarda üreyebilmesi ve çevresel koşullara kolaylıkla direnç geliştirmesi ile *P. aeruginosa* hastane enfeksiyonu etkeni Gram negatif mikroorganizmalar arasında önemli bir yere sahiptir (Çekin ve ark., 2013).

P. aeruginosa'nın bazı sağlıklı insanların derisinde bulunduğu saptanmıştır ve hastanede yatmayan hastaların % 5'inin boğazından ve % 3'ünün gaitasından izole edilmiştir. Gastrointestinal taşıyıcılık oranı hastanede yatan hastalarda, kabulden 72 saat sonra % 20'ye ulaşmaktadır. Hastane bünyesinde *P. aeruginosa*'ya çok sayıda rezervuar bulunmaktadır; hastaların nemli vücut bölgeleri, deri, dezenfektanlar, solunum yolu ekipmanları, yiyecekler, musluklar, tuvaletler, duşlar ve paspaslar bu

rezervuarlara örnek olarak gösterilebilmektedir. Ayrıca hastane çevresinden ve diğer hastanelerden transfer edilen hastalarla bakterinin yeniden taşınımı söz konusu olabilmektedir. Bulaş, hastadan hastaya hastane personelinin ellerinden, kontamine rezervuarlarla hastanın direk teması ile ve kontamine su ve yiyeceklerin yenip, içilmesiyle meydana gelmektedir (Iglewski, 1996).

1.2.2. Çoğunluğu Algılama Sistemi

P. aeruginosa'nın patogeneğinde çeşitli virulans faktörleri rol oynamaktadır. Virulans faktörlerinin üretimi ve salgılanması, hücre yoğunluğunun ve gelişimin söz konusu olduğu logaritmik üreme fazında artmaktadır. *P. aeruginosa* kaynaklı enfeksiyon hastalıklarının oluşumunda önemli rolü olan bu virulans faktörlerinin üretimi, bakteri hücre yoğunluğunu izleyen ve bakteriler arası iletişimi sağlayan ÇA sistemi ile kontrol edilmektedir. *P. aeruginosa*'da Lux sistemine benzeyen, iki ana ÇA sistemi tanımlanmıştır. *las* ve *rhl* olarak isimlendirilen bu sistemler, birbirleri ile hiyerarşik bir ilişki içindedir (Schuster ve Greenberg, 2007).

las sistemi, *lasI* ve *lasR* olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. *lasI*, N-(3-okso-C12-homoserin lakton) sentezinden sorumlu otouyarıcı sentez genidir, *lasR* ise transkripsiyonel aktivatör proteinini (R-protein) kodlayan gendir. Otouyarıcı sentaz, hücre zarını çift yönlü geçebilen otouyarıcının sentezinden sorumludur. Bakteri hücre yoğunluğunun eşik değeri aşmasıyla otouyarıcı, transkripsiyon aktivatör proteini olan R-proteine bağlanır. R-protein/otouyarıcı kompleksi, özgül hedef genlerin ifadesini uyarır. *lasB* elastazın üretimini düzenlendiği için *las* sistemi olarak adlandırılan bu sistemde; stafilolitik proteaz (*lasA*), alkalin proteaz (*apr*), ekzotoksin A (*toxA*), elastaz (*lasB*), biyofilm oluşumu gibi çeşitli hücre dışı enzimlerin sentezi düzenlenmektedir (Lee ve Zhang, 2015; Yurt Göze, 2009).

rhl sistemi, *rhlI* ve *rhlR* olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır. *rhlI*, N-bütiril-L-homoserin lakton (C4-HSL) sentezinden sorumlu otouyarıcı sentez genidir ve *rhlR* ise transkripsiyonel aktivatör proteini kodlayan gendir. Ramnolipid sentezini

kontrol ettiği için bu ismi alan sistem; ramnolipid üretimi için gerekli olan ramnoziltransferazın sentezlenmesini sağlayan *rhIAB* operonun ifadesini düzenlemenin yanında; elastaz, piyosiyanın, siyanid ve lipaz gibi enzimlerin üretimi için gereklidir (Daniels ve ark., 2004 ve Yurt Göze, 2009).

Geçmiş literatür çalışmalarında *las* ve *rhl* sistemlerine ait sinyal moleküllerinin, diğer sistemin aktivatör proteinini uyaramadığı belirlenmiştir (Pearson ve ark., 1997). Ayrıca kendine özgü sinyal molekölü ile kompleks oluşturan R-proteinlerinin DNA üzerinde belli promotor bölgeyi tercih ettiği ifade edilmiştir. Ancak *lasR/3-okso-C12-HSL* kompleksinin, *rhlR* ifadesini uyardığının ve 3-okso-C12-HSL'nin *rhlR*'nin kendi sinyal molekölü olan C4-HSL ile kompleks oluşturmamasını engellediğinin saptanması sonucunda bu iki sistemin birbirinden bağımsız olmadığı ve *las* sisteminin hiyerarşik olarak *rhl* sisteminden daha baskın olduğu kabul edilmiştir (Karatuna ve Yağcı, 2008 ve Pesci ve ark., 1997). McKnight ve ark. (2000) bu iki sistem arasındaki ilişkiyi *P. aeruginosa*'nın diğer otouyarıcılara ek olarak ürettiği bir üçüncü sinyal molekölü ile açıklamışlardır. *Pseudomonas* kinolon sinyal molekölü (PQS) olarak adlandırılan, yapı olarak kinolonlara benzeyen ve *lasB*'yi indüklemeye yeteneğinde olan bu sinyal molekölü, 2-heptil-3-hidroksil-4 kinolon şeklinde tanımlanmıştır. PQS'nin *las* ve *rhl* ÇA sistemlerinin arasında bir bağlantı oluşturarak her ikisinin de transkripsiyonu ve birçok virulans faktörünü düzenlediği belirtilmiştir (Smith and Iglewski, 2003; McKnight ve ark., 2000).

1.2.3. *Pseudomonas aeruginosa* Virulans Faktörleri

P. aeruginosa son zamanlarda yüksek insidans oranı, çeşitli virulans faktörlerinin üretimi ve artan antibiyotik direnciyle yaygın, mortalite ve morbiditesi yüksek, zor tedavi edilen enfeksiyonların etkenidir. Enfeksiyonların oluşumunda ve seyrinde konak ve bakteriye ait faktörler yer almaktadır. Konak bağışıklığının bozulduğu ve immün yanıtın baskımlandığı durumlarda, bakteri kolonizasyonu çoğunlukla enfeksiyona sebep olmaktadır. Bakterinin konakta çoğalıp, yayılması sonucunda hastalık oluşturmaları patojenite olarak tanımlanır ve virulans faktörleri

patojeniteden sorumlu bakteriyel ürünler olarak karşımıza çıkar (Karatuna ve Yağcı, 2008).

Oportunist patojen olarak *P. aeruginosa*'nın enfeksiyon oluşturmaları genellikle konak savunma sisteminde meydana gelen bir açığa bağlıdır. Deri ve mukozaların bütünlüğünün bozulmasıyla bakterinin hücre yüzeyine tutunması kolaylaşmış olur. Tutunmada pilus ve adezin molekülleri rol alır (Düzgün, 2009). Epitel hücre yüzeyinde yer alan müsin tabakası, bakterinin tutunmasını engelleyen bir konak savunma mekanizmasıdır. Ancak epitel dokusu daha önce viral bir enfeksiyon gibi herhangi bir ajan ile zedelenmişse bakterinin adezyonu kolaylaşır ya da *P. aeruginosa* salgıladığı bir takım enzimlerle epitel hücre yapısını bozarak, bağlanacağı reseptörlerin açığa çıkmasını sağlar veya mukoid yapıdaki *P. aeruginosa* suşları salgıladıkları alginatla bronşlardaki müsin tabakasına yapışarak bakteri enfeksiyonunu kolaylaştırır. Tutunmadan sonra *P. aeruginosa*'nın doğal bariyerleri aşarak dokularda invazyonu ürettiği ekstraselüler enzimler ve toksinler ile gerçekleşmektedir. Fizyolojik bariyerlerin bozulmasıyla oluşan doku hasarı sonucunda bakteri ve ürettiği toksinler dolaşıma geçerek yaygın sistemik enfeksiyon tablosu oluşturmaktadır. Enfeksiyon oluşumunun her aşaması bir önceki aşamanın devamı niteliğindedir ve hastalık bu aşamaların herhangi birinde kesintiye uğrayabilir. Bakteriye ait virulans faktörleri belli basamaklarda rol alır ve kendine özgü bulgular ortaya çıkarır (Adamo ve ark., 2004; Scharfman ve ark., 2001 ve Yagci ve ark., 2007).

P. aeruginosa ekstraselüler enzimler, toksinler ve farklı hücre komponentlerinden oluşan hücre içi ve hücre dışına salınan çeşitli virulans faktörlerine sahiptir.

1.2.3.1. Kirpik

Motilite, kendiliğinden hareket edebilme anlamına gelmektedir ve bakterinin besine ulaşma, toksik maddelerden kaçma, yer değiştirme gibi birçok ihtiyacını karşılayan bir fonksiyondur. Yapılan çalışmalar sonucunda belirlenen üç tip motilite

vardır; yüzme (swimming), kayma (swarming) ve titreme (twitching). Yüzme ve kayma hareketi kirpik bağımlı iken, titreme hareketinden tip IV pilus sorumludur (Toutain ve ark., 2005 ve Rashid ve Kornberg, 2000).

Kirpik, *P. aeruginosa*'nın besin içeren ortamdaki yüzme hareketinden mesul, bakterinin yüzeyinde bulunan kutupsal yerleşimli bir yapıdır. Hareket etme yeteneğindeki bakteriler sıvı ortamda kirpiklerinin dönerek hareket etmesiyle yer değiştirirler (Doyle ve ark., 2004). Kirpik aynı zamanda kayma hareketini de kontrol eder. Kayma hareketi sırasında bakteri hücresinin boyu normale göre uzar ve normalde tek olan polar kirpik, çift polar kirpiğe dönüşür (Shrout ve ark., 2006). Kirpik yapısındaki bu değişim tip IV pilus ve ramnolipid salgılanmasını uyarır (Kohler ve ark., 2000). Kirpik ayrıca epitel hücre membranına bağlanarak bakterinin adezyonunu sağlar ve bakteri kolonizasyonunun oluşumunda etkin görev almaktadır (Feldman ve ark., 1998 ve Mahenthiralingam ve ark., 1994).

1.2.3.2. Pilus

Bakteride bulunan kısa, filamentöz yüzey uzantılarıdır. Bakterilerde pilus genellikle hareketten sorumlu değilken, *P. aeruginosa* pilusları bakteriyel motilitede nadir olarak yer alan prokaryotik piluslardandır. *P. aeruginosa*'nın katı yüzeylerde hareketi, tip IV pilusun sorumlu olduğu titreme ile gerçekleşir. Pilus uzayarak hücre yüzeyinde bir noktaya tutunur ve sonra kısalarak bakteriyi o bölgeye çeker. Bakterilerin kirpik yapıları gibi, piluslar da epitel hücre membran yüzeyine bağlanarak bakterilerin birbirlerine ve çeşitli yüzeylere adezyonunda önemli rol oynamaktadırlar (Mattick, 2002 ve Patriquin ve ark., 2007). Piluslar ayrıca solunum yollarında hızlı yayılmaya ve kolonizasyona yardımcı yapılardır (Gupta ve ark., 1994 ve Kipnis ve ark., 2006).

1.2.3.3. Lipopolisakkarit Tabakası

Bakteri hücre zarfında, dış membranın dışında bulunan lipopolisakkarit (LPS) tabakası; iki katmanlı fosfolipid tabakasının arasında gömülü olarak yer alan ve toksik özellikte lipid A, buna bağlı bir O polisakkaridi içeren hidrofilik bir yapıdan meydana gelmektedir. Lipid A organizmanın biyolojik etkisini düzenleyerek endotoksin oluşturur, O-polisakkaridi ise esas olarak *P. aeruginosa* serotiplerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. LPS, hücre yüzeyindeki çeşitli reseptörleri tanıyıp bağlanarak bakterinin adezyonunda önemli rol oynar (Hentzer ve ark., 2001 ve Kipnis ve ark., 2006).

1.2.3.4. Alginat (Polisakkarit Kapsül)

P. aeruginosa tarafından üretilen, kapsül benzeri bir yapıdır. Glukronik ve mannuronik asidin β -1,4 glikozit bağları ile bağlanmış tekrarlayan polimerlerinden oluşmaktadır. Bakterinin etrafında viskoz bir jel kıvamında olan alginat, LPS gibi bakterinin adezyonunda önem arz etmekte, solunum yolu epiteline tutunmayı ve kolonizasyonu sağlamaktadır. Alginat aynı zamanda bakterinin immün sistem hücreleri tarafından fagositozunu engelleyen, antibiyotiklere karşı korunmasını sağlayan ve konak savunma sistemi hücrelerinden kaçarak bakteriye karşı konak yanıtının zayıflamasına sebep olan bir virulans faktörüdür (Hentzer ve ark., 2001).

1.2.3.5. Elastaz

Elastin, akciğerlerin elastikiyetine (genişleyip-daralmasına) olanak sağlayan, akciğerin ve aynı zamanda kan damarlarının önemli bir proteinidir. Akciğerlerde bulunan proteinlerin yaklaşık % 30'unu oluşturmaktadır (Karatuna ve Yağcı; 2008).

Elastaz ise *P. aeruginosa*'nın tip II sekresyon sistemi vasıtasıyla salgıladığı; kollajeni, Ig G ve Ig A'yı, komplemanı parçalayan bir metalloproteazdır.

P.aeruginosa'nın elastine karşı litik aktivitesinden las A proteaz ve las B elastaz sorumludur. Enzimler gösterdikleri sinerjik etki ile elastini parçalarlar. Las A proteaz bir serin metalloproteinazdır, elastini parçalayamaz ancak las B elastazın litik aktivitesini artırır. Elastazın proteolitik gücü diğer enzimlere kıyasla daha fazladır (proteazın 10 katı, tripsinin 4 katı). Hücreler arası bağlantıların koparılmasıyla solunum epitel hücrelerinin parçalanması sonucunda oluşan *P. aeruginosa* kaynaklı solunum yolu enfeksiyonlarında rol oynamaktadır. Epitel bütünlüğünü bozarak bakteri adezyonunu kolaylaştırır, damar duvarındaki kollajenin yıkılmasıyla damar yapısını bozarak akciğerde hemorajik ve nekrotik lezyonların oluşmasına ve alveolar yapıda bozulmalara neden olmaktadır (Karatuna ve Yağcı; 2008 ve Salyers ve Whitt, 2002).

1.2.3.6. Las A (Stafilolitik Proteaz)

Elastin yanında fibrin ve kollajeni de hasara uğratabilen, elastaz ve diğer proteinazların elastolitik aktivitesini arttıran bir serin proteazıdır. *Staphylococcus aureus*'un (*S. aureus*) hücre duvarındaki pentaglisin köprülerine bağlanarak bakteri hücrelerini lizise uğrattığından aynı zamanda bir stafilolitik proteazdır. Elastaz ile las A'nın sinerjik etkisiyle dokularda oluşan hasar, doğal bariyerlerin yıkımı sonucunda organ yetmezliklerine kadar sebep olur (Cowell ve ark., 2003).

1.2.3.7. Alkalen Proteaz

Alkalen proteaz, *P. aeruginosa*'nın virulans faktörlerinden biri olan, 50 kDa'luk bir çinko metalloproteazdır, *apr* geni tarafından kodlanır. Tip I sekresyon sistemi tarafından salgılanır. Konak immün sisteminde kompleman C1q ve C3 ya da IFN- γ ve TNF- α benzeri sitokinler gibi çeşitli bileşenleri yıkıma uğratmaktadır (Coin ve ark., 1997). Kompleman aracılığıyla eritrositlerin yıkımı ile ilişkili olduğu ayrıca fibrini parçalayarak akciğer alveollerinin yapısını bozup, enfeksiyonun ilerlemesine sebep olduğu bildirilmiştir (Laarman ve ark., 2012).

1.2.3.8. Proteaz IV

Proteaz IV, lizin spesifik endoproteazdır ve *P. aeruginosa*'nın göz ve akciğer patogeneğinde anlamlı bir virulans faktörüdür. Olgun proteaz IV, kompleman ve Ig G gibi önemli konak immünolojik proteinlerini parçalar. Ayrıca elastin gibi yapısal proteinlerin bütünlüğünü bozar, doku hasarına yol açar ve bakteriyel enfeksiyonu kolaylaştırır. Demir bağlayıcı proteinler laktoferrin ve transferrini parçalarına ayırarak, *P. aeruginosa*'nın sideroforu piyoverdin vasıtasıyla demiri konaktan uzaklaştırmasına olanak sağlar (Wilderman ve ark., 2001).

1.2.3.9. Piyosiyenin

P. aeruginosa'nın mavi-yeşil renkli, fenazin türevi, düşük molekül ağırlıklı bir pigmenti olan piyosiyenin, bakterinin patojenitesinde önemli role sahiptir. Besi ortamında düşük fosfat iyon konsantrasyonu ve yeterli sülfat iyonu varlığında rahatlıkla üretilmektedir. Bu pigment birçok bakteri türüne karşı inhibitör etki gösterme yeteneğinde olduğundan, bulunduğu ortamda bakterinin rekabet şansını arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar, piyosiyenin hücre solunumunu ve siliyer aktiviteyi engellediğini, epidermal hücre büyümesini durdurduğunu ve akciğerde doku hasarına sebep olduğunu göstermiştir (Denning ve ark., 2003 ve Karatuna ve Yağcı, 2008).

1.2.3.10. Piyoverdin

P. aeruginosa çoğalabilmek için demire gereksinim duymaktadır ve demir için vücut proteinleri ile yarışır. Piyoverdin bir siderofordur ve çevredeki demiri bağlayarak hem ortamdaki diğer bakterilerin gelişimini kısıtlar hem de *P. aeruginosa* metabolizması için demir sağlar. Piyoverdin demir için yüksek afiniteye sahiptir ve bakterinin demir alımını kolaylaştırmak için, demiri çevresel ortamdan ayırır. Ayrıca, piyoverdinin, proteaz IV sentezi için bir sinyal molekülü olarak hareket ettiği ve aynı

zamanda kendi üretimini düzenlemenin yanında ekzotoksin A'nın üretiminde de düzenleyici rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Karatuna ve Yağcı, 2008; Lamont ve ark., 2002 ve Meyer ve ark., 1996).

1.2.3.11. Fosfolipaz C ve Ramnolipid

P. aeruginosa iki çeşit hemolizine sahiptir; biri ısıya duyarlı bir protein olan fosfolipaz C, diğeri ise ısıya dayanıklı bir glikolipit olan ramnolipid.

Fosfolipaz C, *P. aeruginosa*'nın tip II sekresyon sistemi tarafından salgılanır. Fosfat tutucu sistemin bir parçası olarak fonksiyon gösterir, inorganik fosfatları serbest bırakan alkalen fosfatazlar gibi etki göstererek, konak fosfolipidlerinin ürettiği fosfomonoesterleri parçalar. Akut akciğer hasarı patogenezinde rol oynamaktadır. Konak nötrofil oksidatif yanıtını baskıladığı gibi patojenik etkilerini sürfaktan inaktivasyonu ile sağlar (Elleboudy ve ark., 2014).

Ramnolipid ise, *P. aeruginosa*'nın uygun gelişme koşulları altında salgıladığı hemolitik etkili, bir ya da iki ramnoz molekülünden oluşan hidrofilik bir baş ve bir ya da iki yağ asidi içeren hidrofilik kuyruğa sahip bir biosürfaktandır (Moussa ve ark., 2014). Deterjan benzeri etkisiyle akciğer fosfolipidlerinin yapısını bozarak fosfolipaz C'nin işlevine yardımcı olur. Ayrıca silya fonksiyonlarının da bozulmasına neden olarak mukosiliyer taşınımı engellemektedir (Karatuna ve Yağcı, 2008).

1.2.3.12. Ekzotoksin A

P. aeruginosa virulansında önemli bir role sahip, tip II sekresyon sistemi aracılığıyla hücre dışına salgılanan bir toksindir. Etkisini, ökaryot hücrelerde protein sentezi için gerekli olan uzama faktör 2'yi (EF-2) inhibe ederek yani protein sentezini durdurup hücre ölümüne neden olarak göstermektedir. Aynı zamanda konak yanıtını

baskıladığına ve bölgesel doku hasarına sebep olduğuna dair çalışmalar da bulunmaktadır (Vidal ve ark., 1993 ve Wick ve ark., 1990).

1.2.3.13. Sekresyon Sistemi, Ekzotoksin S ve T

Gram negatif bakterilerde dış zar, iki hidrofilik membrandan oluşmuştur. İç ve dış membranlar hidrofilik boşlukla ayrılır, bu boşluğa periplazma denir. Salgılanan proteinler, enzimler ya da toksinler membranın hidrofilik çevresi boyunca bulunmaktadırlar. Bu proteinler genellikle geniş hidrofilik moleküllerdir ve bu nedenle kanallara ya da hücre zarfına ulaşan diğer tip borulara ihtiyaç duyarlar. Dış ortama açılan bu yollar, sekresyon sistemleri denen, çok ya da az karmaşık makromoleküler komplekslerin birleşmesiyle inşa edilmektedir (Filloux ve ark., 1990).

Günümüzde sekresyon sistemini şekillendiren protein ya da bileşenlerin özelliklerine göre tip I'den tip VI'ya kadar, altı farklı tip sistem tanımlanmıştır (Desvaux ve ark., 2009 ve Durand ve ark., 2009). Bu sekresyon sistemleri, tek aşamalı ve iki aşamalı sistem olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Proteinleri bir kerede bakteri hücre zarfına, sitoplazmadan hücre yüzeyine transfer edenler tek aşamalı salgı sistemleri olarak bilinmektedir. Alternatif olarak, salgılanan proteinler dış membrana geçmeden önce periplazmaya transfer olurlar, bu sistemler de iki aşamalı salgı sistemleri olarak bilinir (Filloux, 2011).

İki aşamalı sistem, salgılanan proteinin periplazmaya geçişinden önce kısa süreli duraklamasını sağlar. Bu periplazmik duraklama çok kısadır ve sadece salgı sisteminde bir arıza olduğunda protein burada tutulur. Prensip olarak protein, salgı sisteminin periplazmasına bağımsız olarak ulaşır. Ancak bu sistemde protein, genel dışa aktarma yolunu kullanır, bu aynı zamanda periplazmik ve dış membran proteinlerinin taşınmasında da kullanılan yoldur. Tip II, IV, V salgı sistemleri, iki aşamalıdır (Filloux, 2011).

Tek aşamalı sistem, periplazmada tanımlanan salgılanmış protein havuzu olmaması anlayışına dayanmaktadır. Diğer bir deyişle, salgı sistemi hasara uğradığında salgılanan protein sitozolde bloke edilir ve muhtemelen parçalanır. Bakteri hücre zarfından devamlı bir kanal geçmektedir ve bu kanal bakteriyel sitozolden ekstraselüler çevreye geçişini sağlayan proteinlerin bir ya da çoklu kombinasyonunu içerir. Tip I, III, VI salgı sistemleri tek aşamalıdır (Filloux, 2011).

Tip III sekresyon sistemi, *Pseudomonas* türleri ve bazı Gram negatif bakterilerde (*Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*) rastlanan bir salgı sistemidir (Michiels ve ark., 1990 ve Yahr ve ark., 1996). Bu sistemle, bakterinin sitoplazmik membranından, pilus benzeri kanallar oluşarak konak hücre sitoplazmik membranında porlar açtığı ve bu porlar aracılığıyla bakteriyel proteinlerin bakteri sitoplazmasından konak hücre sitoplazmasına doğrudan aktarıldığı saptanmıştır. *P. aeruginosa*'nın bu sistem aracılığıyla salgılanan 4 farklı toksini bulunmaktadır; Ekzoenzim S (ExoS), Ekzoenzim T (ExoT), Ekzoenzim Y (ExoY), Ekzoenzim U (ExoU). ExoS, konak bağışık yanıtını etkileyen, inflamatuvar cevabı düzenleyebilen ve hücre iskelet organizasyonunu bozma etkisinde olan bir sitotoksindir. ExoT, konak yara iyileşmesini engelleyen önemli virulans faktörleri arasında sayılmaktadır. ExoY, pulmoner vasküler hücrelerde hücreler arası boşluk oluşumuna ve geçirgenliğin artmasına sebep olan bir toksindir. ExoU, konak içine salgılandığında fosfolipaz etkisi göstererek ökaryotik hücre membranının parçalanmasına neden olan toksindir. Yapılan çalışmalarda bu toksinin yalnız başına sepsis ve ilerleyen akciğer enfeksiyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Allewelt ve ark., 2000).

1.2.3.14. Biyofilm

Bakteri tarafından üretilen, bakterinin çeşitli yüzeylere ve birbirlerine yapışmasını sağlayan, büyüme dereceleri ve genetik faktörlere bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen polisakkarit yapıda bir matrikstir. Matriksin yoğunluğu bakteri türleri arasında değişiklik göstermektedir. Biyofilm oluşurken bakteriler planktonik formdan, mukoid agregatların içinde gelişimini sürdürebilen hücre topluluklarının

oluşturduğu sesil forma geçmektedirler. Oluşum aşamaları; tutunma, yapışma, slime oluşumu, olgun biyofilm oluşumu ve koparak ayrılma olarak sıralanmaktadır. Biyofilm tabakasında üreyen bakteriler, planktonik formlarına göre 1000 kat daha dirençlidirler. Biyofilmin gelişmesi ortamdaki besin, pH, oksijen ve ozmolarite ile ilişkilidir (Çevik Tepeli, 2009).

Biyofilm oluşumu ÇA las sistemi tarafından düzenlenmektedir. Bakterinin yüzeye tutunma işleminden sonra ÇA sistemi aracılığıyla, bakterilerin ortamdaki popülasyon yoğunluğunu belirleyerek haberleşmesi, biyofilmin oluşması için gerekli bir dizi işlemi başlatır (De Kievit ve ark., 2001). Biyofilm içerisindeki bakterilerin büyüme hızı planktonik bakterilere oranla daha düşüktür ancak biyofilm vasıtasıyla; bakteri besin yokluğu, pH değişimleri, antibiyotikler, dezenfektanlar vb. çeşitli stres anlarında kendi yaşamını korumaktadır (Costerton ve ark., 1999).

P. aeruginosa enfeksiyonlarının artan insidansı ve dirençli suşlar, biyofilm oluşumuyla ilişkilendirilmektedir. Biyofilm tabakası içerisinde türler arası konjugasyonla direnç plazmidi aktarımı bilinmektedir. Doğal çevrede biyofilm daha çok sucul ortamlarda saptanabilirken; insanlarda kateter, kontakt lens, protez, rahim içi araç gibi yabancı cisim enfeksiyonları ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Wagner ve Iglewski, 2008).

Biyofilm tabakası, bakterinin fagositoz, opsonizasyon ve kompleman sisteminden, yani konak savunmasından korunmasını sağlamaktadır (Düzgün, 2009).

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisi genel olarak bakteriyel üremenin engellenmesi veya bakterinin öldürülmesine dayanmaktadır. Hızla gelişen antibiyotik direnci bu süreci bazen başarısız kılabilir. Bakteriyel virulansı düzenleyen ÇA sisteminin keşfi, enfeksiyon etkenlerinin kontrolü için yeni bir fırsat sağlamaktadır. Bakteriler, iletişim kurdukları sinyal molekülleri aracılığı ile bulundukları ortamda popülasyon yoğunluklarını belirleyerek davranışlarını düzenlerler. ÇA davranışının bloke edilmesiyle bakterilerin birbiriyle iletişimi ve virulans faktörlerinin üretimi

engellenebilmektedir. Virulans faktörlerinin üretilmesi, patojenitenin oluşturulması açısından önem taşımaktadır. Gerek direnç gelişiminin artması ve gerekse sağlık üzerinde oluşturduğu olumsuz yan etkiler nedeniyle, antibiyotiklerin kullanımının sınırlanması, yeni antimikrobiyal tedavi arayışına olan ilgiyi arttırmıştır (Collins ve Gibson, 1999).

Günümüzde *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan enfeksiyonun kontrol altına alınmasına yönelik geliştirilen alternatif yöntemlerin az sayıda olduğu görülmektedir. Bakteriler arası iletişimi bozarak bakteri topluluklarının kontrol altında tutulmasını hedefleyen yeni yaklaşımlar quorum quenching olarak adlandırılmaktadır. Bu araştırmalar ÇA sinyal moleküllerinden biri olan AHL üretiminin önlenmesi (sentezlendiği aminoasitin analoglarının geliştirilmesi), ÇA molekülünün inhibisyonu (moleküllerin parçalanması), ÇA sinyal alımının önlenmesi (reseptörlerin blokajı) temeline dayanmaktadır (Açıkgöz, 2012).

P. aeruginosa ÇA sistemi sinyal moleküllerinin taklidi şeklinde moleküller daha çok bitkilerden elde edilen doğal ya da AHL inhibitörleri olarak geliştirilmeye çalışılan sentetik bileşiklerden oluşmaktadır. Doğal furanonlar, flavonlar (Skogman ve ark., 2016), fenilalanin arjinil beta naftilamid (El-Shaer ve ark., 2016), laktonaz enzimi üretebilen basiller (Joshi ve ark., 2014 ve Rajesh ve Rai, 2016), çeşitli toprak (Hassan ve ark., 2016 ve Samrot ve ark., 2016) ve deniz mikroorganizmaları (Buseti ve ark., 2015), mandalina (Luciardi ve ark., 2016) ve tarçın yağı (Kim ve ark., 2015), geleneksel baharatlar (Vasavi ve ark., 2016), proantosiyaniid (Maisria ve ark., 2016), fenolik bileşikler (Ugurlu ve ark., 2016), glioksamid türevleri (Nizalapur ve ark., 2016), azitromisin, seftazidim (Husain ve ark., 2016), nitrik oksit (Kutty ve ark., 2015), gama amino bütirik asit (Feuilloley ve ark., 2013), bitkiler tarafından üretilen fitokimyasallar ve çeşitli bitki özütleri vb. bileşiklerin *P. aeruginosa* ÇA sistemini ve bu sistem tarafından düzenlenen elastaz, proteaz, piyosiyaniin, biyofilm ve bakteriyel hareket gibi virulans aktivitelerini etkilediği yapılan çalışmalarca belirlenmiştir. Bu bileşiklerin çoğunun ya toksik olması ya da kabul edilebilir dozlarda etki göstermemesi sebebiyle insan kullanımına uygunsuz olduğu saptanmıştır. Ancak Georgi ve ark. (2011)'nın, hipotiosiyaniidin CF'lu akciğerde *P. aeruginosa*

kolonizasyonunu kontrol altına aldığını belirlediği çalışmaları sonrasında, hipotiosiyonidin laktoferrin ile inhalasyon formülasyonu, Avrupa İlaç Ajansı ve Gıda & İlaç Birliği tarafından ilaç statüsü almış ve bu formülasyon klinik uygulamalarda kullanılan ve ilaç statüsü verilen tek ÇA inhibitörü olarak literatürlerde yer almıştır.

Günümüzde biyoteknolojik çalışmalar, virulans faktörlerinin üretimini önlemek amacıyla AHL antagonistlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Bu tip moleküllerin kullanımı, bakteriler arası haberleşmenin bloke edilerek virulansın azaltılması ve dolayısıyla enfeksiyonların kontrolüne fırsat verecek, yeni bir tedavi yaklaşımı olarak düşünülmektedir. Virulans faktörlerinin çoğunun bakteriye özgü olması ve konak organizmada bulunmaması, tedavinin özgüllüğünü sağlayan faktörler olarak düşünülmektedir (Hentzer ve Givskov, 2003).

1.3. Yeni Bir Tedavi Yaklaşımı, Probiyotikler

Probiyotikler, intestinal sistemde mikrobiyal dengeyi sağlayarak insan sağlığına yararlı etkilere sahip olan, canlı mikroorganizma destekleridir. Günümüzde probiyotik tanımı, insan ve hayvan sağlığını güçlendirerek destekleyen mikrobiyal preparatların tümünü kapsamaktadır (Biloo ve ark., 2006; Kim ve ark., 2006 ve Lee ve Salminen, 1995). İnsan gastrointestinal sisteminde (GİS), organizma için faydalı çok sayıda farklı bakteri türü bulunmaktadır ve bu bakteriler doğumdan hemen sonra şekillenir, kolonizasyon yenidoğan döneminde kazanılır. Bu nedenle doğum yöntemi ve beslenme şekli kolonizasyonun en önemli belirleyicilerindendir. Bunların dışında hamilelik yaşı, bebeğin beslenme tipi (anne sütü veya mama), sağlık durumu, GİS'ten geçiş zamanı, infantil dönemde sık antibiyotik kullanımı, pH ve stres durumları da kolonizasyonu etkileyen diğer faktörlerdir (Coşkun, 2006).

Vajinal doğum ile doğan bebeklerin intestinal mikrobiyotasını, annenin genitoüriner sistem mikroorganizmaları oluştururken; sezaryan ile doğan bebekler, doğum kanalından geçemediklerinden, intestinal floranın daha çok deri mikroorganizmalarına benzer şekilde oluştuğu görülmüştür. Ayrıca anne sütüyle

beslenen bebekler ile mama ile beslenenlerde oluşan mikrobiyotada da birbirinden farklıdır. Anne sütü ile beslenenlerde floraya *Bifidobacterium*'lar hakim olurken, mama ile beslenenlerde *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Clostridium* vb. bakteriler baskındır (Dominguez-Bello ve ark., 2010).

Yenidoğan döneminde intestinal flora oluşumundaki bu fark, bebeklerin immünolojik bozukluklara ve alerjik hastalıklara daha yatkın yapıya sahip olmalarında büyük rol oynamaktadır (Coşkun, 2006 ve Çelebi ve Uygun, 2013). Uygun floranın oluşumu, bölgenin patojenlere karşı korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Sağlıklı bireylerde yararlı bakteriler ve patojenler belirli bir denge içindedir. Herhangi bir nedenle bu dengenin bozulması; enfeksiyon hastalıkları, otoimmün ve immünoinflamatuvar hastalıkların oluşmasına ortam hazırlamaktadır. Bozulan bu dengenin düzenlenmesinde probiyotiklerden faydalanılır (Fuller, 1989; Haller ve Jobin, 2004; Kalliomaki ve ark., 2001 ve Rook ve Brunet, 2005).

1.3.1. Probiyotik Mikroorganizmada Aranan Kriterler

Bir bakterinin etkin probiyotik olarak tanımlanabilmesi için, sağlığa yararlı olduğu ve güvenilir olduğu bilimsel olarak tespit edilmelidir. Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) tarafından belirlenen kriterlere göre; suş insan orijinli olmalı, GİS'te canlılığını sürdürebilmeli, mide asidi ve safra tuzuna dirençli olmalı ve bunun yanında ince bağırsak epitel hücrelerine tutunabilmelidir. Ayrıca uygulanacak işlemler sırasında ve depolama süresince canlılığını korumalı ve aktif olduğu bölgede çoğalabilmelidir. Bunun yanı sıra etkin antimikrobiyal madde üretimiyle, gıdaları ve tüketiciyi gıda bozulmasına sebep olan patojen bakterilerin etkilerinden koruyabilmelidir. İnce bağırsak mukozasına tutunup, GİS'te etki ettiği süreyi uzatarak immün sistem düzenini sağlamaya yardımcı olmalıdır (Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 2002).

Probiyotik bir mikroorganizma aynı zamanda;

- Patojen olmamalı,
- Toksik maddeler üretmemeli,
- Genetik yapısı kararlı olmalı,
- Konakta hastalıklara karşı direnç artışı sağlamalı,
- Bağırsaktaki antibiyotiklerden etkilenmemeli,
- Canlı hücrelerde büyük miktarda bulunabilmelidir (Ewaschuk ve Dieleman, 2006 ve Guarner ve Schaafsma, 1998).

Flora bakterileriyle konak arasında simbiyotik bir ilişki söz konusudur. Bazen bağırsağa ulaşan patojen mikroorganizmalar, burada mevcut floranın dengesini bozarlar. Bozulan dengenin tekrar sağlanması için probiyotiklerden yararlanılır. Probiyotikler, çeşitli mekanizmalarla insan bağırsağındaki mikrobiyal dengeyi korurlar.

1. Organik asit, hidrojen peroksit ve bakteriyosinlerden oluşan inhibitör maddeleri aracılığıyla hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerin bağırsağa tutunmasını engellerler.
2. Patojen mikroorganizmaların spesifik reseptörler aracılığıyla mukozal yüzeylere yapışması, enfeksiyonun ilk aşaması olarak düşünülmektedir. Probiyotikler, patojenlerin tutunacağı adezyon bölgelerini kompetitif inhibisyon suretiyle tutarak etkili olurlar yani bağırsak mukozasına yapışarak patojenlerin kolonize olmasını engelleyip, immün sistemi düzenleyerek, zarar gören mukozanın iyileşmesine yardımcı olurlar.
3. Patojen mikroorganizmalarla besin için rekabet ederler.
4. Toksin reseptörlerini bloke ederler.
5. İmmün sistemi güçlendirirler (Rastall ve ark., 2005).

Probiyotiklerin söz konusu etkileri tür özelliklerine göre değişiklik göstermektedir. İnsan sağlığı ve tüketimi için geliştirilen ürünlerde insan kaynaklı mikroorganizmaların kullanılması, konakçı ile spesifik etkileşim ve türe bağlı olarak ortaya çıkacak etkilerin saptanması açısından önem taşır (Dunne ve ark., 2001).

Güvenilir bir probiyotik seçiminde FAO/WHO kriterlerine göre suşun DNA-DNA melezlenmesi ya da 16S rRNA dizi analiz tekniklerinden biri ile kesin olarak tanımlanmış olması ve (Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 2002) eğer suş, patojen türlere ait bir üye ise aynı zamanda detaylı klinik tanının yapılması gerekmektedir. Özellikle önemli bir güvenlik kriterleri olarak suşun aktarılabilen antibiyotik direnç geni taşıyıp taşımadığının ve GİS'e zarar verebilecek özellikte yapısının belirlenerek probiyotik olarak kullanılmaması belirtilmektedir (Uymaz, 2009).

Yapılan çalışmalarla probiyotik tüketiminin vücut direncini arttırmak, intestinal düzensizlikleri ortadan kaldırmak ve sağlıklı bir yaşam sürmek amacıyla gerekli olduğu ispatlanmıştır. Düzenli probiyotik kullanımıyla laktoz intoleransının hafiflediği (Heyman ve Menard, 2002), seyahat (Sullivan ve Nord, 2005), antibiyotik tedavisi sonrası (Rastall ve ark., 2005) ya da radyasyon bağımlı (Delia ve ark., 2002) diyare oranında, Crohn hastalığında (Prantera, 2006), ülseratif kolitlerde (Fedorak, 2010), rahatsız bağırsak sendromunda azalma sağladığı (Ewaschuk ve Dieleman, 2006), *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda (Pacifico ve ark., 2014) ürettiği laktik asit sayesinde bakteri kolonizasyonunun azalmasına yardımcı olarak etki gösterdiği, ürogenital sistem enfeksiyonlarının, kolon kanseri riskinin azaltılmasında etkili olduğu belirlenmiştir (Biler, 2009).

1.3.2. Probiyotik Olarak Kullanılan Mikroorganizmalar

Probiyotik olarak değerlendirilen mikroorganizmalar çoğunlukla laktik asit bakterileridir (LAB). LAB; Gram pozitif, katalaz negatif, hareketsiz, sporsuz, fermentasyon sonucunda son ürün olarak laktik asit vb. organik asit oluşturan bir grup

mikroorganizmadır. *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus bulgaricus* gibi yoğurt yapımında yararlanılan bakteriler dışındaki tüm laktik asit bakterileri bağırsak florası elemanıdır (Gürsoy ve Kınık, 2005). Ayrıca bazı bitkilerde, süt ve süt ürünlerinde ve fermente gıdalarda da LAB üyelerine rastlamak mümkündür (Sanders, 2003).

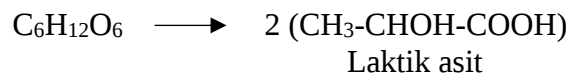
Çizelge 1.1. Probiyotik olarak kullanılan laktik asit bakterileri (Fijan, 2014; Salminen ve ark., 1999)

<i>Enterococcus</i> türleri	<i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus</i> türleri	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactococcus</i> türleri	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Leuconostoc</i> türleri	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
<i>Pediococcus</i> türleri	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i> türleri	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Streptococcus intermedius</i>

LAB'ların sağlığa potansiyel faydalarının belirlenmesi sonucunda bazı suşlar probiyotik olarak kullanılmaya başlamıştır. Bu suşların önemli metabolik özellikleri, gelişim kabiliyetleri, uygulanan işlemlere karşı dirençliliği, oluşturdukları son ürünler vb. durumlarının yanında uzun yıllardır güvenle kullanılıyor olmaları, geniş alanda endüstriyel uygulamaya olanak sağlamıştır (Drinan ve ark., 1976). Probiyotik olarak kullanılan LAB türleri, Çizelge 1.1.'de gösterilmektedir.

LAB, fermentasyon sonucu oluşan ürünlere göre homofermentatif ve heterofermentatif olarak iki grupta sınıflandırılır.

Homofermentatif LAB; glikozu, fruktozu di fosfat yoluyla parçalayıp fermentasyon sonucunda % 95-100 oranında laktik asit üreten mikroorganizmalardır.



Heterofermentatif LAB; glikozu, hegzos mono fosfat yoluyla parçalayarak fermentasyon sonucunda % 50 oranında laktik asit üretirken bunun yanında etanol, asetik asit, gliserol, mannitol ve fruktoz oluşturan mikroorganizmalardır (Drinan ve ark., 1976).



LAB'ın probiyotik olarak kullanılan en önemli cinsleri; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*'tur (Yürümez, 2011).

1.3.3. *Pediococcus* Cinsinin Temel Özellikleri

Pediokoklar, *Lactobacillaceae* ailesine ait Gram pozitif, katalaz negatif, tetrat morfolojide, fakültatif aerob ve karbonhidrat fermentasyonu sonucunda sadece laktik asit üreten homofermantatif bir mikroorganizma grubudur. Optimum gelişme sıcaklığı 35-37°C'dir. 50°C'de üreyebilen türleri de bulunmaktadır (Collins ve ark., 1990). Pastörizasyon sonrasında canlılıklarını korurlar. Fermente gıdalarda ve içeceklerde (turşu, şarap, bira vb.), taze sebzelerde, mandıra ürünlerinde, insan ve hayvan bağırsak florasında doğal olarak bulunurlar. Gıda üretiminde şarap ya da bira mayalanmasında bozunma mikroorganizmaları olarak ya da et, sebze ve günlük fermentasyonlarda başlangıç mikroorganizmaları olarak kullanımları gibi önemli etkileri mevcuttur. Peynirin oluşumunda ikinci flora olarak yer alır, aromanın yanında şekil ve renk değişimine de katkı sağlarlar (Bacus ve Brown, 1981 ve Bhowmilk ve Marth, 1989).

Bilinen türleri; *Pediococcus acidilactici* (*Ped. acidilactici*), *Pediococcus pentosaceus* (*Ped. pentosaceus*), *Pediococcus damnosus*'tur. *Ped. acidilactici* ve *Ped. pentosaceus*'un DNA/DNA kökenleri birbirlerine çok yakın olup karakteristik farklarla birbirlerinden ayrılmaktadırlar. Genetik faktörlerin yanında *Ped. acidilactici* türleri ısıya karşı direnç gösterebildiklerinden 50°C'de gelişmektedirler ancak maltozu fermente edemezler; *Ped. pentosaceus* türleri ise 50°C'de gelişme göstermezler fakat

maltozu fermente etme yeteneğine sahiptirler. Pediokoklar morfolojileri, yalancı katalaz üretimi ve tuza tolerans özellikleriyle mikrokoklarla benzerlik göstermektedir. Mikrokokların pigment üretmesi ve aside duyarlı olması, bu iki cins arasındaki ayrımı güvenle sağlamaktadır (Garvie, 1986 ve Kitahara, 1974).

Bazı pediokokların, ürettikleri antimikrobiyal metabolitler aracılığıyla, farklı ve özellikle kendine yakın LAB'ın ve diğer bazı patojen bakterilerin gelişimini inhibe etme yeteneğinde oldukları belirlenmiştir. Laktik asit, hidrojen peroksit ve pediosin, bazı pediokoklar tarafından üretilen en önemli antimikrobiyal metabolitler arasında yer almaktadır (Rattanachaikunsopon ve Phumkhachorn, 2010).

1.3.3.1. Laktik asit

Laktik asit, bakterilerin fermentasyon metabolizmaları sonucunda ortaya çıkan bir üründür. Son ürün olarak laktik asitin oluşması, ortamın pH'nın düşmesine sebep olarak, bozulma etkeni ve patojen (*Clostridium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Listeria sp.* vb.) bakterilerin gelişimini inhibe etmektedir. Laktik asit antimikrobiyal etkisini, hücre membranının devamlılığını bozup, aktif taşımayı engelleyerek ve intraselüler pH'ı düşürüp, birçok metabolik fonksiyonu inaktive ederek göstermektedir. Laktik asitin hidrofobik karakterlerde çözünmemiş formları bakteri içerisine nüfuz ederek hücre içinde çözünür, böylece sitoplazmada meydana gelen pH düşüşü sebebiyle, hücre ölümü gerçekleşir (Ray ve Bhunia, 2013). Laktik asitin, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler, maya ve küflerin birçoğunu inhibe edecek geniş bir etki spektrumu bulunmaktadır (Caplice ve Fitzgerald, 1999).

1.3.3.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Oksijen, laktat, pürivat, NADH varlığında sentezlen hidrojen peroksitin membran lipidleri ve hücre proteinler üzerine oksitleyici etkisi bulunmaktadır. Bu güçlü oksitleyici etkisiyle birçok mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite

göstermektedir. (Holzapfel ve ark., 1995). Hidrojen peroksit, kolayca hücre içerisine nüfuz ederek kalıtım materyalini zedelemekte ve hücre ölümüne sebep olmaktadır (Lindgren ve Dobrogosz 1990). Hidrojen peroksitin; bakteriler, mayalar, küfler, viruslar ve bakteri sporlarını içeren geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu belirlenmiştir (Fraise ve ark., 2013; Rattanachaikunsopon ve Phumkhachorn, 2010).

1.3.3.3. Bakteriyosin - Pediosin

Bakteriyosinler, LAB'ı da içeren birçok bakterinin ribozomunda sentezlenen, polipeptit yapıda, özellikle yakın türler üzerinde bakterisidal etkiye sahip antimikrobiyal bileşiklerdir (Chen ve Hoover, 2003 ve Klaenhammer, 1993). Günümüzde bakterisit etkili peptit veya proteinler bakteriyosin olarak adlandırılmaktadır. Bakteriyosinler protein yapıları gereği proteazlara karşı hassastır. Tripsin, α - kimotripsin, pepsin ve proteinaz gibi proteazlarla hidroliz işlemi bakteriyosinlerin protein yapısının tayini veya yeni bir bakteriyosinin karakterizasyonu amacıyla yararlanılan en yaygın uygulamadır. LAB bakteriyosinleri; I, II, III, IV olmak üzere dört sınıfa ayrılmaktadır. Bazı pediokoklar tarafından üretilen ve pediosin olarak adlandırılan bakteriyosinler sınıf II bakteriyosinlerdendir. Sınıf II bakteriyosinler, anti-listeral aktivitesiyle bilinen pediosin benzeri bakteriyosinleri içermektedir. Pediosin üreten probiyotik suşların kullanımı, gıda korunması amacıyla tercih edilmektedir. Fermente ürünlerde *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) inhibisyonunun pediosin ile sağlandığını belirten birçok çalışma bulunmaktadır (Kaur ve ark., 2014).

Probiyotikler üzerine yapılan çalışmalar daha çok probiyotiklerin mikroenkapsülasyonu, farklı gıdalar ile birlikte kullanımı (Anal ve Singh, 2007; Champagne ve Fustier, 2007; Hsieh ve Ofori, 2007 ve Qi ve ark., 2006) ile fonksiyonel gıda oluşturulması ve insan sağlığı üzerine yararlı etkilerini kapsamaktadır (Sullivan ve Nord, 2005). Ancak geniş bir yelpazede toplum ilişkili ve hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavisi ve önlenmesinde probiyotiklerin kullanımı son zamanlarda önem kazanmaya başlamıştır (Elmer ve ark., 1996; Vanderhoof ve ark., 1999 ve

Viswanathan ve ark., 2009). Asit salgılama yetenekleri, ürettikleri bakteriyosinler ve diğer ikincil ürünleri ile patojenler tarafından oluşturulan enfeksiyonu nötralize edebilecekleri gibi, konağın inflamatuvar ve immün cevabını düzenleyebilecek yapıda mikroorganizmalar olmaları, vücudun diğer bölgelerindeki klinik enfeksiyonların tedavisinde de kullanılabilirliklerini düşündürmektedir (Gan ve ark., 2002; Harder, 2002; Hesse ve ark., 2000 ve Reid, 2001).

Bu noktadan hareketle çalışmamızda, yenidoğan gaitasından potansiyel probiyotik özellikte bir *Ped. acidilactici* suşu izole etmek ve bu suşun ürettiği organik asitten yararlanarak, hastane enfeksiyonu etkenleri içinde önemli yere sahip, çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirebilen ve oluşturduğu enfeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan klinik *P. aeruginosa* izolatlarının, ÇA sistemi ve bu sistem tarafından kontrol edildiği bilinen bazı virulans faktörleri üzerine inhibitör etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Bakteriyel Suşlar

2.1.1.1. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatları

Ankara Lokman Hekim Etlik Hastanesi Laboratuvarı'ndan 2014-2015 yılları arasında, çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve *P. aeruginosa* olarak tanımlanan toplam 141 suş çalışmaya dahil edilmiştir. Bu suşların tanımlama kontrolü klasik konvensiyonel yöntemler (Gram boyama, Ceftrimide agar'da üreme, 42°C'de gelişme, mavi-yeşil pigment üretimi, kendine has koku, katalaz, oksidaz, IMVIC, nitrat ve hemoliz testi) ile gerçekleştirilmiş ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere % 15 gliserol içerisinde stoğu yapılarak -80°C'de muhafaza edilmiştir.

2.1.1.2. *Pediococcus acidilactici* Suşları

2015-2016 yılları arasında Ankara Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yenidoğan Polikliniği'nde normal doğum yöntemi ile doğan ya da rutin kontrole gelen, sadece anne sütü ile beslenen, kendisi ve annesi bu periyotta hiç antibiyotik tedavisi almamış, 0-3 ay bebeklerden alınan gaita örneklerinden izole edilen *Ped. acidilactici* suşları çalışmaya dahil edilmiştir.

2.1.2. Araştırmada Kullanılan Besiyeri, Ayıraç ve Ekipmanlar

2.1.2.1. Besiyeri ve Ayıraçlar:

Cetrimide Agar (Oxoid)

Besiyeri içeriği (g/L)

Gelatin peptone	20 g
Magnesium Chloride	1,4 g
Potassium Sulphate	10 g
Cetrimide	0,3 g
Agar	13,6 g

pH 7,2 $\pm$ 0,2

Besiyerinden 45,3 g tartılıp 1000 mL distile suda çözülmüş, üzerine 10 mL gliserol ilave edilerek kaynatılmış ve homojenize edilmiştir. pH'ı 7,2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve petri plaklarına eşit hacimde paylaştırılmıştır.

Columbia Agar (Oxoid)

Besiyeri içeriği (g/L)

Special peptone	23 g
Starch	1 g
Sodium chloride	5 g
Agar	10 g

pH 7,3 $\pm$ 0,2

Besiyerinden 39 g tartılıp üzerine 1000 mL distile su ilave edilmiş, besiyeri tamamen çözülene kadar kaynatılmış ve pH 7,3'e ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilen besiyeri 50°C'ye soğuduktan sonra, % 5 defibrine koyun kanı ilave edilip karıştırılmış ve petri plaklarına eşit hacimde paylaştırılmıştır.

De Man Rogosa Sharpe Agar (Merck)

Besiyeri içeriği (g/L)

Enzymatic Digest of Casein	10 g
Meat Extract	10 g
Yeast Extract	4 g
D (+) Glucose	20 g
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2 g
Tween® 80	1,08 g
Di-Ammonium Hydrogen Citrate	2 g
Sodium Acetate	5 g
Magnesium Sulfate Heptahydrate	0,2 g
Manganese Sulfate Monohydrate	0,04 g
Agar	14 g
pH 5,5± 0,2	

Besiyerinden 68,2 g tartılıp 1000 mL distile suda çözülmüş, kaynayan su içerisinde ısıtılarak tamamen homojenize edilmiştir. pH 5,7'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

De Man Rogosa Sharpe Broth (Merck)

Besiyeri içeriği (g/L)

Peptone from casein	10 g
Meat Extract	8 g
Yeast Extract	4 g
D (+) Glucose	20 g
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2 g
Tween® 80	1 g
Di-Ammonium Hydrogen Citrate	2 g
Sodium Acetate	5 g
Magnesium Sulfate Heptahydrate	0,2 g

Manganese Sulfate Monohydrate	0,04 g
-------------------------------	--------

pH 5,5± 0,2

Besiyerinden 52,2 g tartılıp 1000 mL distile su içerisinde çözümüştür. pH 5,7'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Luria Bertani Agar (Sigma)

Besiyeri içeriği (g/L)

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

pH 7,0± 0,2

Besiyeri karışımından 35 g tartılıp 1000 mL distile su içerisinde ısıtılarak homojenize edilmiş ve pH'ı 7,0'a ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilen besiyeri, 45-50°C'ye soğuduktan sonra petri plaklarına eşit miktarda paylaştırılmıştır.

Luria Bertani Broth (Merck)

Besiyeri içeriği (g/L)

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g

pH 7,0± 0,2

Besiyeri karışımından 25 g tartılıp 1000 mL distile suda çözünmesi sağlanmış ve pH 7,0'a ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Nutrient Agar (Difco™)

Besiyeri içeriği (g/L)

Beef Extract	3,0 g
Peptone	5,0 g
Agar	15,0 g
pH 6,8± 0,2	

Besiyeri karışımından 23 g tartılıp 1000 mL distile su içerisinde ısıtılarak homojenize edilmiş ve pH'ı 7,0'a ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilen besiyeri, 45-50°C'ye soğuduktan sonra petri plaklarına eşit miktarda paylaştırılmıştır.

Nutrient Broth (Difco™)

Besiyeri içeriği (g/L)

Beef Extract	3,0 g
Peptone	5,0 g
pH 6,8± 0,2	

Besiyeri karışımından 8 g tartılıp 1000 mL distile suda çözünmesi sağlanmış ve pH'ı 7,0'a ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Tryptone Glucose Extract Agar (Difco™)

Besiyeri içeriği (g/L)

Peptone from casein	5 g
Meat Extract	3 g
D (+) Glucose	1 g
Agar	14 g
pH 7,0± 0,2	

Besiyerinden 24 g tartılıp 1000 mL distile su içerisinde kaynatılarak homojenize edilmiş ve pH'ı 7,0'a ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve 45-50°C'ye soğuduktan sonra petri plaklarına eşit miktarda paylaştırılmıştır.

Tryptone Glucose Extract Broth (Difco™)

Besiyeri içeriği (g/L)

Peptone from casein	10 g
Meat Extract	6 g
D (+) Glucose	2 g
pH 7,0± 0,2	

Besiyerinden 18 g tartılıp 1000 mL distile su içerisinde kaynatılarak homojenize edilmiştir. pH'ı 7,0'a ayarlanarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Yüzme (Swimming) Testi Besiyeri

Besiyeri içeriği (g/L)

Tryptone	10 g
NaCl	5 g
Agar	3 g
pH 7,2 ± 0,2	

Belirtilen tüm malzemeler 1000 mL distile su içerisinde karıştırılarak homojenize edilmiş ve pH'ı 7,2'ye ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra 45-50°C'ye soğuyan besiyeri petri plaklarına eşit hacimde paylaştırılmıştır.

Kayma (Swarming) Testi Besiyeri

Besiyeri içeriği (g/L)

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Agar	5 g
pH 7,2 ± 0,2	

Besiyerinin hazırlanmasında tüm malzemeler karıştırılarak 1000 mL distile su içerisinde çözülmüştür. pH'ı 7,2'ye ayarlanan besiyeri, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve 45-50°C'ye soğuduktan sonra petri plaklarına dökülmüştür.

Titreme (Twitching) Testi Besiyeri

Besiyeri içeriği (g/L)

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Agar	10 g
pH 7,2 ± 0,2	

Belirtilen tüm malzemeler karıştırılarak 1000 mL distile suda çözülmüş, pH'ı 7,2'ye ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilen besiyeri 45-50°C'ye soğuduktan sonra petri plaklarına eşit hacimde paylaştırılmıştır.

Kısa Zincirli AHL Besiyeri

Besiyeri içeriği (g/L)

LB agar	35 g
Kanamisin	25 µg

Belirtilen tüm malzemeler karıştırılarak 1000 mL distile suda çözülmüş, pH'ı 7,2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45-50°C'ye soğuduktan sonra petri plaklarına dökülmüştür.

Uzun Zincirli AHL Besiyeri

Besiyeri içeriği (g/L)

LB agar	35 g
Gentamisin	15 µg
5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid	20 µg

Belirtilen tüm malzemeler karıştırılarak 1000 mL distile suda çözülmüş, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 45-50°C'ye soğuduktan sonra petri plaklarına eşit hacimde paylaştırılmıştır.

Skim Milk LB Agar

Besiyeri içeriği (g/L)

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Skim milk	20 g

Besiyerinin hazırlanmasında skim milk ayrı bir erlende, diğer malzemeler ayrı bir erlende ve eşit hacimlerde olmak üzere toplam 1000 mL distile suda çözülmüştür. Skim milk ve diğer malzemeler otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Hazırlanan iki ayrı erlen, 45-50°C'ye soğuduktan sonra karıştırılıp petri plaklarına eşit hacimde paylaştırılmıştır.

M9- Glutamat Minimal Medium Agar

Besiyeri içeriği (g/L)

48 mM Na₂HPO₄

22 mM KH₂PO₄

8,5 mM NaCl

18,7 mM NH₄Cl

2 mM MgSO₄.7H₂O

0,1 mM CaCl₂.2H₂O

Agar 15 g

%0,02 CTAB

%0,2 Glikoz

%0,0005 Metilen Mavisi

%0,05 Glutamat

Belirtilen tüm malzemeler 1000 mL distile su içerisinde karıştırılarak homojenize edilmiş ve pH 7,0'a ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilen besiyeri, 45-50°C'ye soğuduktan sonra petri plaklarına paylaştırılmıştır.

Elastin Congo Red (ECR) Tamponu

Tampon içeriği (g/L)

100 mM Tris,

1 mM CaCl₂, pH 7,5

Elastin Kongo Red 10 mg

Fosfat Tamponu

Tampon içeriği (g/L)

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na₂HPO₄ 1,44 g

KH₂PO₄ 0,24 g

Belirtilen tüm maddeler 800 mL distile su içerisinde çözülmüştür. pH HCl yardımıyla 7,4'e ayarlanmış ve hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Amikasin: BD BLL™ antibiyotik diski, 30 µg, katalog no: 231597.

Ampisilin: BD BLL™ antibiyotik diski, 10 µg, katalog no: 231264; Sigma Aldrich, katalog no: A9393.

API 50 CH kit: Biomérieux.

Aztreonam: BD BLL™ antibiyotik diski, 30 µg, katalog no: 231640.

Bile Salts: Sigma Aldrich, katalog no: 48305.

Elastin Congo Red: Sigma Aldrich, katalog no: E0502.

Eritromisin: BD BLL™ antibiyotik diski, 15 µg, katalog no: 230793; Sigma Aldrich, katalog no: E6376.

Gentamisin: BD BLL™ antibiyotik diski, 10 µg, katalog no: 231227; Sigma Aldrich, katalog no: G1264.

Hidrojen Peroksit, % 3: Sigma Aldrich, katalog no: 88592.

İmipenem: BD BLL™ antibiyotik diski, 10 µg, katalog no: 231645.

Kanamisin: BD BLL™ antibiyotik diski, 30 µg, katalog no: 230829; Sigma Aldrich, katalog no: 1355006.

Katalaz: Sigma Aldrich, katalog no: C9322.

Klindamisin: BD BLL™ antibiyotik diski, 2 µg, katalog no: 231275; Sigma Aldrich, katalog no: 1138008.

Kloramfenikol: BD BLL™ antibiyotik diski, 30 µg, katalog no: 230733; Sigma Aldrich, katalog no: C1200000.

Laktik Asit: Sigma Aldrich, katalog no: 1356734 USP.

Meropenem: BD BLL™ antibiyotik diski, 10 µg, katalog no: 231703.

Pankreatin: Sigma Aldrich, katalog no: P7545.

Pepsin: Sigma Aldrich, katalog no: 1510051.

Piperasilin/tazobaktam: BD BLL™ antibiyotik diski, 30/6 µg, katalog no: 231691.

Proteinaz K: Sigma Aldrich, katalog no: P6556.

Sefepim: BD BLL™ antibiyotik diski, 30 µg, katalog no: 231696.

Seftazidim: BD BLL™ antibiyotik diski, 30 µg, katalog no: 231632.

Siprofloksasin: BD BLL™ antibiyotik diski, 5 µg, katalog no: 231657.

Streptomisin: BD BLL™ antibiyotik diski, 10 µg, katalog no: 230942; Sigma Aldrich, katalog no: S1400000.

Tetrasiklin: BD BLL™ antibiyotik diski, 30 µg, katalog no: 230998; Sigma Aldrich, katalog no: T4062.

Vankomisin: BD BLL™ antibiyotik diski, 30 µg, katalog no: 231034.

2.1.2.2. Ekipmanlar:

Agilent 1100 YBSK Sistemi: Laktik asitin ayrımını gerçekleştirerek analizin yapılmasında kullanılmıştır.

BİOSAN Den-1 Mc Farland Okuyucu: Bakteri süspansiyonunun dansitesini ayarlamak amacıyla yararlanılmıştır.

Esco Marka -80°C Derin Dondurucu: Bakteri suşlarının stok halinde muhafaza edilmesinde kullanılmıştır.

FINEPCR Fine Vorteks: Homojen karışmış süspansiyon elde etmek amacıyla kullanılmıştır.

Heraus İnkübatör: Bakteri suşlarının üretiminin gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır.

Hettich Universal 320 Santrifüj: Bakteri kültür supernatantı elde etmek amacıyla kullanılmıştır.

Hirayama Otoklav: Çalışılan malzemelerin sterilizasyonu amacıyla kullanılmıştır.

Leica ICC50W Mikroskop: Bakteri suşlarının görüntülenmesi ve incelenmesinde yararlanılmıştır.

Molecular Devices Spectra Max 190 Mikroplak Okuyucu: *P. aeruginosa* suşlarının bazı virulans faktörlerinin tayininde kullanılmıştır.

Sartorius Hassas Terazî: Tüm hassas tartım işlemlerinde kullanılmıştır.

Sigma 1-15PK Mikrosantrifüj: Bakteri kültür supernatantı elde etmek amacıyla kullanılmıştır.

STIK® Incubator Shaker Series PSE-T150 Çalkalamalı İnkübatör: Bakteri suşlarının üretiminde yararlanılmıştır.

Thermo Orion 3 Star pH Metre: *Ped. acidilactici*'nin potansiyel probiyotik testleri için gerekli ortamların pH aralıklarının ayarlanmasında kullanılmıştır.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Yenidoğanlardan Gaita Örneklerinin Toplanması

Yenidoğan kaynaklı gaita örnekleri aseptik koşullara dikkat edilerek alınmış ve aynı gün içerisinde uygun koşullarda laboratuvara getirilerek pediokok izolasyonu için kullanılmıştır.

2.2.2. Yenidoğan Gaita Örneklerinden Pediokokların İzolasyonu ve Tanımlanması

Laboratuvar ortamında numuneler steril kaplarda net ağırlıkları 1 g olacak şekilde tartılarak üzerlerine 9 mL steril fizyolojik su (SF; % 0,9 NaCl) ilave edilmiştir. SF içerisinde homojenize edilen örneklerin 10^{-4} oranında dilüsyonları hazırlanmış ve bu dilüsyonlardan 100 µL alınarak de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar besiyerine yayma yöntemiyle ekilmiştir. Ekim yapılan petriler 37°C’de 48 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda farklı morfoloji gösteren koloniler seçilip, steril öze yardımı ile yeni bir MRS agar besiyerine ekilerek 37°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda izolatların tanımlanma ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere morfolojik ve fizyolojik özellikleri incelenmiştir.

2.2.2.1. Gram Boyama

MRS agarda 37°C’de 18-24 saat geliştirilen farklı suşlara ait kolonilerden temiz bir lam üzerine alınıp, steril SF ile preparat hazırlanmıştır. Kurutulup tespit edilen preparatlar Gram boyama yöntemi ile boyanarak 1000X büyütme ışık mikroskopunda incelenmiştir. Mor renk oluşumu var ise kültürler Gram-pozitif, pembemsi kırmızı renk oluşumunda ise Gram-negatif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan, 2002).

2.2.2.2. Katalaz Testi

Katalaz testi için, MRS agar ortamında 37°C’de 18-24 saat geliştirilen koloniler temiz bir lama alınmış ve üzerilerine % 3’lük H₂O₂ damlatılmıştır. Yüzeyde hava kabarcığının oluşup oluşmadığı izlenmiştir. Gaz çıkışı gözlenen suşlar katalaz-pozitif, gözlenmeyenler katalaz-negatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kontrol olarak katalaz pozitif *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu kullanılmıştır (Harrigan ve McCance 1976).

2.2.2.3. Pediokokların Karakterizasyonu

Suşların tür ve cins bazında karakterizasyonu için Analytical Profile Index (API) 50 CH kit ve API 50 CHL medium kullanılmıştır. API 50 CH tanımlama kiti; biri kontrol tüpü olmak üzere, farklı biyokimyasal test substratlarını içeren toplam 50 adet mikrotüp içermektedir.

Öncelikle 2 mL'lik steril SF içerisinde tanımlaması yapılacak olan bakterinin yoğun bir süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu yoğun bakteri süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla alınarak 5 mL'lik bir diğer steril SF tüpü Mc Farland 2 bulanıklığına ayarlanmıştır. Bu bulanıklık elde edilirken yoğun süspansiyondan alınan bakteri hacminin iki katı API 50 CHL medium'a ilave edilmiştir. Bakteri inoküle edilen API 50 CHL medium, API 50 CH kitine uygulanmış ve kit kuyucukları mineral yağ ile kapatılarak $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonların sonuçları inkübasyon sonrasında API tanımlama tablosu ile karşılaştırılarak bakterilerin tanımlanması gerçekleştirilmiştir (API®, 2007).

2.2.4. İzole Edilen Pediokok Suşlarının Bazı Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışma kapsamında API 50 CH kiti ile *Ped. acidilactici* olduğu belirlenen suşların potansiyel probiyotik özellikleri araştırılmıştır. Gerçekleştirilen *in vitro* deneyler ile suşların antibiyotik duyarlılık seviyeleri, pH, pepsin, pankreatin, safra tuzlarına direnç özellikleri ve hemolitik aktiviteleri belirlenmiştir.

2.2.4.1. Suşların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Suşların, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority/EFSA, 2012) tarafından belirlenen 9 farklı antibiyotiğe (kanamisin, ampisilin, vankomisin, streptomisin, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin,

kloramfenikol ve klindamisin) karşı duyarlılıkları öncelikle disk difüzyon yöntemi ile tespit edilmiş ve daha sonra sıvı dilüsyon yöntemi ile minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir.

Suşların disk difüzyon yöntemi ile duyarlılıklarının belirlenmesinde Bauer ve ark. (1966) uyguladığı metot modifiye edilerek kullanılmıştır (Ocaña ve ark., 2006 ve Turhan Eryılmaz, 2011). MRS sıvı besiyerinde hücre yoğunluğu Mc Farland 0,5'e ayarlanan suşlar, MRS agar yüzeyine eküvyon yardımıyla yayılmıştır. Daha sonra bu petriye farklı antibiyotik diskleri yerleştirilerek 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapı mm cinsinden dijital kumpasla ölçülmüştür.

Sıvı dilüsyon metodunda (Duškovâ ve Karpíškovâ, 2013), antibiyotiklerin farklı konsantrasyonları MRS sıvı besiyeri içeren tüplerde hazırlanmış ve bu tüplere hücre yoğunluğu Mc Farland 0,5'e ayarlanan bakteri kültürlerinden eşit hacimde inoküle edilmiştir. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonucunda bakterilerin üremesini inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak belirlenmiştir.

2.2.4.2. Suşların Düşük pH Değerlerine Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Probiyotik özellikte bir suşun sindirim siteminden geçerken midenin değişen pH değerlerine dayanıklı olması beklenmektedir (Food and Agriculture Organization/World Health Organization, 2002). Buna dayanarak suşların bağırsaklara ulaşabilme yeteneğini saptamak amacıyla, öncelikle midenin değişen içeriğine benzer bir pH (1,0-3,0) ortamı oluşturularak, suşların mide asidine karşı dayanıklılığı 3 saat süre ile belirlenmiştir.

Aktif kültürlerden MRS besiyerine % 1 oranında ekim yapılarak 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplerden 1 mL aktif kültür alınmış, 12000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır.

Supernatantın uzaklaştırılmasıyla tüpün dibinde kalan pellet, pH 7,4 fosfat tamponu (PBS) ile 2 kez yıkanmıştır. Daha sonra pH'ı, 5 M hidroklorik asit (HCl) ile 1,0, 2,0 ve 3,0'e ayarlanan PBS tamponların her birinden, pelletlerin üzerine 1'er mL olacak şekilde ilave edilerek vortekslenmiş, 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak pH 7,4 PBS tamponu kullanılmıştır. İnkübasyonun 0., 1., 2. ve 3. saatlerinde tüplerden örnek alınarak MRS agara ekimler 2 paralel olacak şekilde yapılmıştır. Petri plaklarının 37°C'de 48 saat inkübasyonu sonucunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log koloni oluşturan birim/mL (kob/mL) olarak değerleri hesaplanmıştır (Maragkoudakis ve ark., 2006).

2.2.4.3. Suşların Pepsine Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Suşların pepsine karşı direncinin belirlenmesi amacıyla 3 mg/mL pepsin içeren, pH 2,0 ve 3,0 PBS tamponları kullanılmıştır. Aktif bakteri kültüründen 1 mL alınarak 12000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek supernatant kısım uzaklaştırılmış, ardından pellet pH 7,4 PBS ile iki kez yıkanmıştır. Pepsin içeren pH 2,0 ve 3,0 PBS tamponları ile pelletin çözülmesi sağlanıp 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 1., 2. ve 3. saatlerinin sonunda tüplerden örnek alınarak MRS agara yayma ekim 2 paralel olacak şekilde yapılmış ve petri plakları 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. pH 7,4 olan PBS kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol ve test gruplarında inkübasyon süresi sonunda oluşan koloniler sayılıp, log kob/mL olarak hesaplanmıştır (Maragkoudakis ve ark., 2006).

2.2.4.4. Suşların Pankreatine Karşı Direnç Özelliklerinin Belirlenmesi

Suşların pankreatine karşı direncinin incelenmesi amacıyla 1 mg/mL pankreatin içeren ve pH değeri 8,0'a ayarlanmış PBS kullanılmıştır. Taze bakteri kültüründen 1 mL alınarak 12000 rpm'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen pellet, pH 7,4 PBS ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra pankreatin içeren pH 8,0 PBS tamponunda pellet çözülerek 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0. ve 4.

saatlerinin sonunda tüplerden örnek alınarak MRS agara yayma ekim 2 paralel olarak gerçekleştirilmiş ve petri plakları 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Kontrol olarak pH 7,4 PBS kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kontrol ve test gruplarında oluşan koloniler sayılıp, log kob/mL olarak hesaplanmıştır (Maragkoudakis ve ark., 2006).

2.2.4.5. Suşların Safra Tuzuna Karşı Direnç Özelliğinin Belirlenmesi

Suşların safra tuzuna karşı direncinin belirlenmesi amacıyla % 0,3, % 0,5, % 1 oranında safra tuzu içeren MRS sıvı besiyeri ve kontrol olarak safra tuzu içermeyen MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Bakterilerin taze kültürlerinden 1 mL alınarak 12000 rpm’de 4°C’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet pH 7,4 PBS ile iki kez yıkanmıştır. Farklı oranlarda safra tuzu (% 0,3, % 0,5 ve % 1) içeren MRS sıvı besiyerlerinde pellet çözülerek 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0. ve 4. saatlerinin sonunda besiyerlerinden örnekler alınarak MRS agara yayma ekim 2 paralel olarak yapılmış ve petri plakları 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kontrol ve test gruplarındaki koloniler sayılıp, log kob/mL olarak değerler hesaplanmıştır (Maragkoudakis ve ark., 2006).

2.2.4.6. Suşların Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Hemolitik aktiviteleri belirlenmek istenen suşlar 37°C’de 18 saat geliştirildikten sonra % 5 koyun kanı içeren Columbia agara çizgi ekim yapılmıştır. 37°C’de 24 saat inkübasyondan sonra kolonilerin etrafında berrak zon oluşturanlar beta (β) hemolitik, parlak yeşil zon oluşturanlar alfa (α) hemolitik ve zon oluşturmayanlar ise gama (γ) hemolitik olarak değerlendirilmiştir (Maragkoudakis ve ark., 2006).

2.2.4.7. Suşların Metabolit Üretiminin Araştırılması ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Çalışmamızda *Ped. acidilactici* suşlarının metabolitleri olarak bilinen hidrojen peroksit, bakteriyosin ve laktik asit üretimi (Biler ve ark., 2009) ve bu metabolitlerin altı farklı indikatör mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivitesi “spot on lawn metodu” (Lima ve ark., 2007) ile belirlenmiştir.

Ped. acidilactici suşlarının bu metabolitlerden hangisini ürettiğini ve antimikrobiyal aktivitenin esas kaynağını belirlemek amacıyla farklı testler uygulanmıştır. *Ped. acidilactici* suşlarının, MRS sıvı besiyerine pasajı yapıp 37°C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen taze kültür, 12000 rpm’de 4°C’de 15 dakika santrifüj edilerek hücre bağımsız supernatant (CFS) elde edilmiş, bu CFS 0,22 µm çaplı membran filtreden süzülerek steril edilmiştir. *Ped. acidilactici* suşlarının laktik asit üretiminin araştırılması amacıyla; steril CFS içeren tüpün içerisine katalaz (1 mg/mL, Ammor ve ark., 2005) ve proteinaz K (1 mg/mL, Franz ve ark., 1997), hidrojen peroksit üretiminin araştırılması amacıyla; steril CFS içerisine proteinaz K (1 mg/mL) ve nötral pH’a kadar 1N NaOH, bakteriyosin üretiminin belirlenmesi amacıyla; steril CFS içine katalaz (1mg/mL) ve nötral pH elde edilene kadar 1N NaOH ilave edilmiş ve tüpler 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda enzim aktivitelerini sonlandırmak için tüpler 100°C’de 5 dakika kaynatılmış, steril CFS kontrol olarak kullanılmıştır (Sahnouni ve ark., 2015; Savagado ve ark., 2004 ve Tuncer ve ark., 2008).

Ped. acidilactici suşlarının hidrojen peroksit, bakteriyosin ve laktik asit kaynaklı antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde *Escherichia coli* (*E. coli*) American Type Culture Collection (ATCC) 25922, *P. aeruginosa* ATCC PAO-1, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923 indikatör mikroorganizmalar olarak kullanılmıştır.

İndikatör mikroorganizmalar, Trypton Glikoz Ekstrakt (TGE) sıvı besiyerinde 37°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. Suşların metabolit üretiminin araştırılması için öncelikle TGE agar (TGE sıvı besiyeri + % 1,5 agar) petri plaklarına dökülüp, katılaştırılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda üreyen indikatör suşlardan 5 µL alınarak 5 mL yarı-katı (TGE sıvı besiyeri + % 0,75 agar) besiyerine inoküle edilmiştir. Daha sonra indikatör suşun bulunduğu yarı-katı besiyeri, petri plaklarına önceden dökülüp katılaştırılan TGE agarın üzerine yayılmıştır. Metabolit örneği 5 µL olacak şekilde katılaştıran yarı-katı TGE besiyeri üzerine spot on lawn metodunda belirtildiği üzere direkt olarak damlatılmıştır. Petriler 37°C’de 18 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda petri plaklarında saptanan inhibisyon zonu antimikrobiyal aktivite olarak değerlendirilmiştir (Lima ve ark., 2007).

2.2.5. *Pediococcus acidilactici* Suşları Tarafından Üretilen Laktik Asitin Miktar Tayini İçin Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografi Metodunun Optimizasyonu

Tez kapsamında Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) yöntemiyle gerçekleştirilecek olan laktik asit analizi için en uygun kromatografik koşullar belirlenmiştir. Öncelikle sabit faz özellikleri; fonksiyonel grup, tanecik çapı, silika türü açısından değerlendirilmiştir. Daha sonra hareketli faz organik düzenleyicisinin seçimi, hareketli faz organik çözücü türünün ve oranının etkisi, akış hızı ve sıcaklık etkileri incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda Sistem Uygunluk Testi (SUT) parametreleri göz önüne alınarak kromatografik analizler gerçekleştirilmiştir.

Analizde sabit faz olarak laktik asitin analizi için özellikle geliştirilmiş olan Rezex ROA Organik asit H⁺ (300 × 7,8 mm) kolonu, kolon ömrünü uzatmak ve safsızlıkların analiz üzerine etkisini azaltmak için koruyucu kolon olarak Security guard cartridges Carbo-H (4x3,0 mm) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25-45-60°C’ye ayarlanarak analiz sonuçlarına sıcaklığın etkisi olup olmadığı incelenmiştir. Bu sonuçlar ışığında kolon fırın sıcaklığı 45°C’de sabit tutulmuştur. Analiz kapsamında su ile farklı asitlerin karışımları kullanılarak hareketli faz denemeleri yapılmış ve etkin bir ayırma sağladığı için H₂SO₄ içeren çözelti seçilmiştir. 0,005 N H₂SO₄ kullanılarak

hazırlanan hareketli fazın optimum sonuçlar verdiği görülmüştür. 210 nm’de görüntüleme yapılan sistemde akış hızı denemeleri de gerçekleştirilmiş (0,5-1,25 mL/dk) ve en iyi sonuçların elde edildiği 0,75 mL/dk çalışmaların tüm basamakları için kullanılmıştır.

2.2.6. *Pseudomonas aeruginosa* Klinik İzolatlarının Açıl Homoserin Lakton Üretiminin Belirlenmesi ve Laktik Asit Sinyal Molekülü Üretimine Etkisi

P. aeruginosa izolatlarının ÇA sistemi sinyal moleküllerinin üretimi, *Chromobacterium violaceum* CV026 (*C. violaceum*) ve *Rhizobacterium radiobacter* BAA 2240 (*R. radiobacter*, eski adı *Agrobacterium tumefaciens* NT1) biyosensör suşları ile belirlenmiştir. *C. violaceum* (vahşi tip), kısa zincirli AHL ve mor renkli viyolasein pigmenti üretebilen bir suş iken; mutanıt *C. violaceum* CV026, AHL ve pigment üretmeyen ancak sahip olduğu mini Tn5 transpozonu sayesinde ortamda bulunan kısa zincirli (zincir uzunluğu C4-C8 arasında olan AHL molekülleri) AHL moleküllerini tanıyarak viyolasein pigmenti üretebilen bir biyosensör suştur (McClellan ve ark., 1997). *R. radiobacter* BAA 2240 ise bitki tümöründen elde edilen, fonksiyonel bir Ti plazmidi içeren, mutant biyosensör suştur (Fuqua ve Winans, 1994). Ti plazmidi bir AHL reseptör proteinidir ve zincir uzunluğu C6-C12 arasında olan homoserin laktonlara duyarlıdır (Shaw ve ark., 1997).

Kısa zincirli AHL molekülü araştırılacak olan *P. aeruginosa* izolatları *C.violaceum* CV026 suşu ile aralarında 1 cm aralık olacak şekilde kanamisin (25µg/mL) içeren Luria Bertani (LB) agara ekilmiş ve 30°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda oluşan mor renk kısa zincirli AHL pozitifliğini göstermiştir. Uzun zincirli AHL üretimi araştırılacak olan *P. aeruginosa* izolatları, *R. radiobacter* BAA 2240 suşu ile 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid (X-Gal, 20 µg/mL) ve gentamisin (15 µg/mL) içeren LB agara aralarında 1 cm aralık olacak şekilde ekilmiştir. 30°C’de 24 saat inkübasyon sonucunda oluşan mavi renk uzun zincirli AHL pozitifliğini göstermiş, AHL negatif izolatlarda herhangi bir renklenme gözlenmemiştir.

Laktik asitin izolatların AHL üretimine etkisini belirlemek amacıyla, her izolat için belirlenen sub-inhibitör konsantrasyonda (subMİK) laktik asit içeren LB tüplerine 0,5 Mc Farland yoğunluğunda *P. aeruginosa* izolatlarının taze kültüründen inoküle edilmiştir. 2 kez 10 saniye vortekslenen tüplerden bir öze dolusu alınarak biyosensör suşlarla aralarında 1 cm olacak şekilde, biyosensör suşlar için özel olarak hazırlanan ayrı LB agarlara ekilmiştir. Petrilerin 30°C’de 24 saat inkübasyonu sonucunda biyosensör suşlarda meydana gelen renk değişimi pozitif ve negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Alpak, 2011).

2.2.7. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının ÇA Sistemi Tarafından Kontrol Edilen Bazı Virulans Faktörleri Üzerine Laktik Asitin Etkisinin Araştırılması

2.2.7.1. Yüzme (Swimming) Testi

Yüzme testi için özel olarak hazırlanan besiyerine, *Ped. acidilactici* M7 suşunun ürettiği laktik asit, her izolat için belirlenen subMİK oranında eklenmiş ve *P.aeruginosa* izolatlarının taze kültüründen, bu şekilde hazırlanan besiyerinin ortasına nokta ekim yapılmıştır (Deziel ve ark., 2001). Bakteriler 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda ekimin yapıldığı noktadan etrafa doğru yayılarak üreme görülmesi yüzme pozitif olarak değerlendirilmiştir. *P. aeruginosa* PAO-1 suşu kontrol olarak kullanılmıştır ve test sonuçları, izolatların laktik asit içermeyen besiyerinde verdiği sonuçlarla kıyaslanmıştır.

2.2.7.2. Kayma (Swarming) Testi

Kayma testi için, 45-50°C’ye soğutulmuş besiyerlerine *Ped. acidilactici* M7 suşunun ürettiği laktik asit, her bir izolat için belirlenen subMİK oranında ilave edilerek ayrı petri plakları oluşturulmuştur. *P. aeruginosa* izolatlarının taze kültüründen bu besiyerlerinin ortasına nokta ekim yapılarak 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda kayma hareketi, ekimin yapıldığı

bölgeden çevreye doğru dendiritik yayılım gösteren üremenin görülmesi ile belirlenmiştir (Deziel ve ark., 2001). Kayma hareketi pozitif *P. aeruginosa* PAO-1 suşu kontrol olarak kullanılmış ve sonuçlar izolatların laktik asit içermeyen besiyerinde verdiği sonuçlarla kıyaslanmıştır.

2.2.7.3. Titreme (Twitching) Testi

Titreme testi için, *Ped. acidilactici* M7 tarafından üretilen laktik asitin subMİK'ini içeren bu teste özel besiyerine, *P. aeruginosa* izolatlarının taze kültüründen batırma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Petri plakları 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon süresi sonunda besiyerinin temas ettiği petri plağının polistiren yüzeyinde sisli zon/bulanık alan görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Petri plağı ters çevirilerek besiyeri, kenarından iğne öze yardımıyla kaldırılarak uzaklaştırılmıştır. Steril distile su ile petri kutusunun yüzeyindeki yapışmayan hücreler yıkanmış ve sonrasında petri plağının zemini %1'lik kristal viyole ile 15-20 dakika boyunca boyanmıştır. Yüzeye yapışan izolatların boyanması incelenmiştir (Glessner ve ark., 1999). *P. aeruginosa* PAO-1 suşu kontrol olarak kullanılmış ve sonuçlar izolatların laktik asit içermeyen besiyerinde verdiği sonuçlarla kıyaslanmıştır. Titreme testi pozitif suşların, indirekt yoldan tip IV pilusa sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

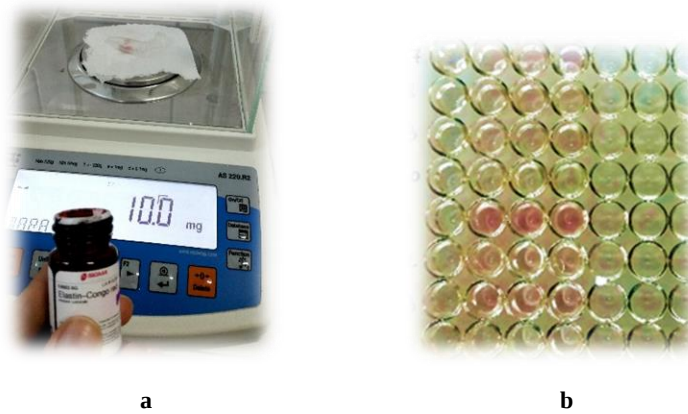
2.2.7.4. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Proteaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu amaçla, *P. aeruginosa* izolatlarının LB agarda 37°C'de bir gece inkübasyonu sonucu elde edilen taze kültüründen, *Ped. acidilactici* M7 suşu tarafından üretilen laktik asitin, izolatlar için belirlenen subMİK'ini içeren % 2 skim milk LB agar petrilerinin ortasına iğne öze ile tek bir koloni ilave edilmiş ve petriler 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Proteolitik aktivite, bakteri kolonilerinin etrafındaki berrak zon oluşumu ile belirlenmiş ve proteoliz oranı hesaplanmıştır. Proteoliz oranı (Rp); kolonilerin etrafında oluşan berrak zon çapının (Dzc), bakteri koloni çapına (Dc) bölünmesi ile elde edilmiştir. Test sırasında *P. aeruginosa* PAO-1 kontrol olarak kullanılmış ve sonuçlar laktik asit eklenmemiş % 2 skim milk LB agarda gelişen izolatlarla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Dong ve Zhang, 2005).

2.2.7.5. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Elastaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İzolatların elastaz aktivitesi Ohman ve ark. (1980)'nın önerdiği metodun modifiye edilmesi ile belirlenmiştir. SubMİK'de laktik asit içeren 10 mL LB sıvı besiyerine, *P. aeruginosa* izolatlarının 0,5 Mc Farland'a ayarlanmış taze kültüründen 1:100 oranında inoküle edilerek 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. *P.aeruginosa* izolatlarının steril CFS'si, 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip, 0,22 µm membran filtreden süzülmesiyle elde edilmiştir. Daha sonra 900 µL ECR tamponunun içine 100 µL CFS ilave edilerek, 200 rpm'de 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda çözülmemiş ECR, 1500 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüjlenerek uzaklaştırılmış ve supernatant kısım OD 495 nm'de okunmuştur. *P.aeruginosa* PAO-1 suşu kontrol olarak kullanılmış ve sonuçlar izolatların laktik asit içermeyen besiyerinde verdiği sonuçlarla kıyaslanarak yorumlanmıştır.



Şekil 2.1. a) Elastin kongo kırmızısı tartımı, b) elastin kongo kırmızısı testi mikropalak sonucu

2.2.7.6. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Piyosiyenin Oluşumunun Belirlenmesi

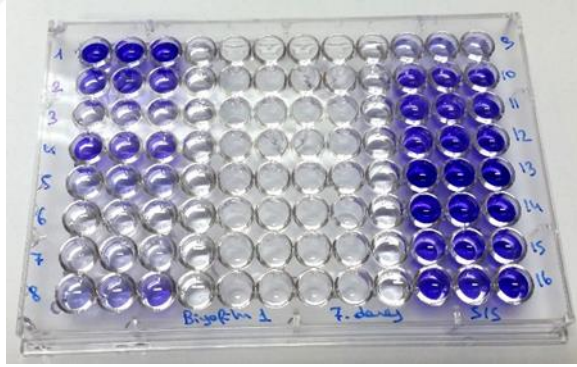
Ped. acidilactici M7 tarafından üretilen laktik asitin, *P. aeruginosa* izolatlarının piyosiyenin oluşumu üzerine inhibitör etkisini belirlemek amacıyla subMİK değerinde laktik asit içeren 10 mL LB sıvı besiyeri tüplerine 0,5 Mc Farland yoğunluğunda *P. aeruginosa* izolatlarının taze kültüründen 1:100 oranında inoküle edilmiş, 37°C’de 100 rpm’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında izolatlarının steril CFS’si, 9000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip, 0,22 µm membran filtreden süzülmesiyle elde edilmiştir. 5 mL CFS, 3 mL kloroform ile karıştırılmış, 2 kez 10 saniye vortekslenmiştir. Kloroform tabakası temiz bir tüpe alınıp üzerine 1 mL 0,2 M HCl ilave edilip, 2 kez 10 saniye vortekslenmiştir. Tüplerin üst kısmında oluşan pembe faz OD 520 nm’de piyosiyenin aktivitesinin belirlenmesi amacıyla ölçülmüştür (Chong ve ark., 2011). *P. aeruginosa* PAO-1 suşu kontrol olarak kullanılmış ve sonuçlar izolatların laktik asit içermeyen LB’de verdiği sonuçlarla kıyaslanarak yorumlanmıştır.



Şekil 2.2. *P. aeruginosa* suşlarının piyosiyenin pigmentinin elde edilme aşamaları

2.2.7.7. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Ped. acidilactici M7 tarafından üretilen laktik asitin *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşumuna inhibitör etkisi incelenmiştir. Bu amaçla suşlar 37°C’de 18 saat inkübe edilmiştir. Her bir izolat için subMİK değerinde laktik asit içeren 100 µL LB sıvı besiyerine, Mc Farland 0,5 dansitede *P. aeruginosa* izolatlarından 1:100 oranında ilave edilmiştir. Mikroplaklar 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardan izolatlar uzaklaştırılmış ve steril distile su ile kuyucuklar 3 kez yıkanmıştır. Her kuyucuğa 125 µL % 0,1’lik kristal viyole ilave edilmiş, oda sıcaklığında 10 dakika boyanması sağlanmıştır. Boyama sonrasında kuyucuklar 2 kez steril distile su ile yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruyan kuyucuklara 200 µL % 30 glasiyel asetik asit ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiş ve sonuçlar OD 520 nm’de okunmuştur. Sadece LB besiyeri içeren kuyucuklar kontrol olarak kullanılmış, sonuçlar suşun laktik asit ilave edilmeden önceki biyofilm oluşumu ve PAO-1 suşu ile kıyaslanarak yorumlanmıştır (Christensen ve ark., 1982).



Şekil 2.3. *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm aktivite sonuçlarının mikropalak görünümü

2.2.7.8. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Ramnolipid Üretiminin Belirlenmesi

Test, glutamat minimal medium agar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Ped. acidilactici* M7 suşu tarafından üretilen laktik asiti subMİK oranında içeren besiyerlerine, *P. aeruginosa* izolatlarının taze kültürlerinden iğne öze ile bir koloni

ekilmiş ve 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda koloni etrafında oluşan şeffaf zon ramnolipid üretimi olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, PAO-1 suşu ve izolatların laktik asit içermeyen glutamat minimal medium agarda verdiği sonuçlarla kıyaslanarak yorumlanmıştır (Siegmund ve Wagner, 1991).

2.2.7.9. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Klinik *P. aeruginosa* izolatlarının sefepim 30 µg, seftazidim 30 µg, piperasilin/tazobaktam 30/6 µg, imipenem 10 µg, meropenem 10 µg, aztreonam 30 µg, siprofloksasin 5 µg ve amikasin 30 µg’ e karşı antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Bauer ve ark., 1966). Sonuçlar European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standartlarına göre değerlendirilmiştir (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2014).

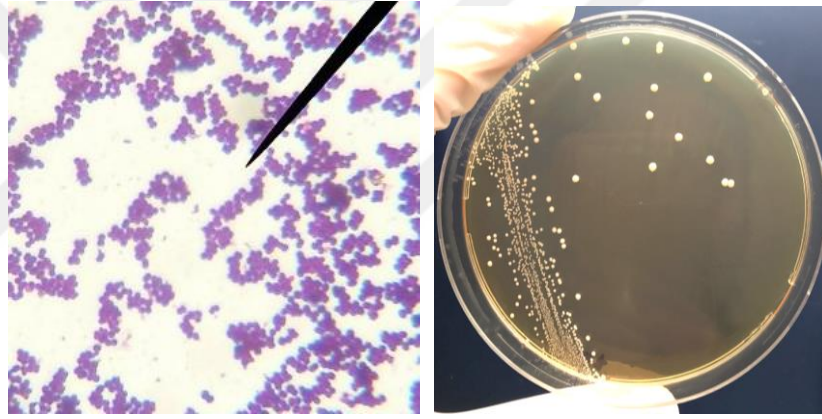
2.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm deneyler üç tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen veriler *P. aeruginosa* PAO-1 suşuyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar SPSS versiyon 20,0 paket programı kullanılarak Pearson Ki-Kare testi ile analiz edilmiştir. $p \leq 0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Yenidoğan Gaita Örneklerinden Pediokokların İzolasyonu

Bu çalışma kapsamında Ankara Dr. Sami Ulus Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yenidoğan Polikliniği'nde normal doğum ile doğan ya da kontrol amaçlı gelen, 0-3 ay aralığında, anne sütü ile beslenen, kendisi ve annesi bu dönemde antibiyotik tedavisi almamış 19 farklı bebeğin gaitasından izole edilen, Gram (+), katalaz negatif, tetrat morfolojide koklar değerlendirilmiş ve API 50 CH kiti uygulanması sonucunda *Ped.acidilactici* olarak tanımlanan 3 suş (*Ped. acidilactici* M3, M4, M7) ile çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 3.1. *Ped.acidilactici* suşunun mikroskopik ve MRS agar görünümü



Şekil 3.2. *Ped. acidilactici* suşunun API 50 CH kiti sonuçları

3.2. Pediokokların Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.1. Suşların Antibiyotik Duyarlılıkları

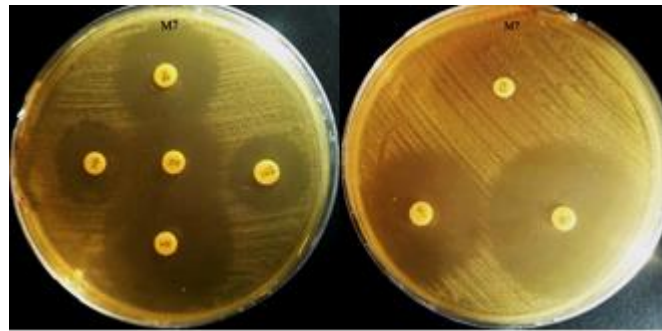
EFSA standartlarına göre pediokoklar için antibiyotik duyarlılığının MİK değeri olarak belirlenmesi önem arz etmektedir (European Food Safety Authority, 2012). Çalışmamızda sıvı dilüsyon metoduna bir ön çalışma olması amacıyla öncelikle suşların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile inhibisyon zonu olarak belirlenmiştir. Antibiyotik disklerinin etrafında oluşan 21 mm ve üzerindeki zon çapları duyarlı, herhangi bir inhibisyon zonu oluşmaması dirençli olarak değerlendirilmiş (Abbasili ve ark., 2012) ve sonuçlar Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *Ped. acidilactici* olarak tanımlanan 3 suşun disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotikler	<i>Ped. acidilactici</i> suşları		
	<u>M3</u>	<u>M4</u>	<u>M7</u>
<u>Eritromisin</u> (15 µg)	S	S	S
<u>Kanamisin</u> (30 µg)	S	S	S
<u>Ampisilin</u> (10 µg)	S	R*	S
<u>Gentamisin</u> (10 µg)	S	S	S
<u>Tetrasiklin</u> (30 µg)	S	S	S
<u>Streptomisin</u> (10 µg)	S	S	S
<u>Vankomisin</u> (30 µg)	R*	R*	R*
<u>Klindamisin</u> (2 µg)	S	S	S
<u>Kloramfenikol</u> (30 µg)	S	S	S

(S): Duyarlı.

(R*): Dirençli.



Şekil 3.3. *Ped. acidilactici* M7 suşunun disk difüzyon yöntemi ile belirlenen duyarlılık sonuçları

Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre tüm pediokok suşları vankomisine dirençli bulunmuştur. Pediokoklarda vankomisin direncinin kromozom kodlu bir direnç olması ve EFSA'nın antimikrobiyal duyarlılık standartlarında, pediokoklar için vankomisin duyarlılığının belirlenmesine gerek olmadığını belirtmesine dayanarak çalışmalara devam edilmiştir. (European Food Safety Authority, 2012).

Vankomisin dışındaki tüm antibiyotiklere karşı suşların MİK değerleri belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir. Buna göre M4 suşu EFSA'nın belirlediği ölçütler doğrultusunda, uygulanan her iki antimikrobiyal duyarlılık testi sonucunda ampilisine dirençli bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda pediokokların penisilin grubu antibiyotiklere duyarlı mikroorganizmalar olduğu belirtilmesine rağmen (Haakensen ve ark., 2009), bu çalışmada izole edilen M4 suşunun ampisilin dirençli olması, suşun elenmesine sebep olmuştur. M3 ve M7 suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları belirtilen sınırlar içerisinde olduğundan diğer çalışmalara bu suşlar ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 3.2. *Ped. acidilactici* suşlarının belirlenen MİK sonuçları ve EFSA standartları (European Food Safety Authority, 2012)

Antibiyotikler	<i>Ped. acidilactici</i> suşlarının MİK (µg/mL) sonuçları			
	Pediokoklar için EFSA Standartları	M3 suşu	M4 suşu	M7 suşu
<u>Eritromisin</u>	1	1	0,5	0,5
<u>Kanamisin</u>	64	32	32	32
<u>Ampisilin</u>	4	4	8	4
<u>Gentamisin</u>	16	2	4	4
<u>Tetrasiklin</u>	8	4	2	8
<u>Streptomisin</u>	64	8	16	32
<u>Vankomisin</u>		Gerekli değildir		
<u>Klindamisin</u>	1	1	1	1
<u>Kloramfenikol</u>	4	1	0,5	1

3.2.2. Suşların Düşük pH, Pepsin, Pankreatin ve Safra Tuzuna Karşı Dirençleri

Sindirim sistemine dayanarak oluşturulan düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzu içeren temsili ortamlarda, suşların hayatta kalma oranları 3 ve/veya 4 saat süreyle belirlenmiştir.

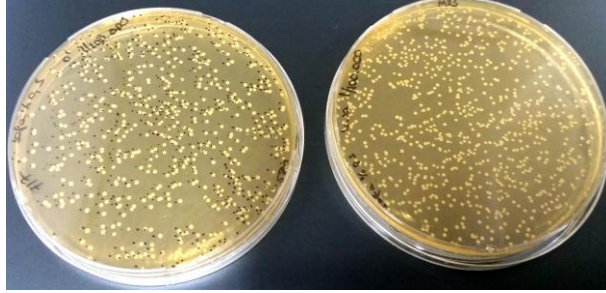
Ped. acidilactici M3'ün canlılığını pH 1,0'da hemen kaybettiği, pH 2,0'da bir saat hayatta kalabildiği ve pH 3,0'da canlılık oranını 1. ve 2. saatte sırasıyla % 44 ve % 38 koruyabildiği belirlenmiştir. M7 suşunun ise, pH 1,0 değerinde bir saat içerisinde tüm canlılığını kaybettiği, pH 2,0'da bir saatin sonunda % 28 canlılığını korurken; pH 3,0'da 1. saatin sonunda % 97,5, 2. ve 3. saatin sonunda ise canlılığını % 96 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan pH 7,4'te, 3. saatin sonunda M3 ve M7 suşlarının sırasıyla % 95 ve % 99 oranında hayatta kaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak *Ped. acidilactici* M3'ün düşük pH değerlerine dayanıklı olmadığı belirlenmiş ve suş elenmiştir.

Mide pH'ı normal şartlarda 5,0 - 6,0 değerlerindedir. Sindirim süresince mide HCl gibi proteazları sentezlemekte ve proteinlerin bu proteazlar tarafından sindirimi sırasında mide pH'ı 1,0 -2,0'a kadar düşmektedir. Ancak midenin kendisini korunması amacıyla pH hızlıca 3,0 – 4,0 değerlerine yükselmektedir. Sindirim süresince genellikle 3,0 – 4,0 değerlerinde olan mide pH'ı, sindirim sonrasında normal değerlerine dönmektedir (Loomis, 2016). Literatürlerde potansiyel probiyotik özellikleri araştırılan pediokok cinsine ait suşların pH 3,0 değerlerindeki aktiviteleri önem arz ettiğinden (Osmanagaoglu ve ark. 2010 ve Uymaz ve ark., 2009), sonraki çalışmalara *Ped. acidilactici* M7 suşu ile devam edilmesine karar verilmiş ve suşun pepsin, pankreatin ve safra tuzu uygulamalarına direnci belirlenmiştir.

Buna göre suş; pepsin pH 2,0'da 1. saatin sonunda % 31, 2. saatin sonunda %1 oranında canlı kalabilmiştir. pH 3,0 pepsin uygulamasında suşun canlılığı 1. saatin sonunda % 97,5, 2. saatin sonunda % 94, 3. saatin sonunda % 93 olarak saptanmıştır. Kontrol olarak çalışılan pH 7,4'te ise suşun canlılığı 3. saatin sonunda % 99 olarak devam etmiştir.

Pankreatin pH 8,0'da 4. saatin sonunda M7 suşunun canlılığı % 98 oranında saptanmıştır, kontrol olarak çalışılan ve pankreatin içermeyen pH 7,4'te suşun canlılığı 4. saatin sonunda % 98 olarak belirlenmiştir.

Safra tuzu uygulamasında ise 4. saatin sonunda suşun canlılığı % 0,3, % 0,5 ve % 1 safra tuzu için sırasıyla; % 93, % 91 ve % 76 oranında bulunmuştur. Kontrol olarak safra içermeyen MRS besiyerinde gelişen suşun 4. saatin sonunda canlılığının % 98 olarak devam ettiği saptanmıştır.



Şekil 3.4. *Ped. acidilactici* M7'nin % 0,5 safra tuzuna dayanıklılığının MRS agar görünümü (10^{-5} konsantrasyon)

Çizelge 3.3. *Ped. acidilactici* M7 suşunun düşük pH değerlerine, pepsin, pankreatin ve safra tuzlarına karşı hayatta kalma^a oranı (log kob^b/mL)

<i>Ped. acidilactici</i> M7	İnkübasyon zamanı (saat)				
	0	1	2	3	4
pH 1,0	7,507	0	0	0	gd ^c
pH 2,0	7,477	4,919	0	0	gd
pH 3,0	7,870	7,863	7,859	7,855	gd
Pankreatin	7,855	gd	gd	gd	7,846
Pepsin pH 2,0	7,342	4,903	0	0	gd
Pepsin pH 3,0	7,808	7,797	7,779	7,777	gd
% 0,3 Safra tuzu	7,547	gd	gd	gd	7,514
% 0,5 Safra tuzu	7,954	gd	gd	gd	7,912
% 1 Safra tuzu	7,733	gd	gd	gd	7,613

^a Oranlar deneylerin üç kez tekrarı sonucunda elde edilmiştir

^b kob: Koloni oluşturan birim, ^c gd: Gerekli değil

3.2.3. Suşların Hemolitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ped. acidilactici M7 suşunun, % 5 koyun kanı içeren Columbia agarda gelişen kolonilerinin etrafında herhangi bir hemolitik zon gözlenmemiştir, suş γ -hemolitikdir.



Şekil 3.5. *Ped. acidilactici* M7'nin kanlı agarda görünümü

3.2.4. Suşların Metabolit Üretiminin Araştırılması ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi

Ped. acidilactici M7 suşunun antimikrobiyal metabolit varlığı indikatör mikroorganizmalara karşı oluşan inhibisyon zonu ile değerlendirilmiş ve zon oluşumu Çizelge 3.4'te "+", yokluğu ise "-" olarak belirtilmiştir. Uygulanan metot sonucunda elde edilen verilere göre; *Ped. acidilactici* M7'nin, laktik asit dışında herhangi bir antimikrobiyal metabolit üretmediği; hidrojen peroksit ve bakteriyosin üretiminin araştırıldığı supernatantların indikatör mikroorganizmalar üzerinde herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmaması sonucunda belirlenmiştir. Kontrol olarak çalışılan supernatant da antimikrobiyal aktivitenin yalnızca laktik asitten kaynaklandığı sonucunu desteklemiştir. Buna göre; M7 suşunun ürettiği laktik asitin indikatör mikroorganizmalardan *P. aeruginosa* PAO-1, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* 9027, *E. faecalis* ATCC 29212 üzerine antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. *Ped. acidilactici* M7 suşu tarafından üretilen metabolitlerin indikatör suşlar üzerine antimikrobiyal aktivite sonuçları

Metabolit	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	<i>P. aeruginosa</i> 27853	<i>P. aeruginosa</i> 9027	<i>E. coli</i> 25922	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>S. aureus</i> 25923
Laktik asit aktivitesi (katalaz + proteinazK)	+	+	+	-	+	-
Hidrojen peroksit aktivitesi (NaOH + proteinaz K)	-	-	-	-	-	-
Bakteriyosin aktivitesi (katalaz + NaOH)	-	-	-	-	-	-
Supernatant (Kontrol supernatant)	+	+	+	-	+	-

+: antimikrobiyal inhibisyon zonunu; -: antimikrobiyal inhibisyon zonunun oluşmadığını ifade etmektedir.



Şekil 3.6. İndikatör mikroorganizmalar üzerine laktik asit ve kontrol supernatantlarının antimikrobiyal aktivite sonuçları

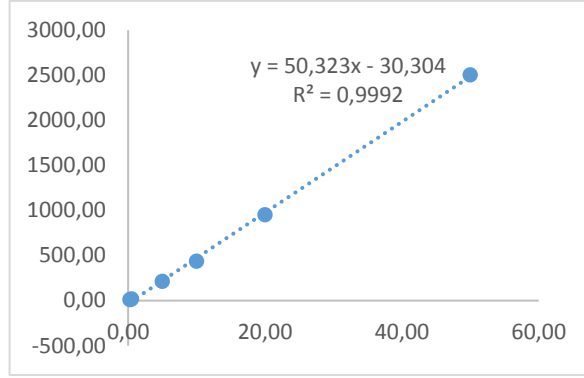
3.3. *Pediococcus acidilactici* M7 Suşu Tarafından Üretilen Laktik Asitin Yüksek Başarımlı Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini

Optimum koşullarda gerçekleştirilen analiz sonuçları, SUT parametreleriyle hesaplanmış ve yöntemin analize uygun olduğuna karar verilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. SUT parametreleri

Parametreler	Laktik asit
Alıkonma zamanı (dk)	10,68
Kapasite Faktörü (k)	1,09
Ayırma Gücü (Rs)	5,77
Kolon Etkinliği (N)	15441
Seçicilik (α)	1,37
Kuyruklanma Faktörü	1,43

İkinci olarak optimum koşullar altında validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Laktik asitin YBSK yöntemi ile analizindeki kalibrasyon parametreleri (tanımlayıcılık katsayısı, doğrusallık, kalibrasyon aralığı, yakalama sınırı (YS), tayin alt sınırı (TAS) gibi) ve tekrar edilebilirlik sonuçları (% Bağıl Standart Sapma (%BSS)) Çizelge 3.6’da belirtilmiştir.



Şekil 3.7. Laktik asite ait kalibrasyon grafiği ve denklemi

Çizelge 3.6. Laktik asitin YBSK yöntemi ile analizine ait kalibrasyon verilerinin istatistiksel değerlendirilmesi (n= 5)

Parametreler	Laktik Asit
Alıkonma zamanı (dk)	10,68
Doğrusal Aralık (mmol)	0,25-50
Eğim	50,323
Kesişim	-30,304
Tanımlayıcılık Katsayısı (r^2)	0,9992
Eğimin Standart Hatası	$7,07 \times 10^{-1}$
Kesişimin Standart Hatası	1,587
Tehhis Sınırı (mmol)	0,005
Tayin Alt Sınırı (mmol)	0,017
Gün içi tekrar edilebilirlik % BSS	0,20
Günler arası tekrar edilebilirlik % BSS	0,44

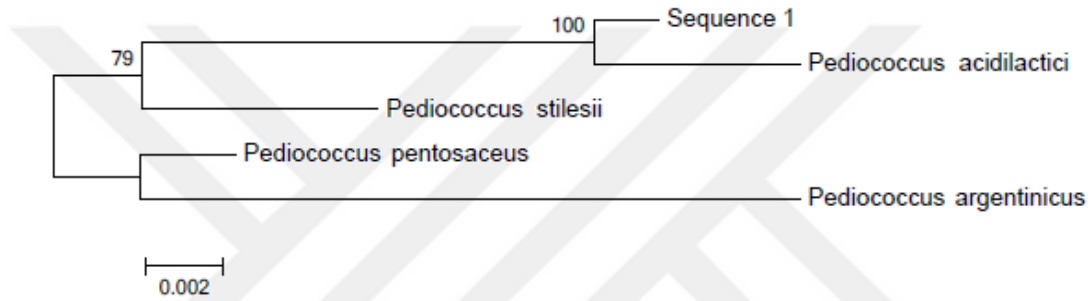
Kalibrasyon basamağından sonra yöntem, gerçek numunelere uygulanabilir hale gelmiştir. Optimize edilen yöntemle yapılmış gerçek numune analizlerinde yöntemimizin seçici olduğu belirlenmiştir.

3.3.1. *Pediococcus acidilactici* M7 Numunesine Uygulama

Optimizasyonu ve validasyonu tamamlanan yöntem *Ped. acidilactici* M7'den laktik asit analizi için kullanılmıştır. Analiz sonucundaki pik alanları kalibrasyon denkleminde yerleştirilerek laktik asit miktarı hesaplanmıştır. Farklı günlerde üç paralel olarak yapılan analizler sonucunda *Ped. acidilactici* M7'nin ürettiği laktik asit miktarı 5,59-5,94 mg/mL arasında bulunmuştur. Bu sonuçlara ait % BSS değeri 0,30-3,38 olarak hesaplanmıştır.

3.4. *Pediococcus acidilactici* M7 Suşunun 16S rRNA Sekans Analizi

Bu çalışma kapsamında izole edilen M7 suşu, API 50 CH kiti reaksiyon sonuçlarına göre *Ped. acidilactici* olarak tanımlanmış ve potansiyel probiyotik özellikleri belirlenmiştir. *P. aeruginosa* klinik izolatlarının ÇA sistemi ve bazı virulans faktörleri üzerine M7 suşu ile yapılacak deneylerden önce, suşun 16S rRNA dizi analizi REFGEN Biyoteknoloji Laboratuvarı (Ankara Üniversitesi Teknokent, Gölbaşı-Ankara) tarafından gerçekleştirilmiş ve yapılan analiz sonucunda dizinin *Ped.acidilactici* mikroorganizması ile % 100 uyum gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 3.8. 16S rRNA sekans analizi sonucunda belirlenen *Ped. acidilactici* M7 suşunun filogenetik ağacı

Bu aşamaya kadar uygulanan testler sonucunda yenidoğan gaitasından izole edilen *Ped. acidilactici* M7 suşunun tanımlama kontrolü 16S rRNA analizi sonucunda gerçekleştirilmiştir. Suşun düşük pH, pepsin, pankreatin ve safra tuzu uygulamalarına dirençli, EFSA tarafından belirlenen antibiyotiklere duyarlı ve γ -hemolitik olduğu belirlenmiştir. Suşun metabolit olarak ürettiği laktik asitin çeşitli indikatör mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiş ve laktik asitin YBSK ile miktar tayini yapılmıştır. Belirlenen bu probiyotik potansiyelde kriterler doğrultusunda, çalışmanın sonraki aşamalarında suş tarafından üretilen laktik asitin klinik *P. aeruginosa* izolatlarının AHL üretimi ve ÇA sistemi tarafından kontrol edilen bazı virulans faktörleri üzerine inhibitör etkisi araştırılmıştır.

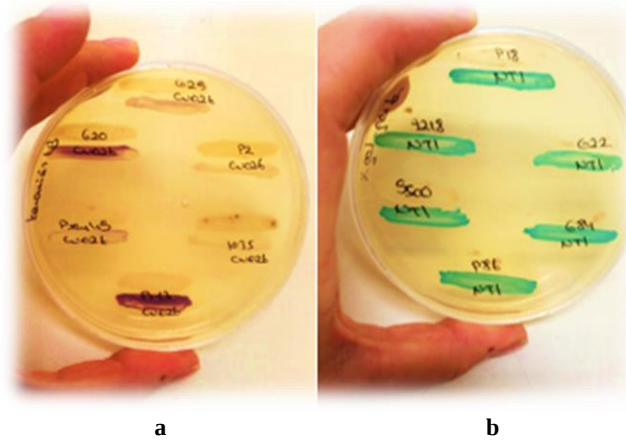
3.5. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının AHL Üretimi ve Virulans Faktörleri

Bu çalışma kapsamında, 2014-2015 yılları arasında Ankara Lokman Hekim Etlik Hastanesi'ne başvuran hastaların, çeşitli klinik örneklerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen ve tanımlanan toplam 141 *P. aeruginosa* izolatı kullanılmıştır. İzolatların vücut bölgelerinden izolasyon yerine göre dağılımı Çizelge 3.7'de gösterilmiştir. İzolatların bakteriyel iletişimde rol alan, kısa (C4-AHL) ve uzun zincirli (3-okso-C12-AHL) AHL üretimi araştırılmış, ÇA sistemi tarafından kontrol edildiği kabul edilen virulans faktörlerinden; yüzme-kayma-titre, elastaz, proteaz, piyosyanin ve biyofilm aktiviteleri incelenmiştir. Belirlenen bu virulans faktörleri üzerine *Ped. acidilactici* M7 suşu tarafından üretilen laktik asitin inhibitör etkisi araştırılmıştır.

Çizelge 3.7. *P. aeruginosa* izolatlarının izolasyon bölgelerine göre dağılımı

Vücut bölgesi	n (sayı)
Balgam	16
İdrar	19
Kateter	3
Kulak Akıntısı	61
Trakeal Aspirat	22
Yara	20

C. violaceum CV026 ve *R. radiobacter* BAA 2240 biyosensör suşları, izolatlarda kısa ve uzun zincirli AHL molekülü üretimini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Buna göre; 141 izolatın tümünün uzun zincirli AHL molekülü ürettiği, ancak yalnızca 84 izolatın uzun zincirli AHL molekülü ürettiği saptanmıştır ve kısa zincirli AHL üreten izolatlar AHL pozitif (+) olarak değerlendirilmiştir. *P. aeruginosa* izolatlarının izole edildikleri vücut bölgesi ile AHL üretimi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır ($p = 0,655$).



Şekil 3.9. Kısa-uzun zincirli AHL molekülleri araştırılan *P. aeruginosa* izolatlarında pozitif ve negatif deney sonuçları. a. Kısa zincirli AHL molekülü araştırılan izolatlar, mor renk pozitif sonucu göstermektedir. b. Uzun zincirli AHL molekülü araştırılan izolatlar, mavi renk pozitif sonucu göstermektedir.

İncelemeye alınan 141 izolatın 114'ü (% 81) kayma, 123'ü (% 87) yüzme, 102'si (% 72) titreme hareketi yönünden pozitif bulunmuştur.

Çizelge 3.8. *P. aeruginosa* izolatlarının (n:141) kısa zincirli AHL üretimi ve bazı virulans faktörleri yönünden pozitif sonuçları

AHL (+)	Kayma	Hareket Yüzme	Titreme	Proteaz	Ramnlipid
n (%)					
84 (% 60)	114 (81)	123 (87)	102 (72)	125 (89)	139 (99)

n: İzolat sayısı

AHL (+) 84 izolatın; 76'sı (% 90) kayma, 77'si (% 92) yüzme, 61'i (% 73) titreme hareketi, 75'i (% 90) proteaz aktivitesi ve 84'ü (% 100) ramnolipid üretimi bakımından pozitif bulunmuştur.

AHL (-) 57 izolatın, 38'i (% 67) kayma, 46'sı (% 81) yüzme, 41'i (% 72) titreme hareketi, 50'si (% 88) proteaz aktivitesi ve 55'i (% 97) ramnolipid üretimi bakımından pozitif bulunmuştur.

Çizelge 3.9. *P. aeruginosa* izolatlarında (n:141) AHL moleküllerinin varlığı ve incelenen virulans faktörleri arasındaki ilişki

AHL	Kayma n: 114	Yüzme n: 123	Titreme n: 102	Proteaz n: 125	Ramnlipid n: 139
(+)	76	77	61	75	84
(-)	38	46	41	50	55

n: İzolat sayısı

Kısa zincirli AHL sinyal molekülü üreten ve üretmeyen izolatlarda kayma hareketi oluşumu ($p=0,001$) ve proteaz aktivitesi ($p=0,045$) arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. AHL (+) ve AHL (-) suşların yüzme, titreme hareketleri ve ramnolipid oluşturması arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (sırasıyla $p=0,097$, $p=0,0928$, $p=0,162$).

P. aeruginosa izolatlarının yapılan antimikrobiyal duyarlılık testi sonucunda çeşitli antibiyotiklere duyarlılık ve direnç yüzdeleri ve EUCAST duyarlılık sınır değerleri Çizelge 3.10'da gösterilmiştir (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2014). Kısa zincirli AHL sinyal molekülü üreten izolatlarda sefepim ve aztreonam dışındaki antibiyotiklere direnç gelişiminin, AHL (-) izolatlara oranla daha fazla olduğu saptanmıştır ancak kısa zincirli AHL üreten ve üretmeyen izolatlarda sinyal molekülü üretimi ve antibiyotik direnci arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır ($p> 0,05$).

Çizelge 3.10. *P. aeruginosa* izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılık yüzdeleri

Antibiyotikler	Antibiyotiklerin Duyarlılık Sınırları	<i>P. aeruginosa</i> izolatları	
		Duyarlı n (%)	Dirençli n (%)
Sefepim 30 µg	$S \geq 19\text{mm}$, $R < 19\text{mm}$	138 (98)	3 (2)
Seftazidim 10 µg	$S \geq 17\text{mm}$, $R < 17\text{mm}$	130 (92)	11 (8)
Piperasilin/Tazobaktam 30/6 µg	$S \geq 18\text{mm}$, $R < 18\text{mm}$	96 (68)	45 (32)
Imipenem 10 µg	$S \geq 20\text{mm}$, $R < 17\text{mm}$	110 (78)	31 (22)
Meropenem 10 µg	$S \geq 24\text{mm}$, $R < 18\text{mm}$	124 (88)	17 (12)
Aztreonam 30 µg	$S \geq 50\text{mm}$, $R < 16\text{mm}$	135 (96)	6 (4)
Siprofloksasin 5 µg	$S \geq 25\text{mm}$, $R < 22\text{mm}$	128 (91)	13 (9)
Amikasin 30 µg	$S \geq 18\text{mm}$, $R < 15\text{mm}$	130 (92)	11 (8)

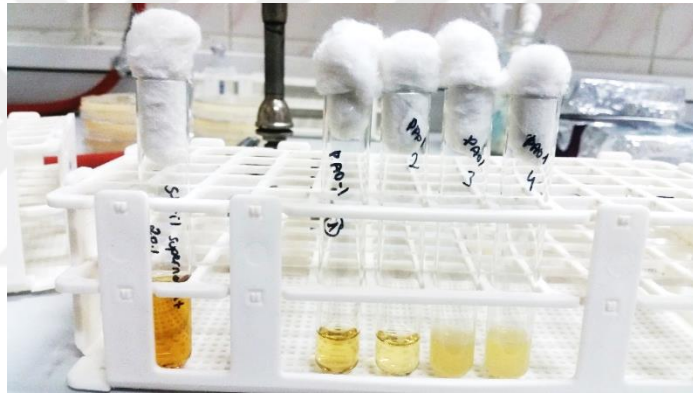
n: İzolat sayısı

3.6. *Pediococcus acidilactici* M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Virulans Faktörleri Üzerine İnhibitör Etkisinin Araştırılması

3.6.1. *Pediococcus acidilactici* M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin *Pseudomonas aeruginosa* İzolatları İçin Belirlenen MİK ve subMİK Değerleri

Ped. acidilactici M7 suşunun YBSK yöntemiyle yapılan miktar tayini sonucunda 5,59-5,94 mg/mL arasında laktik asit ürettiği belirlenmiştir. Suş tarafından üretilen laktik asitin, *P. aeruginosa* klinik izolatları üzerine makrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK değerlerinin 0,698-0,742 mg/mL arasında değiştiği saptanmıştır.

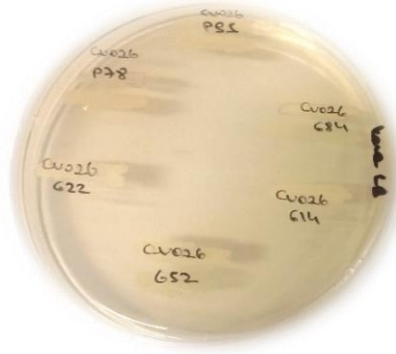
YBSK ile belirlenen miktarlarda standart laktik asit kullanılarak deney *P.aeruginosa* PAO-1 suşu ile tekrarlanmış, M7 suşunun kültür supernatantının içerdiği laktik asit ve standart laktik asitin PAO-1 suşu üzerine inhibitör konsantrasyonları birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Buna göre MİK'lerin bir kat düşük konsantrasyonu subMİK olarak kabul edilmiş ve izolatların laktik asitin subMİK etkisi altında AHL üretimi ve virulans durumları incelenmiştir.



Şekil 3.10. *Ped. acidilactici* M7'nin ürettiği laktik asitin PAO-1 suşuna karşı belirlenen MİK sonuçları

3.6.2. *Pediococcus acidilactici* M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının AHL Üretimine Etkisi

Ped. acidilactici M7 suşu tarafından üretilen laktik asitin *P. aeruginosa* izolatlarıyla bir araya getirilmesi sonucunda, AHL (+) izolatların % 76'sının kısa zincirli AHL üretiminin inhibe edildiği, uzun zincirli AHL üretimine ise laktik asitin herhangi bir inhibitör etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Kontrol olarak çalışılan *P.aeruginosa* PAO-1 suşunun da laktik asit etkisinde kısa zincirli AHL üretiminin engellendiği ancak uzun zincirli AHL üretiminin devam ettiği saptanmıştır.



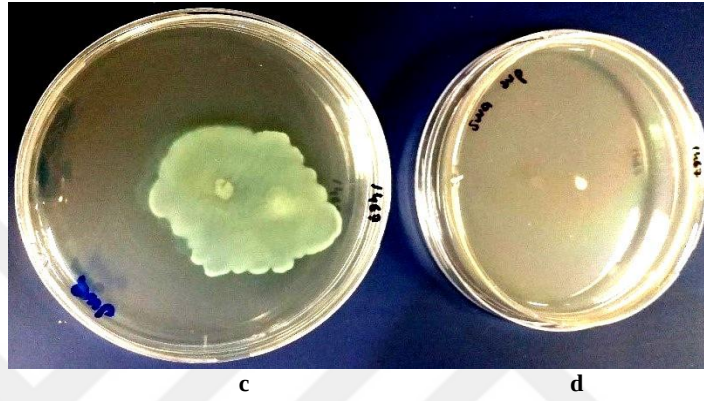
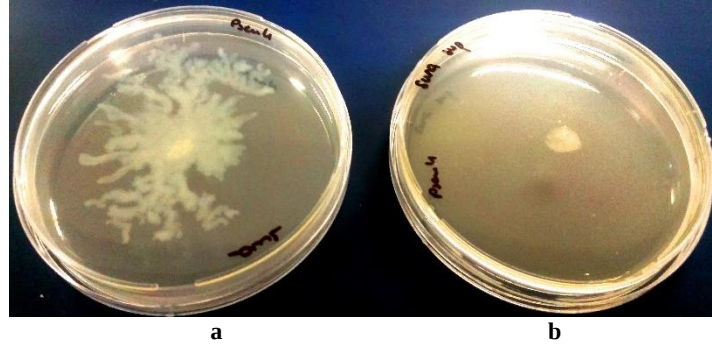
Şekil 3.11. Kısa zincirli AHL üretimi inhibe edilen *P. aeruginosa* izolatları

3.6.3. *Pediococcus acidilactici* M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Kayma-Yüzme-Titre Hareketi Üzerine Etkisi

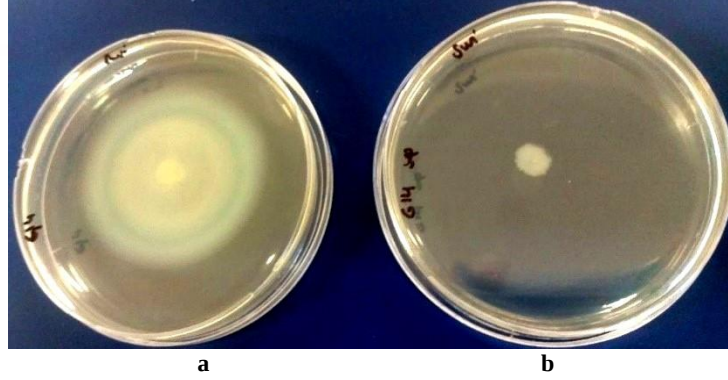
Laktik asit etkisinde, kısa zincirli AHL üretimi engellenen *P. aeruginosa* izolatlarının aynı zamanda; % 72'sinin kayma, % 64'ünün yüzme, % 46'sının titreme hareketinin inhibe edildiği belirlenmiştir. Kontrol suşu olarak çalışılan *P. aeruginosa* PAO-1'in kayma ve yüzme aktivitesinin inhibe edildiği ancak titreme hareketinin devam ettiği saptanmıştır.

AHL (-) izolatların da laktik asitin etkisi altında % 82'sinin kayma, % 83'ünün yüzme ve % 56'sının titreme hareketinin inhibe edildiği belirlenmiştir.

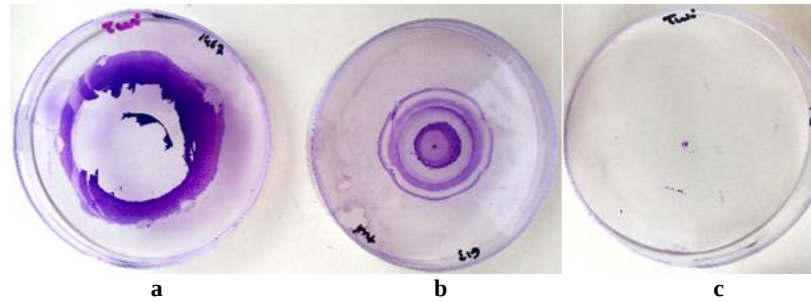
Laktik asitin etkisinde izolatların kayma, yüzme ve titreme hareketinin inhibisyonu ile kısa zincirli AHL üretiminin engellenmesi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır ($p > 0,852$).



Şekil 3.12. *P. aeruginosa* klinik izolatlarının kayma hareketi sonuçları a-c) kontrol (pozitif sonuç), b-d) laktik asit etkisi altında gösterdiği negatif sonuç



Şekil 3.13. *P. aeruginosa* klinik izolatının yüzme hareketi sonuçları a) kontrol (pozitif sonuç), b) laktik asit etkisi altında gösterdiği negatif sonuç

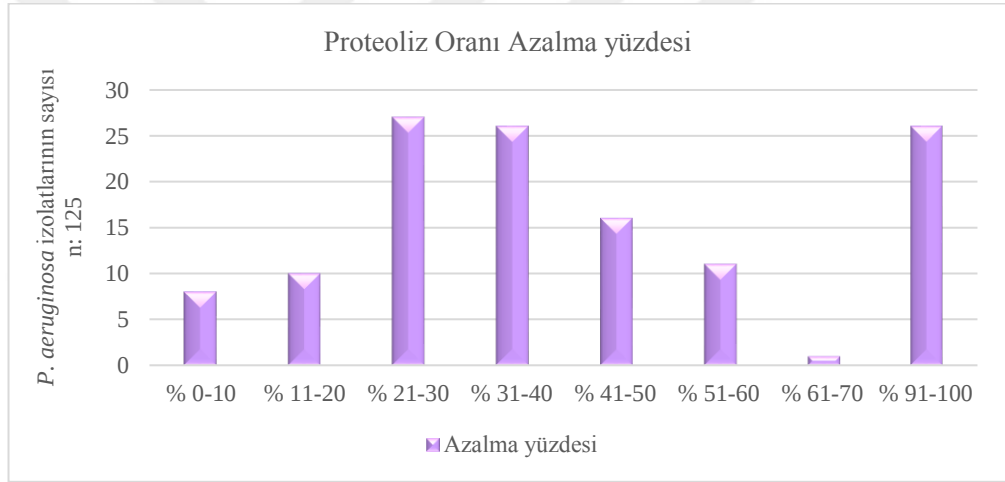


Şekil 3.14. *P. aeruginosa* klinik izolatlarının titreme hareketi sonuçları a-b) kontrol (pozitif sonuç), c) laktik asit etkisi altında gösterdiği negatif sonuç

3.6.4. *Pediococcus acidilactici* M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Proteaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

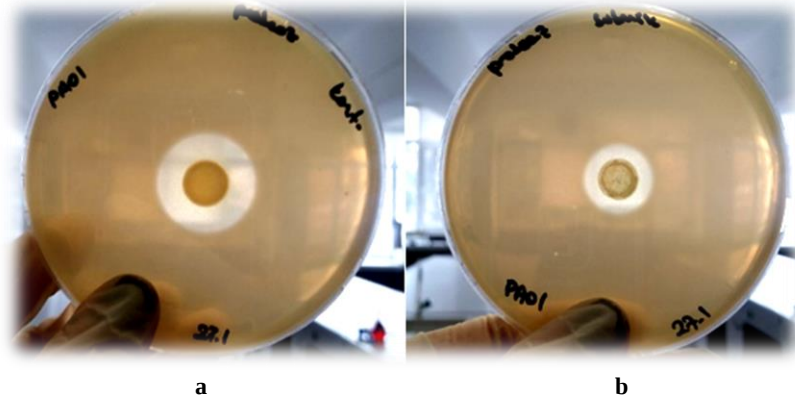
141 *P. aeruginosa* izolatı proteaz üretimi yönünden incelenmiştir. Bakteri kolonisinin etrafında berrak zon oluşumu proteaz aktivitesi olarak belirlenmiştir. İzolatların proteoliz oranı (Rp); bakteri kolonisi etrafında oluşan zon çapının (Dzc), bakteri koloni çapına (Dc) bölünmesi ile elde edilmiştir. Rp'si 2'den büyük olan toplam 125 izolat, proteolitik aktiviteye sahip olarak değerlendirilmiştir.

Proteaz pozitif klinik izolatların, laktik asit etkisinde proteoliz oranındaki azalma % olarak Şekil 3.15'te gösterilmiştir.

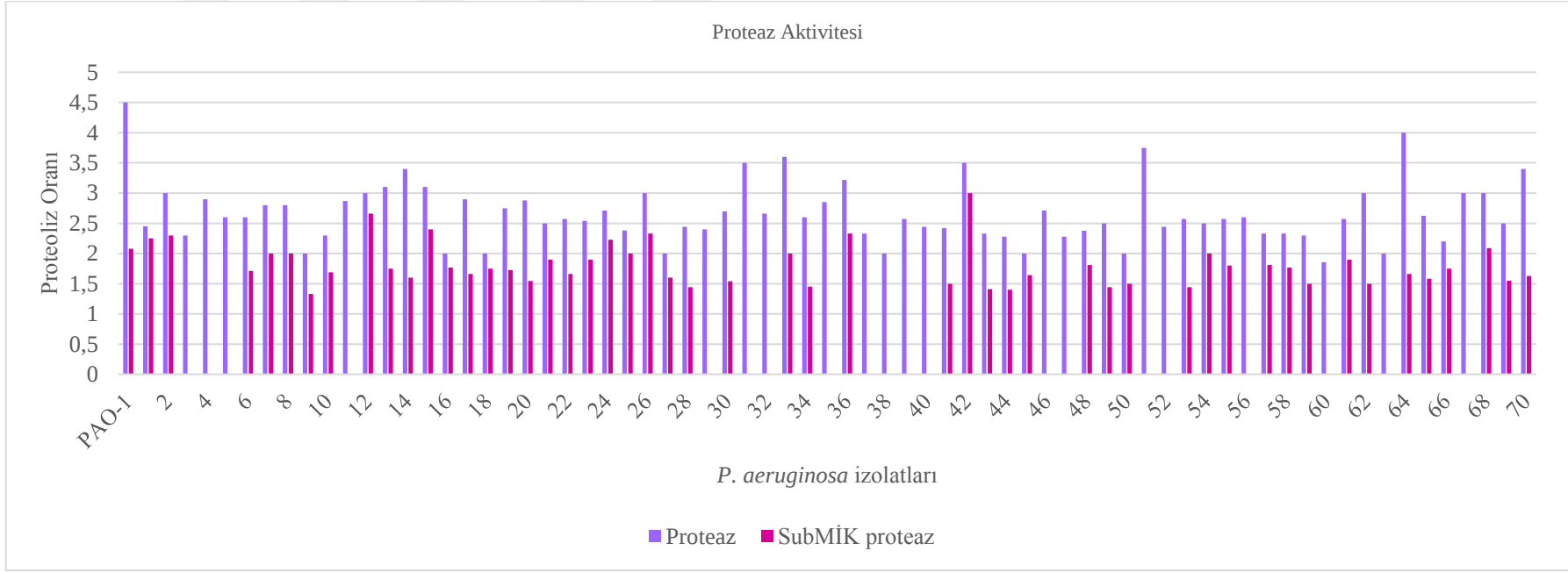


Şekil 3.15. *P. aeruginosa* izolatlarının laktik asit etkisinde proteoliz azalma yüzdeleri

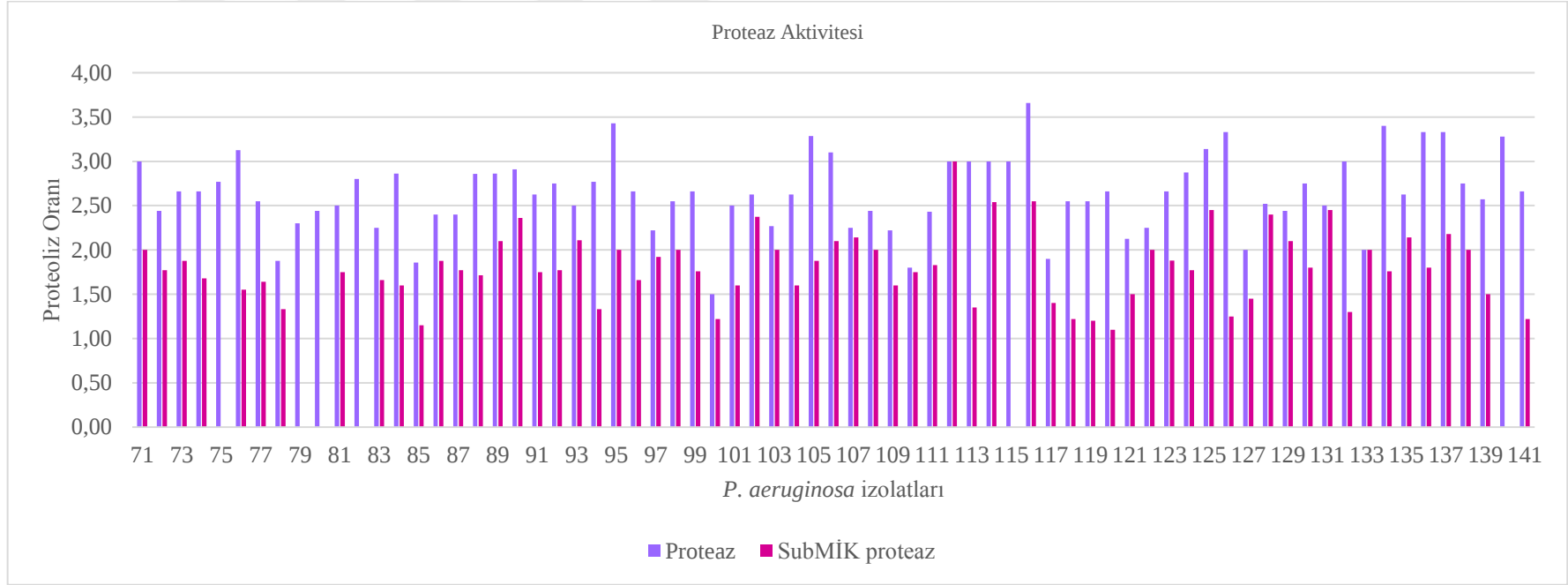
P. aeruginosa PAO-1 suşunun proteoliz oranının laktik asit etkisinde % 54 azaldığı belirlenmiştir. Kısa zincirli AHL üretimi inhibe edilen proteaz pozitif izolatların aynı zamanda % 74'ünün; AHL (-)'lerin ise % 68'inin proteoliz oranlarının azaldığı saptanmıştır. Proteoliz oranlarının azalması ve AHL sinyal molekülü inhibisyonu arasındaki ilişkinin istatistiksel açıdan anlamsız olduğu belirlenmiştir ($p>0,05$). İzolatların proteoliz oranlarının kontrol ve laktik asit etkisinde verdiği aktivite sonuçları Şekil 3.17 ve 3.18'de gösterilmiştir.



Şekil 3.16. PAO-1 suşunun proteaz aktivitesinin % 2 skim milk LB agarda oluşturduğu zonlar a) kontrol, b) laktik asit etkisi altında



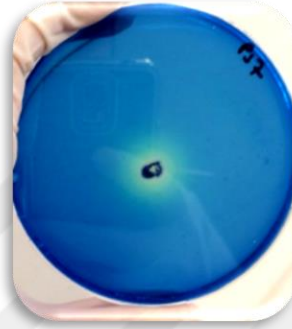
Şekil 3.17. *P. aeruginosa* izolatlarının proteaz aktivitesi ve laktik asitin subMİK etkisinde aktivite sonuçları



Şekil 3.18. *P. aeruginosa* izolatlarının proteaz aktivitesi ve laktik asitin subMİK etkisinde aktivite sonuçları (devam)

3.6.5. *Pediococcus acidilactici* M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Ramnolipid Üretimi Üzerine Etkisi

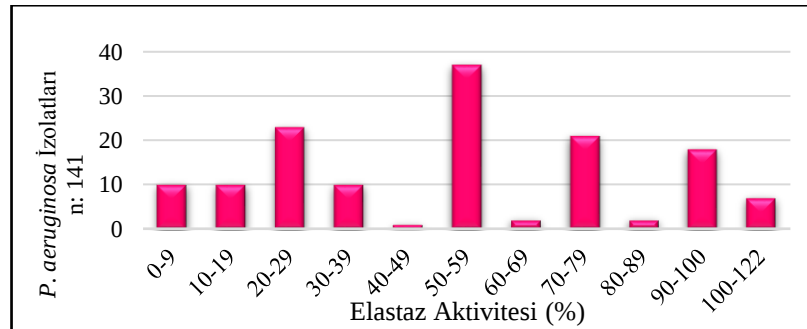
İzolatlarının glutamat minimal medium agarda üreyen kolonilerinin etrafında oluşan şeffaf zon ramnolipid üretimi olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, izolatların 139'unun (% 99) ramnolipid pozitif olduğu ancak uygulanan laktik asitin, izolatların ramnolipid üretimine herhangi bir inhibitör etkisinin bulunmadığı saptanmıştır.



Şekil 3.19. *P. aeruginosa* izolatının ramnolipid üretimi

3.6.6. *Pediococcus acidilactici* M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Elastaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

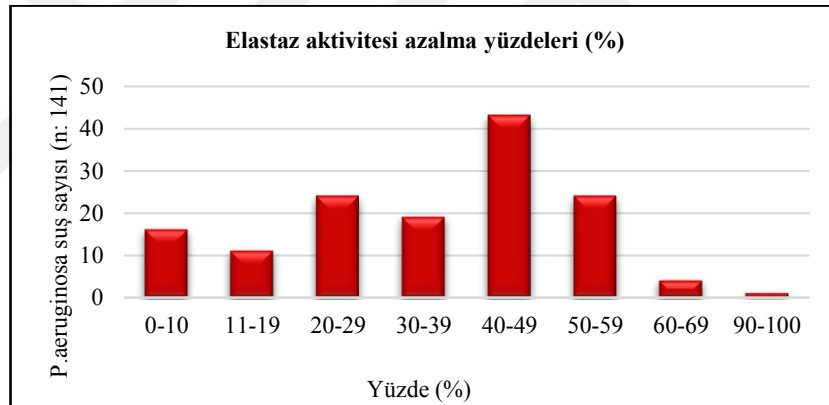
P. aeruginosa klinik izolatlarının elastaz üretimleri incelendiğinde, 141 izolatın 7 tanesinin (5 AHL (+), 2 AHL (-) izolatın), elastaz üretimi % 100 kabul edilen *P. aeruginosa* PAO-1 suşuna göre % 1-24 arasında değişen oranlarda daha fazla aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer izolatların elastaz üretiminin ise % 2 ile % 94 arasında değiştiği belirlenmiştir.



Şekil 3.20. *P. aeruginosa* PAO-1 ve *P. aeruginosa* izolatlarında elastaz üretimi (%)

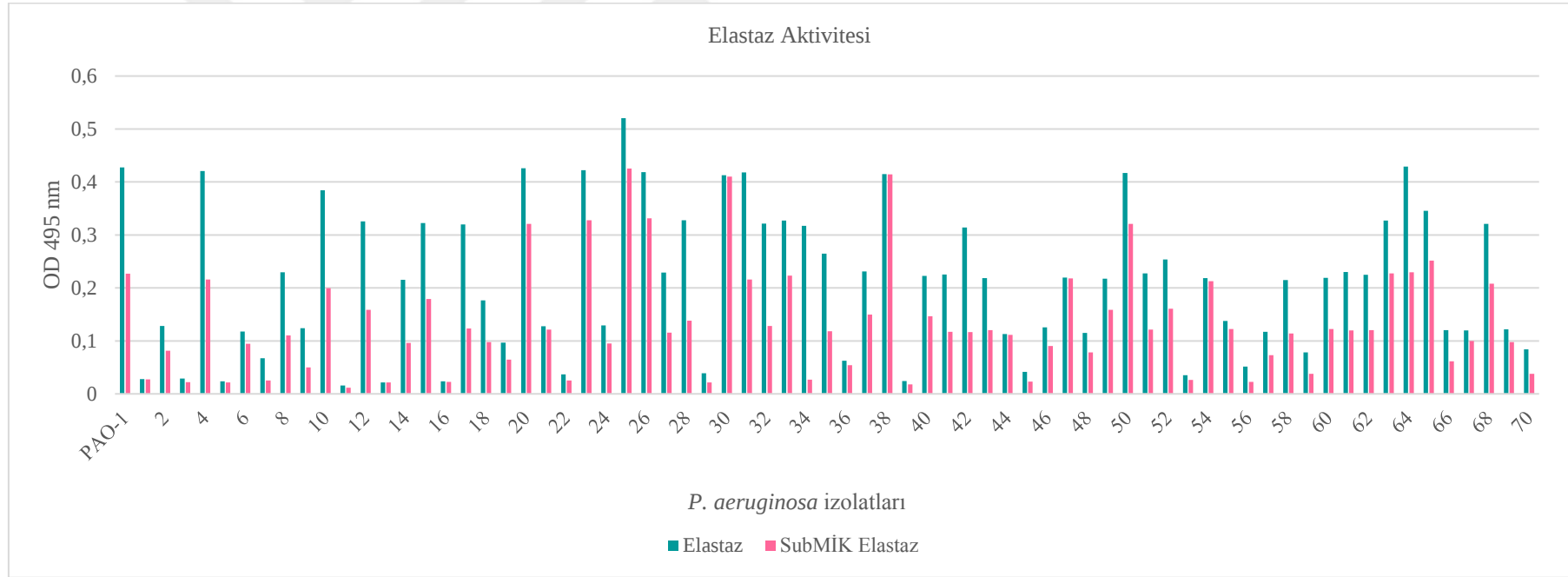
P. aeruginosa PAO-1 suşunun elastaz aktivitesi $0,4275 \pm 0,00423$, izolatlar arasında en düşük elastaz aktivitesi $0,01597 \pm 0,0007$, en yüksek elastaz aktivitesi $0,528203 \pm 0,00148$ olarak bulunmuştur.

Ped. acidilactici M7 suşunun ürettiği laktik asitin izolatlarla bir araya getirilmesi sonucunda, izolatların elastaz aktivitesi azalma yüzdeleri Şekil 3.21’de gösterilmiştir. Sonuçlara göre, laktik asitin *P. aeruginosa* PAO-1 suşunun elastaz aktivitesini % 47 engellediği; kısa zincirli AHL üretimi inhibe edilen klinik izolatların 17 tanesinin, AHL (-) izolatların ise 12 tanesinin elastaz aktivitesini % 50-100 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Diğer izolatların (47 AHL (+), 129 AHL (-) izolat) elastaz aktivitesindeki azalma yüzdelerinin % 0,4 ile % 49 arasında değiştiği belirlenmiştir.

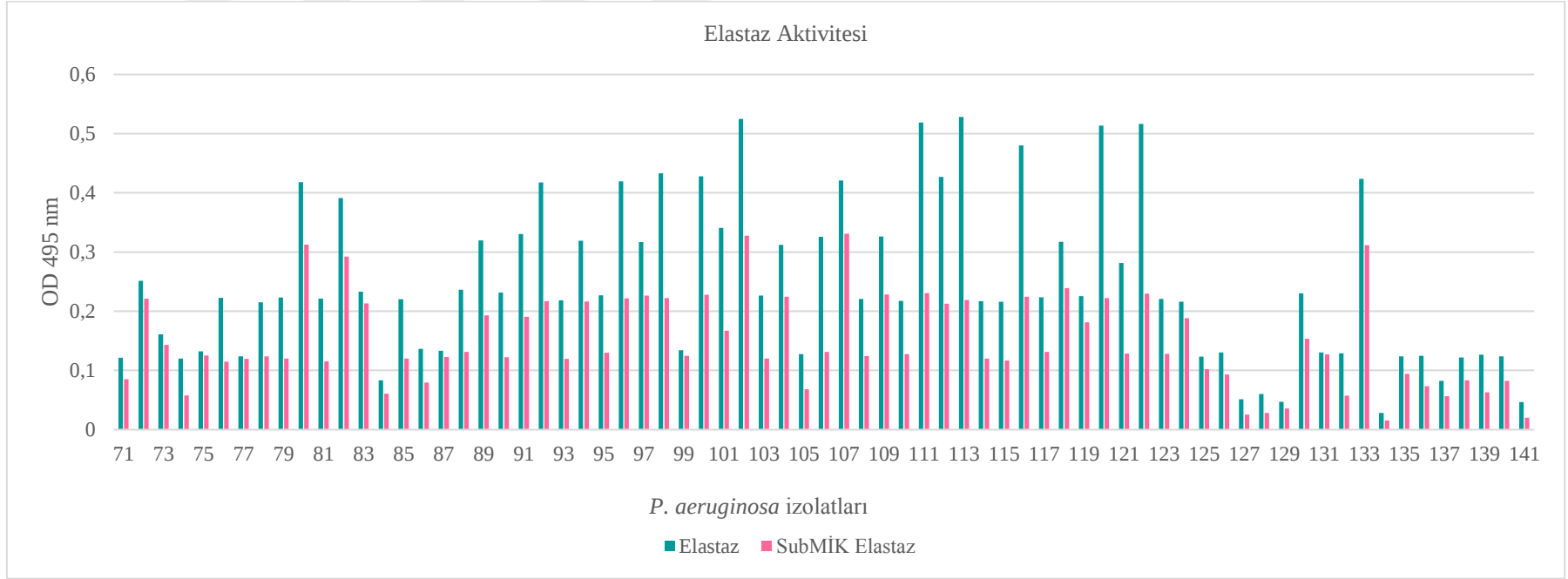


Şekil 3.21. *P. aeruginosa* izolatlarının laktik asit etkisinde elastaz aktivitesi azalma yüzdesi

İzolatların elastaz aktivitesi için belirlenen sonuçlarının % BSS’sı 0,003-4,833 arasında değişmektedir, bu değerler sonuçların tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir. İzolatların elastaz aktivitesi ve bu aktivitenin laktik asitin etkisi altında verdiği spektrofotometrik ölçüm sonuçları Şekil 3.22 ve 3.23.’te gösterilmiştir.



Şekil 3.22. *P. aeruginosa* klinik izolatlarının elastaz üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları



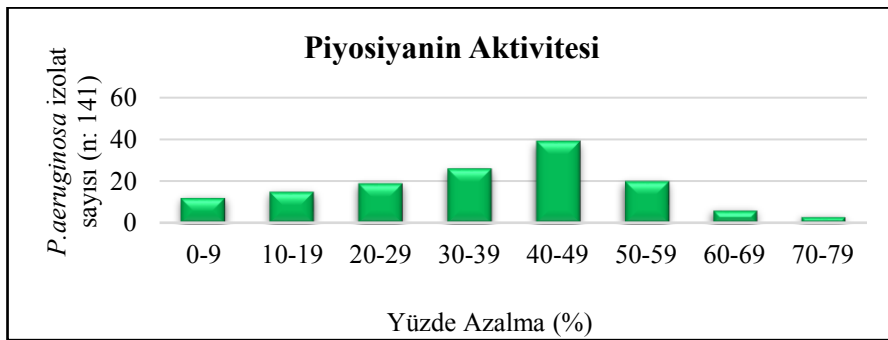
Şekil 3.23. *P. aeruginosa* klinik izolatlarının elastaz üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları (devam)

3.6.7. *Pediococcus acidilactici* M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Piyosiyanin Aktivitesi Üzerine Etkisi

Piyosiyanin üretiminin spektrofotometrik ölçümü sonucunda kontrol olarak çalışılan *P. aeruginosa* PAO-1 suşunun aktivite sonucu $0,06773 \pm 0,00067$ bulunmuştur. Sonuçlarda en düşük aktivite gösteren izolatın $0,00313 \pm 0,0004$, en yüksek aktiviteye sahip izolatın ise $0,26497 \pm 0,00867$ değerinde piyosiyanin ürettiği saptanmıştır.

P. aeruginosa izolatlarının piyosiyanin üretimleri incelendiğinde, 141 izolatın 11 tanesinin (6 AHL (+), 5 AHL (-) izolatın), piyosiyanin oluşumu % 100 kabul edilen *P. aeruginosa* PAO-1 suşuna göre % 0,4 – 74,4 arasında değişen oranlarda daha fazla piyosiyanin oluşturduğu tespit edilmiştir. Diğer izolatların piyosiyanin aktivitesinin ise % 4,6 ile % 99,6 arasında değiştiği belirlenmiştir.

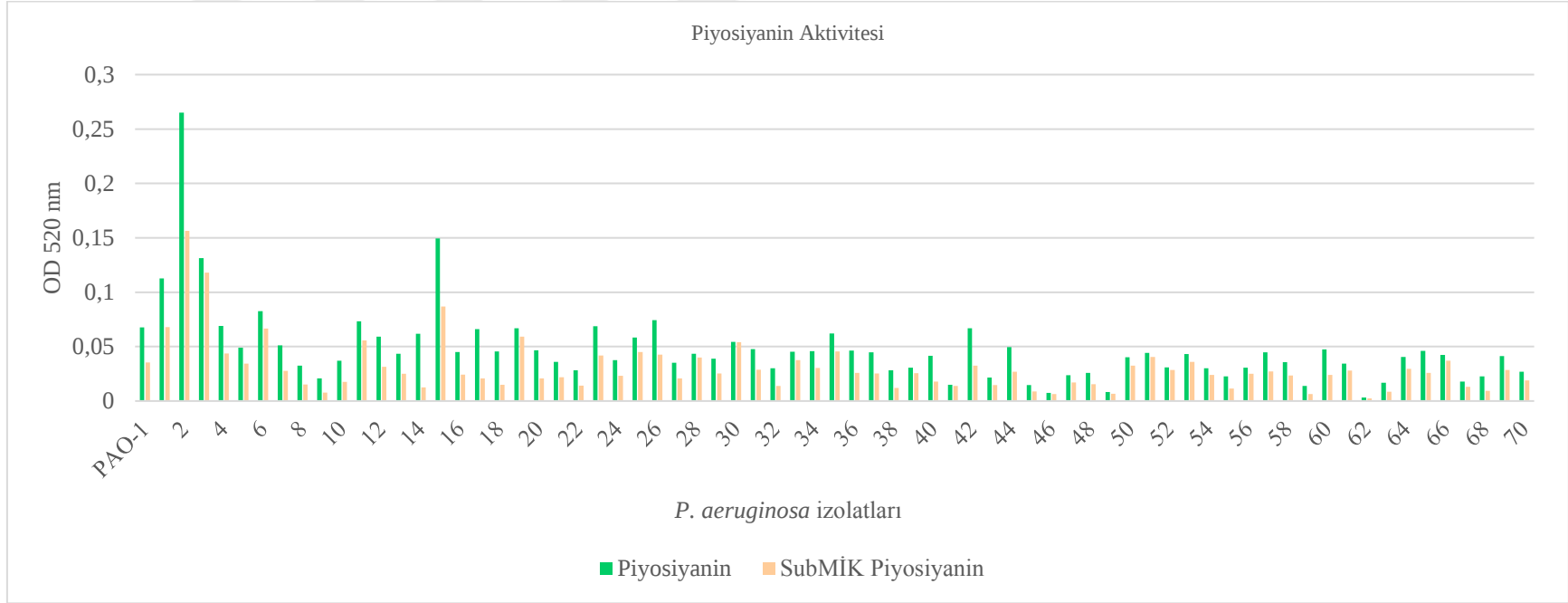
Ped. acidilactici M7 suşunun ürettiği laktik asitin izolatlarla bir araya getirilmesi sonucunda, izolatların piyosiyanin üretiminin azalma yüzdeleri Şekil 3.24'te gösterilmektedir. Sonuçlara göre, laktik asitin *P. aeruginosa* PAO-1 suşunun piyosiyanin aktivitesini % 48 engellediği; kısa zincirli AHL üretimi inhibe edilen 13 izolatın ve AHL (-) 16 klinik izolatın piyosiyanin aktivitesini ise % 50-100 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Diğer izolatların (51 AHL (+) ve 125 AHL (-) izolatın) piyosiyanin aktivitesinin azalma yüzdelerinin % 0,3 ile % 49 arasında değiştiği belirlenmiştir.



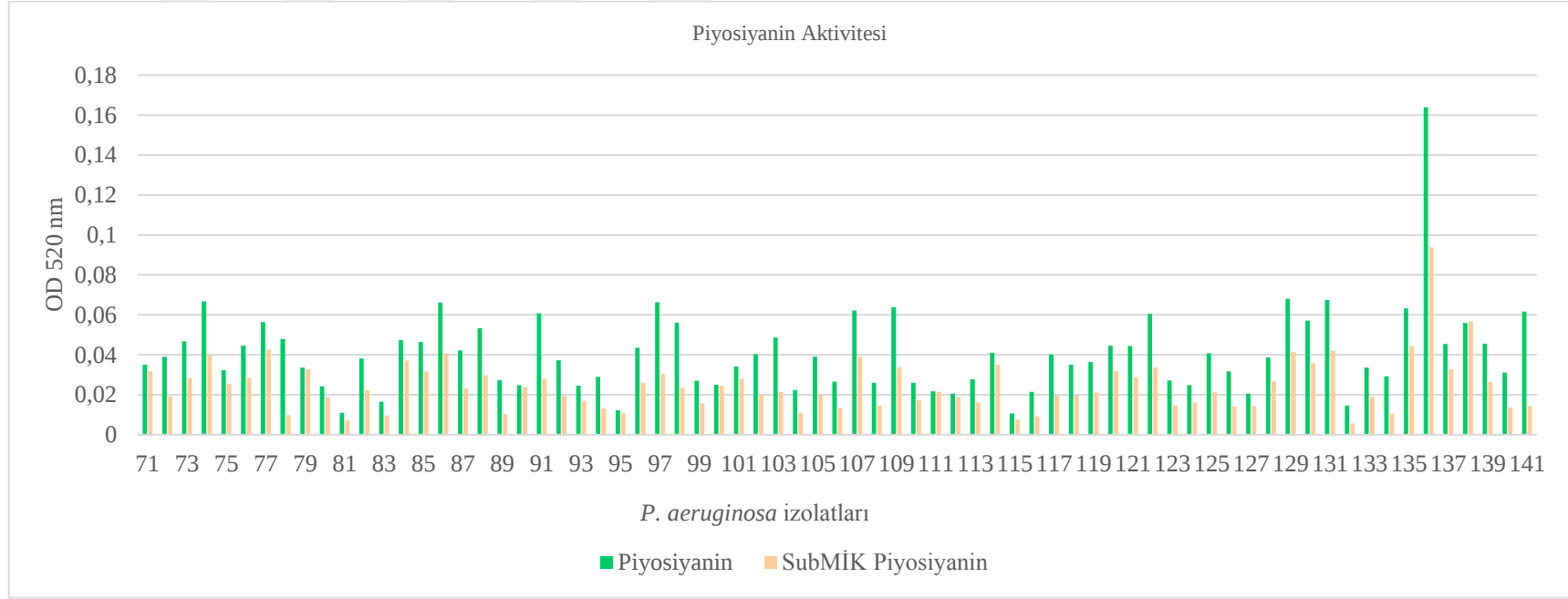
Şekil 3.24. *P. aeruginosa* izolatlarının laktik asit etkisinde piyosiyanin aktivitesi azalma yüzdesi

İzolatların piyosiyanin aktivitesi için belirlenen sonuçlarının % BSS değerleri 0,056-4,959 arasında değişmektedir, bu değerler sonuçların tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir. İzolatların piyosiyanin aktivitesi ve bu aktivitenin laktik asitin etkisinde verdiği spektrofotometrik ölçüm sonuçları Şekil 3.25 ve 3.26’da gösterilmiştir.





Şekil 3.25. *P. aeruginosa* klinik izolatlarının piyosiyenin üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları



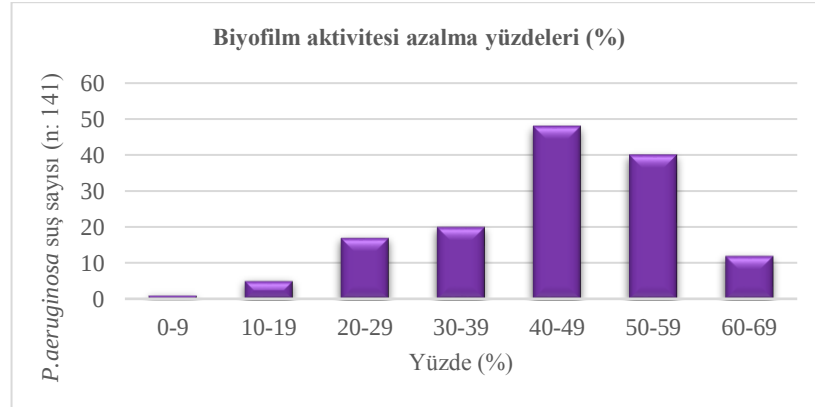
Şekil 3.26. *P. aeruginosa* klinik izolatlarının piyosiyenin üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları (devam)

3.6.8. *Pediococcus acidilactici* M7 Tarafından Üretilen Laktik Asitin *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Biyofilm Üretimi Üzerine Etkisi

Spektrofotometrik ölçüm sonuçları incelendiğinde kontrol olarak çalışılan *P.aeruginosa* PAO-1 suşunun biyofilm aktivitesi $0,94783 \pm 0,0039$ bulunmuştur. İzolatlar arasında biyofilm aktivitesi en düşük $0,02253 \pm 0,0005$, en yüksek $1,95445 \pm 0,0001$ değerinde bulunmuştur.

P. aeruginosa izolatlarının biyofilm üretimleri incelendiğinde, 141 izolatın 24 tanesinin (9 AHL (+), 15 AHL (-) izolatın), biyofilm oluşumu % 100 kabul edilen *P.aeruginosa* PAO-1 suşuna göre % 0,4-51,5 arasında değişen oranlarda daha fazla biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Diğer izolatların biyofilm aktivitesinin ise % 2 ile % 99 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Ped. acidilactici M7 suşunun ürettiği laktik asitin izolatlarla bir araya getirilmesi sonucunda, izolatların biyofilm aktivitesi sonuçlarındaki azalma yüzdeleri Şekil 3.27’de gösterilmiştir.



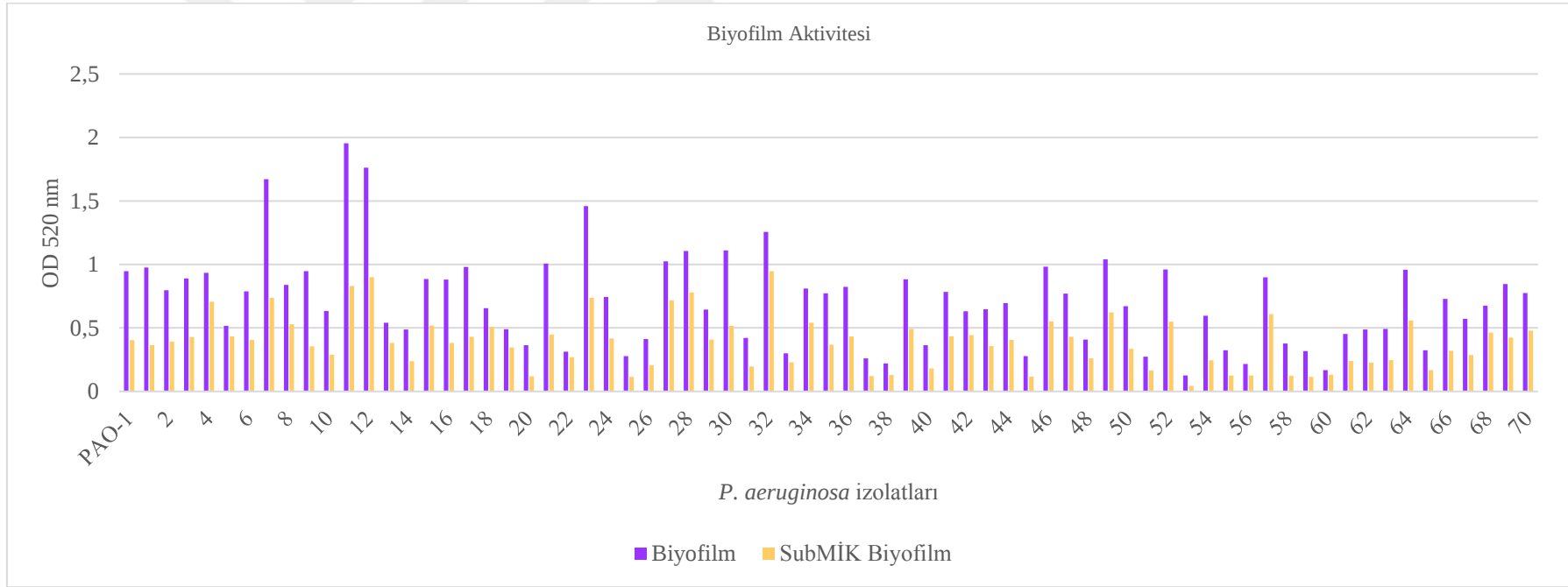
Şekil 3.27. *P. aeruginosa* izolatlarının laktik asit etkisinde biyofilm aktivitesi azalma yüzdeleri

Laktik asitin *P. aeruginosa* PAO-1 suşunun biyofilm oluşumunu % 57 engellediği; kısa zincirli AHL üretimi inhibe edilen klinik izolatların 24 tanesinin ve AHL (-) izolatların ise 28 tanesinin biyofilm aktivitesini % 50-69 oranında inhibe ettiği

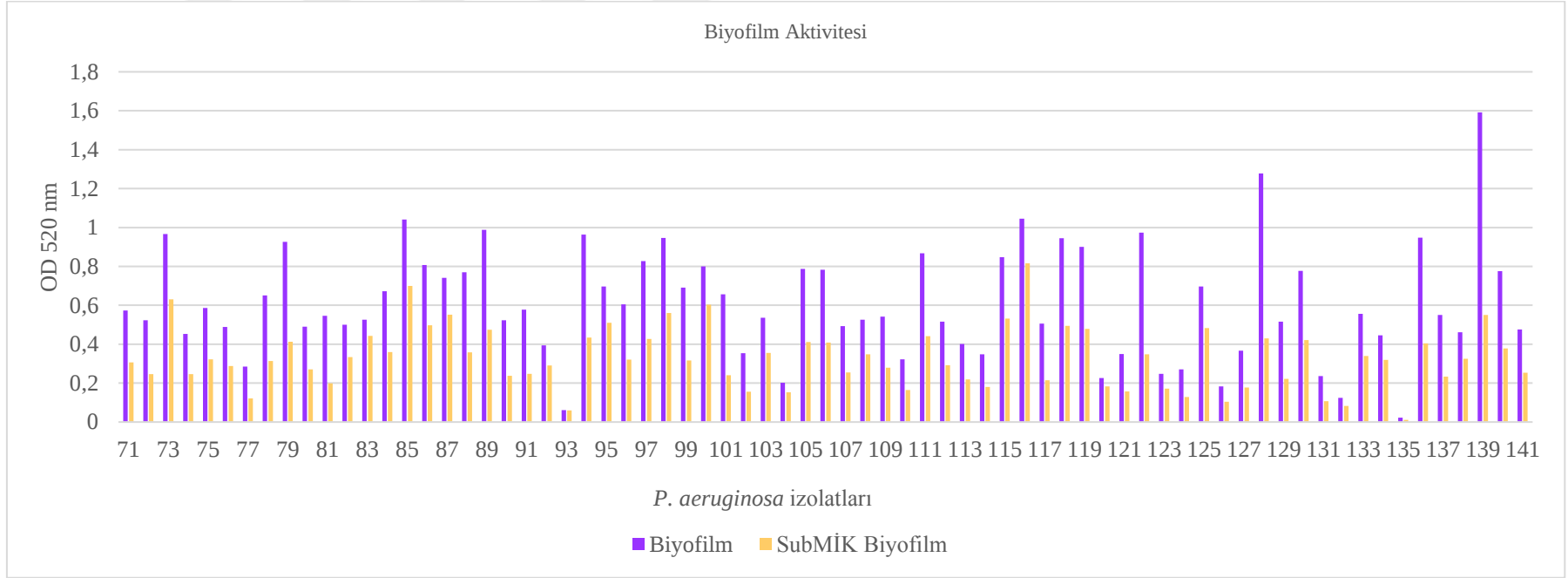
saptanmıştır. Diğer izolatlar (40 AHL +), 113 AHL (-) izolat) üzerine laktik asitin inhibitör etkisinin % 2 ile % 49 arasında değiştiği belirlenmiştir.

İzolatların biyofilm üretimi için belirlenen sonuçlarının % BSS değerleri 0,007-4,870 arasında değişmektedir, bu değerler sonuçların tekrar edilebilir olduğunu belirtmektedir. İzolatların biyofilm aktivitesi ve bu aktivitenin laktik asitin etkisi altında verdiği spektrofotometrik ölçüm sonuçları Şekil 3.28 ve 3.29’da gösterilmiştir.





Şekil 3.28. *P. aeruginosa* klinik izolatlarının biyofilm üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları



Şekil 3.29. *P. aeruginosa* klinik izolatlarının biyofilm üretimi ve laktik asit subMİK etkisinde aktivite sonuçları (devam)

4. TARTIŞMA

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, bakteriler arasındaki iletişimin bozulması sonucunda bakterilerin koordine hareket edemeyeceği, konakta daha az kolonize olma yeteneğine sahip olacakları ve buna bağlı olarak başarılı bir enfeksiyon süreci ortaya koyamayacakları rapor edilmiştir (Rasko ve Sperandio, 2010). Günümüzde bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede tercih edilen klasik yöntemler; protein sentezi, hücre duvarı sentezi, DNA replikasyonu gibi bakteriler için önemli basamakları engellemek ya da bakterileri öldürerek yok etmek temeline dayanmaktadır. Ancak bu yöntemlerin sürekli kullanılması belirli bir süre sonra dirençli popülasyonların oluşmasına, kullanılan antibiyotiklerin giderek etkisiz kalmasına, hastalıkların tam anlamıyla tedavi edilememesi, antibiyotik direncinin yayılması gibi durumlara ve aynı zamanda ekonomik kayıplara da yol açmıştır (Boşgelmez-Tinaz, 2003).

P. aeruginosa; pnömoni, CF, menenjit, abse, yumuşak doku, idrar yolu, kateter ilişkili, korneal enfeksiyonlar ve konjunktival eritem gibi hastalıklarda en yaygın patojenlerden biridir. Akut enfeksiyonlara ek olarak *P. aeruginosa* immün sistemi baskılanmış ve kemoterapi alan bireylerde, hastayı büyük ölçüde zayıf düşüren, kronik akciğer enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Kateter gibi medikal aletlerde ve CF hastalarının solunum yollarında kalıcı biyofilm oluşturabilmekte ve bu biyofilmler antibiyotiklere dirençli, yavaş gelişen bakteriyel sub-popülasyonlara barınak oluşturmaktadır (Williamson ve ark., 2012). *P. aeruginosa* aynı zamanda geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ya da immün sistemin fonksiyon bozukluğu neticesinde normal flora dengesinin bozulmasıyla da kolonize olabilmektedir (Abdelghany ve ark., 2012).

Hastalık Kontrol Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından, her yıl dünyada binlerce *P. aeruginosa* ilişkili enfeksiyon rapor edilmektedir ve çoklu ilaç dirençli (MDR) *P. aeruginosa* suşlarının ciddi tehlike tehdidi oluşturduğu bu raporlarda belirtilmektedir (Centers for Disease Control and

Prevention, 2013). Kolistin (polimiksin E), nefrotoksitesitesi ve nörotoksitesitesi bilinmesine rağmen MDR *P. aeruginosa* suşlarında son tedavi çaresi olarak kullanılan bir antibiyotiktir (Sabuda ve ark., 2008). Son zamanlarda kolistine bile Danimarka, Birleşik Krallık, Avustralya gibi çeşitli ülkelerde direnç gelişiminin ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Denton ve ark., 2002 ve Johansen ve ark., 2008). *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisindeki zorluklar ele alındığında; yeni antibiyotik geliştirilmesi için yoğunlaşan araştırmalar, farklı antibiyotik kombinasyonlarının kullanılması ve antibiyotik içermeyen alternatif tedavi metotlarının tanımlanmasını içeren çeşitli yaklaşımları içermektedir. Yeni antibiyotiklerin gelişiminde ana amaç eskilerine göre daha etkili ve direnç gelişimi sıklığının güncel antibiyotiklerden daha az olmasıdır (Chatterjee ve ark., 2016).

Birçok araştırma *P. aeruginosa* enfeksiyonlarını tedavi etmek amacıyla; yeni antibiyotik kombinasyonları oluşturmaya ya da probiyotik, faj ve fito-ilaçların kullanılması gibi antibiyotik içermeyen terapötikler geliştirilmeye odaklanmıştır (Dubois ve ark., 2001; Rahal, 2006; Sobieszczyk ve ark., 2004 ve Waters ve Smyth, 2015). Antibiyotik içermeyen terapötik ajanların yalnız ya da antibiyotiklerle kombinasyon halinde dirençli *P. aeruginosa* suşlarına etki göstermesi, bu ajanların gelecekte *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının yönetilmesinde önemli ve anlamlı bir rol oynayacağını göstermektedir (Veesenmeyer ve ark., 2009).

P. aeruginosa enfeksiyonlarının çeşitliliği virulans faktörlerine bağlıdır. Virulans faktörleri, normal iskelet yapısının bozulmasına, aktin filamentlerinin depolimerizasyonuna ve Ig G ve Ig A'nın parçalanmasına neden olurlar. Bu şekilde invaze olup yayılırlar ve kronik enfeksiyon gelişimini sağlarlar (Sadikot ve ark., 2005). Bakterileri direkt öldürmek yerine virulans faktörlerinin üretiminden sorumlu olan bakteriyel haberleşme sistemini, ÇA inhibitörü bileşikler ile engelleyerek bakteriyel enfeksiyonların tedavisini veya kontrolünü sağlamak, patojen mikroorganizmalarla savaşta umut vaat eden yeni bir strateji olarak düşünülmektedir (Bosgelmez-Tınaz, 2013).

ÇA inhibitörleri, *P. aeruginosa*'nın artan antibiyotik direnç probleminin üstesinden gelmede kullanılabilecek alternatif terapötikler olarak en çok çalışılan ajanlardır. Bu inhibitörler, mikroorganizmanın virulansını hedef alan antipatojenik ilaçlar olarak da adlandırılırlar. *P. aeruginosa*'nın virulansı hücre-hücre iletişim sistemine ya da artan hücre yoğunluğuna bağlı olarak bakterilerin koordineli cevap oluşturmalarını sağlayan, çözünebilir sinyal moleküllerini kullanan ÇA sistemine dayanmaktadır. Yoğun araştırmalar bakteri, alg ve bitkileri içeren çeşitli kaynaklardan çok sayıda ÇA inhibitörünün tanımlanmasına yol açmıştır (Rasmussen ve ark., 2005). Bu inhibitör moleküllerin proteaz, piyoverdin, kitinaz, kayma hareketi ve biyofilm oluşumu gibi *P.aeruginosa* virulans faktörlerinin üretimi üzerine etki gösterdikleri belirlenmiştir, ancak çoğunun ya toksik olması ya da tolere edilebilir dozlarda etki göstermemesi nedeniyle insan kullanımına çok uygun olmadığı saptanmıştır (Bosgelmez-Tınaz, 2013).

Çalışmamızda insan intestinal florasında doğal olarak bulunduğu bilinen, probiyotik potansiyelde bir suşun ürettiği organik asitten yararlanılarak, *P. aeruginosa* izolatlarının attenüasyonu amacıyla yeni ve alternatif bir tedavi şekli oluşturmak amaçlanmıştır.

Öncelikle yenidoğan gaita örneklerinden izole edilen ve 16S rRNA sekans analizi sonucunda *Ped. acidilactici* olduğu doğrulanan M7 suşunun probiyotik potansiyelinin ortaya konması için gastrointestinal sistem şartlarına toleransı; düşük pH, pepsin, pankreatin, safra tuzu denemeleri ile belirlenmiştir. Probiyotiklerin mide asidinden etkilenmeden bağırsaklara ulaşabilmesi ve burada safra tuzlarına direnç göstermesi beklendiğinden, bakterinin intestinal sistem koşullarına direnci önemli bir ölçüt olarak değerlendirilmiştir. Besinlerle alınan bakterilerin gastrik koşullardan korunmasında besin partikülleri ve konakçı yüzeyel tutunma bölgelerinin tolere edici rolü sayesinde pH-pepsin uygulamalarında pH 3,0'da 3 saat sonundaki direnç, pankreatin pH 8,0 ve safra tuzu (% 0,3-1) uygulamalarında 4 saat sonunda belirlenen direnç dikkate alınmıştır (Uymaz, 2009). Buna göre; çalışmamızda izole edilen M7 suşunun, pH 3,0'da 3. saatin sonunda % 96; pepsin pH 3,0'da 3. saatin sonunda % 93; pankreatin pH 8,0 ve % 0,3, % 0,5 ve % 1'lik safra tuzu testlerinin 4. saatinin sonunda

sırasıyla; % 98, % 93, % 91 ve % 76 oranında hayatta kaldığı belirlenmiştir. Belirlenen bu sonuçların, literatürlerde yer alan insan gaita ve vajen örneklerinden, tavuk, hayvan GİS'inden izole edilen farklı *Ped. acidilactici* suşlarının düşük pH (2,5-3,0), safra tuzu % 0,1-1 (Abbasili ve ark., 2012; Attri ve ark., 2015; Damayanti ve ark., 2014; Erkkilä ve Petäjä, 2000; Feng ve ark., 2016; Garsa ve ark., 2014; Kaboré ve ark., 2012; Khalil ve ark., 2007; Noohi ve ark., 2016; Oh ve Jung, 2015; Ruiz Moyano ve ark., 2008 ve Todorov ve ark., 2011), pepsin pH 3,0 (Amin ve ark., 2016; Barbosa ve ark., 2015 ve Turhan Eryılmaz, 2011), pankreatin pH 8,0 (Maragkoudakis ve ark. 2006; Oliveira Riberio ve ark., 2014 ve Uymaz, 2009) testleri sonucunda elde edilen hayatta kalma oranları ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Devi ve ark. (2015), izole ettikleri insan kaynaklı pediokok suşlarının asit ve safra stresine diğerlerine oranla maksimum tolerans gösterdiğini, Khalil ve ark. (2007) bebek gaitasından izole edilen suşlar için pH 2,0'ın letal pH olduğunu, Begley ve ark. (2005), suşların safra tuzuna direncinin membran yapısına ve safra tuzlarının hidrolize edilmesine sebep olan safra tuzu hidrolaz aktivitesine bağlı olarak değiştiğini bildirdikleri çalışmalarıyla değerlendirmeye alınan koşulların önemini vurgulamışlardır.

Probiyotik mikroorganizmaların seçilmesinde hemolitik aktivite önemli kriterlerden birini oluşturmaktadır ve probiyotik potansiyeli araştırılan suşların hemolize neden olmayan, γ -hemolitik suşlardan seçilmesi gerekmektedir (Maragkoudakis ve ark., 2006). Çalışmamızda izole edilen M7 suşu γ -hemoliktir. Yapılan diğer çalışmalarda potansiyel probiyotik olarak belirlenen pediokok suşlarının γ -hemolitik olduğu rapor edilmiştir (Oh ve Jung, 2015; Osmanagaoglu ve ark., 2010; Turhan Eryılmaz, 2011 ve Uymaz, 2009).

Probiyotik potansiyeli belirlenecek suşlarda esas alınan bir diğer özellik aktarılabilen herhangi bir antibiyotik direncinin bulunmamasıdır. Yapılan çalışmalarda pediokokları da içeren bazı laktik asit bakterilerinde vankomisin direncinin bulunduğu rapor edilmiştir (Ammor ve ark., 2007; Barbosa ve ark., 2015; Charteris ve ark., 1998; Kastner ve ark., 2006; Maragkoudakis ve ark., 2006; Temmerman ve ark., 2002 ve Zhou ve ark., 2005). Çalışmamızda, yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucunda *Ped. acidilactici* M7 suşu vankomisine dirençli, diğer

antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur. Pediokoklarda vankomisin direncinin intrinsek, kromozom kodlu ve aktarılmayan bir direnç olması sebebiyle, suşun probiyotik olarak kullanımında herhangi bir kısıtlamanın söz konusu olmadığı yapılan çalışmalarca belirtilmiştir (Osmanagaoglu ve ark., 2010 ve Swenson ve ark., 1990). EFSA'nın belirlediği bakteriyel antimikrobiyal duyarlılık standartlarında da pediokokların vankomisin için herhangi bir MİK değerinin belirlenmesine gerek olmadığı belirtilmektedir (European Food Safety Authority, 2012).

Probiyotik mikroorganizma seçim ölçütlerinden biri de, incelenen suşun patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite göstermesidir. Pediokoklar tarafından üretilen laktik asit, hidrojen peroksit, protein yapısındaki pediosinler vb. metabolitlerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Hücre bağımsız supernatantın organik asit dışında bir metabolitten kaynaklanacak antimikrobiyal etkisi pH'ın 1 N NaOH ile nötral değere getirilmesinden sonra belirlenmiştir. Çalışmamız doğrultusunda öncelikle *Ped. acidilactici* M7 suşunun bu metabolitlerden hangisini ürettiği ve bazı patojenler üzerine antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Sonuçlara göre, M7 suşunun bu metabolitler arasından yalnızca laktik asiti ürettiği ve laktik asitin *P. aeruginosa* PAO-1, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 9027 ve *E. faecalis* ATCC 29212 suşları üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

LAB tarafından üretilen laktik asit gibi organik asitlerin ayrışmamış formları patojenlerin hücre membranını geçerek ayrışıp bakteri sitoplazmasını asidikleştirmekte ve dolayısıyla metabolik sürecin bozulmasına sebep olarak etkisini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda *Ped. acidilactici* suşları tarafından üretilen laktik asit (Amin ve ark., 2016; Ibrahim ve ark., 2008; Yesillik ve ark., 2011) ve diğer metabolitlerin, *P. aeruginosa* (Damayanti ve ark., 2014; Jamalifar ve ark., 2011; Munguía-Villavicencio ve ark., 2015), *Salmonella sp.* (Damayanti ve ark., 2014; Kaboré ve ark., 2012), *Salmonella enteritidis*, *E. coli* (Damayanti ve ark., 2014; Iranmanesh ve ark. 2015; Kaboré ve ark., 2012; Noohi ve ark., 2016; Oliveira Riberio ve ark., 2014) *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. proteolyticus*, *Yersinia ruckeri* (Amin ve ark., 2016), *L. monocytogenes* (Barbosa ve ark., 2015; Iranmanesh ve ark.; 2015; Kaboré ve ark., 2012; Munguía-Villavicencio ve ark., 2015), *S. aureus* RTCC 1112

(Iranmanesh ve ark., 2015; Oliveira Riberio ve ark., 2014; Turhan Eryılmaz, 2011) *Bacillus cereus* (Kaboré ve ark., 2012; Oliveira Riberio ve ark., 2014) suşları üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Bu çalışma kapsamında izole edilen *Ped. acidilactici* M7 suşunun, GİS koşullarına direnci, antibiyotik duyarlılık profili ve ürettiği laktik asit ile patojen mikroorganizmalara antagonist etkisi, güncel literatürlerle uyum sağladığından suş bu doğrultuda potansiyel probiyotik olarak değerlendirilmiştir.

Probiyotik suşların konak sağlığı üzerinde olumlu etkilerinin yanı sıra farklı patojen bakterilerin virulansı üzerine inhibitör aktivitesinin olması (Chifiriuc ve ark., 2010), toplum ilişkili - hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavisi ve önlenmesinde kullanımlarının önem kazanmasını sağlamıştır (Elmer ve ark., 1996; Vanderhoof ve ark., 1999 ve Viswanathan ve ark, 2009). Asit salgılama yetenekleri, bakteriyosinler ve ürettikleri diğer metabolitleri ile patojenler tarafından oluşturulan enfeksiyonu nötralize edebilecekleri gibi, konağın inflamatuvar ve immün cevabını düzenleyebilecek yapıda mikroorganizmalar olmaları, vücudun diğer bölgelerindeki klinik enfeksiyonların tedavisinde de kullanılabileceklerini düşündürmektedir (Harder, 2002; Hessle ve ark, 2000; Gan ve ark., 2002 ve Reid, 2001).

Buna dayanarak çalışmamızda probiyotik potansiyeli belirlenen *Ped.acidilactici* M7 suşu tarafından üretilen laktik asitin hastane enfeksiyonu etkenleri arasında önemli yere sahip olan *P. aeruginosa* izolatlarının ÇA sistemi sinyal molekülleri ve virulans faktörlerinin üretimi üzerine inhibitör etkisi araştırılmıştır. ÇA sisteminin inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan inhibitör adaylarının bakteri gelişimini engellemeyip sistem üzerine inhibitör aktivitesinin olması beklenmektedir. Yaptığımız bu çalışmada, ÇA sisteminin kısa zincirli sinyal molekülleri üzerine potansiyel inhibitör adayı olarak tespit edilen laktik asitin, klinik *P. aeruginosa* izolatlarının kayma-yüzme-titrete, elastaz, proteaz, piyosiyenin, ramnolipid ve biyofilm aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. ÇA sisteminin devreye girmesini sağlayan sinyal moleküllerinin üretiminin inhibisyonunun, bakterilerin

koordineli hareket edememesine, virulans faktörlerinin üretiminin bloke edilmesine, patojenite oluşumunun engellenmesine sebep olacağı, dolayısıyla bakterinin başarılı bir enfeksiyon süreci gerçekleştiremeyeceğini düşündürmektedir.

Laktik asit, LAB'ın fermentasyon metabolizması sonucunda oluşan bir organik asittir. Asitleştirici, tatlandırıcı, pH tamponlayıcı ajan ya da gıdalarda bakteriyel bozunma inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Laktik asit üretimi kimyasal sentez ve karbonhidrat fermentasyonu ile gerçekleştirilebilmektedir. Karbonhidrat fermentasyonu nispeten daha ucuz ve tercih edilen bir yöntemdir. Pediokoklar tarafından da üretilen laktik asitin *Pseudomonas*, *Salmonella* vb. birçok patojene karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği bizim çalışmamız da dahil olmak üzere birçok araştırmada gösterilmiştir (Damayanti ve ark., 2014; Jamalifar ve ark., 2011; Munguía-Villavicencio ve ark., 2015).

Çalışmamızda *Ped. acidilactici* M7 tarafından üretilen laktik asitin miktar tayini YBSK ile gerçekleştirilmiş ve suşun 5,59-5,94 mg/mL arasında laktik asit ürettiği belirlenmiştir. Özcelik ve ark. (2016) da çalışmalarında *Ped. acidilactici* tarafından üretilen laktik asit miktarını 2,34-2,40 mg/mL, Okori (2014), *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen laktik asit miktarını 280,16 mg/mL olarak YBSK yöntemi ile belirlemişler; Cotar ve ark. (2013) ise yenidoğan gaitasından izole ettikleri *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* suşunun 4,95 mg/mL laktik asit ürettiğini kapiler elektroforez ile saptamışlardır. M7 suşu tarafından üretilen laktik asitin klinik *P. aeruginosa* izolatları üzerine MİK değeri makrodilüsyon yöntemiyle araştırılmış ve 0,698-0,742 mg/mL arasında değiştiği saptanmıştır. Okori (2014), laktik asitin en yüksek inhibitör aktiviteyi *P. aeruginosa* izolatları üzerine gösterdiğini rapor etmiş, Cotar ve ark. (2013) ise *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* tarafından üretilen laktik asitin *P. aeruginosa* izolatına karşı MİK değerini 0,875 mg/mL olarak saptamışlardır.

Bu çalışmada M7 suşu tarafından üretilen laktik asit, sub-inhibitör konsantrasyonda klinik *P. aeruginosa* izolatları ile bir araya getirilmiş ve bakterilerin

hem ÇA davranışı hem de ÇA sistemi tarafından kontrol edildiği bilinen kayma-yüzme-titreme hareketi, elastaz, proteaz, piyosiyenin, ramnolipid ve biyofilm aktivitesi üzerine inhibitör etkisi incelenmiştir.

İdrar, yara, kulak akıntısı, trakeal aspirat, balgam, kateter örneklerini içeren toplam 141 *P. aeruginosa* izolatu ÇA sinyal molekülleri ve ürettikleri virulans faktörleri açısından değerlendirilmiştir. Kısa-uzun zincirli AHL ve test edilen tüm virulans faktörlerini ürettiği bilinen *P. aeruginosa* PAO-1 suşu kontrol olarak çalışılmıştır. Buna göre 141 izolatu tümünün uzun zincirli AHL, 84'ünün ayrıca kısa zincirli AHL ürettiği belirlenmiştir. Bakterilerin vücuttan izole edildiği bölge ile ÇA sinyal molekülü üretimi arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır ($p=0,655$) ve bu bulgunun diğer çalışmalarla desteklendiği belirlenmiştir (Hançer Aydemir, 2012; Önal, 2005 ve Önem, 2013). Laktik asitin subMİK değerinde, *P. aeruginosa* izolatlarının uzun zincirli AHL üretimini engellemediği ancak kısa zincirli AHL üreten suşların 64'ünün sinyal molekülü üretimini inhibe ettiği saptanmıştır. Almasoud ve ark. (2016), standart laktik asitin *E. coli* ve *S.typhimurium*'un ÇA sinyal molekülü üretimini engellediğini, Park ve ark. (2014), *Lactobacillus sakei* ile birlikte üretilen *E. coli* O157:H7'nin ÇA sinyal molekülü üretiminin engellendiğini, Cotar ve ark. (2013), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* tarafından üretilen laktik asitin *P. aeruginosa* ÇA gen ekspresyon seviyelerini azalttığını, Chifiriuc ve ark. (2009) ise laktobasil suşları tarafından üretilen fenil laktik asitin *P. aeruginosa* ÇA sinyal molekülü üretimini inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonucuna göre suşların % 24'ünün iki ya da daha fazla antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenmiştir, ancak suşların antibiyotik direnci ile AHL sinyal molekülü üretimi arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Önem (2013) de çalışmasında AHL sinyal molekülü üretimi ve antibiyotik direnci arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını belirtmiştir ($p>0,05$).

P. aeruginosa'nın kayma, yüzme, titreme olarak belirlenen 3 tip motilitesi söz konusudur. Yüzme ve kayma hareketi kirpik bağımlı iken, titreme hareketi tip IV pilus bağımlıdır (Rashid ve Kornberg, 2000 ve Toutain ve ark., 2005). Laktik asitin subMİK değerinde kısa zincirli AHL üretimi engellenen *P. aeruginosa* izolatlarının kayma, yüzme, titreme hareketlerini sırasıyla; % 72, % 64, % 46; AHL negatif izolatların ise % 81,5, % 83, % 56 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Kontrol suşu PAO-1'in ise kayma ve yüzme aktivitesi laktik asit tarafından inhibe edilmiş ancak titreme hareketi üzerine herhangi bir inhibitör aktivite saptanmamıştır. Motilitenin yanında bakterinin epitel hücrelere adezyonundan ve kolonizasyonundan sorumlu olan kirpik ve pilus bağımlı kayma-yüzme-titreme hareketlerinin % 50'den fazla inhibisyonunun bakterinin dokulara tutunması ve enfeksiyon oluşumunun başlangıcı olarak görülen bu basamaktaki aktivite kaybı önemli bir virulans inhibisyonu olarak belirlenmiştir.

Ped. acidilactici M7 tarafından üretilen laktik asitin, *P. aeruginosa* izolatlarının % 27'sinin proteaz aktivitesini, % 20'sinin ise elastaz aktivitesini % 50 – 100 oranında inhibe ettiği ve bu inhibisyon ile AHL sinyal molekülü üretiminin engellenmesi arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Elastaz ve proteaz üretimleri % 100 kabul edilen PAO-1 suşunun elastaz ve proteaz aktivitelerini ise laktik asitin sırasıyla; % 47, % 54 oranında engellediği belirlenmiştir. *P. aeruginosa* tarafından üretilen elastaz ve proteaz, bakterinin elastolitik aktivitesinden, akciğer alveollerinin ve kan damarlarının yapısının bozulmasından sorumlu olan sinerjik etkili enzimlerdir. Çalışmamızda bakterilerin virulansında büyük role sahip olan bu enzimlerin aktivitesinin laktik asit tarafından yarıya yakın ya da yarıdan fazla oranda inhibisyonunun bakteri patojenitesinde önemli virulans kayıplarına neden olabileceği düşünülmektedir.

Piyosiyanin, birçok bakteri türüne karşı inhibitör özelliği olan, bakteriye rekabet şansı tanıyan ve akciğerde doku hasarına sebep olan bir pigmenttir. Çalışmamızda, *P. aeruginosa* izolatlarının % 20'sinin laktik asit etkisinde piyosiyanin üretimlerinin % 50 – 100 oranında, PAO-1 suşunun aktivitesinin ise % 48 oranında inhibe edildiği belirlenmiştir. İzolatların piyosiyanin aktivitesindeki inhibisyon ile AHL sinyal molekülü üretiminin engellenmesi arasında anlamlı bir ilişki olmadığı

saptanmıştır. Pseudomonal enfeksiyonların patogenezinin ve enfeksiyonun olduğu bölgedeki biyolojik sistemlere toksik etkilerinin bu virulans faktörü ile alakalı olduğu yapılan çalışmalarla saptandığından, çalışmamızda elde edilen piyosianin üretiminin % 50 ya da daha fazla oranda inhibe edilmesine dair bulguların, *P. aeruginosa* enfeksiyon sürecinde önemli virulans kayıpları ortaya çıkarabileceği değerlendirilmiştir.

Ramnlipid, biosürafaktan etkisiyle akciğer fosfolipidlerinin yapısını bozan hemolitik etkili bir moleküldür. Bu çalışma kapsamında, *Ped. acidilactici* M7 suşu tarafından üretilmiş laktik asitin *P. aeruginosa* izolatlarının ramnlipid aktivitesine inhibitör etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.

Biyofilm, bakterinin besin yokluğu, değişen ortam koşulları, antibiyotik, dezenfektan vb. stres faktörlerine dayanıklılığını sağlayan polisakkarit yapıda bir matriks, bakterinin konak savunmasından korunmasını sağlayan en önemli virulans faktörlerinden biridir. *P. aeruginosa* izolatlarının % 37'sinin biyofilm oluşumu laktik asit etkisi altında % 50 – 69 oranında inhibe edilmiştir ve bu inhibisyon ile AHL sinyal molekülü üretiminin engellenmesi arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptanmıştır. Kontrol olarak çalışılan PAO-1 suşunun biyofilm aktivitesinin ise başlangıca göre %57 oranında inhibe edildiği saptanmıştır. Süregen *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında biyofilm üreten mukoid suşlar göze çarpmaktadır. Çalışmamızda bakterinin patogenezinde önemli rol oynayan biyofilm oluşumundaki yüksek oranda eksilmenin ya da biyofilm tabakasındaki çözülmenin artmasının daha duyarlı suşların oluşmasına sebep olacağı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma kapsamında incelenen virulans faktörlerinden elastaz, proteaz, biyofilm aktivitesi ve *rhl* sisteminin düzenlenmesi, *las* sisteminin kontrolü altında yani 3-okso-C12-AHL'nin sentezlenmesine bağlı olarak gerçekleşmektedir. *Las* sistemi hiyerarşik üstünlüğü ile *rhl* sistemi sinyal molekülü C4-AHL tarafından düzenlenen elastaz, piyosianin ve ramnlipid aktivitesini de etkilemektedir. *Ped. acidilactici* M7 suşu tarafından üretilen laktik asit, *las* sistemi sinyal molekülü olan 3-okso-C12-AHL

üzerine inhibitör etki göstermemiş, *rhl* sistemi sinyal molekülü olan C4-AHL'yi inhibe etmiştir. Bu sinyal molekülünün laktik asit etkisi altında inhibisyonu sonucunda izolatların elastaz, piyosyanin ve diğer virulans aktivitelerinde belirli oranlarda inhibisyon görülmesine rağmen ramnolipid üretiminin aynen devam ettiği saptanmıştır. Deziel ve ark. (2005)'nin de çalışmalarında belirttikleri gibi, bizim çalışmamızda da *las* ve *rhl* sistemleri arasındaki bağlantının, ÇA bağımlı faktörlerden ramnolipid üretimini etkilemesinin, izolatlarda kısa zincirli sinyal molekülü inhibisyonuna rağmen ramnolipid üretiminin aynen devam etmesine sebep olduğu saptanmıştır. Hatta *las* sisteminin etkisiyle, mevcut inhibisyon sağlanan virulans faktörlerinde daha büyük kayıpların oluşmasının engellendiği ve bu durumda *las* ve *rhl* sistemlerinin virulans faktörlerinin düzenlenmesinde birlikte rol almasına bağlı olarak ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır.

ÇA sistemi tarafından kontrol edildiği bilinen virulans faktörlerinin üretiminin inhibisyonunun bakterinin enfeksiyon sürecinde önemli aksamalara sebebiyet vereceği açıktır. Howe ve Iglewski (1984), çalışmalarında alkalen proteaz üretimleri azaltılan suşların, farelerde geliştirilen travmatik göz modelinde kolonize olmadıklarını ve kornea hasarı oluşturmadıklarını rapor etmiştir. Tang ve ark. (1996), regülatör proteini kodlayan *lasR* geninin mutasyonu sonucunda *P. aeruginosa* suşlarının virulansında azalma meydana geldiğini saptamışlardır. Wu ve ark. (2001), *lasI* ve *rhII* genleri mutasyona uğramış *P. aeruginosa* suşlarının immün sistem cevabından daha çabuk etkilendiklerini belirtmişlerdir.

Bugüne kadar, *P. aeruginosa* ÇA sisteminin inhibisyonu ve aynı zamanda virulans faktörleri üzerine probiyotik mikroorganizmaların ürettiği organik asitlerden direkt yararlanılarak yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunurken, pediokoklarla ilgili ise herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Cotar ve ark. (2013), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* probiyotik suşunun ürettiği laktik asit ve asetik asitin *P. aeruginosa* AHL molekülü ekspresyonunu azaltmanın yanında suşun biyofilm oluşumunu engellediğini belirtmişlerdir. Çalışmamız suşların ürettiği laktik asit miktarları, klinik izolatlar üzerine belirlenen MİK değerleri ve organik asitlerin ÇA sistemi ve biyofilm aktivitesi inhibisyonu açısından benzerlik göstermektedir. Ayrıca; Alexandre ve ark.

(2014), bazı laktobasil suşlarının *P. aeruginosa* ÇA sistemini inhibe ettiğini, Varma ve ark. (2011), *Lactobacillus fermentum*'un salgıladığı bileşiklerle birçok *P. aeruginosa* suşunun gelişimini, sitotoksitesini, biyofilm oluşumunu ve elastaz üretimini inhibe ettiğini, Forestier ve ark (2008), oral olarak alınan *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 35 suşunun *P.aeruginosa* tarafından oluşturulan solunum yolu enfeksiyonunu anlamlı derecede geciktirdiğini, Valdez ve ark., (2005) *Lactobacillus plantarum*'un metabolitlerinin etkisiyle *P. aeruginosa* patojenitesini, elastaz ve biyofilm oluşumunu, ÇA sinyal molekülü oluşumunu (AHL) inhibe ettiğini saptamışlardır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmacılar tarafından belirlenen klinik *P. aeruginosa* suşlarındaki artan antibiyotik direnci, antibiyotik tedavisine yeni alternatiflerin bulunması arayışını doğurmuştur. Konak hasarına ve hastalığına sebep olan virulans faktörleri gibi enfeksiyon oluşumunda ana fonksiyonları hedef alan alternatif yaklaşımlar tedavi edici ajan gelişiminde en yeni stratejiler olarak sunulmaktadır. Bu yaklaşımların, bakteriyel hedeflerin genişletilmesi, konak endojen mikrobiyomunun korunması ve direnç azalması ile sonuçlanacak etkide seçicilik sağlama gibi birçok potansiyel avantajları bulunmaktadır. Virulans faktörlerinin düzenlenmesinin inhibisyonu üzerine araştırmalar daha çok ÇA sistemi üzerine odaklanmıştır (Cotar ve ark., 2013).

Dünya çapında birçok araştırmacı MDR *P. aeruginosa* suşlarının virulans ve patojenitesinin inhibisyonu amacıyla kullanılacak en uygun ÇA inhibitörünü bulmaya odaklanmıştır. Çoklu ilaç dirençli bakterilere karşı devam eden savaşta ÇA inhibitörleri yeni umut vaatmesine rağmen hala tam anlamıyla belirgin değildir ancak sonuçlar kesinlikle ümit vericidir. ÇA inhibitörleri birçok virulans faktörünün ekspresyonunu azaltarak düzenlemenin yanında aynı zamanda biyofilm oluşturan bakterilerin konvansiyonel antimikrobiyal tedaviye çok daha duyarlı hale gelmelerini sağlamaktadırlar. Şimdiye kadar çok sayıda ÇA inhibitörü incelenmesine rağmen, hipotiosiyamid dışında bu bileşiklerin hiçbiri *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde klinik uygulamalarda kullanılmamıştır (Bosgelmez-Tınaz, 2013 ve Georgi ve ark., 2011).

Bu çalışma kapsamında *Ped. acidilactici* M7 potansiyel probiyotik suşu tarafından salgılanan laktik asit, *P. aeruginosa* izolatlarının gelişimi üzerine inhibitör aktivite göstermiştir. Aynı zamanda ÇA sistemi kısa zincirli AHL molekülü olan C4-AHL'nin üretimini engellemiş ve ÇA sistemi tarafından düzenlenen kayma-yüzme-titrete, elastaz, proteaz, piyosiyanın ve biyofilm üretimleri üzerine belirli oranlarda inhibitör aktivite göstermiştir. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarıyla savaşta probiyotik mikroorganizmaların salgıladığı organik asitler tarafından patojen

mikroorganizmaların virulans faktörlerinin ekspresyonunu düzenleyen ÇA sisteminin inhibisyonu yeni bir silah olarak sunulmaktadır.

Bu çalışma, antimikrobiyal terapiye mikroorganizmaların doğal olarak ürettiği çözünebilir bileşiklerden yararlanılarak geliştirilecek yeni bir alternatif tedavi şekli oluşturması açısından önem arz etmektedir. Homo- ve heterofermentatif yapıda probiyotik suşlardan elde edilecek organik asitlerin sıklıkla kullanılan antipseudomonal tedavilerle birlikte hareket ederek patojen mikroorganizmaların ÇA sistemleri ve virulans faktörleri üzerinde inhibitör aktivitenin arttırılabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen verilere göre *P. aeruginosa* virulansının inhibisyonu için virulans faktörlerinin yanında *rhl* sistemini kontrol altında tutan *las* sisteminin yani bu sistemi uyaran 3-okso-C12-AHL sinyal molekülünün inhibisyonunun daha büyük virulans kayıplarına yol açacağı sonucuna varılmıştır. Probiyotik suşlardan elde edilecek daha güçlü organik asitleri içeren *las* sistemi inhibitörlerinin *P. aeruginosa* suşlarının attenüasyonunda ve enfeksiyonlarının eradikasyonunda antimikrobiyallerle birlikte kuvvetli ajanlar olarak yer alabilmesi yapılacak çalışmalarla desteklenmelidir.

ÖZET

***Pseudomonas aeruginosa* Çoğunluğu Algılama Sistemi Ve Virulans Faktörleri Üzerine Potansiyel Probiyotik Bir Suşun Organik Asitlerinin Etkisi**

Patojen bakteriler konağı enfekte etmek ve hastalık oluşturmak amacıyla bir seri virulans faktörü üretirler. Birçok farklı Gram negatif patojenin virulans faktörlerinin üretimini düzenlemek amacıyla N-açıl-homoserin lakton türevi sinyal molekülleri üretmek suretiyle birbirleriyle haberleştikleri bilinmektedir. Çoğunluğu algılama olarak adlandırılan bu olayın biyoluminesans, antibiyotik biyosentezi, plazmid konjugasyonu, virulans faktörlerinin üretimi, biyofilm oluşumu gibi bakteriye ait çeşitli faktörlerin düzenlenmesinde kullanıldığı belirlenmiştir. İnsanlarda farklı tipte pek çok enfeksiyona neden olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın virulans mekanizması da sinyal moleküllerinin üretimi doğrultusunda, çoğunluğu algılama sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Virulans faktörlerinin üretilmesi patojenitenin oluşturulması açısından önem taşımaktadır. Günümüzde biyoteknolojik çalışmalar, AHL antagonistlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Bu tip moleküllerin kullanımı bakteriler arası haberleşmenin bloke edilerek virulansın azaltılması ve dolayısıyla enfeksiyonların kontrolüne fırsat verecek yeni bir tedavi yaklaşımı olarak düşünülmektedir. Bu çalışma kapsamında izole edilen *Pediococcus acidilactici* suşunun potansiyel probiyotik özellikleri belirlenmiş ve suşun ürettiği laktik asitin miktar tayini yüksek başarımlı sıvı kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Laktik asitin sub-inhibitör konsantrasyonlarda klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının çoğunluğu algılama sistemi ve virulans faktörleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Laktik asitin, *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının kısa zincirli AHL üretimini engellediği ve ÇA sistemi tarafından düzenlenen kayma-yüzme-titrete, elastaz, proteaz, piyosyanin ve biyofilm üretimleri üzerine belirli oranlarda inhibitör aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Çoğunluğu algılama, *Pediococcus acidilactici*, *Pseudomonas aeruginosa*, Virulans faktör, YBSK

SUMMARY

Effects Of Organic Acids Produced By A Potential Probiotic Strain On *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing And Virulence Factors

Pathogen bacteria produce a series of virulence factors to infect host and cause diseases. It is known that many different Gram negative pathogen communicate with each other by producing N-acyl-homoserine lacton derivative signal molecules to regulate the production of virulence factors. It's been discovered that this communication method, named as quorum sensing, is used in the regulation of diverse bacterial factors like bioluminescence, antibiotic biosynthesis, plasmid conjugation and the production of virulence factors as biofilm formation. Virulence mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*, which causes various types of infections in humans, are also regulated by quorum sensing following the production of signal molecules. The production of virulence factors has importance in the pathogenity formation. Nowadays, biotechnological researches are focused on the development of AHL antagonists. The use of these types of molecules is considered to be a new treatment approach for blocking communication between bacteria and reducing virulence, therefore improving infection control. In this study, potential probiotic properties of isolated *Pediococcus acidilactici* strain was determined and a high performance liquid chromatography method was performed for quantification of its lactic acid. Lactic acid was combined with clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates at sub inhibitor concentrations to evaluate its effects on quorum sensing system and virulence factors. It has been determined that lactic acid has an inhibitory effect on short-chain AHL production and swarming-swimming-twitching motility, elastase, protease, pyocyanin and biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates that regulated by the quorum sensing system.

Keywords: *Pediococcus acidilactici*, *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum sensing, Virulans factor, HPLC

KAYNAKLAR

- ABBASILIASI S, TAN JS, IBRAHIM TAT, RAMAKRISHNAN RN, FAEZEH V, SHUHAIMI M, TAU CL, RAHA AR, ARBAKARIYA BA (2012). Isolation of *Pediococcus acidilactici* Kp10 with ability to secrete bacteriocin-like inhibitory substance from milk products for applications in food industry. *BioMed Central Microbiol*, **12**: 260-271.
- ABDELGHANY SM, QUINN DJ, INGRAM RJ, GILMORE BF, DONNELLY RF, TAGGART CC, SCOTT CJ (2012). Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Int J Nanomedicine*, **7**: 4053–4063.
- AÇIKGÖZ E (2012). Quorum quenching. *Orlab Online Mikrobiol Derg*, **10** (2): 22-44.
- ADAMO R, SOKOL S, SOONG G, GOMEZ MI, PRINCE A (2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialo GM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **30** (5): 627-634.
- AKOVA M (2005). Bakteriler arası iletişimin engellenmesi: umut vaad eden yeni bir antibakteriyel tedavi yaklaşımı. *ANKEM Derg*, **19** (2): 126-128.
- ALEXANDRE Y, LE BERRE R, BARBIER G, LE BLAY G (2014). Screening of *Lactobacillus spp.* for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. *BMC Microbiol*, **14**: 107.
- ALLEWELT M, COLEMAN FT, GROUT M, PRIEBE GP, PIER GB (2000). Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun*, **68**: 3998-4004.
- ALMASOUD A, HETTIARACHCHY N, RAYAPROLU S, BABU D, KWON YM, MAUROMOUSTAKOS A (2016). Inhibitory effects of lactic and malic organic acids on autoinducer type 2 (AI-2) quorum sensing of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *LWT - Food Sci Technol*, **66**: 560-564.
- ALPAK O (2011). Karbapenem Grubu Antibiyotiklerin (Meropenem, İmipenem, Ertapenem) Etkisi Altında Quorum Sensing Olumlu ve Olumsuz Quorum Sensing Olumsuz *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Konak Etken Etkileşiminin Araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, s. 49, İzmir.
- AMIN M, ADAMS M, BOLCH CJS, BURKE CM (2016). In vitro screening of lactic acid bacteria isolated from gastrointestinal tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as probiont candidates. *Aquacult Inc*, 1-14.

- AMMOR MS, FLOREZ AB, MAYO B (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol*, **24**: 559-570.
- AMMOR S, RACHMAN C, CHAILLOU S, PREVOST H, DOUSSET X, ZAGOREC M (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale producing traditional dry sausages. *Food Microbiol*, **23** (5): 373-382.
- ANAL AK, SINGH H (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Tech*, **18**: 240-251.
- API® (2007). API® 50 CHL Medium, REF 50 410. 07486G - fr - 2007/09.
- ATTRI P, JODHA D, GANDHI D, CHANALIA P, DHANDA S (2015). In vitro evaluation of *Pediococcus acidilactici* NCDC 252 for its probiotic attributes. *Int J Dairy Technol*, **68** (4): 533-542.
- BACUS JN, BROWN WL (1981). Use of microbial culture; meat products. *Food Technol*, **35** (1): 74-78.
- BARBOSA J, BORGES S, TEIXEIRA P (2015). *Pediococcus acidilactici* as a potential probiotic to be used in food industry. *Int J Food Sci Tech*, **50** (5): 1151-1157.
- BAUER AW, KIRBY WM, SHERRIS JC, TURCK M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, **45** (4): 493-496.
- BEGLEY M, GAHAN CG, HILL C (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev*, **29**: 625-651.
- BHOWMILK T, MARTHEH (1989). Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *J Dairy Sci*, **73**: 859-866.
- BILLOO AG, MEMON MA, KHASKHELI SA, MURTAZA G, IQBAL K, SHEKHANI MS, SIDDIQI AQ (2006). Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. *World J Gastroenterol*, **12**: 4557-4560.
- BİLER B (2009). *Pediococcus acidilactici* PBF Suşu Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, s.130, Ankara.
- BİLGEHAN H (2002). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 3. Baskı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir.
- BOŞGELMEZ-TINAZ G (2003). Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Turk J Biol*, **27**: 85-93.

- BOSGELMEZ-TINAZ G (2013). Disruption of bacterial cell-to-cell communication (quorum sensing): a promising novel way to combat bacteria-mediated diseases. *MÜSBED*, **3** (3): 159-163.
- BUSETTI A, SHAW G, MEGAW J, GORMAN SP, MAGGS CA, GILMORE BF (2015). Marine-derived quorum-sensing inhibitory activities enhance the antibacterial efficacy of tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine Drugs*, **13** (1): 1-28.
- CAPLICE E, FITZGERALD GF (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol*, **50** (1-2): 131-149.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2013). Antibiotic resistance threats in the United States. Erişim: [<http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>]. Erişim tarihi: 8 Kasım 2016.
- CHAMPAGNE C, FUSTIER P (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr Opin Biotech*, **18**: 184-190.
- CHARTERIS WP, KELLY PM, MORELLI L, COLLINS JK (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Protect*, **61**: 1636-1643.
- CHATTERJEE M, ANJU CP, BISWAS L, KUMAR VA, MOHAN CG, BISWAS R (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol*, **306** (1): 48-58.
- CHEN H, HOOVER DG (2003). Bacteriocins and their food applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **2**: 82-100.
- CHIFIRIUC MC, BLEOTU C, PELINESCU DR, LAZAR V, DITU LM, VASSU T, STOICA I, DRACEA O, AVRAM I, SASARMAN E (2010). Patterns of colonization and immune response elicited from interactions between enteropathogenic bacteria, epithelial cells and probiotic fractions. *Int J Biotechnol Mol Biol Res*, **1** (4): 47-57.
- CHIFIRIUC MC, DIȚU, LM, BANU O, BLEOTU C, DRĂCEA O, BUCUR M, LARION C, ISRAIL AM, LAZĂR V (2009). Subinhibitory concentrations of phenyl lactic acid interfere with the expression of virulence factors in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Roum Arch Microbiol Immunol*, **68** (1): 27-33.
- CHONG YM, YIN WF, HO CY, MUSTAFA MR, HADI AH, AWANG K, NARRIMA P, KOH CL, APPLETON DR, CHAN KG (2011). Malabaricone C from *Myristica cinnamomea* exhibits anti-quorum sensing activity. *J Nat Prod*, **74** (10): 2261-2264.
- CHRISTENSEN GD, SIMPSON WA, BISNO AL, BEACHE EH (1982). Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*, **37**: 318-326.

- COIN D, LOUIS D, BERNILLON J, GUINAND M, WALLACH J (1997). LasA, alkaline protease and elastase in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: Quantification by immunochemical methods. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **18**: 175-184.
- COLLINS MD, GIBSON GR (1999). Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr*, **69**: 1052-1057.
- COLLINS MD, WILLIAMS AM, WALLBANKS S (1990). The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rDNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* generation novel. *FEMS Microbiol Lett*, **70**: 255-256.
- COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**: 1318-1322.
- COŞKUN T (2006). Pro, Pre ve Sinbiyotikler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **49**: 128-148.
- COTAR AL, SAVIUC C, NITA R., BEZIRTZOGLU E, LAZAR V, CHIFIRIUC MC (2013). Anti-pathogenic Strategies for Fighting *Pseudomonas aeruginosa* Infections- Probiotic Soluble Compounds as Inhibitors of Quorum Sensing Genes Expression. *Curr Organic Chem*, **17**: 155-161.
- COWELL BA, TWINING SS, HOBDEN JA, KWONG MS, FLEISZIG SM (2003). Mutation of lasA and lasB reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells. *Microbiology*, **149** (8): 2291-2299.
- CZAJKOWSKI R, JAFRA S (2009). Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *ABP*, **56** (1): 1-16.
- ÇEKİN Y, KARAGÖZ A, KIZILATEŞ F, ÇEKİN AH, ÖZTOPRAK ÇUVALCI N, BÜLBÜLLER N, DURMAZ R (2013). Karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa*'ya bağlı bir hastane enfeksiyonu salgınının incelenmesi. *Mikrobiyol Bul*; **47** (4): 619-627.
- ÇELEBİ G, UYGUN A (2013). İntestinal mikrobiyota ve fekal transplantasyon. *Güncel Gastroenteroloji*, **17** (2): 148-157.
- ÇEVİK TEPELİ E (2009). *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında biyofilm yapımının ve quorum sensing'de rol alan genlerin araştırılması. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, s.85, Denizli.
- DAHL C (2011). Bacterial quorum sensing. Erişim: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacterial_Quorum_Sensing_by_CarolineDahl.jpg]. Erişim Tarihi: 9 Kasım 2016.

- DAMAYANTI E, JULENDRA H, SOFYAN A, HAYATI SN (2014). Bile salt and acid tolerant of lactic acid bacteria isolated from proventriculus of broiler chicken. *Media Peternakan*, **37** (2): 80-86.
- DANIELS R, VANDERLEYN J, MICHIELS J (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, **28** (3): 261–289.
- DE KIEVIT TR, GILLIS R, MARX S, BROWN C, IGLEWSKI BH (2001). Quorum sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol*, **67** (4): 1865-1873.
- DE KIEVIT TR, IGLEWSKI BH (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*, **68** (9): 4839-4849.
- DELIA P, SANSOTTA G, DONATO V (2002). Prevention of radiation-induced diarrhea with the use of VSL 3, a new high-potency probiotic preparation. *Am J Gastroenterol*, **97** (8): 2150-2152.
- DENNING GM, IYER SS, RESZKA KJ, O'MALLEY Y, RASMUSSEN GT, BRITIGAN BE (2003). 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**: 584-592.
- DENTON M, KERR K, MOONEY L, KEER V, RAJGOPAL A, BROWNLEE K, ARUNDEL P, CONWAY S (2002). Transmission of colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* between patients attending a pediatric cystic fibrosis center. *Pediatr Pulmonol*, **34**: 257-261.
- DERETIC V, SCHURR MJ, YU H (1995). *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends Microbiol*, **3** (9): 351-356.
- DESWAUX M, HEBRAUD M, TALON R, HENDERSON IR (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol*, **17**: 139-145.
- DEVI SM, ARCHER AC, HALAMI PM (2015). Screening, Characterization and In Vitro Evaluation of Probiotic Properties Among Lactic Acid Bacteria Through Comparative Analysis. *Probiotics Antimicrob Proteins*, **7** (3): 181-192.
- DEZIEL E, GOPALAN S, TAMPAKAKI AP, LEPINE F, PADFIELD KE, SAUCIER M, XIAO G, RAHME LG (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol*, **55** (4): 998–1014.
- DEZIEL E, COMEAU Y, VILLEMUR R. (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57 RP correlates with emergence of hyperpiliated and

highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming and twitching motilities. *J Bacteriol*, **183** (4): 1195-1204.

DOMINGUEZ-BELLO MG, COSTELLO EK, CONTRERAS M, MAGRIS M, HIDALGO G, FIERER N, KNIGHT R (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**: 11971-11975.

DONABEDIAN H (2003). Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect*, **46** (4): 207-214.

DONG YH, ZHANG LH (2005). Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *J Microbiol*, **43**: 101-109.

DOYLE TB, HAWKINS AC, MCCARTER LL (2004). The complex flagellar torque generator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **186** (19): 6341-6350.

DRINAN DF, TOBIN S, COGAN TM (1976). Citric acid metabolism in hetero and homofermentative lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **31** (14): 481-486.

DUBOIS V, ARPIN C, MELON M, MELON B, ANDRE C, FRIGO C, QUENTIN C (2001). Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of beta-lactam resistance. *J Clin Microbiol*, **39**: 2072-2078.

DUNNE C, O'MAHONY L, MURPHY L, THORNTON G, MORRISSEY D, O'HALLORAN S, FEENEY M, FLYNN S, FITZGERALD G, DALY C, KIELY B, O'SULLIVAN GC, SHANAHAN F, COLLINS JK (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. *Am J Nutr*, **73**: 386-392.

DURAND E, VERGER D, REGO AT, CHANDRAN V, MENG G, FRONZES R, WAKSMAN G (2009). Structural biology of bacterial secretion systems in gram-negative pathogens – potential for new drug targets. *Infect Disord Drug Targets*, **9**: 518-547.

DUŠKOVÁ M, KARPÍŠKOVÁ R (2013). Antimicrobial Resistance of Lactobacilli Isolated from Food. *Czech J Food Sci*, **31**(1): 27-32.

DÜZGÜN D (2009). Değişik kaynaklardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virulans faktörleri, biyofilm formasyonu ve quorum sensing yönünden değerlendirilmesi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s.66, Bursa.

ELLEBOUDY NS, ABOULWABA MM, ABDEL HALEEM HASSOUNA N (2014). Phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*; characterization of catalytic activity. *Asian Pac J Trop Med*, **7** (11): 860-866.

- ELMER GW, SURAWICZ CM, MCFARLAND LV (1996). Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA*, **275**: 870-876.
- EL-SHAER S, SHAABAN M, BARWA R, HASSAN R (2016). Control of quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* using phenylalanine arginyl β -naphthylamide. *J Med Microbiol*, **65** (10): 1194-1204.
- ERKKILÄ S, PETÄJÄ E (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci*, **55** (3): 297-300.
- EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (2014). EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 5.0. Erişim: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_4/Reading_guide_v_4.0_EUCAST_Disk_Test.pdf]. Erişim Tarihi: 9 Kasım 2016.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, **10** (6): 2740.
- EWASCHUK JB, DIELEMAN LA (2006). Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, **12**: 5941-5950.
- FEDORAK RN (2010). Probiotics in the management of ulcerative colitis. *Gastroenterol Hepatol*, **6** (11): 688-690.
- FELDMAN M, BRYAN R, RAJAN S, SCHEFFLER L, BRUNNERT S, TANG H, PRINCE A (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun*, **66**: 43-51.
- FENG J, WANG L, ZHOU L, YANG X, ZHAO X (2016). Using in vitro immunomodulatory properties of lactic acid bacteria for selection of probiotics against salmonella infection in broiler chicks. *PloS One*, **11** (1):1-14.
- FEUILLOLEY MGJ, DAGORN A, HILLION M, CHAPALAIN A, LESOUHAITIER O, DUCLAIROIR POC C, VIEILLARD J, CHEVALIER S, TAUPIN L, LE DERF F (2013). Gamma-aminobutyric acid acts as a specific virulence regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol (UK)*, **159** (2): 339-351.
- FIJAN S (2014). Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Int J Environ Res Public Health*, **11**: 4745-4767.
- FILLOUX A (2011). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution, and function. *Front Microbiol*, **2**: 155.

- FILLOUX A, BALLY M, BALL G, AKRIM M, TOMMASSEN J, LAZDUNSKI A (1990). Protein secretion in gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. *EMBO J*, **9**: 4323-4329.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). Guidelines for evaluation of probiotics in food: Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Erişim: [http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf?ua=1]. Erişim Tarihi: 9 Kasım 2016.
- FORESTIER C, GUELON D, CLUYTENS V, GILLART T, SIROT J, DE CHAMPS C (2008). Oral probiotic and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in intensive care unit patients. *Crit Care*, **12**: 69.
- FRAISE AP, MAILLARD JY, SATTAR S (2013). Russel, Hugo and Ayliffe's Principles and Practise of Disinfection, Preservation and Sterilization. Wiley-Blackwell Science, Oxford.
- FRANZ CMAP, DU TOIT M, VON HOLY A, SCHILLINGER U, HOLZAPFEL WH (1997). Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J Basic Microbiol*, **37** (3): 187-196.
- FULLER R (1989). Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, **66**: 365.
- FUQUA C, GREENBERG EP (2002). Listening In On Bacteria: Acyl-Homoserine Lactone Signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3** (9): 685-695.
- FUQUA C, WINANS SC, GREENBERG EP (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol*, **50**: 727-751.
- FUQUA WC, WINANS SC (1994). A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium Ti* plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol*, **176** (10): 2796-2806.
- GALLOWAY WR, HODKINSON JT, BOWDEN SD, WELCH M, SPRING DR (2011). Quorum sensing in Gram negative bacteria: small molecule modulation of AHL and Al-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev*, **111**: 28-67.
- GAN BS, KIM J, REID G, CADIEUX P, HOWARD JC (2002). *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *J Infect Dis*, **185**: 1369-1372.
- GARSA AK, KUMARIYA R, KUMAR A, LATHER P, KAPILA S, SOOD SK, KAPASIYA M (2014). In vitro evaluation of the probiotic attributes of two pediococci strains

producing pediocin PA-1 with selective potency as compared to nisin. *Eur Food Res Technol*, **239** (3): 491-499.

GARVIE EI (1986). Genus *Pediococcus* Claussen 1903. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, ed. SNEATH PHA, Vol. 2, Williams and Wilkins, 1075-1079, Baltimore.

GEORGI E, LE GUELLEC S, VECELLIO L, FICHANT E, STORDEUR P, BORDEAU P, PERRAUDIN JP (2011). Feasibility study of OSCN- and lactoferrin (Meveol) nebulization for cystic fibrosis patients. *J Cystic Fibros*, **10** (1): 18.

GLESSNER A, SMITH RS, IGLEWSKI BH, ROBINSON JB (1999). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl Quorum-Sensing systems in control of twitching motility. *J Bacteriol*, **181** (5): 1623-1629.

GUARNER F, SCHAAFSMA GJ (1998). Probiotics. *Int J Food Microbiol*, **39**: 237-238.

GUPTA SK, BERK RS, MASINICK S, HAZLET LD (1994). Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun*, **62**: 4572-4579.

GÜRSOY O, KINIK Ö (2005). Laktobasiller ve probiyotik peynir üretiminde kullanım potansiyelleri. *J Eng Sci*, **11** (3): 361-371.

HAAKENSEN M, VICKERS DM, ZIOLA B (2009). Susceptibility of *Pediococcus* isolates to antimicrobial compounds in relation to hop-resistance and beer-spoilage. *BMC Microbiol*, **9**: 190.

HALLER D, JOBIN C (2004). Interaction between resident luminal bacteria and the host: can a healthy relationship turn sour. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **38** (2): 123-136.

HANÇER AYDEMİR D (2012). Klinik *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çevreyi algılama sistemine tıbbi ve aromatik bitki özütlerinin etkisinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Doktora Tezi, s. 166, Isparta.

HARDER B (2002). Germs that do a body good. *Sci News*, **161**: 72-77.

HARRIGAN WF, MCCANCE ME (1976). Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press Inc., London.

HASSAN R, SHAABAN MI, ABDEL BAR FM, EL-MAHDY AM, SHOKRALLA S (2016). Quorum sensing inhibiting activity of *Streptomyces coelicoflavus* isolated from soil. *Frontiers in Microbiol*, **7**: 659.

HENTZER M, GIVSKOV M (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*, **112**: 1300-1307.

- HENTZER M, TEITZEL GM, BALZER GJ, HEYDORN A, MOLIN S, GIVSKOV M, PARSEK MR (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol*, **183**: 5395-5401.
- HESSLE C, ANDERSSON B, WOLD A (2000). Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic IL-12 while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun*, **68**: 3581-3586.
- HEYMAN M, MENARD S (2002). Probiotic microorganisms how they affect intestinal patophysiology. *Cell Mol Life Sci*, **59**: 1151-1165.
- HOLZAPFEL W, GEISEN R, SCHILLINGER RG (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol*, **24**: 343-362.
- HOWE TR, IGLEWSKI BH (1984). Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect Immun*, **43** (3): 1058-1063.
- HSIEH YP, OFORI JA (2007). Innovations in food technology for health. *Asia Pac J Clin Nutr*, **16** (1): 65-73.
- HUSAIN FM, AHMAN I, BAIG MH, KHAN MS, KHAN MS, HASSAN I, AL-SHABIB NA (2016). Broad-spectrum inhibition of AHL-regulated virulence factors and biofilms by sub-inhibitory concentrations of ceftazidime. *RSV Adv*, **6** (33): 27952-27962.
- IBRAHIM SA, YANG H, SEO CW (2008). Antimicrobial activity of lactic acid and copper on growth of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Chem*, **109**: 137-143.
- IGLEWSKI BH (1996). *Pseudomonas. Medical Microbiology*. 4th Ed. BARON S. Galveston TX. Erişim: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8326/>]. Erişim Tarihi: 9 Kasım 2016.
- IRANMANESH M, EZZATPANAH H, MOJGANI N, MAK T (2015). Characterization and Kinetics of Growth of Bacteriocin like Substance Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Ewe Milk and Traditional Sour Buttermilk in Iran. *J Food Process Technol*, **6**: 12.
- JAMALIFAR H, RAHIMI HR, SAMADI AR, SHARIFIAN Z, HOSSEINI F, ESLAHI H, FAZELI MR (2011). Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian J Microbiol*, **3** (1): 21-25.
- JOHANSEN HK, MOSKOWITZ SM, CIOFU O, PRESSLER T, HOIBY N (2008). Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*, **7**: 391-397.

- JOSHI S, KAUR A, SHARMA P, HARJAI K, CAPALASH N (2014). Lactonase-expressing *Lactobacillus plantarum* NC8 attenuates the virulence factors of multiple drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in co-culturing environment. *World J Microbiol Biotechnol*, **30** (8): 2241-2249.
- KABORÉ D, SAWADOGO-LINGANI H, DICKO MH, DIAWARA B, JAKOBSEN M (2012). Acid resistance, bile tolerance and antimicrobial properties of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional “maari” baobab seeds fermented condiment. *African J Biotechnol*, **11**: 1197–1206.
- KALLIOMAKI M, SALMINEN S, ARVILOMMI H, KERO P, KOSKINEN P, ISOLAURI E (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo controlled trial. *Lancet*, **357** (9262): 1076-1079.
- KAPER JB, SPERANDIO V (2005). Bacterial cell-to-cell signalling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun*, **73**: 3197-3209.
- KARATUNA O, YAĞCI A (2008). *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **38** (1): 42-51.
- KASTNER S, PERRETE V, BLEULER H, HUGENSCHMIDT G, LACROIX C, MEILE L (2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiol*, **29**: 145-155.
- KAUR G, SINGH TP, MALIK RK, BHARDWAJ A, DE S (2014). Antibacterial efficacy of nisin, pediocin 34 and enterocin FH99 against *L. monocytogenes*, *E. faecium* and *E. faecalis* and bacteriocin cross resistance and antibiotic susceptibility of their bacteriocin resistant variants. *J Food Sci Technol*, **51** (2): 233-244.
- KHALIL R, MAHROUS H, EL-HALAFawy K, KAMALY K, FRANK J, AN EL SODA M (2007). Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. *African J Biotechnol*, **6** (7): 939-949.
- KIM HS, PARK H, CHO IY, PAIK HD, PARK E (2006). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus polyfermenticus*, Bispán strain, modulates natural killer cell and T-cell subset populations and immunoglobulin G levels in human subjects. *J Med Food*, **9**: 321-327.
- KIM YG, LEE JH, KIM SI, BAEK KH, LEE J (2015). Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. *Int J Food Microbiol*, **195**: 30-39.
- KIPNIS E, SAWA T, WIENER KRONISH J (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infec*, **36**: 78-91.
- KITAHARA K (1974). Genus *Pediococcus*. In *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 8th Ed. BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Williams and Wilkins, “p.: 513-515”, Baltimore.

- KLAENHAMMER TR (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, **12**: 39-86.
- KOHLER T, CURTY LK, BARJA F, VAN DELDEN C, PECHERE JC (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol*, **182** (21): 5990-5996.
- KUTTY SK, BARRAUD N, HO KKK, ISKANDER GM, GRIFFITH R, RICE SA, BHADBHADHE M, WILLCOX MDP, BLACK DS, KUMAR N (2015). Hybrids of acylated homoserine lactone and nitric oxide donors as inhibitors of quorum sensing and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Org Biomolecul Chem*, **13** (38): 9850-9861.
- LAARMAN AJ, BARDOEL BW, RUYKEN M, FERNIE J, MILDER FJ, VAN STRIJP JAG, ROOIJAKKERS SHM (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *J Immunol*, **188**: 386-393.
- LAMONT IL, BEARE PA, OCHSNER U, VASIL AI, VASIL ML (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci*, **99**: 7072–7077.
- LEE J, ZHANG L (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, **6** (1): 26-41.
- LEE YK, SALMINEN S (1995). The coming age of probiotics. *Trends Food Sci Technol*, **6**: 241-245.
- LIMA ET, ANDREATTI FILHO RL, OKAMOTO AS, NOUJAIM JC, BARROS MR, CROCCI (2007). Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus spp.* isolated from chickens. *Can J Vet Res*, **71**(2): 103-107.
- LINDGREN SE, DOBROGOSZ WJ (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev*, **87**: 149-163.
- LOOMIS HF (2016). Digestion in the Stomach. Food Enzyme Institute. Erişim: [<http://www.foodenzymeinstitute.com/articles/digestion-in-the-stomach.aspx?list=bydate&print=yes>]. Erişim Tarihi: 8 Kasım 2016.
- LUCIARDI MC, BLAZQUEZ MA, CARTAGENA E, BARDON A, ARENA ME (2016). Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT- Food Sci Technol*, **68**: 373-380.
- MAH TF, O'TOOLE GA (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, **9** (1): 34-39.

- MAHENTHIRALINGAM E, CAMPBELL ME, SPEERT DP (1994). Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun*, **62**: 596-605.
- MAISRIA VB, LOS SANTOS YL, TUFENKJI N, DEZIEL E (2016). Cranberry-derived proanthocyanidins impair virulence and inhibit quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Reports*, **6**: 30169.
- MARAGKOUDAKIS PA, ZOUMPOPOULOU G, MIARIS C, KALANTZOPOULOS G, POT B, TSAKALIDOU E (2006). Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Dairy Products. *Int Dairy J*, **16**: 189-199.
- MATTICK JS (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*, **56**: 289-314.
- MCCLEAN KH, WINSON MK, FISH L, TAYLOR A, CHHABRA SR, CAMARA M, DAYKIN M, LAMB JH, SWIFT S, BYCROFT BW, STEWART GSAB, WILLIAMS P (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of acyl homoserine lactones. *Microbiology*, **143**: 3703-3711.
- MCKNIGHT SL, IGLEWSKI BH, PESCI EC (2000). The *Pseudomonas* Quinolone Signal Regulates rhl Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2702-2708.
- MESAROS N, NORDMANN P, PLESIAT P, ROUSSEL-DELVALLEZ M, VAN ELDERE J, GLUPCZYNSKI Y, VAN LAETHEM Y, JACOBS F, LEBECQUE P, MALFROOT A (2007). *Pseudomonas aeruginosa* resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*, **13** (6):560-578.
- MEYER JM (2000). Pyoverdines. Pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol*, **174** (3):135-142.
- MEYER JM, NEELY A, STINTZI A, GEORGES C, HOLDER IA (1996). Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, **64**: 518-523.
- MICHIELS T, WATTIAU P, BRASSEUR R, RUYSSCHAERT JM, CORNELIS G (1990). Secretion of Yop proteins by *Yersinia*. *Infect Immun*, **58**: 2840-2849.
- MOUSSA TAA, MOHAMED MS, SAMAK N (2014). Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. *Braz J Chem Eng*, **31** (4): 867-880.
- MUNGUÍA-VILLAVICENCIO P, MARTÍNEZ-TREJO MC, LOPEZ-PÉREZ J, VALDIVIA-ANDA G, FARRÉSGONZÁLEZ SARABÍA A, LORENTE-BOUSQUETS A (2015). In vitro evaluation of the antagonistic activity of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes*. *XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*.

- NIZALAPUR S, KIMYON Ö, BISWAS NN, GARDNER CR, GRIFFITH R, RICE SA, MANEFIELD M, WILLOX M, BLACK DS, KUMAR N (2016). Design, synthesis and evaluation of N-aryl-glyoxamide derivatives as structurally novel bacterial quorum sensing inhibitors. *Org Biomolecul Chem*, **14** (2): 680-693.
- NOOHI N, EBRAHIMIPOUR G, ROHANI M, TALEBI M, POURSHAFIE MR (2016). Evaluation of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of strains of *Pediococcus* species isolated from broiler chickens. *Br Poult Sci*, **57** (3): 317-323.
- OCAÑA V, SILVA C, NADER-MACIAS ME (2006). Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Vaginal Lactobacilli. *Inf Dis Obs Gynecol*, **2006**: 1-6.
- OH YJ, JUNG DS (2015). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. *LWT-Food Sci Technol*, **63** (1): 437-444.
- OHMAN DE, CRYZ SJ, IGLEWSKI BH (1980). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *J Bacteriol*, **142** (3): 836-842.
- OKORI BF (2014). Anti-pseudomonas activity of organic acids produced by lactic acid bacteria. *IBSPR*, **2** (9): 106-114.
- OLIVEIRA RIBEIRO MC, SOUZA VANDENBERGHE LP, RIGON SPIER M, PALUDO KS, SOCCOL CR, SOCCO VT (2014). Evaluation of probiotic properties of *Pediococcus acidilactici* B14 in association with *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 for application in a soy based aerated symbiotic dessert. *Braz Arch Biol Technol*, **57** (5): 755-765.
- OSMANAGAOGLU O, KIRAN F, ATAOGULU H (2010). Evaluation of in vitro probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF isolated from human breast milk. *Probiotics&Antimicro Prot*, **2**: 162-174.
- ÖNAL S (2005). Değişik klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında virulans faktörleri ve bu faktörlerin sentezlenmesinde rol oynayan bakteriyel iletişim “quorum sensing” sistemindeki sinyal moleküllerinin hastalık patogenezindeki rolü. Süleyman Demirel Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, s. 68, Isparta.
- ÖNEM E (2013). Çevreyi algılama (Quorum sensing) inhibitörü olarak tasarlanan moleküllerin etkileri üzerine çalışmalar. Süleyman Demirel Üniversitesi, Doktora Tezi, s.103, Isparta.
- ÖZCELİK S, KULEY E, ÖZOGUL F (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT-Food Sci Technol*, **73** (1): 536-542.

- PACIFICO L, OSBORN JF, BONCI E, ROMAGGIOLI S, BALDINI R, CHIESA C (2014). Probiotics for treatment of *Helicobacter pylori* infection in children. *World J Gastroenterol*, **20** (3): 673-683.
- PALLERONI NJ (2003). Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*, a personal view. *Microbiology*, **149** (1): 1-7.
- PAPENFORT K, BASSLER BL (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram negative bacteria. *Nature*, **14**: 576-588.
- PARK H, SHIN H, LEE K, HOLZAPFEL W (2016). Autoinducer-2 properties of kimchi are associated with lactic acid bacteria involved in its fermentation. *Int J Food Microbiol*, **225**: 38-42.
- PATRIQUIN GM, BANIN E, GILMOUR C, TUCHMAN R, GREENBERG EP, POOLE K (2007). Influence of quorum-sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **189** (22): 8357-8360.
- PEARSON JP, PESCI EC, IGLEWSKI BH (1997). Role of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in the control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol*, **179**: 5756-5767.
- PESCI EC, PEARSON JP, SEED PC, IGLEWSKI BH (1997). Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **179**: 3127-3132.
- PRANTERA C (2006). Probiotics for Crohn's disease: what have we learned? *Gut*, **55** (6): 757-759.
- QI WT, MA J, YU WT, XIE YB, WANG W, MA X (2006). Behavior of microbial growth and metabolism in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsules. *Enzyme Microb Tech*, **38**: 697-704.
- RAHAL JJ (2006). Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clin Infect Dis*, **43** (2): 95-99.
- RAJESH PS, RAI VR (2016). Inhibition of QS-regulated virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Pectobacterium carotovorum* by AHL-lactonase of endophytic bacterium *Bacillus cereus* VT96. *Biocatal Agric Biotechnol*, **7**: 154-163.
- RASHID MH, KORNBERG A (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97** (9): 4885-4890.
- RASKO D, SPERANDIO V (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov*, **9**: 117-128.

- RASMUSSEN TB, BJARNSHOLT T, SKINDERSOE ME, HENTZER M, KRISTOFFERSEN-KOTE M, NIELSEN J, EBERL L, GIVSKOV M (2005). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol*, **187** (5): 1799-1814.
- RASTALL R, GIBSON GR, GILL HS, GUARNER F, KLAENHAMMER TR, POT B, REID G, ROWLAND IR, SANDERS ME (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiol Ecol*, **52**: 145-152.
- RATTANACHAIKUNSOPON P, PHUMKHACHORN P (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Ann Biol Res*, **1** (4):218-228.
- RAY B, BHUNIA A (2013). Fundamental Food Microbiology. 5th Ed. CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton.
- REID G (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nut*, **73**: 4375-4435.
- ROOK GA, BRUNET LR (2005). Microbes, immunoregulation and gut. *Gut*, **54** (3): 317-320.
- RUIZ-MOYANO S, MARTÍN A, BENITO MJ, HERNÁNDEZ A, CASQUETE R, DE GUÍA CÓRDOBA M (2008). Safety and functional aspects of pre-selected pediococci for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Int J Food Sci Technol*, **45** (6): 1138-1145.
- RUMBAUGH KP, GRISWOLD JA, IGLEWSKI BH, HAMOOD AN (1999). Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun*, **67** (11): 5854-5862.
- SABUDA DM, LAUPLAND K, PITOUT J, DALTON B, RABIN H, LOUIE T, CONLY J (2008). Utilization of colistin for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, **19**: 413–418.
- SADIKOT RT, BLACKWELL TS, CHRISTMAN JW, PRINCE AS (2005). Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, **171** (11): 1209–1223.
- SAHNOUNI F, MATAALLAH-BOUTIBA A, BOUTIBA Z (2015). Antibacterial activity of marine bacteriocinogenic *Lactobacillus casei* Lb 28 against clinical pathogens including multidrug-resistant organisms (MDROs). *J Chem Pharm Res*, **7** (4): 987-991.
- SAKURAGI Y, KOLTER R (2007). Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **189** (14): 5383-5386.

- SALMINEN S, OUWEHAND A, BENNO Y, LEE KY (1999). Probiotics: How should they be defined?. *Trends in Food Sci & Technol Vol*, **10**: 107-110.
- SALYERS AA, WHITT DD (2002). Bacterial pathogenesis: a molecular approach. 2nd Ed. ASM Press, Washington, USA.
- SAMROT AV, AZEEMULLAH S, AZHARUDEEN S, SREE SAMANVITHA K, SAHAYA SNEHA J (2016). Quorum quenching activity of soil isolates against pigment producing *Pseudomonas aeruginosa* SU-8. *Der Pharmacia Lettre*, **8 (11)**: 224-229.
- SANDERS ME (2003). Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev*, **61 (3)**: 91- 99.
- SAVAGADO A, CHEIK ATO, BASSOLE HNI, TRAORE AS (2004). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. *Pakistan J Nutr*, **3**: 1174- 1179.
- SCHARFMAN A, ARORA SK, DELMOTTE P, VAN BRUSSEL E, MAZURIER J, RAMPHAL R, ROUSSEL P (2001). Recognition of Lewis x derivatives present on mucins by flagellar components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, **69 (9)**: 5243-5248.
- SCHUSTER M, GREENBERG EP (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics*, **8**: 287.
- SHAW PD, PING G, DALY SL, CHA C, CRONAN JRJE, RINEHART KL, FARRAND SK (1997). Detecting and characterizing acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94 (12)**: 6036-6041.
- SHROUT JD, CHOPP DL, JUST CL, HENTZER M, GIVSKOV M, PARSEK MR (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol*, **62 (5)**: 1264-1277.
- SIEGMUND I, WAGNER F (1991). New methods for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth in mineral agar. *Bio Techniques*, **5**: 265- 268.
- SKOGMAN ME, KANERVA S, MANNER S, VUORELA PM, FALLARERO A (2016). Flavones as quorum sensing inhibitors identified by a newly optimized screening platform using *Chromobacterium violaceum* as reporter bacteria. *Molecules*, **21 (9)**: 1211.
- SMITH RS, IGLEWSKI BH (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest*, **112**: 1460-1465.
- SOBIESZCZYK ME, FURUYA EY, HAY CM, PANCHOLI P, DELLA-LATTA P, HAMMER SM, KUBIN CJ (2004). Combination therapy with polymyxin B for the

- treatment of multidrug-resistant Gram-negative respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother*, **54**: 566–569.
- STAB E (2010). Why sequence *Vibrio fischeri*? Erişim: [<http://jgi.doe.gov/why-sequence-vibrio-fischeri/>]. Erişim Tarihi: 9 Kasım 2016.
- SULLIVAN A, NORD CE (2005). Probiotics and gastrointestinal diseases. *J Intern Med*, **257** (1): 78-92.
- SWENSON JM, FACKLAM RR, THORNBERRY C (1990). Antimicrobial susceptibility of vancomycin resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. *Antimicrob Agents Ch*, **34**: 543-549.
- TANG HB, DIMANGO E, BRYAN R, GAMBELLO M, IGLEWSKI BH, GOLDBERG JB, PRINCE A (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun*, **64** (1): 37-43.
- TEMMERMAN R, POT B, HUYS G (2002). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol*, **81**: 1-10.
- TODOROV SD, FURTADO DN, SAAD SMI, TOME E, FRANCO BDGM (2011). Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *J Appl Microbiol*, **110** (4): 971-986.
- TOUTAIN CM, ZEGANS ME, O'TOOLE GA (2005). Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **187** (2): 771- 777.
- TURHAN ERYILMAZ F (2011). Vajinal sekresyondan izole edilen laktik asit bakterine ait bazı suşların potansiyel probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora Tezi, s. 95, Ankara.
- TUNCER Y, ÖZDEN B, AVŞAROĞLU MD (2008). Bozanın bazı mikrobiyolojik özelliklerinin ve laktik asit bakterisi izolatlarının antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **12** (1): 19-25.
- UGURLU A, KARAHASAN YAGCI A, ULUSOY S, AKSU B, BOSGELMEZ-TINAZ G (2016). Phenolic compounds affect production of pyocyanin, swarming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed*, **6** (8): 698-701.
- UYMAZ B (2009). Probiyotik özellik taşıyan gıda ve insan kaynaklı laktobasillerin izolasyonu, tanımlanması ve bakteriyosin üretim yeteneklerinin karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s. 146, Ankara.

- UYMAZ B, ŞİMŞEK Ö, AKKOÇ N, ATAÖĞLU H, AKÇELİK M (2009). In vitro characterization of *Pediococcus pentosaceus* BH105 isolated from human faeces. *Ann Microbiol*, **59**: 485-491.
- VALDEZ JC, PERAL MC, RACHID M, SANTANA M, PERDIGON G (2005). Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clin Microbiol Infect*, **11**: 472-479.
- VANDERHOOF JA, WHITNEY DB, ANTONSON DL, HANNER TL, LUPO JV, YOUNG RJ (1999). *Lactobacillus GG* in the prevention of antibiotic associated diarrhea in children. *J Pediatr*, **135**: 564-568.
- VARMA P, NISHA N, DINESH KR, KUMAR AV, BISWAS R (2011). Anti-infective properties of *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **20**: 137-143.
- VASAVI HS, ARUN AB, REKHA PD (2016). Anti-quorum sensing activity of flavonoid-rich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Microbiol Immunol Infect*, **49** (1): 8-15.
- VEESENMEYER JL, HAUSER AR, LISBOA T, RELLO J (2009). *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med*, **37**: 1777-1786.
- VIDAL DR, GARRONE P, BANCHEREAU J (1993). Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human B- lymphocytes. *Toxicon*, **31**: 27-34.
- VISWANATHAN VK, HODGES K, HECHT G (2009). Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nat Rev Microbiol*, **7**: 110-119.
- WAGNER VE, IGLEWSKI BH (2008). *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clinic Rev Allerg Immunol*, **10**: 8079-8090.
- WATERS V, SMYTH A (2015). Cystic fibrosis microbiology: advances in antimicrobial therapy. *J Cyst Fibros*, **14**: 551-560.
- WU H, SONG Z, GIVSKOV M, DORING G, WORLITZSCH D, MATHEE K, RYGAARD J, HOIBY N (2001). *Pseudomonas aeruginosa* mutations in lasI and rhlI qs systems result in milder chronic lung infection. *Microbiol*, **147**: 1105-1113.
- WICK MJ, HAMOOD AN, IGLEWSKI BH (1990). Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol Microbiol*, **4** (4): 527-535.

- WILDERMAN PJ, VASIL AI, JOHNSON Z, WILSON MJ, CUNLIFFE HE, LAMONT IL, VASIL ML (2001). Characterization of an endo- protease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, **69**: 5385–5394.
- WILLIAMS P, CÁMARA M (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: A tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opi Microbiol*, **12 (2)**: 182-191.
- WILLIAMSON KS, RICHARDS LA, PEREZ-OSORIO AC, PITTS B, MCINNERNEY K, STEWART PS, FRANKLIN MJ (2012). Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *J Bacteriol*, **194**: 2062–2073.
- YAGCI A, YAGCI T, SENER B, SUZIKI Y, AHMED K (2007). Sulfatide mediates attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to human pharyngeal epithelial cells. *New Microbiol*, **30 (2)**:167-171.
- YAHN T L, GORANSON J, FRANK DW (1996). Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Mol Microbiol*, **22**: 991-1003.
- YESİLLİK S, YILDIRIM N, DİKİCİ A, YILDIZ A, YESİLLİK S (2011). Antibacterial effects of some fermented commercial and homemade dairy products and 0,9% lactic acid against selected foodborne pathogens. *Asian J Ani Vet Adv*, **6 (2)**: 189-195.
- YU D, ZHAO L, XUE T, SUN B (2012). *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an icaR-dependent manner. *BMC Microbiol*, **5 (12)**: 288.
- YURT GÖZE E (2009). Çeşitli bitki ekstratlarının *Pseudomonas aeruginosa*'da çevreyi algılama sistemi üzerine etkilerinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi. s. 70, Isparta.
- YÜRÜMEZ E (2011). Gayta örneklerinden izole edilen bazı laktik asit bakterilerinin probiyotik özellikleri. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, s. 123, Ankara.
- ZHOU JS, PILLIDGE CJ, GOPAL PK, GILL HS (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int J Food Microbiol*, **98**: 211-217.

EKLER

EK-1

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Pseudomonas aeruginosa çoğunluğu algılama sistemi ve virulans faktörleri üzerine potansiyel probiyotik Pediococcus acidilactici suşunun organik asitlerinin etkisi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Nurten ALTANLAR			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Farmasötik Mikrobiyoloji			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
DESTEKLEYİCİ				
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
	Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
	İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
	İlaç dışı klinik araştırma	☐		
	Diğer ise belirtiniz: Metadolojik Çalışma			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

M. Melli

ASTI GİRİŞİMİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
26 Mart 2015

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmaktadır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Pseudomonas aeruginosa çoğunluğu algılama sistemi ve virulans faktörleri üzerine potansiyel probiyotik Pediococcus acidilactici suşunun organik asitlerinin etkisi		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:05-196-15	Tarih: 23 Mart 2015		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>M. Melli</i>
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>C. Yurdaydin</i>
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>M. Gürel</i>
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>T. Özçelikay</i>
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>C. Atbaşoğlu</i>
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>S. Öztürk</i>
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>S. Sivri</i>
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>Z. Şenocak</i>
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>B. Çakır</i>
Doç.Dr.A. Ruhi SOYLU	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>A. Ruhi</i>
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>D. Öztuna</i>
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>S. Koçak</i>
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>N. Kutlay</i>
Uz.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>O. İlgili</i>
Mühür SUTAY	İşletme	-	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>M. Sutay</i>

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.



EK-2

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı:

Pseudomonas aeruginosa çoğunluğu algılama sistemi ve virulans faktörleri üzerine potansiyel probiyotik *Pediococcus acidilactici* suşunun organik asitlerinin etkisi

Araştırmanın anlaşılır adı(Halk diliyle):

İnsanlar için yararlı bir mikrobun (*Pediococcus acidilactici*) oluşturduğu asidik maddelerin hastalık yapan birtakım mikropların (*Pseudomonas aeruginosa*) haberleşmesi üzerine etkisi

Sorumlu Araştırmacı: Prof.Dr. Nurten ALTANLAR

Araştırmanın Yürütüleceği Yer: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

-Sayın veli

Bebeğinizin aşağıda konusu ve amacı belirtilmiş bir araştırma çalışmasına katılması istenmektedir. Bebeğinizin çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bebeğinize ait bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Eğer isterseniz, bebeğinizin bu çalışmaya katılmasıyla ilgili olarak hekiminiz/aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Araştırma için bebeğinizin gaita (dışkı) örneğine ihtiyacımız var. Araştırma için sizden veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumundan herhangi bir ücret talep edilmeyecektir.

Araştırmanın Konusu ve Amacı

Mikroplar, insan vücudunu hastalandırmak için birbirlerine küçük sinyaller göndererek haberleşir. Bu haberleşmeye çoğunluğu algılama denir. İnsanları hastalandıran birçok mikrobun birbiriyle haberleşerek hastalık oluşturduğu bilinir. Mikropları öldürmek için mevcut ilaçlar dışında farklı maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü aynı ilaçların sürekli kullanılması, o ilaçların mikropları öldürmemesine neden olmaktadır. Anne sütü ile beslenen bebek vücudunda, insanlar için yararlı birçok mikrop bulunmaktadır. Bu yararlı mikropların ürettiği birçok madde hasta olmamıza neden olan zararlı mikropları öldürücü etki göstermektedir. Bu çalışmada sadece anne sütü ile beslenen ve hiç antibiyotik tedavisi görmemiş yeni doğmuş bebek kakasından elde edilecek, insan sağlığına yararlı bir mikrobun oluşturduğu asitlerin hastalık yapan mikropların haberleşmeleri üzerine etkisi araştırılacaktır.

Araştırmada Uygulanacak Yöntemler

Steril bir kap verilerek bebeğinizin kaka örneğinin velisi (yasal temsilcisi) tarafından alınması istenecektir.

Bu işlem, hastada hiçbir risk oluşturmaz ve herhangi bir sağlık sorununa neden olmaz.

Araştırmanın Deneysel Kısımları ve Yararları

Araştırmamıza Ankara Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yenidoğan Polikliniği'nde doğan ya da kontrol amacıyla gelen, sadece anne sütü ile beslenen, 0-3 ay ve hiç antibiyotik tedavisi almamış 100 gönüllü yenidoğan katılımının olması beklenmektedir. Bebeğinizin araştırmaya katılım süreci kaka örneklerinin Ankara Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yenidoğan Polikliniği'nde alınması ile son bulacaktır.

-Alınan örneğin incelemesi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılacaktır.

Bu araştırmada bebeğinizin dışkısından elde edilecek yararlı bir mikrobun ürettiği asitlerin, insanlara zarar veren bir diğer mikrop grubunun hastalık yapma özelliklerini engelleyip engellemediği araştırılacaktır. İnsan vücudunda doğal olarak bulunan, yararlı bir mikrobun asitlerinin, zararlı mikroorganizmaların haberleşmesini engelleyerek hastalık tedavilerine yardımcı ve insan yararına kullanılabileceğinin belirlenmesi açısından bu çalışma önem arz etmektedir.

Kişisel Bilgilerin Kullanımı

Değerlendirmede bebeğinizin sadece anne sütü ile beslendiği, yaşı ve örneğin alındığı dönemden önce hiç antibiyotik tedavisi alıp almadığına dair bilgi alınacaktır.

İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Bakanlık ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişimleri bulunabilecektir. Yazılı bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunun imzalanması ile gönüllü ve/veya yasal temsilcisi söz konusu erişime izin vermiş olacaktır.

Bebeğinizden alınan tüm bilgiler gizli tutulacak, mahremiyete azami dikkat gösterilecektir.

☐ Araştırma kapsamında alınan bebeğinize ait biyolojik örneğini (dışkı) başka araştırmalarda kullanılıp kullanılmaması ile ilgili olarak lütfen aşağıdaki kutucukların uygun olanını işaretleyiniz.

Gönüllünün Bilgi Alabileceği Kişiler/Araştırmacılar:

1. Prof.Dr. Nurten ALTANLAR
Adres: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tandoğan/Ankara
Telefon: 05324424312
2. Arş.Gör. Uzm. Merve Eylül KIYMACI
Adres: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tandoğan, Ankara
Telefon: 05304589799
3. Doç.Dr. Ayşegül ZENCİROĞLU
Adres: Ankara Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yenidoğan Polikliniği, Babür Caddesi No:44, Altındağ, 06080 Ankara
Telefon: (0312) 305 6000

Çalışmaya Katılma Onayı

Ben.....

”*Pseudomonas aeruginosa* çoğunluğu algılama sistemi ve virulans faktörleri üzerine potansiyel probiyotik *Pediococcus acidilactici* suşunun organik asitlerinin etkisi” başlıklı araştırma ile ilgili hazırlanan bu bilgilendirilmiş olur formunu okudum ve anladım. Bebeğimin bu araştırmaya katılmasını kabul ediyor ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

*Araştırması kapsamında alınan bebeğimin biyolojik örneğinin (kaka)

- ☐ Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Gönüllü Adı Soyadı:		Tarih -
Adres ve Telefon:		
Alınan Numune Örneği	Gaita ☐	
Gönüllü Durumu		
	Yaş:	Cinsiyet:

Veli / Vasinin Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:
Adres ve Telefon:		

Araştırmacı* Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:
Adres ve Telefon:		

*:Gönüllüyü araştırma hakkında bilgilendiren kişi

EK-3



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü

Sayı : 64299502-604.01.03/E.46905

08.08.2016

Konu : 14L0237003 Kod Nolu Projenizin Sonuç
Raporu

Sayın Prof. Dr. Nurten ALTANLAR
Eczacılık Fakültesi Farmasotik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İlgi : 20.06.2016 tarihli yazınız.

Yöneticisi bulunduğunuz **14L0237003** kod nolu "**Pseudomonas aeruginosa çoğunluğu algılama sistemi ve virulans faktörleri üzerine potansiyel probiyotik Pediococcus acidilactici suşunun organik asitlerinin etkisi**" başlıklı **Lisansüstü Tez (Doktora)** projenize ait Sonuç Raporunuz, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun **05.08.2016** tarih ve **05** sayılı toplantısında alınan kararla **kabul** edilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine gösterdiğiniz ilgi ve gerçekleştirdiğiniz çalışma için teşekkür eder, araştırma sonuçlarının özellikle bilimsel atıf indekslerine giren uluslararası bilimsel dergilerde, nitelikli bir yayına dönüştürülmesi ve uygunluğu durumunda patent ve faydalı model haklarının alınmasına müracaatlarınızı beklediğimizi bir kez daha belirtmek isterim.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

NOT: BAP Komisyonumuz tarafından kabul edilen sonuç raporunuzun son halini kabul tarihinden itibaren en geç 1(bir) ay içerisinde Birimimizden temin ettiğiniz cilt kapağı ile ciltlenmiş ve CD ortamına yüklenmiş halde Koordinatörlüğümüze teslim etmeniz gerekmektedir.



e-imzalıdır

Prof. Dr. Erkan İBİŞ
Rektör

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

Ankara Üniversitesi Rektörlüğü-BAP- 06100 Tandoğan / Ankara /ANKARA
Telefon No: 0312 215 90 01
e-posta: -

Bilgi için: Levent KAÇMAZ
Bilgisayar İşletmeni
Telefon No: (312) 215 90 01-3145

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Merve Eylül KIYMACI
Doğum yeri ve tarihi : Çorlu, 1985
Uyruğu : TC
Medeni durumu : Evli
İletişim adresi ve telefonu : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tandoğan, Ankara/Türkiye, +90 312 203 31 88.

II- Eğitimi

Doktora : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2011-
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2008-2011
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2003-2007
Yabancı Dili : İngilizce

III- Ünvanları

Uzman : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2011

IV- Mesleki Deneyimi

Araştırma Görevlisi : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2009-

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

Banu Kaskatepe, **Merve Eylül Kıymacı**, Duygu Simsek, Hilal Basak Erol, Sinem Aslan Erdem (2016). "Comparison of the Contents and Antimicrobial Activities of Commercial and Natural Cinnamon Oils." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(3): 541-548.

Mujde Eryilmaz, Banu Kaskatepe, **Merve Eylül Kıymacı**, Hilal Basak Erol, Duygu Simsek, Aysen Gumustas (2016). "In vitro antimicrobial activity of three new generation disinfectants." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15 (10): 2191-2195.

Banu Kaskatepe, **Merve Eylül Kıymacı**, Serap Suzuk, Sinem Aslan Erdem, Salih Cesur, Sulhiye Yildiz (2016). "Antibacterial effects of cinnamon oil against carbapenem resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates". *Industrial Crops and Products*, 81 (2016): 191-194.

Merve Eylül Kıymacı, Aysen Gumustas, Mehmet Gumustas, Ahmet Akin, Sibel Aysil Ozkan (2015). "Comparative Study for the Determination of Gemifloxacin by HPLC and Microbiological Methods from Pharmaceutical Preparations and Biological Samples". *Current Pharmaceutical Analysis*, 11 (3): 193-200.

Merve Eylül Bozkurt Kıymacı, Banu Kaskatepe, Sukran Ozturk, Sulhiye Yildiz, Ahmet Akin (2014). "Correlation between antibiotic susceptibility and slime production of some staphylococci strains." *International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 1 (8): 91-95.

Merve Eylül Bozkurt, Ahmet Akin (2014). "Investigation of antimicrobial effects of some anesthetics." *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8 (2): 1009-1014.

ERYILMAZ M., **BOZKURT ME.**, YILDIZ MM., AKIN A (2010). "Antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* isolates." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9 (2): 205-209.

ERYILMAZ M., **BOZKURT ME.**, YILDIZ MM., AKIN A (2010). "Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz sıklığının araştırılması." *Marmara Eczacılık Dergisi*, 14: 10-12.

Bildirileri:

Banu Kaşkatepe, Serap Süzük, **Merve Eylül Kıymacı**, Sinem Aslan Erdem, Ayşe Nur Yazgan, Salih Cesur. "Sağlık Hizmetleri ile ilişkili enfeksiyon etkeni olarak izole edilen GSBL pozitif *Escherichia coli* izolatları üzerine kekik yağının antimikrobiyal etkinliğinin agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile araştırılması". 3. Ulusal Mikrobiyoloji Kongresi, 18-22 Kasım 2015, Belek-Antalya, Türkiye.

Merve Eylül Kıymacı, Nurten Altanlar, Ahmet Akin, Aysegul Zenciroglu. "Probiotic potential of *Pediococcus acidilactici* strains isolated from newborn faeces". International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD-15), October 15-17, 2015, Eskişehir, Turkey.

M. Eryilmaz, B. Kaskatepe, **M.E. Kıymacı**, H.B. Erol, D. Simsek, A. Gumustas. "Evaluation of In vitro antimicrobial efficacy of some new generation disinfectants". 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), June 9-12 2015, Ankara, Turkey.

M. Eryilmaz, B. Kaskatepe, **M.E. Kıymacı**, D. Simsek, H.B. Erol, A. Gumustas. "In vitro antimicrobial efficacy of four contact lens care solutions". 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), June 9-12 2015, Ankara, Turkey.

B. Kaskatepe, **M.E. Kiymaci**, S. Suzuk, S. Aslan Erdem, S. Cesur, S.Yildiz. "Antibacterial effects of Cinnamon oil against carbapenem-resistant nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates". 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), June 9-12 2015, Ankara, Turkey.

B. Kaskatepe, **M.E. Kiymaci**, S. Suzuk, A.N. Yazgan, S. Aslan Erdem, S. Cesur. "Antimicrobial properties of thyme and sage oils against some pathogens". 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), June 9-12 2015, Ankara, Turkey.

M.E. Kiymaci, N. Altanlar, A. Akin. "Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*". 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11), June 9-12 2015, Ankara, Turkey.

Banu Kaskatepe, **Merve Eylul Bozkurt**, Duygu Simsek, Hilal Basak Cuhadaroglu, Sinem Aslan Erdem, Sulhiye Yildiz. "Comparing the antimicrobial activities of various commercial essential oils of cinnamon and rosemary." International Conference on Antimicrobial Research (ICAR), October 1-3 2014, Madrid, Spain.

Aysen Gumustas, **Merve Eylul Bozkurt**, Mehmet Gumustas, Ahmet Akin, Sibel A. Ozkan. "Comparative Study for the Determination of gemifloxacin by HPLC and Microbiological Methods from Pharmaceutical Preparations and Biological Samples." 2nd International Conference on Analytical Chemistry, September 17-21, 2014, Targoviste, Romania.

Sezen Bilen Özyürek, Sinem Diken Gür, Işıl Seyis Bilkay, Nilüfer Aksöz, **Merve Eylül Bozkurt**. "Bitkisel yağların farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal ve antifungal etkilerinin araştırılması". 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir, Türkiye.

Merve Eylul Bozkurt, Nurten Altanlar, Ahmet Akin. "Kan örneklerinden izole edilen stafilocok suşlarının indüklenebilir klindamisin direncinin araştırılması". 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, 18-20 Nisan 2014, Harbiye-İstanbul, Türkiye.

Merve Eylul Bozkurt, Aysen Gumustas, Mehmet Gumustas, Ahmet Akin, Sibel A. Ozkan. "Microbiological and HPLC method for the determination of gemifloxacin in pharmaceutical preparations and biological samples." 20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques, October 6-9 2013, Tenerife Canary Islands, Spain.

Merve Eylul Bozkurt, Ahmet Akin. "An investigation of antibiotic susceptibility and inducible-beta lactamase (IBL) production of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from external auditory canal." Twelfth Congress of the International Federation of Infection Control, 10-13 October 2012, Zagreb, Croatia.

Merve Eylul Bozkurt, Ahmet Akin. "Investigation of antimicrobial effects of some anesthetics". 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-10) June 26-29, 2012, Ankara/Turkey.

Merve Eylul Bozkurt, Ahmet Akin. "An investigation of potential virulence factors of *Candida albicans*". 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-10) June 26-29, 2012, Ankara/Turkey.

ERYILMAZ, M., **BOZKURT M.E.**, YILDIZ M., AKIN A. "Antibiotic Resistance of Urinary Escherichia coli Isolates". 9th International Symposium On Pharmaceutical Sciences, 23-26 June 2009, Ankara, Turkey.

Kitap Bölümü:

Merve Eylül Bozkurt, Ahmet Akın. “Probiyotiklerin İnsan Sağlığındaki Rolü”. Eczacılıkta Yenilikler 2, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayın No:99, 2010, Ankara.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Projeler:

BAP Projesi	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Çoğunluğu Algılama Sistemi ve Virulans Faktörleri Üzerine Potansiyel Probiyotik <i>Pediococcus acidilactici</i> Suşunun Organik Asitlerinin Etkisi
Projedeki Araştırmacıların İsimleri	: Prof.Dr. Nurten ALTANLAR (Yürütücü) Arş. Gör. Merve Eylül KIYMACI (Araştırmacı)
Proje No	: 14L0237003
Bütçesi	: 25.000 TL
Başlangıç ve Bitiş tarihi	: 30.06.2014 - 30.06.2016

VIII- Diğer Bilgiler

Yönetmelik Görevleri:

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Burs Değerlendirme Komisyonu Üyesi, 02.01.2013 tarihinden beri devam ediyor.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Web Sayfası Sorumlusu, 17.12.2012 tarihinden beri devam ediyor.

Organizasyonlar:

11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11, 2015)- Sosyal Komite

European Association of Faculties of Pharmacy, Annual Conferance (EAFP- 2013)- Sosyal Komite

10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-10, 2012)- Sosyal Komite

Diğer Faaliyetler:

Merck Gıda Mikrobiyolojisi Semineri, 17 Mart 2016, Katılımcı.

İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitim Programı, 22 Haziran 2015, Katılımcı.

Avrupa Bilim ve Eğlence Günü, 2 Ekim 2015, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Görevli.

T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Kozmetik Analizleri Konferansı, 4 Aralık 2014, Hacettepe Üniversitesi Kültür Merkezi, Ankara. **Katılımcı.**

Ankara Üniversitesi Araştırma Görevlileri İçin Eğiticilerin Eğitimi Programı, 24 Kasım - 25 Aralık 2014, Ankara. **Katılımcı.**

Avrupa Bilim ve Eğlence Günü, 2013, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, **Görevli.**

Dijital Bilgi Okuryazarlığı Eğitim Programı, 25-26 Eylül 2012, **Katılımcı.**

