

**HAYVANSAL VE ÇEVRESEL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
HAREKETLİ *AEROMONAS* TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN
İNCELENMESİ**

Seral ORMANCI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HAZİRAN 2010
ANKARA**

Seral ORMANCI tarafından hazırlanan HAYVANSAL VE ÇEVRESEL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN HAREKETLİ *AEROMONAS* TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN İNCELENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Nihal YÜCEL

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Bu çalışma jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, H.Ü.

Doç. Dr. Nihal YÜCEL

Biyoloji Anabilim Dalı, G. Ü.

Doç. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN

Biyoloji Anabilim Dalı, G. Ü.

Tarih:/..../2010

Bu tez ile Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Seral ORMANCI

**HAYVANSAL VE ÇEVRESEL KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
HAREKETLİ *AEROMONAS* TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN
İNCELENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Seral ORMANCI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2010**

ÖZET

Bu araştırmada, su arıtma ve gıda işletim sistemlerinde potansiyel yüzey kolonizerleri olan *Aeromonas*'ların biyofilm oluşumunda önem arz eden bakteriler olmalarından dolayı, gıda ve çevresel kaynaklardan izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde farklı yüzeylerde biyofilm oluşumu ve türlere göre biyofilm oluşturma dereceleri incelenmiştir.

Biyofilm çalışma yöntemi olarak sıklıkla kullanılan standart mikropate (96 kuyucuklu plastik mikropate) yönteminin yanı sıra tüp (camda tutunma) testi ve Congo Red Agar (CRA) testleri ile çalışılmıştır. Mikropate yöntemiyle yapılan çalışmada farklı iki besiyeri ortamının sıvı (Tryptic Soy Broth, TSB ve Brain Heart İnfision Broth, BHIB) ve katı (Tryptic Soy Agar, TSA ve Brain Heart Infision Agar, BHIA) fazları kullanılmış ve katı besiyerlerinden alınan izolatların sıvı besiyerlerinden alınanlara göre daha iyi biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Ortam olarak ise TSA ve TSB' nin BHIA ve BHIB'ye göre *Aeromonas*'ların biyofilm oluşturmada daha etkili ortamlar oldukları saptanmıştır. Mikropate çalışmasında *A. veronii biovar sobria* tüm besiyeri ortamlarında kuvvetli derecede pozitif biyofilm oluşumunda ilk sırada iken, *A.*

hydrophila ikinci sıradadır. Aynı şartlar altında *A. caviae*'nın ise mikropate yüzeyinde tutunma göstermediği gözlemlenmiştir.

İkinci bir yöntem olan tüp (cam yüzeyde tutunma) testi yönteminde ise *A. veronii biovar sobria* %61,34, *A. hydrophila* ise %30,43 kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu gösterirken, *A. caviae* ise %100 zayıf pozitif biyofilm oluşumu göstermiştir.

Son olarak üçüncü metod olan Congo Red Agar (CRA)'da ise *A. veronii biovar sobria* %59, 37 ve *A. hydrophila* % 8,69 kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu gösterirken, *A. caviae*'nın %100 zayıf biyofilm oluşumu gösterdiği tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 203.1.010

Anahtar Kelimeler : *Aeromonas*, izolasyon, identifikasyon, biyofilm oluşumu, mikropate yöntemi

Sayfa Adedi : 100

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Nihal YÜCEL

**THE INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION BY MOTILE
AEROMONAS SPP. ISOLATED FROM ANIMAL AND ENVIRONMENTAL
SOURCES
(M. Sc. Thesis)**

Seral ORMANCI

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE
June 2010**

ABSTRACT

In this study, *Aeromonas spp.* were isolated from food and environmental samples for researching biofilm formation in distinct surfaces and adhesion levels of bacteria because of *Aeromonas* are potential surface colonizers in water distribution and food processing systems which have importance as a biofilm forming bacteria.

For biofilm forming, beside microplate method which uses frequently, we used tube (adhesion on glass) and Congo Red Agar test. In microplate method, two different media's liquid (Tryptic Soy Broth, TSB ve Brain Heart Infusion Broth, BHIB) and solid (Tryptic Soy Agar, TSA ve Brain Heart Infusion Agar, BHIA) phase were used and when isolated bacteria was taken from solid media, bacteria showed better biofilm formation than bacteria taken from liquid media. As culture media in biofilm formation, TSA and TSB are better media for *Aeromonas* biofilm formation capacity compare with BHIA and BHIB. Microplate method indicated that *A. veronii biovar sobria* is the first as a strong

biofilm producer bacteria in all media while *A. hydrophila* is the second. Under same conditions no biofilm was observed on microplate surface for *A. caviae*.

As a second method was tube test. *A. veronii biovar sobria* showed %61, 34 and *A. hydrophila* % 30,43 strong biofilm formation, while *A. caviae* showed %100 weak biofilm formation.

Finally, third method was Congo Red Agar. *A. veronii biovar sobria* showed %59, 37 and *A. hydrophila* % 8,69 strong biofilm formation, while *A. caviae* showed %100 weak biofilm formation.

Science code : 203.1.010
Key Words : *Aeromonas*, isolation, identification, biofilm formation,
microplate method
Page Number : 100
Adviser : Assoc. Prof. Dr. Nihal YÜCEL

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarını, maddi ve manevi her türlü desteğini benden esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Nihal YÜCEL'e, tezime olan değerli katkıları için sayın hocalarım Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR ve Doç. Dr. Neslihan GÜNDOĞAN'a, laboratuvarında başta asistan hocamız Dr. Ebru YILMAZ olmak üzere büyük bir uyum içinde çalıştığım ve her türlü maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma ve her zaman yanımda olan annem, babam ve aileme tüm katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISATMALAR.....	xvi
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. <i>Aeromonas</i>	3
2.1.1. <i>Aeromonas</i> 'ların sınıflandırılması.....	3
2.1.2. <i>Aeromonas</i> 'ların genel özellikleri	3
2.1.3. <i>Aeromonas</i> 'ların Virulans Faktörleri	5
2.1.4. <i>Aeromonas</i> enfeksiyonları.....	8
2.1.5. <i>Aeromonas</i> 'ların potansiyel kaynakları.....	11
2.2. Biyofilm.....	15
2.2.1. Biyofilmin tarihçesi.....	15
2.2.2. Biyofilm ve önemi.....	15
2.2.3. Biyofilm oluşum mekanizması.....	18
2.2.4. Biyofilm oluşumunun klinik olarak önemi.....	21
2.2.5. Biyofilm oluşumunun gıda endüstrisi açısından önemi.....	25
3. MATERYAL VE METOD.....	29

3.1. Hareketli <i>Aeromonas</i> Türlerinin İzolasyonu İçin Örneklerin Toplanması.....	29
3.2. <i>Aeromonas</i> 'ların İzolasyonu.....	29
3.3. Örneklerin Analiz Edilmesinde Kullanılan Besiyerleri.....	29
3.4. İdentifikasyon Testleri.....	31
3.5. Hareketli <i>Aeromonas</i> 'ların Cins Düzeyinde Ayırt Edici Testleri.....	32
3.5.1. Gram boyama.....	32
3.5.2. Oksidaz testi.....	32
3.5.3. Katalaz testi.....	33
3.5.4. O/129 dirençliliği.....	33
3.5.5. Tuzsuz ve tuzlu(%6,5) buyyonda üreme.....	33
3.5.6. Mannitol fermantasyon testi.....	34
3.6. Hareketli <i>Aeromonas</i> 'ların Tür Ayırıcı Testleri.....	35
3.6.1. KCN Broth Base'de üreme.....	35
3.6.2. Eskülin hidrolizi.....	35
3.6.3. Glikozdan gaz oluşturma.....	36
3.6.4. Salisin fermantasyonu.....	37
3.6.5. Hidrojen Sülfid (H ₂ S) testi.....	37
3.6.6. Voges-Proskauer testi.....	38
3.7. Biyofilm ölçümü.....	41
3.7.1. Mikroplate ile biyofilm ölçümü.....	41
3.7.2. Tüp (Camda tutunma) testi.....	47
3.7.3. Congo Red Agar (CRA) ile biyofilm ölçümü.....	49
4. BULGULAR.....	51
4.1. Mikroplate ile biyofilm ölçümü sonuçları.....	56

4.2. Tüpte (Camda tutunma) biyofilm ölçümü sonuçları	73
4.3. Congo Red Agar (CRA) ile biyofilm ölçümü sonuçları	76
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	81
KAYNAKLAR.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	100

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Gastroenterit ile ilişkili mezofilik <i>Aeromonas</i> türlerinde enfeksiyonlar ve oluşma sıklığı.....	8
Çizelge 2.2. Ekstraintestinal enfeksiyonlar ile ilişkili mezofilik <i>Aeromonas</i> türlerinde enfeksiyonlar ve oluşma sıklığı.....	9
Çizelge 3.1. Biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan aralıklar.....	47
Çizelge 4.1. Çeşitli kaynaklardan izole edilen hareketli <i>Aeromonas</i> izolatlarının çalışılan örnek sayısına göre dağılımı.....	51
Çizelge 4.2. Gıda ve çevresel örneklerinden izole edilen <i>Aeromonas</i> izolatlarının türlere göre dağılımı.....	52
Çizelge 4.3. İzole edilen <i>Aeromonas</i> türlerinin incelenen gıda örneklerine göre dağılımı.....	53
Çizelge 4.4. İzole edilen <i>Aeromonas</i> türlerinin incelenen çevresel örneklerine göre dağılımı.....	54
Çizelge 4.5. <i>A. hydrophila</i> ve <i>A. caviae</i> ATCC suşları.....	55
Çizelge 4.6. Gıdalardan izole edilen <i>Aeromonas</i> 'larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin TSA ve TSB'deki sonuçları.....	56
Çizelge 4.7. Gıdalardan izole edilen <i>Aeromonas</i> 'larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin BHIA ve BHIB'deki sonuçları.....	58
Çizelge 4.8. Çevresel örneklerden izole edilen <i>Aeromonas</i> 'larda biyofilm oluşumunun 570 nm'de ölçümlerinin TSA ve TSB'deki sonuçları.....	60
Çizelge 4.9. Çevresel örneklerden izole edilen <i>Aeromonas</i> 'larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin BHIA ve BHIB'deki sonuçları.....	65
Çizelge 4.10. Gıda ve çevresel örneklerden izole edilen hareketli <i>Aeromonas</i> türlerinde biyofilm oluşumunun besiyerlerine göre dağılımı.....	70

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.11. Gıda ve çevresel örneklerden izole edilen hareketli <i>Aeromonas</i> türlerinde biyofilm oluşumunun TSA ve TSB’de türlere göre dağılım oranı.....	71
Çizelge 4.12. Gıda ve çevresel örneklerden izole edilen hareketli <i>Aeromonas</i> türlerinde biyofilm oluşumunun BHIA ve BHIB’de türlere göre dağılım oranı	72
Çizelge 4.13. Gıda örneklerinden izole edilen hareketli <i>Aeromonas</i> türlerinde tüp (camda tutunma) testi sonuçları.....	73
Çizelge 4.14. Çevresel örneklerden izole edilen hareketli <i>Aeromonas</i> türlerinde tüpte biyofilm testi sonuçları.....	73
Çizelge 4.15. <i>A. hydrophila</i> (ATCC 7966) ve <i>A. caviae</i> (ATCC 15468) suşlarının tüpte biyofilm testi sonuçları	75
Çizelge 4.16. Tüp (cam yüzeyde tutunma) testi sonuçlarının <i>Aeromonas</i> türlerine göre yüzde olarak dağılımı.....	76
Çizelge 4.17. Gıda örneklerinden izole edilen hareketli <i>Aeromonas</i> türlerinde CRA testi sonuçları.....	77
Çizelge 4.18. Çevresel örneklerden izole edilen hareketli <i>Aeromonas</i> türlerinde CRA testi sonuçları	78
Çizelge 4.19. <i>A. hydrophila</i> (7966 ATCC) ve <i>A. caviae</i> (ATCC 15468) suşlarının CRA testi sonuçları.....	79
Çizelge 4.20. CRA testi sonuçlarının <i>Aeromonas</i> türlerine göre yüzde olarak dağılımı.....	79

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>A. caviae</i> Sch3N ve <i>A. hydrophila</i> AH-3 (doğal suşlar)'ün TSA (B ve D) ve BHIB'deki (A ve C) gelişimlerinin yüzey organellerine etkisinin elektron mikroskop görüntüsü	7
Resim 2.2. Biyofilmdeki oksijen dağılımı.....	16
Resim 2.3. Biyofilm oluşum mekanizması.....	19
Resim 3.1. GSP Agar' da üreyen <i>A. hydrophila</i> (ATCC 7966) ve <i>A. caviae</i> (ATCC 15468) suşları.....	31
Resim 3.2. GSP Agar' da üreyen <i>Aeromonas</i> spp.....	32
Resim 3.3. Mannitol fermantasyonu testi.....	34
Resim 3.4. Eskülin hidroliz testi.....	36
Resim 3.5. Glukozdan gaz oluşumu.....	37
Resim 3.6. Salisin fermantasyonu testi.....	37
Resim 3.7. Sisteinden hidrojen sülfid (H ₂ S) oluşumu testi.....	38
Resim 3.8. Voges-Proskauer testi.....	39
Resim 3.9. <i>Aeromonas</i> spp tanışmanmış kitler (API 20NE).....	38
Resim 3.10. <i>Aeromonas</i> izolatlarının mikropate ortamındaki inkübasyonu.....	41
Resim 3.11. Yıkama sonrası metanol fiksasyonu.....	42
Resim 3.12. Kristal viyole ile mikropatelerin boyanması.....	42
Resim 3.13. Boyama öncesi (A) ve sonrası (B) ters çevrilip kurumaya bırakılan mikropateler.....	43
Resim 3.14. Biyofilm oluşumunun mikropate tabanındaki görünümü.....	43
Resim 3.15. Tutunma olan yüzeylerde bakteri hücresinin tuttuğu boyanın geri çözülmesi.....	44

Resim	Sayfa
Resim 3.16. Safranin ile boyanan tüpte biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi.....	46
Resim 3.17. Kristal viyole ile boyanan tüpte biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi.....	47
Resim 3.18. Congo Red Agar’da biyofilm ölçümü.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
pH	Asitlik değeri
β	Beta
Cfu	Colony forming unit
°	Derece
gr	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
Lt	Litre
μ	Mikron
μ g	Mikrogram
ml	Mililitre
-	Negatif
+	Pozitif
C	Santigrat
NaCl	Sodyum Klorür

Kısaltmalar**APS****ATCC****BHIA****BHIB****CRA****GSP****PBS****TSA****TSB****Açıklama**

Alkali peptonlu su

American Type Culture Collection

Brain Heart Infusion Agar

Brain Heart Infusion Broth

Congo Red Agar

Glutamate Starch Phenol Red

Phosphate Buffered Saline

Tryptic Soy Agar

Tryptic Soy Broth

1.GİRİŞ

*Aeromonas*lar dünya genelinde hemen hemen tüm sucul ekosistemde yaygın olarak bulunan bakterilerdir. Sayıları kirlenmiş ve kirlenmemiş sucul çevrelerde hatta klorlanmış içme sularında dahi oldukça yüksektir [Araujo ve ark., 1991]. İçme suları ve gıdalar *Aeromonas* türleri için bir rezervuar olmalarından dolayı insan enfeksiyonlarında önemli kaynaklardır. Yapılan son çalışmalarda sucul çevrelerdeki insan enfeksiyonları *Aeromonas*'larla ilişkilendirilmiştir [Baddour, 1992; King ve ark., 1992; Ghanem ve ark., 1993]. Hareketli *Aeromonas* türleri, özellikle; *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *sobria* ve *A. caviae* gibi enteropatojen suşlar insanlarda, çoğunlukla çocuklarda ve immün sistemi baskılanmış kişilerde gastroenterit ve dizanterik enfeksiyonlara neden olmaktadır [Altwegg ve ark., 1991].

Aeromonas'ların virulans özellikleri içerisinde toksin üretimi, biyofilm oluşumu ve antibiyotik direnci gibi önemli virulans faktörler yer alır. *Aeromonas*'lar suda yaşayan bitki ve hayvanlarda olduğu kadar gıda işletim sistemleri ve su arıtma sistemlerinde de kolonize olur ve biyofilm oluşturular [Kirov ve ark., 2003]. Yapılan çalışmalar *Aeromonas*'ların neden olduğu kalıcı enfeksiyonlar ve %30'lara varan oranda gastroenterit enfeksiyonlarından biyofilm oluşumunun sorumlu olduğunu göstermiştir [Costerton ve ark., 1999; Gracey ve ark., 1982; Rautelin ve ark., 2001].

Aeromonas türleri polar ve lateral flegella olmak üzere iki farklı flagellar sisteme sahiptir. Polar flagella yüzme hareketinden sorumlu iken, çoğunlukla fenotipte ifade olan lateral flagella ise yüzeylere tutunmadan sorumludur. [Gavin ve ark., 2002; Rabaan ve ark., 2001]. Yapılan son çalışmalar *Aeromonas*'ların flagellalarının plastik yüzeylerde (mikroplate ölçümü) biofilm oluşturmasını kolaylaştırdığı kadar epitelyal hücre dizisi Hep-2'ye de tutunmasını kolaylaştırdığını göstermiştir [Gavin ve ark., 2003; Gavin ve ark., 2002; Rabaan ve ark., 2001].

Bu araştırmada etkili yüzey kolonizerleri olan *Aeromonas*’ların su artıma ve gıda işletim sistemlerinde biyofilm oluşumunda önem arz eden bakteriler olmalarından dolayı; gıda ve çevresel kaynaklardan izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde farklı yüzeylerde (plastik ve cam) biyofilm oluşumu ve türlere göre biyofilm oluşturma dereceleri incelenmiş ve sonuçların ileriki yıllarda yapılan çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Aeromonas*

2.1.1. *Aeromonas*'ların sınıflandırılması

Aeromonas cinsi, *Vibrionaceae* familyasında yer alan ve iki alt gruptan oluşan bir cinstir [Popoff, 1984]. İlk grup psikrofilik ve hareketsiz *Aeromonas*'ları kapsarken, ikinci grup ise mezofilik ve hareketli olanları kapsar. Bunlar; hareketsiz ve psikrofil *Aeromonas salmonicida* ve hareketli mezofilik olan *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii* ve *Aeromonas schubertii*'dir [Janda ve Abbott, 1996]. Von Gravenitz (1991), bazı yeni fenotipik türler tanımlamıştır. Bunlar DNA hibridizasyon çalışmalarıyla belirlenen *A. veronii biovar veronii* (eskülin hidrolizi ve ornitin dekarboksilaz pozitif) ve *A. veronii biovar sobria* (eskülin hidrolizi ve ornitin dekarboksilaz negatif)'dır [Von Gravenitz, 1991].

Yapılan son çalışmalara göre *Aeromonas*'ların ayrı bir familya olarak sınıflandırılması görüşü üzerinde durulmaktadır. Bu konuda *Aeromonas* türlerinin farklı bir ribozomal RNA kolonu oluşturmaları ve bundan dolayı da ayrı bir familya olarak incelenmesi gerektiği belirtilmiştir [Colwell ve ark., 1983]. Ayrıca ribozomal RNA-DNA hibridizasyonuna ve 5S rRNA diziliminden elde edilen genetik bilgilere bağlı olarak *Aeromonas*'ların *Aeromonadaceae* olarak ayrı bir familya şeklinde sınıflandırılmaları gerektiği ileri sürülmüştür [Popoff, 1984; Aytaç ve ark., 1992; Joseph ve Carnahan, 2000].

2.1.2. *Aeromonas*'ların genel özellikleri

Aeromonas'lar, Gram negatif, fakültatif anaerobik, spor ve kapsül oluşturmayan, uçları yuvarlak veya çomakçık şeklindeki mikroorganizmalardır. Optimal üreme ısısına ve hareketliliklerine göre iki gruba ayrılmışlardır. Birinci grup psikrofil ve hareketsiz *Aeromonas*'lar; ikincisi ise mezofil ve hareketli *Aeromonas*'lardır. Birinci gruptaki *Aeromonas* türleri *A. salmonicida*, *A. media*, *A. achromogenes* ve *A. masuocida* olarak adlandırılmıştır. İkinci gruptaki *Aeromonas*'lar ise fenotipik ve

genotipik farklılıklarına göre *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. schubertii*, *A. jandaeii*, *A. allosaccharophila*, *A. enteropelogenes*, *A. ichthiosmia* ve *A. eucrenophila* olarak ayrılmıştır [Allen ve ark.,1983]. Mezofilik türlerin insanlarda geniş çapta hastalıklara neden olduğu bilinirken, psikrofil türler genel olarak balık patojeni olarak bilinmekte ve insanlarda enfeksiyon oluşturup oluşturmadığı bilinmemektedir [Janda ve Abbott, 1996]. Mezofilik *Aeromonas* türleri genel olarak gastroenteritli hastalardan izole edilmektedir. Bu türler aynı zamanda sepsis, yara enfeksiyonları, solunum sistemi ve diğer sistemik enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir [Janda ve Duffey, 1988; Janda ve Abbott, 1996; Nichols, 1996]. Özellikle *A. caviae*, *A. hydrophila* ve *A. veronii biovar sobria* gastroenteritle en sık ilişkili olan *Aeromonas* türleridir [Joseph, 1996].

Hareketli *Aeromonas*'lar mikroskop altında incelendiklerinde değişik morfoloji ve büyüklükler gösterirler. Bazı suşları kısa çomak, bazıları ise ince ve uzun filamentöz şekilde görülebilirler. Çomak şeklinde olanlar genellikle 0,6x1-4,4 µm boyutlarında, filamentöz olanları ise 8 µm uzunluğunda olabilirler. Mikroskopta tek tek, ikili veya kısa zincirler halinde görülürler. Hareketli *Aeromonas*'lar sahip oldukları polar flagella sayesinde aktif hareketlidirler.

Hareketli *Aeromonas*'lar, kemoorganotrofikler ve hem oksidatif hem de fermentatif metabolik respirasyona sahiptirler. Vibriostatik ajan olan O/129'a (2,4 diamino 6,7, diisopropyl pteridine) karşı dirençlidirler. Oksidaz testinde pozitif olmasının dışında hareketli *Aeromonas*'ların birçok biyokimyasal reaksiyonu enterobakterilere benzemektedir. Tüm *Aeromonas*'lar birçok karbonhidratı fermente ederek bunlardan asit ve gaz meydana getirirler. Glikoz, maltoz, mannitol, trehaloz, fruktoz, galaktoz, sükroz, dekstrin ve mannitolü fermente ederek asit veya asit-gaz oluştururlar iken, rafinoz, dulsitol, ramnoz, malonat, ksiloz, inositol ve adonitolü fermente etmezler. Nitratları nitritlere indirgerler. Thiosülfattan hidrojen sülfür oluşturamazlar. Lipaz, nükleaz, amilaz, DNaz, esteraz, peptidaz, arilamidaz, sitokrom oksidaz, katalaz, fosfataz, arginin dehidrolaz, ve diğer hidrolitik enzimlere sahiptirler. Nişasta hidrolizi, jelatinaz aktivitesi ve Tween 80 pozitifdir. Temel hücresel yağ asitleri, "hexadecanoic" ve "octadecanoic" asitler olmakla beraber "3-

hydroxymyristic” ve “3-hydroxypentadecanoic” asitler de bulunabilir. Nutrient agarda 37 oC’de üreme pozitif, arginin dehidrolaz negatif, indol pozitifdir.

Kanlı agar, MacConkey agar gibi standart besi yerlerinde kolayca ürerler. Üreme ortamında % 2-3 oranında NaCl bulunması üremelerini kolaylaştırır; ancak ortamda % 6’nın üzerinde NaCl olması durumunda üremeleri baskılanmaktadır. Deniz suyu ve tatlı su örneklerinden *Aeromonas*’ların izolasyonunda ısrının üremeye fazla etkili olmadığını, lağım ve atık suların denizle ağızlaştığı yere yakınlığı ile orantılı olarak bakteri izolasyon oranlarının arttığı görülmüştür. *Aeromonas* cinsi bakterilerin izolasyonlarında ampiciline dirençli olmalarından faydalanılmakta, bu amaçla genellikle ampicilinli besiyerleri kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan Ampicilinli Kanlı Agar dışında, Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSPA) , Dextrin Fuchsin Sülfite (DFS) agar, *Aeromonas hydrophila* (AH) Agar, MacConkey Agar, Cefsulodin Irgasan Novobiosin (CIN) Agar ve Starch Ampicilline (SA) Agar besiyerleri kullanılmaktadır. Araştırmacılar ön zenginleştirmede alkali peptonlu su (APS), strontium hidrojen, selenit buyyon, strontium clorit B buyyon, tripticase soy buyyon, etrathionat buyyon ve potasyum tellürit kullanılmaktadırlar [Carnahan ve ark., 1991; Popoff,1984].

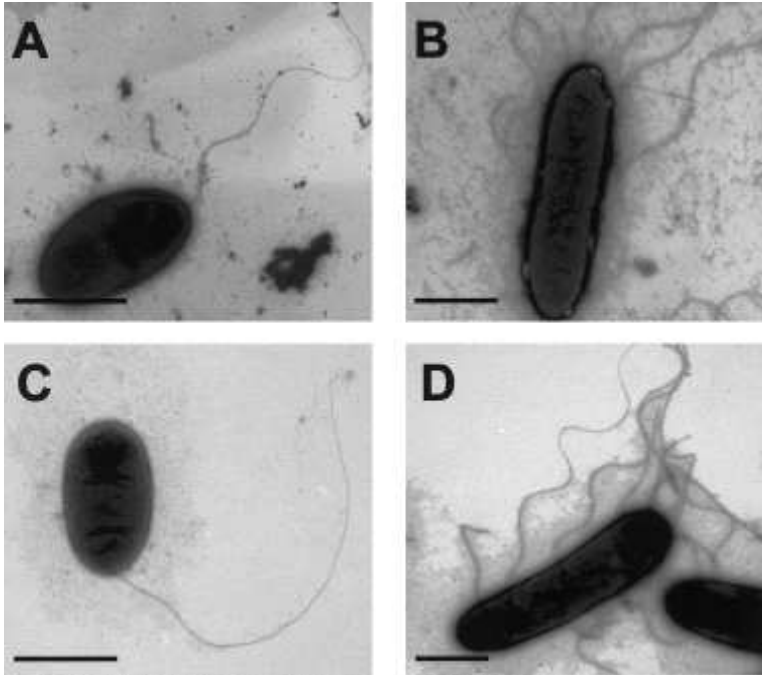
2.1.3. *Aeromonas*’ların virölans faktörleri

Aeromonas’ların değişik virölans faktörleri ve toksijenik mekanizmaları vardır. Bunlar arasında, enterotoksinler, hemolizinler (α , β), hemagglütininler, endotoksinler, yüzey adezinleri (fimbria, flagella ve pili) ve çeşitli proteazlar sayılabilir.

Aeromonas genomu sıklıkla enterotoksin Act, Alt ve Ast ve ayrıca hemolizin gibi virölans faktörleri içeren genleri kodlar. Act sitotoksik bir enterotoksin olarak *Aeromonas*’ların patojenitesinde önemli rol oynar [Xu ve ark., 1998]. Aynı zamanda Act kolera toksiniyle de oldukça yakından ilişkilidir. Ancak Alt ve Ast toksinleride sitotoksik olmalarına rağmen kolera ile ilişkili değildir [Albert ve ark., 2000; Ljungh ve ark., 1982].

Aeromonas'ların ürettiği diğer önemli toksinlerden biride hemolizinlerdir. Bunların da en önemlisi ısıya dayanıklı β hemolizin olarak bilinen aerolizinlerdir. Bu toksinler *A. hydrophila* ve *A. sobria* gibi *Aeromonas* türleri tarafından üretilmektedir [Janda, 1991]. Isıya duyarlı olan proteolitik α -hemolizin enziminin, infeksiyon patogenezindeki etkinliğinin düşük olduğu, eritrositlerin lizisinde etkili olduğu ve Vero hücrelerine sitotoksik etki yaptığı bildirilmektedir. *Aeromonas* infeksiyonlarında esas sitotoksik aktiviteden β -hemolizin sorumlu olup infeksiyon bölgesinde vasküler permeabilite artışı, ödem, nekroz ve ölümcül etkiye neden olmaktadır.

Aeromonas'ların enteroinvazivite (Hep-2 hücrelerine invaziflik) ve yapışma (yüzey adhezinleri ile) özellikleri de bulunmaktadır. Mezofilik *Aeromonas*'larda yüzme hareketinden sorumlu polar flagella insan ve balık hücre dizilerine invaziv olma ve tutunmadan sorumluyken [Gryllos ve ark., 2001; Merino ve ark., 1997; Rabaan ve ark., 2001; Thornley ve ark., 1996], *Aeromonas*'ların %50 ile %60' na yakın kısmı tarafından üretilen lateral flagella ise biyofilm oluşumundan sorumludur [Gavin ve ark., 2002]. Ayrıca *Aeromonas*'larda tip IV pili de hücre tutunmasından sorumlu bir virülans faktördür. Özellikle hemolitik üremik sendromla ilişkili (HUS) *Aeromonas*'larda virülans faktörler tip IV pili [Ivanaga ve Hokama, 1992; Kirov ve Sanderson, 1996] ve aerolizin toksini üretimidir [Howard ve Buckley, 1986; Van Der Goot ve ark., 1994].



Resim 2.1. *A. caviae* Sch3N ve *A. hydrophila* AH-3 (doğal suşlar)'ün TSA (B ve D) ve BHIB'deki (A ve C) gelişimlerinin yüzey organellerine etkisinin elektron mikroskop görüntüsü [Gavin ve ark., 2002]

Aeromonas proteazlarının da direkt doku zedelenmesine yol açarak veya invazifliği artırarak patojenitede rolü bulunmaktadır. *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* ve *A. veronii* genellikle gastrointestinal hastalıklardan, *A. schubertii*, *A. veronii*, *A. hydrophila* ve *A. sobria* ise kan ve enfekte yaralardan izole edilmiştir.

Cahil (1990), *Aeromonas* suşlarında insan ve hayvanlar için toksik etkiye sahip olan ısıya dayanıklı (LPS) endotoksinlerin bulunduğunu [Cahil, 1990]; Dooley ve ark., (1986) ve Kay ve Trust (1991), *Aeromonas*'lardaki yüzey proteinlerinin (S-layer) hayvanlar için esas virulent olabileceğini beyan etmişlerdir [Dooley ve ark., 1986], [Kay ve Trust, 1991]. Abbey ve Etang, (1988) proteazların direk doku zedelenmelerine yol açarak veya invazifliği artırarak hayvanlarda patojeniteye destek sağladıklarını bildirmişlerdir [Abbey ve Etang, 1988].

2.1.4. *Aeromonas* enfeksiyonları

İçme suları ve gıdalar *Aeromonas* türleri için bir rezervuar olmalarından dolayı insan enfeksiyonlarında önemli kaynaklardır. Halk sağlığı önemi açısından geniş sayıdaki *Aeromonas* türü temiz olmayan sularda gelişim gösterebilir. Yapılan son çalışmalarda sucul çevrelerde insan enfeksiyonları *Aeromonas*'larla ilişkilendirilmiştir [Baddour 1992; King ve ark., 1992; Ghanem ve ark., 1993]. *Aeromonas*'ların balık ve amfibi patojeni oldukları gibi insan sağlığında tehdit ettiği bilinmektedir [Lederberg ve ark., 1992]. Ayrıca *Aeromonas*'ların insanlarda fırsatçı patojen olduğu göz önünde bulundurulmaktadır. Genellikle; gastroenteritli, *Aeromonas* sepsisli, yara ve göz enfeksiyonlu hastalardan ve peritonit ve menenjit gibi çeşitli enfeksiyonlardan izole edilmektedirler. *Aeromonas*'lar gastrointestinal enfeksiyon etkeni olmakla beraber, çocuklarda akut ishale [Albert ve ark., 2000; Subashkumar ve ark., 2006] ve Afrika, Latin Amerika ve Asya gibi gelişmekte olan ülkelerde ise seyahat ishaline neden olmaktadır [Vila ve ark., 2003]. İntestinal enfeksiyonların yanı sıra *Aeromonas*'lar özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde hepatobilyer enfeksiyonlara neden olmaktadır [Clarck ve Chenoweth, 2003].

Çizelge 2.1. Gastroenterit ile ilişkili mezofilik *Aeromonas* türlerinde enfeksiyonlar ve oluşma sıklığı [Janda ve Duffey, 1988; Nichols ve ark., 1996].

Gastroenterit	Özellikleri	Oluşma sıklığı
Sekretuar	Akut sulu diyare, kusma	Çok yaygın
Dizanterik	Akut diyare kanlı ve mukuslu	Yaygın
Kronik	10 günden fazla devam eden diyare	Yaygın
Kolerik	Pirinç suyu feçes	Nadir

Çizelge 2.2. Ekstraintestinal enfeksiyonlar ile ilişkili mezofilik *Aeromonas* türlerinde enfeksiyonlar ve oluşma sıklığı [Janda ve Duffey, 1988; Nichols ve ark., 1996].

Ekstraintestinal enfeksiyonlar	Özellikleri	Oluşma sıklığı
Selülitis	Doku enflamasyonu	Yaygın
Miyonekroz	Gazlı yada gazsız gangren nekrozu	Nadir
Eritem gangrenozum	Nekrotik merkezli deri lezyonları	Yaygın değil
Septisemi	Ateş, üşüme, hipotansiyon	Oldukça yaygın
Peritonits	Karın zarı enflamasyonu	Yaygın değil
Pnömoni	Septisemi ve nekroz ile pnömoni	Nadir
Osteomyelit	Yumuşak doku enfeksiyonunu takip eden kemik enfeksiyonu	Nadir
Göz enfeksiyonları	Göz nezlesi, korneal ülser, endoftalmi	Nadir

Gastroenteritis

Son yıllarda yapılan çalışmalar hareketli *Aeromonas* türlerinin insanlarda önemli bakteriyel ishal etkenlerinden birisi olduğunu ortaya çıkarmıştır [Burke ve ark., 1984; Kirov ve ark., 1990]. Özellikle *A. caviae*, *A. hydrophila* ve *A. veronii biovar sobria* gastroenteritle en sık ilişkili olan *Aeromonas* türleridir [Joseph, 1996]. *A. hydrophila* ve *A. sobria* insanlarda iki tip gastroenteritise neden olmaktadır. Birincisi sulu dışkı, hafif ateşle seyreden kolera benzeri hastalık, ikincisi de dışkıda kan ve mukusla tanımlanan dizanteri benzeri klinik tablosudur. En sık görülen enfeksiyon tipi birincisidir. *A. caviae* ise daha sıklıkla 3 yaş altındaki çocuklarda gastroenterite neden olmaktadır.

Aeromonas'ların neden olduğu gıda kaynaklı zehirlenmelerde enfektif doz miktarı ve inkübasyon süresi hakkında henüz görüş birliğine varılamamasına rağmen şüpheli gıdalardan elde edilen *Aeromonas* sayısının 10^6 – 10^9 'a kadar çıktığı, bu olaylardaki inkübasyon süresinin ise 24-36 saat olduğu tespit edilmiştir.

Gray ve Griffith (1990), 2 yıl süresince inceledikleri 3766 insan dışkı örneğinin 91'inde (% 2,4) hareketli *Aeromonas*'ları belirlemişlerdir. Bu suşların 30'u *A. sobria*, 39'u *A. caviae* ve 25'i *A. hydrophila* olarak tanımlanmıştır [Gray ve Griffith, 1990].

Gray ve Sticler (1990), sığır ve domuz dışkı örneklerinden mezofilik *Aeromonas*'ları izole etmişler ve bu suşların % 52'sinin *A. hydrophila*, % 32'sinin *A. caviae*, % 16'sının *A. sobria* olduğunu bildirmişlerdir [Gray ve Sticler, 1990].

Kalıcı enfeksiyonlar ve %30 varan oranda *Aeromonas* gastroenterit enfeksiyonlarından biyofilm oluşumu sorumludur. [Costerton ve ark., 1999; Gracey ve ark., 1982; Rautelin ve ark., 2001]. İngiltere'de çocuk diyarel fecesinden izole edilen *A. caviae* suşunun yapılan çalışmalarda laringal epitelyal Hep-2 hücre dizisine tutunma gösterdiği görülmüştür [Wilcox ve ark., 1992].

Ekstraintestinal enfeksiyonlar

A. hydrophila, *A. caviae*, *A. sobria* gibi hareketli *Aeromonas* türleri çeşitli yara enfeksiyonları, göz enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, menenjit, sepsisemi, endokardit, pnömoni ve osteomyelit gibi bağırsak dışı hastalıklara neden olmaktadır [Roberts ve ark., 1996; Aytaç ve Özbaş, 1992; Palumbo ve ark., 1989].

Aeromonas'lar genellikle immün sistemi baskılanmış olan insanlarda sepsisemiye neden olur. *Aeromonas* sepsisemisi görülen insanların çoğunda genellikle karaciğer hastalıkları, kanser veya lösemi sonucu oluşan bozuk konakçı savunması vardır. Sepsisemi, bazen çevresel bir suyla kontamine olmuş bir yara enfeksiyonunu takip eder, bazen de cerrahi bir yara *Aeromonas* ile enfekte olur. Sepsisemi intestinal bölge kolonizasyonunun bir sonucu olarak da oluşabilir.

Yara enfeksiyonları genellikle *Aeromonas* ile kontamine olmuş sulara maruz kalan yaralarda meydana gelmektedir. Yara enfeksiyonlarına *A. hydrophila* ve *A. veronii* gibi türler sıklıkla neden olmaktadır [Huys ve ark., 1997]. Yara enfeksiyonları

abuk ilerlemekte ve eğer enfeksiyon sistemik hale gelirse ölümcül olabilmektedir. Yara enfeksiyonunun sonucunda sellitis, miyonekrozis ve eritem gangrenozumlar oluşur.

2.1.5. *Aeromonas*'ların potansiyel kaynakları

Çevresel kaynaklar

Aeromonas'lar dünya genelinde hemen hemen tüm sucul habitatlarda bulunurlar. Sayıları kirlenmiş ve kirlenmemiş sucul çevrelerde hatta klorlanmış içme sularında dahi oldukça yüksektir. Sucul çevrelerdeki mezofilik *Aeromonas*'ların ayırımı su kirliliğinin derecesine bağlıdır. *A. caviae* zellikle kanalizasyon ve yüksek derecede fekal kontaminasyona uğramış sulara baskın bir türdür [Araujo ve ark., 1991; Schubert, 1975; Stecchini ve Domenis, 1994]. Buna bağlı olarak daha az kirli sulara *A. hydrophila* ve *A. caviae* eşit bir dağılım gösterir. *A. sobria* kirlenmemiş sulara bulunabilir. Özellikle *A. caviae* besin değeri yüksek suların göstergesi olarak kabul edilebilir. Birkaç mezofilik *Aeromonas* türü sucul çevrelerde sezona bağlı varyasyonlar göstermektedir. Yılın daha sıcak olan aylarında *Aeromonas* populasyonu hem tatlı su göllerinde [Rippey ve Cabelli, 1989] hemde klorlanmış içme sularında [Burke ve ark., 1984] artış göstermektedir.

Yapılan bir araştırmada 147 doğal sucul habitatı, *Aeromonas* dağılımı açısından incelenmiş ve sıcak kaynak suları, aşırı tuzlu sular ve aşırı kirli dereler gibi birkaç ekstrem örnek dışında (135 tanesini) hepsini pozitif bulmuşlardır [Hazen ve ark., 1978]. *Aeromonas* varlığı bakımından pozitif bulunan bu 135 doğal su rneği, tuzluluk, iletkenlik, sıcaklık, pH ve bulanıklık bakımından çok değişen habitatlara aittir. Tuzlu su örnekleri tatlı sulardan, lotik çevrelerde (hızlı hareket eden) lentik çevrelerden (durağan) daha yüksek *Aeromonas* sayısına sahiptirler [Farmer ve ark., 1992]. *Aeromonas*'lar zorunlu denizel bir bakteri olmadığı halde, en yüksek sayı deniz ekosistemlerinin tatlı sularla etkileştiği yerlerde tespit edilmiştir [Nishikawa ve Kishi, 1988].

Aeromonas'lar insan gastrointestinal kanallarının geçici bir üyesidir ve insanlar *Aeromonas*'ların çevreye verilmesinde ana kaynak değildir. Ancak, insanlardan kanalizasyonlara geçen *Aeromonas*'lar uygun koşullarda kanalizasyon hattı boyunca çoğalarak, boşaltım noktasında önemli sayılara ulaşabilirler.

Aeromonas'lar esasen su kökenli mikroorganizmalar olmalarına karşın, özellikle suyla sık temas eden bölgelerin topraklarında da bu mikroorganizmalara rastlanmaktadır.

Gıdasal kaynaklar

Aeromonas'lar tavuk, biftek, domuz eti, kuzu eti ve süt gibi hayvansal ürünlerin buzdolabında bozulmaları ile ilişkilidir. Bozulmakta olan bu tip gıdalardaki dominant organizma *Pseudomonas* ssp. iken düşük sayıda *Aeromonas*'a da rastlanır. *A. hydrophila* fakültatif anaerobik bir organizma olduğundan dolayı değiştirilmiş atmosferle paketlenen ürünlerdeki *A. hydrophila* büyümesi büyük bir ilgi çekmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucu *Aeromonas*'ların hemen hemen bütün taze etlerde bulunduğu ve modifiye edilmiş atmosfer kullanarak buzdolabı sıcaklığında saklama süresinin uzatılmasının *Aeromonas*'ların çok yüksek sayılara ulaşmasına neden olduğu bulunmuştur [Abeyta ve Wekell 1988].

Aeromonas'ların sütlerde bulunduğu dair yapılan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Freitas ve ark. (1993), Brezilya'da yaptıkları çalışmada pastörize süt örneklerinin %28,5'inden ve beyaz peynir örneklerinin %32'sinden *Aeromonas* izolasyonu yaptıklarını bildirmişler ve bu kontaminasyonun pastörizasyon sonrası gerçekleştiğini göstermişlerdir [Freitas ve ark., 1993].

Palumbo ve arkadaşları 1985'de yaptıkları çalışmada çiğ süt örneklerinde başlangıçta *Aeromonas* türüne rastlanmazken, 5°C'de buzdolabında 7 gün saklamadan sonra 10^3 - 10^4 org/ml oranında *Aeromonas* spp. saptamışlardır [Palumbo ve ark., 1985].

Aeromonas'lar buzdolabı sıcaklığında da büyüme yeteneğine sahip olduklarından ve buzdolabında saklama sırasında yüksek sayılara ulaşabileceklerinden dolayı bu tip ürünlerde bulunan az sayıdaki *Aeromonas* spp. de sağlık açısından önemlidir.

Kirov ve arkadaşları 1993 yılında çiğ ve pastörize süt ürünlerinde *Aeromonas* türlerinin bulunma sıklığı ile bazı virulans özelliklerini ve *Aeromonas*'ların gastrointestinal enfeksiyonların meydana gelmesinde sütün potansiyel bir kaynak olup olmadığını araştırmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada *Aeromonas*'ları 72 çiğ süt örneğinin 43'ünden (% 60), 183 pastörize süt örneğinde 7'sinden (% 4) izole etmişlerdir. Çiğ süt örneklerinden izole edilen suşların büyük bir kısmı *A. hydrophila*, pastörize süt örneklerinden de % 42'si *A. sobria* olarak tanımlanmışlardır. Kirov ve arkadaşları pastörize süttten izole ettikleri bazı *Aeromonas* suşlarının diare ile ilgili olduklarını ve 37°C'de ekzotoksin ürettiklerini belirlemişlerdir [Kirov ve ark., 1993].

Aslında balıkların doğal olarak taşıdıkları patojen bakterilerin sayısı azdır, patojen bağırsak bakterileri balıklara kirli sulardan bulaşabildikleri gibi, tüketiciye ulaşana kadar geçen süre içerisinde çevre elemanlarından ve taşıyıcı kişilerden de bulaşabilir. *Aeromonas*'lar balıklarda küçük yüzeysel lezyonlar, pulların dökülmelerine, lokal kanamalar ve sepsisemiye kadar uzanan hastalıklara hatta ölümlere yol açmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalarda sulardaki *Aeromonas* yoğunluğu ile balıklardaki salgın hastalıklar ve ölümler arasında bir ilişki gözlemlendiği de bulunmuştur [Hazen ve ark., 1978].

Balıklarda doğal enfeksiyonların genellikle ilkbahar ve yaz aylarında ortaya çıktığı, buna sebep olarak da ilkbaharda su ısısının ani yükselmesi ve yaz aylarında düşük oksijen seviyesi gösterilmektedir. Enfeksiyonun şiddeti üzerinde çevresel koşulların önemi büyüktür. Bu faktörler arasında, kalabalık, anormal olarak yüksek ya da alçak su ısısı, kıştan yaza geçiş durumları, açlık ve kötü beslenme, oksijen yetersizliği, kabaca elle yakalama sonucu pulların kaybı ve aşınmalar, ektoparazitler tarafından meydana getirilen lezyonlar sayılmaktadır. Hastalığın inkübasyon periyodunun, balık türü ile direncine ayrıca çevre koşulları ile mevsimlere bağlı olduğuda bildirilmiştir.

Bu sürenin doğal enfeksiyonlarda 2-4 gün olduğu deneysel enfeksiyonlarda ise 8-48 saat arasında bir değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Ölmek üzere olan hasta balıklardan ve sağlıklı görünen balıklardan da *Aeromonas*'lar izole edilmiş ve isolatların büyük bir kısmının enterotoksin, hemolizin ve proteaz ürettiği bu suşların aynı zamanda adhezyon yeteneğine sahip olduğu da bildirilmiştir [Lallier ve ark., 1984; Rahim ve ark., 1984; Santos ve ark., 1988].

Aeromonas'ların bilinen en yaygın kaynaklarından. Bu organizmalar sağlıklı balıkların doku ve intestinal floralarının da bir üyesidir. Diğer bir bilinen kaynak ise deniz kabukluları, özellikle de istiridyelerdir. Genel olarak deniz kabukluları gıda kökenli hastalıklarla ilişkili aracılar olarak bilinirler. ABD'de 1900'den beri 11,600'ün üzerinde deniz kabuklusu kökenli salgının etkeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak bunların sebebinin viral patojenler, *Vibrio* spp. ve *A. hydrophila* ile ilişkili oldukları tahmin edilmektedir [Abeyta ve Wekell, 1988].

İnsanlar

Aeromonas türlerinin bir kaynağı da besinlerin işlenmesinde çalışan asimptomatik insanlardır. *Aeromonas*'ların asimptomatik taşıyıcılardan ve besinlerden bulaşması immün sistemi baskılanmış insanlar için en büyük tehlikeyi oluşturur [Abeyta ve Wekell, 1988].

A. hydrophila insan gaitalarından diğer bağırsak patojenleri ile beraber izole edilirken bazı durumlarda da tek enterik patojen olarak izole edilmiştir [Koehler ve Ashdown, 1992]. Yine *Aeromonas*'ların gastroenteritisli çocuklardan, sağlıklı çocuklardan olduğundan çok daha fazla sıklıkta izole edildiği ve hasta olmayan insanlardan izolasyonunun nadir olduğu bildirilmiştir [Berrang ve ark., 1989].

2.2. Biyofilm

2.2.1. Biyofilm tarihçesi

Biyofilm kavramı, ilk olarak 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek'un kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları tespit etmesi ile ortaya çıkmıştır. Uzun yıllar konu üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamasına karşın, biyofilmler ve özellikleri ile ilgili genel teori 1978' den sonra artarak bildirilmeye başlanmıştır [Costerton ve ark., 1978]. O zamandan beri biyofilm yapısı, oluşum nedeni ve mekanizması ile ilgili çalışmalar hızla ilerlemiş olup biyofilmlerin varlığı derin yeraltı suları ve okyanusun derinleri dışında tüm doğal ekosistemlerde saptanmıştır [Costerton ve ark., 1995].

İlk defa Zobell tarafından kullanılan slide teknikleri 1943 yılında araştırmacı tarafından biyofilmler hakkında ilk yayının da yapılmasından sonra [Zobell, 1943], 70'lerin sonunda bu fenomenin tüm doğal alanlarda evrensel olarak var olduğu fark edilmiştir. Marshall 1976 yılında çok ince ekstrasellüler polimer fibrillerin bakteri yüzeyine sabitlendiğini bildirmiştir [Marshall, 1976]. 1978 yılında ise Costerton ve arkadaşları su sistemlerindeki bakteri topluluklarının, doğal olarak polisakkarid içinde bulunurken, yapışmış bakteri topluluklarının glikokaliks matriks içinde bulunduğunu ve bu matriks yapısının adezyona aracılık ettiğini gözlemlemişlerdir [Costerton ve ark., 1978]. Yine aynı araştırmacı 1987 yılında biyofilmin daha çok aniyonik eksopolimer matriksden oluşan oldukça hidrate yapı içinde sessil hücreler ve mikrokolonilerden oluştuğunu bildirmiştir [Costerton ve ark., 1987]. 1995'e gelindiğinde Costerton ve Lappin-Scott, bakterilerin biyofilm oluşturmalarının ve adezyonunun bir kısım spesifik genler tarafından düzenlendiğini bildirmişlerdir [Costerton ve Lappin-Scott 1995].

2.2.2. Biyofilm ve önemi

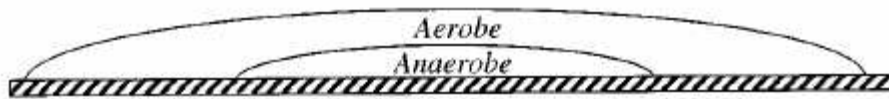
Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin

yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu bir organizasyondur [Post ve ark., 2002].

Biyofilmin temel birimi “mikrokoloniler”dir. Mikrokoloniler bir veya birkaç türden bakteri hücresinden oluşurlar. Mikrokolonilerin %10-25’i hücrelerden, %75-90’ı ise EPS matriksinden oluşmaktadır. Mikrokoloniler çoğunlukla “mantar benzeri şekil”e sahip yapı olarak tanımlanırlar.

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

Biyofilm büyüdüğünde, polimer matris içerisinde enkapsüle edilen mikroorganizma sayısı artar. Biyofilm yapısının şekillenmesinde, difüzyon baskın faktör haline gelir. İç tarafta kalan mikroorganizmalar oksijen, besin ve üreme ortamı açısından yüzeydekilere nazaran dezavantajlı konumdadırlar. Bu nedenle film yapısında başlangıçta aerobik mikroorganizmalar çoğunlukta iken, aerobik mikroorganizmaların sayıca artış göstermeleri sonucunda ortamdaki oksijen miktarı hızlı bir biçimde düşer ve oksijen noksanlığında anoksik bölge oluşumu gerçekleşir [Greenberg ve ark., 1999].



Resim 2.2. Biyofilmdeki oksijen dağılımı.

Yapılan araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel

toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur [Davey ve O'Toole, 2000]. Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan 'su kanallarına' sahip, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler [Donlan ve Costerton, 2002]. Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaridler biyofilmin ana ekstrasellüler içeriğini oluşturur. İçerisinde yaşayan organizmaya bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler taşıyabilir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilmler oluşturduğu ve Gram pozitif bakterilerin katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir.

Sonuç olarak Donlan ve Costerton biyofilm tanımını biraz daha geliştirmiş ve elde edilen bilgiler ışığında biyofilmleri;

- Hücreleri geri dönüşümsüz olarak bir substrata, ara yüzey veya birbirlerine tutunmuş olan,
- Kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülmüş,
- Büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıkları olan mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamışlardır [Donlan ve Costerton, 2002].

Bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka biyofilm yapısının özelliklerini taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısında olmayan topluluklar, bulundukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedirler. Bunlarda biyofilm içerisindeki bakterilerde gösterilen rezistans ve geri dönüşümsüz yapışma gibi özellikler bulunmamaktadır. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki bakterilerinde zamanla matriksten koparak ayrıldıkları, dolaşıma geçtikleri ve planktonik formda olmalarına rağmen, ayrıldıkları topluluğun tüm rezistans karakterlerini taşıdığı bildirilmiştir. Mikroorganizmaların serbest formdan biyofilme geçişlerinin dört temel nedeni olduğu düşünülmektedir. Birinci neden, mikroorganizmaların kendilerine daha korunaklı bir ortam yaratma

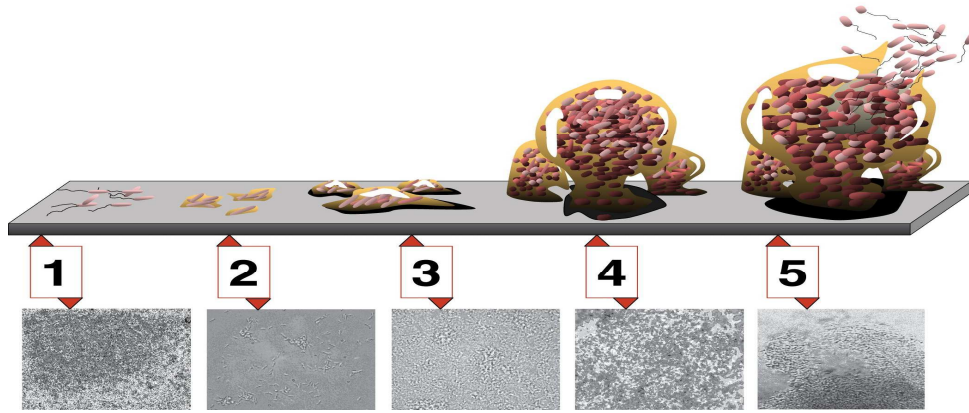
gereksinimidir ve bu durum “koruma” olarak tanımlanmaktadır. İkinci neden; mikroorganizmalar kendilerine besin miktarı bakımından bol bir çevre oluşturmaktadırlar ve bu da “kolonizasyon” olarak tanımlanmaktadır. Üçüncü olarak mikroorganizmalar ortak yaşamın yararlarından faydalanmaktadırlar ve bu “birliktelik (symbiosis)” olarak tanımlanmıştır. Dördüncü olarak ise mikroorganizmalar biyofilm şeklinde üremektedirler, serbest koloniler belirli bir değerden sonra üreme sürecini durdurmaktadırlar [Jefferson, 2002].

2.2.3. Biyofilm oluşum mekanizması

Doğada ve gıda sistemlerinde mikroorganizmalar yaşama yeteneği ve gelişimi için elverişli besinlerle uygun hale gelmiş katı yüzeylere ilgi duyarlar. Mikroorganizmalar başlangıçta katı yüzey üzerine çöker daha sonra yapışır, gelişir ve hücre kolonilerinin oluşumu aktif olarak artar. Bu bakımdan mikroorganizmaların tam kolonizasyonuna yardımcı organik polimerlerin oluşumu esansiyeldir [Allison ve Sutherland, 1987].

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturmaları çeşitli aşamalardan meydana gelmektedir. Biyofilm oluşumu rastgele bir süreç değildir. Bakteri bir yüzey ile karşılaştığında, genetik olarak belirlenmiş bir seri süreç birbirini izler. Bunlar sırasıyla şöyledir;

- 1- Bakterinin yüzeye geri dönüşümlü (reversibl) yapışması.
- 2- Bakterinin ekzopolimerik yapılarla yüzeye geri dönüşümsüz (irreversibl) olarak yapışıp, hareket için gerekli oluşumlarını kaybetmesi.
- 3- Biyofilmin ilk oluşma dönemi.
- 4- Biyofilmin tamamen olgunlaşarak kompleks yapıyı oluşturduğu dönem
- 5- Oluşan mikrokolonilerden hareketli bakterilerin ortama dağılımı



Resim 2.3. Biyofilm oluşum mekanizması [Marshall ve ark., 1976].

Biyofilm oluşumu

Mikrobiyal yapışmanın mekanizması

Biyofilm gelişimi uygun mikroorganizmaların varlığında hemen hemen her evre ve her yüzeyde meydana gelebilir. Mikroorganizmaların çoğunluğu durumunda; mikroorganizmaların normal yaşamı ve üremeleri için katı yüzeylere tutunmasında canlı ya da inert ve/veya organik ya da inorganik oluşumlar esansiyel şartlardır. [Costerton ve ark., 1987; Melo ve ark., 1992; Zottola ve Sasahara , 1994].

Yüzey koşullandırması

Biofilm oluşumu bakterinin var olduğu neredeyse her yüzeyde ve çevrede meydana gelir. Gıda işletim sisteminde et ve sütten protein gibi organik ve inorganik moleküllerle birlikte bakteri yüzeye tutunarak biyofilm oluşturur. Bu organik ve inorganik moleküller, ve mikroorganizmalar sıvı akış dalgası ve difuzyonla yüzeye aktarılır. Aktarımın oranı ve yüzeye tutunmanın boyutu bu bağlamda aynı derecede önemlidir [Characklis, 1981]. Gıdayla temas eden yüzeyler üzerinde ki sıvı-katı ara yüzeyinde ki moleküllerin akümülasyonu sıvı faza nazaran besinlerin daha yüksek konsantrasyonuna neden olur. Gıda işletim sistemlerinde gıdayla temas eden yüzeylerde ki gıda kalıntılarının seviyesinin artması biofilm oluşumunda rol oynar

[Hood ve Zottola, 1997]. Ayrıca Besin transferi biofilmden sıvı fazdaki bakteri hücrelerinden daha hızlıdır. Besin seviyesinde ki artış biofilm oluşumunu destekler ve ayrıca biofilmle ilişkili rekabetçi kültür tipinde bağlıdır [Jeong ve Frank, 1994]. Şartlar ayrıca viskozite, serbest yüzey enerjisi elektrostatik ve hidrofobisitedeki değişiklikler gibi mikrobiyal olayların sonraki sekansına etki edebilen fiziko-kimyasal özelliklerle de başkalaşabilir [Dickson ve Koohmaraie, 1989]. Taramalı elektron mikroskopu göstermiştir ki gıda kökenli patojenler ve bozulmaya neden olan mikroorganizmalar tipik olarak gıda işletim çevrelerinde bulunan paslanmaz çelik alüminyum, cam, Buna-N, teflon ve naylon materyaller üzerinde biyofilm olarak birirmektedir [Herald ve Zottola, 1988; Mafu ve ark., 1990; Notermans ve ark. 1991]. Naylon ve teflon yüzeyler pürüzsüzdür ve mikroorganizmalar yapışmaya hazır durumdadırlar. Bununla birlikte alüminyum yüzeyler daha geniş yarıklara ve sünger benzeri görünüme sahipken paslanmaz çelik yüzey bakterileri tuzagina düşürmek için elverişli olan çatlak ve yarıklardan dolayı pürüzlü bir görünüme sahiptir [Wirtanen ve ark., 1996].

Hücrelerin tutunması

Biofilm oluşumundaki ikinci aşama mikroorganizmaların şartlanmış yüzeye tutunmasıdır. Bu aşama aktif ya da pasif olabilir ve bakterinin hareketliliğine ya da planktonik hücrelerin transprotuna bağlıdır. Bakteri hücre yüzeyinin fiziko-kimyasal özelliği başlangıçtaki yapışma fazı sırasında hücrelerin tutunmasının belirlenmesinde önemlidir [Van Loosdrecht ve ark., 1990]. Bakteriyel tutunma bakterilerin gelişme aşaması ve ortamdaki uygun besinlerden de etkilenir. Hücresel tutunma reversibl aşamayı takip eden irreversibl aşama olmak üzere iki aşamada gerçekleşir.

Başlangıçta bakteri hücreleri arasında gelişen zayıf etkileşim ve substrat reversibl tutunmadır. Reversibl yapışma sürecini etkileyen çeşitli uzun mesafe etkileşim güçleri, van der Waals çekim güçleri, elektrostatik güç ve hidrofobik etkileşimlerdir. Bu aşamada bakteri hala Brown hareketi gösterir ve çok az bir durulama gibi kesici güç akımları ile ortadan kaldırılabilir [Marshall ve ark., 1971]. Hücrelerin irreversibl tutunması ise biyofilm oluşumundaki bir sonraki çok önemli basamaktır. İtici güçler

bakteri hücrelerinin yüzeyle direkt kontaktını engeller. Ancak bakterilerin flegella, fimbria ve pili gibi yüzey uzantılarını ve ekzopolisakkarit fibrillerinin üretiminden dolayı yüzeyle kontakt devam eder [Jones ve Isaacson, 1983; Hancock, 1991]. Geri dönüşümsüz tutunma dipol dipol etkileşimi, hidrojen, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrofobik etkileşimleri içeren kısa mesafede etkili çeşitli güçleri içerir. Bakteri hücresi ile yüzey arasında köprü görevi gören polimerik fibriller yüzeyle geri dönüşümsüz tutunmaya olanak sağlar. Bu süreçte hücrelerin yüzeyle ilişkisinin kesilmesi ortadan kaldırılması için fırçalama ve ovalama gibi çok güçlü kuvvetler gereklidir [Marshall ve ark., 1971].

Mikrokoloni oluşumu

Geri dönüşümsüz tutunan bakteri hücreleri bu şartlar altında büyür ve bölünür. Bu da mikrokolonilerin oluşumuna neden olur. Bu peryotta yapışan hücreler polimer (EPS) üretimi gerçekleştirir. Polimer üretimi hücrelerin yüzeye sabitlenmesini ve çevreden gelen bozucu etkilere karşı koymasını sağlar [Characklis ve Marshall, 1990].

Biyofilm oluşumu

Yüzeye bakteriyel tutunmanın devam etmesi ve bunu takiben bakteri gelişimi ile beraber EPS üretimi biyofilm oluşumuna neden olur. Biyofilm oluşumu oldukça yavaş bir süreçtir ve kültür şartlarına bağlı olarak oldukça uzun bir süreçte milimetrik bir kalınlığına ulaşır [Melo ve ark., 1992].

2.2.4. Biyofilm oluşumunun klinik olarak önemi

Biyofilmlerin öneminin anlaşılması ve bu yönde yapılan çalışmalar son otuz yıldır hız kazanmıştır. Vücut içerisinde biyofilm oluşumu önem taşımaktadır. Oluşan biyofilmler yüksek ateş, ciddi organ hasarları ve hatta ölümlere bile neden olabilirler. Birçok biyomalzeme üzerinde tutunan bakteriler, biyofilm oluşturarak enfeksiyona neden olurlar. Bu tip üreme kronik enfeksiyonları da beraberinde getirir, çünkü biyofilmlerden doğal olarak zaman zaman kopan mikroorganizmalar vücutta başka

yerlerde de bir enfeksiyona neden olabilirler [Costerton ve ark., 1999]. Klinik olarak biyofilmler canlı dokularda ve vücuda implante edilen biyomalzemeler üzerinde oluşabilirler.

Canlı dokularda oluşan biyofilmler

Patojen mikroorganizmalar yaşamlarını sürdürebilmek ve çoğalabilmek için genellikle canlı dokulara tutunurlar. Mikroorganizmaların tutunması için uygun proteinlere sahip olan canlı doku, aynı zamanda mikroorganizmaların beslenebilmesi için önemli olan besinleri de elde etmelerini sağlar. Dokulara tutunan bakteriler uygun yaşam şartları nedeniyle çok hızlı bir biçimde çoğalmaya başlar ve kısa süre içerisinde biyofilm oluşturabilirler. Normal bir bakteriyal floranın patojenik hale geçmesi de söz konusu olabilir. Bu geçiş, doku yüzey kimyasındaki değişimlerle, antibiyotik tedavisiyle veya yaşlanma sonucu ortaya çıkabilir. Patojen olmayan (saprofit) mikroorganizmalar normalde bulundukları ortamdan farklı bir bölgeye yerleştiklerinde patojen hale geçebilirler. Yer değişikliği sonucunda aşırı üreme ve buna bağlı olarak zehirli atık üretiminin artması zararsız mikroorganizmaları zararlı hale getirmektedir. Mikroorganizmalar yapışkan polimerler üretip, fimbria gibi yüzey bileşenlerini kullandıklarından kuvvetli bir yapışma özelliğine sahiptir. Böylece bulundukları ortamdaki sıvı akışı (örneğin kan) ve mekanik hareket gibi onlar için olumsuz fiziksel şartlardan korunurlar [Jefferson, 2004].

Vücuda implante edilen biyomalzemeler üzerinde oluşan biyofilmler

Biyomalzeme olarak metaller, seramikler, kompozitler ve polimerler kullanılmaktadır. Yapay deri, damar, kalp, eklem gibi birçok protez bu malzemelerden üretilmektedir. Biyomalzemelerin vücut tarafından kabul edilmesi için biyouyumlu olmaları gerekmektedir. Biyouyumlu malzemeler, doku yapısına benzer yapıda olup vücudun bağışıklık sistemi tarafından reddedilmeyen malzemelerdir. Fakat vücudun kabul ettiği malzemeler aynı zamanda bakteriler için de elverişli olabilir. Örneğin vücut hücrelerinin malzemeyi kaplaması için fibronektin gibi bağlayıcı (yapıştırıcı) proteinler kullanılır. Bu proteinler sadece

vücut hücreleri için değil, bakteriler için de bağlayıcı bir fonksiyon göstermektedir. Fakat bazı durumlarda bu fonksiyon farklılaşabilmektedir. Örneğin fibronektin yüksek derişimlerde vücut hücreleri için bağlayıcı özelliğini korumakta, ancak bakteri hücreleri için bu fonksiyonunu kaybetmektedir. Mikroorganizmaların sentetik malzemelere tutunarak sağladıkları en önemli avantaj, canlı dokudaki bağışıklık sistemi ile karşı karşıya gelmemeleridir. Bunun dışında, malzemede bulunan bazı metaller (Al_3^+ , Mg_2^+), mikroorganizmaların oluşturduğu hücre dışı polisakkarit matris için destek malzeme oluşturur. Böylece mikroorganizmalar olumsuz dış koşullara karşı daha dayanıklı hale gelir [Costerton ve ark., 1999]. Biyomalzemeye patojen bakteriler iki şekilde ulaşabilir. Birinci yol, üretim veya implantasyon sırasında malzemenin bakterilerle temas ederek enfekte olması ve vücuda bu şekilde yerleşmesidir. İkinci yol ise vücut içerisinde bulunan veya vücudun dış ortama açık kısımlarından (ağız, burun, vb.) vücuda ulaşan mikroorganizmaların vücut sıvıları yoluyla malzemeye ulaşması şeklindedir. İmplantların reddedilmesini önlemek amacıyla implant yerleştirildikten sonra bağışıklık sistemi baskılanır, ancak bu durum enfeksiyon riskini de artırır

Biyofilmler İle İlgili Enfeksiyonlar

“Hastalık Kontrol Merkezi (CDC)”, tüm dünyada biyofilme bağlı enfeksiyonların oranını %65 olarak açıklamıştır [Costerton ve ark., 1999]. Biyofilmler ile ilişkili enfeksiyonların bulunma sıklığı ve modelini belirlemek güçtür. Ancak biyofilmlerin, dental plak, üst solunum yolu enfeksiyonları, peritonit, ürogenital enfeksiyonlar ve yabancı cisim enfeksiyonları gibi birçok durum ile ilgili oldukları söylenebilir. Biyofilmler normal floranın oluşumundan, kronik enfeksiyonlara kadar çok geniş bir yelpazede rol oynamaktadırlar.

Bu çalışmalar arasında biyofilm belirleyen genetik modülasyonlar kadar, biyofilm enfeksiyonlarını tedavi etmeye ve biyofilmi eradike etmeye yönelik çalışmalar önemli yer tutmaktadır. Biyofilm oluşumu; *S. aureus*, *S. epidermidis*, viridans streptokoklar, enterokoklar, aktinomiçesler, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *V. cholerae*, *Klebsiella* spp. ve *Candida* spp. gibi birçok mikroorganizmada

gösterilmiştir. Biyofilm oluşturan bakterilerin yüzeylere adheransının, biyofilm oluşturmayan bakterilere oranla daha fazla olduğu bilinmektedir.

Yapılan çalışmalar *Aeromonas* 'ların neden olduğu gastroenterik enfeksiyonların % 30 'unun biyofilm oluşumları olduklarını göstermiştir. *Aeromonas* türlerinin lateral ve polar flegelları konak hücrelerin yüzeyine tutunmada kritik rol oynamaktadır. Polar flegella yüzme hareketi ve ilk tutunma ile intestinal kolonizasyonda rol alırken lateral flegella ise belirgin bir şekilde hücrelere tutunmada rol oynamaktadır Bu flegellalar insan bağırsak hücrelerine tutunabilmekte olup, tüm bu bulgular her iki flegellanında *Aeromonas*'ların biyofilm oluşumu sırasında yüzeylere tutunmasında etkili olduğu sonucunu desteklemektedir [Kirov ve ark., 2003].

Biyofilmin Antibiyotiklere Karşı Direnci

Biyofilm içerisindeki bakterilerin en önemli özelliği, konak cevabından kurtulup antibiyotik tedavisine direnç göstermeleridir. Laboratuvar koşullarında (in vitro) yapılan testlerde biyofilm bakterilerinin, serbest bakteriler için belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonundan (MIC) birkaç yüz veya bin kez fazla antibiyotik konsantrasyonuna bile direnç gösterdikleri bulunmuştur [Stewart ve Costerton, 2001]. Vücut içinde (in vivo) antibiyotikler serbest bakterileri öldürerek enfeksiyon riskini azaltabilir, fakat antibiyotik tedavisi kesildiği anda biyofilm oluşumu yeniden gözlenir.

Mikroorganizmalar biyofilm oluşturduğunda, antimikrobiyallere karşı oldukça dirençlidir. Biyofilmi oluşturan her mikroroganizma tek başına bulunduğunda, herhangi bir antimikrobiyal ile kolayca inhibe olmasına rağmen biyofilm mimarisi içinde yer aldığı zaman aynı antimikrobiyal ile inhibe etmek oldukça zordur [Durack ve Beeson, 1972]. Biyofilm oluştuğu zaman onu yüzeyden ayırmak son derece güçtür ve antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlidir [Bunce ve ark., 1992]. Biyofilmin doğal yapısı ve biyofilm içindeki mikroorganizmalar antibiyotik, dezenfaktan ve germisid gibi antimikrobiyal ajanlara karşı direnç göstermektedir. Direnç gösterme mekanizmaları şu şekilde açıklanabilir [Pattive ark., 1994].

Antimikrobiyal ajanının biyofilm matriksinde çok yavaş ilerlemesi

Antimikrobiyal ajanların hücreleri inaktive edebilmesi için, biyofilm matriksi içerisinde yayılması gerekmektedir. Biyofilm matriksini oluşturan ekstrasellüler polimerik maddeler antimikrobiyal molekülerin yayılım hızını yavaşlatan ya da matriks ajanlarıyla ilişkisini kesen bariyer görevi görmektedir [Pattive ark., 1994].

Biyofilm organizmalarının üreme hızlarının değişmesi

Biyofilm hücrelerinin planktonik fazdaki hücrelere göre çok yavaş çoğaldığı bu nedenle antimikrobiyal ajanları çok daha yavaş hücre içine aldığı bildirilmektedir [Pattive ark., 1994].

2.2.5. Biyofilm oluşumunun gıda endüstrisi açısından önemi

Doğada ve gıda sistemlerinde mikroorganizmalar gelişimlerini ve yaşamlarını sürdürebilmek için uygun besinler, iyonlar ve diğer organik maddelerin temas halinde olduğu katı yüzeylere tutunurlar. Biyofilm ve biyolojik kirlenme temas halinde bulunan yüzeyler üzerinde ki gelişme ve biyolojik yapışmayla ilgili iki terimdir [Zottola ve Sasahara, 1994]. Doğada ve gıda işletim sistemlerinde ortamda bulunan patojenlerin yüzeyle teması direk olarak kontamine olan yüzeylerle ya da indirek olarak hava kökenli partiküller aracılığı ile olur [Lindsay ve Holly, 1999].

Birçok patojen ve gıda kökenli bakteri gıdayla temas halindeki yüzeylere yapışabilme yeteneğindedir. Bu bakterilerden bazıları biyofilm oluşturmaya daha fazla eğilimlidirler. Bunlardan *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* en yaygın olanlarıdır [Mattila-Sandholm ve Wirtanen, 1992; Genigeorgis, 1995]. Bu nedenle temizlik ve dezenfeksiyon mikrobiyal oluşumun akümülyasyonunu önlemek için oldukça önemli işlemlerdir [Costerton ve ark., 1987]. Biyofilm oluşumu birçok endüstride problemlere yol açar. Özellikle atık su arıtma sistemleri ve gıda endüstrilerini yakından ilgilendirir.

Boru sistemleri içerisindeki biyofilm oluşumu sistemdeki sıvı akışının azalmasına neden olur. Ve bu kirliliğin artışıyla ısı geçişleri düşer, ürünler kontamine olur ve ayrıca biyofilm oluşumuyla meydana gelen asit üretimi sistemdeki boruların aşınmasına yol açar. Biofilm oluşumunda yaygın kaynaklar; atık su boruları, boruların bağlantı yerleri, lastik contalar, taşıma bantları, paslanmaz çelik ve benzeri yüzeylerdir [Fletcher, 1988]. Su dağıtım sistemlerindeki biyofilm koliform grubu bakterilerden oluşur ve bu oluşumlar boru aşınımına, suda tat ve koku değişimine yol açarlar. Boru sistemlerinde oluşan biyofilm bu sistemlerdeki suyun kullanımı sonucunda ciddi sağlık sorunlarını beraberinde getirebilmektedir. Boru içinde oluşan filmler daha çok borunun alt kısmında seyrek ve rastgele yerleşmiştir. Borunun üst kısımlarında hava akımı ve besinsizlik nedeniyle film oluşumu görülmemektedir [Lehtola ve ark., 2007].

Salmonella Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* gibi patojenlerle kontamine gıdaların sadece gıda işletmeleri açısından değil, halk sağlığı bakımından da büyük sorun olduğu bilinmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalarda, bulaşma için çapraz kontaminasyonun, personel ve tesis hijyeninin önemini ikinci plana iten, üretim alanında yüzeylere yapışan bakterilerin varlığı ortaya konmuştur [Denes ve ark., 1999; Denes ve ark. 2002]. Gıda işletim sistemlerinde ise biyofilm oluşumu gıdaların ve ekipmanın kontamine olmasına neden olur [Mattila-Sandholm ve Wirtanen, 1992; Genigeorgis, 1995]. Gıda teknolojisinde biyofilm oluşumu insan sağlığı açısından oldukça önemli olup, gıdayla temas halinde bulunan yüzeylerde bakteriyel yapışma gıdalarda bozulma ve bozulmaya bağlı olarak hijyen problemlerine ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır [Dunsmore ve ark., 1981]. Elverişli şartlar altında bakteri hücreleri yüzeylere tutunup üreme gösterebilir. Bu tür mikroorganizmalar tamamen ortamdaki uzaklaştırılmadıkları sürece gıdaların güvenliğini ve kalitesini etkileyecek biyofilm oluştururlar. Gıda endüstrisinde temizlik ve sanitasyon prosedürlerinin limiti ekipmanların yüzeyinde biofilm oluşumuna neden olan mikroorganizmaların akümülyasyonudur, ancak biyofilm oluşturan mikroorganizmaların akümülyasyonunun

direnci işletim sonrası kontaminasyona ve ürünlerin raf ömrünün kısalması gibi sorunlara yol açmaktadır [Holah ve Kearney, 1992].

Süt, et ve birçok besin maddesinin üretimi sırasında, üretilen besinin proteinleri (kazein, jelatin), üretimde kullanılan teçhizat (reaktör, kazan, tepsi, vb.) üzerinde hazırlayıcı bir film oluşturarak mikroorganizma yapışmasını kolaylaştırırlar. Böylece mikroorganizmalar paslanmaz çelik, cam, alüminyum, teflon, naylon gibi gıda teknolojisinde kullanılan birçok malzeme üzerinde film oluşturarak insan sağlığını tehdit edebilir [Zottola ve Sasahara, 1994]. Yine benzer şekilde süt ve süt ürünleri endüstrisinde uygun olamayan temizlik ve sanitasyon ekipmanları ve hava kökenli mikroflora genellikle süt ve süt ürünlerinin kontaminasyonunun ana kaynağını olarak dikkate alınmaktadır [Poulsen, 1999].

Süt ve gıda endüstrisinin de biyolojik kirlenme yüzey çapraz ısı akımının engellenmesi, yüzeydeki akıcı sürtünme direncindeki artma ve enerji ve ürün kaybına sebep veren aşındırma oranındaki artma gibi ciddi problemlere neden olur. Mesela sıcaklık değişimi durumunda biyofilimler hem sıvı akımına hem de sıcaklık transferindeki direncin artmasına neden olur [Dunsmore ve ark., 1981]. Buna ek olarak biyofilimler, bozulmaya neden olan ve patojen mikroflorayı içeren, kümes hayvanı etleri ya da diğer et yüzeyleri gibi gıda yüzeylerinde oluşan çapraz kontaminasyon ve işletim sonrası kontaminasyonda problem arz eden oluşumlardır.

Listeria monocytogenes et, süt ve çeşitli gıdalarda da biyofilm oluşturabilmektedir [Criado ve ark., 1994]. Gıda kökenli bir patojen olarak gıda endüstrisi açısından büyük önem taşıyan *Listeria monocytogenes*' in paslanmaz çelik yüzeylere yapışmasını ve yapışmayı sağlayan fibril üretimini gözlemlemişlerdir. Patojenin aynı zamanda cam poripropilen ve plastik yüzeylere de tutunduğu [Herald ve Zottola, 1988]. ve cam Buna-N ve plastik yüzeylerde sanitizerlere karşı dirençli biyofilm ürettiği görülmüştür [Mafu ve ark., 1990].

Yüksek sıcaklıklarda gelişebilen ve süt teknolojisi açısından önemli bir bakteri olarak *Streptococcus thermophilus*' un süt işletim sistemi ekipmanlar içindeki ısı

değiştiriciler üzerine tutunabildiği tespit edilmiştir. Bilindiği gibi sütün pastörizasyonu sırasında sporlar ölmekte, sadece vejetatif mikroorganizmalar yok edilebilmektedir. Dolayısıyla sütte *Bacillus cereus* sporları bulunabilmektedir. Sporlar hidrofobik karakterde olup boru yüzeyine tutunmakta ve ürettikleri ısıya dayanıklı toksinleri ile ciddi problemlere yol açmaktadır [Anderson ve ark., 1995].

Salmonella gıda kökenli patojenler arasında en önemli olanlardan birisidir. Uzun süren çalışmalar bu bakterinin farklı yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşturabilme yeteneğinde olduğunu göstermiştir. Özellikle tavuk ve kırmızı et gibi gıdalarda salmonellanın kolajen fibrillere tutunma gösterdiği gözlemlenmiştir [Anderson ve ark., 1995].

Aeromonas'lar sucul bitki ve hayvanlarda olduğu kadar gıda işletim sistemlerinde ve su dağıtım sistemlerinde de kolonize olur ve biyofilm oluştururlar. Son çalışmalar iki farklı flegeller sisteme sahip olan *Aeromonas*'ların, flegellalarının plastik yüzeylerde biyofilm oluşturduğunu göstermiştir [Gavín ve ark., 2003].

Su arıtma sistemlerindeki boru yüzeylerinde biyofilm oluşturan bakteriler uzun süre kalıcı olabilirler ve biyofilm oluşumu su sistemlerinde patojen mikroorganizmalara rezarvuvar görevi yapabilir [Szewzyk ve ark., 2000]. Laboratuvar deneyleri *Helicobacter pylori* [Mackay ve ark. 1998], enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) [Szewzyk ve ark., 1994], *Salmonella enterica serovar typhimurium* [Armon ve ark., 1997] ve *Campylobacter spp.* [Buswell ve ark. 1998] gibi su kökenli patojen bakterilerin uzun süre kalıcı biyofilmler oluşturdıklarını göstermiştir. Ancak bu patojenler geleneksel kültür yöntemleri ile kentlerin su sistemlerinden izole edilememiş fakat *Aeromonas*'lar izole edilmiştir. [Van Der Kooij ve Hijnen, 1988; Gavriel ve ark., 1998; Szewzyk ve ark., 2000]. Bu nedenle biyofilmler *Aeromonas*'ların akümüasyonu ve kalıcılığı açısından avantajlı bir ortam sağlayan rezarvuarlardır.

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Hareketli *Aeromonas* Türlerinin İzolasyonu İçin Örneklerin Toplanması

Bu araştırmada Hareketli *Aeromonas* türlerinin izolasyonu için bazı gıda ve çevresel kaynaklı örnekler toplandı. Ankara'daki çeşitli marketlerden kıyma (6 adet), peynir (18 adet) ve süt fabrikasından temin edilen çiğ süt (6 adet) örnekleri ile Kirmir ve Devres çaylarından toplanan (*Barbus plebejus* (15), *Capoeta tinca* (32)) balık ve sediment (4 adet) örnekleri ile çalışılmıştır.

3.2. *Aeromonas*'ların İzolasyonu

Çalışmada ön zenginleştirme amacıyla Alkali Peptonlu Su (APS), izolasyon için ise Ampisilinli Glutamate Starch Phenol Red Agar (GSP) kullanılmıştır. Laboratuvarda incelenen gıda örneklerinden et ve peynir steril koşullarda bir lam yardımıyla ezilmiş ve içerisinde APS bulunan erlenlere 1/10 (10 gram örnek/ 90 ml APS) oranında ilave edilmiştir. Aynı şekilde çevresel örneklerden balık ise; deri, solungaç ve bağırsak kısımları steril koşullarda bir bistüri yardımıyla ayrı ayrı parçalanacak şekilde ayrılmak üzere içerisinde APS bulunan erlenlere 1/10 (10 gram örnek/ 90 ml APS) oranında ilave edilmiştir. Süt ve sediment örnekleri ise direkt olarak 1/10 oranında APS bulunan erlenlere ilave edilmiştir. APS içinde bulunan örnekler 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında örnek homojen hale getirildikten sonra Ampisilinli GSP Agar'a öze ile tek koloni ekim yapılmış ve plaklar 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu besiyerinde üreyen sarı ve bal rengi koloniler muhtemel *Aeromonas* kolonileri olarak değerlendirilmişlerdir.

3.3. Örneklerin Analiz Edilmesinde Kullanılan Besiyerleri

Ampicilinli GSP (Glutamate Starch Phenol Red) Agar (Merck 1.102300500)

Bileşimi:	gr/lt
Sodyum-L(+) glutamat	10,0 gr

Nişasta eriyiği	2,0 gr
Magnezyum sũlfat	0,5 gr
Fenol kırmızı	0,36 gr
Agar-agar	12,0 gr
pH 7,2±0,2	

Hazırlanışı: GSP Agar besiyerinden 45 gram tartılıp 1 litre distile içinde çözdürüldükten sonra, besi ortamı 121°C’de 15 dakika steril edilir. Besiyeri 55°C’ye soğutulur ve ampicilin (20 µg/ml) steril koşullarda ilave edilir. İyice karıştırıldıktan sonra petrilere dökülür. +4 °C’de muhafaza edilir.

Alkali Peptonlu Su (APS)

Bileşimi:	gr/lt
Pepton	10,0 gr
Sodyum klorür	5,0 gr
Potasyum nitrat(KNO ₃)	1,0 gr
Sodyum karbonat(NaCO ₃)	2,0 gr

Hazırlanışı: Besi ortamından erlenlere 90 ml alınır ve pH: 8,6’ya ayarlanıp besiyeri 121°C’de 15 dakika steril edilir. +4°C’de muhafaza edilir.

TSB (Tryptic Soy Broth) (Acumedia 7164A)

Bileşimi:	gr/lt
Enzymatic Digest of casein	17,0 gr
Enzymatic Digest of soybean meal	3,0 gr
Sodyum klorür	5,0 gr
Dipotasyum fosfat	2,5 gr
Dextrose	2,5gr
pH 7,3±0,2	

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

3.4. İdentifikasyon Testleri

İzolatların tür düzeyindeki tanımlamalarında çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik testlerden yararlanılmıştır. İdentifikasyon amacıyla Ampisilinli GSP Agar’da üreyen sarı renkli koloniler *Aeromonas* şüpheli koloniler olarak seçilmiş ve Gram boyama ile boyanmıştır. Gram negatif olan çomakçıklar, Tryptic Soy Broth (TSB)’a inoküle edilmiş ve 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hareketli ve Gr (-) çomakçıklara oksidaz, katalaz, tuzlu (% 6,5) ve tuzsuz buyyonda üreme, O/129 (2,4-diamino-6,7-d-iso-propyl-pteridine) dirençlilik ve mannitol fermantasyonu testi yapılmıştır. Daha sonra izolasyonu yapılmış hareketli *Aeromonas*’lara tür düzeyinde identifikasyon yapılmıştır. Tür düzeyinde ayrımları için de glikozdan gaz oluşturma, eskülin hidrolizasyonu, salisin fermantasyonu, KCN’li besiyerinde üreme, Voges Proskauer (VP) ve sisteinden H₂S oluşumu testleri yapılmıştır.



Resim 3.1. GSP Agar’ da üreyen *A. hydrophila* (ATCC 7966) ve *A. caviae* (ATCC 15468) suşları.



Resim 3.2. GSP Agar’ da üreyen *Aeromonas* spp.

3.5. Hareketli *Aeromonas* türlerinin Cins Düzeyinde Ayırt Edici Testleri

3.5.1. Gram boyama

Klasik Gram boyama yöntemindeki Kristal Viyole, Lügol, Alkol ve Bazik Fuksin hazırlanarak gram boyama yapılmıştır. Mikroskopik olarak Gr (-) basil ya da kokobasil şeklinde görülen koloniler *Aeromonas* şüpheli olarak düşünülmüştür.

3.5.2. Oksidaz testi

Tetrametil p-fenilendiamin dihidrokloridin (% 1’lik) çözeltisi hazırlanarak Whatman No.1 kurutma kağıdına emdirilir. Bu kurutma kağıdının üzerine şüpheli koloniler öze ile alınarak reaksiyona sokulur. 5-10 saniye içinde pembe renk oluşturan koloniler oksidaz negatif, mavi renk oluşturan koloniler oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir [Koneman ve ark., 1992].

3.5.3. Katalaz testi

Lam üzerine bir öze dolusu % 3'lük H₂O₂ ile mikroorganizmaların 24 saatlik katı kültüründen öze ile bir koloni alınarak karıştırılır. Hava kabarcıklarının çıkması pozitif olarak değerlendirilmiştir [Koneman ve ark., 1992].

3.5.4. O/129 dirençliliği

Nutrient Broth hazırlanır. Litreye 10 mg O/129 (2,4-diamino-6,7-d-iso-propylpteridine) ilave edilir. Mikroorganizmaların taze kültürlerinden O/129 içeren buyyonlara ekim yapılarak 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar bulanıklığa göre değerlendirilmiştir [Koneman ve ark., 1992].

3.5.5. Tuzsuz ve tuzlu (%6,5) buyyonda üreme

Nutrient Broth (Merck 1.05443.0500)

Bileşimi:	gr/lt
Beef extract	5,0 gr
Pepton	3,0 gr
pH 7,0 ± 0,2	

Hazırlanışı: Nutrient Broth besiyerinden 8 gram tartılıp 1 litre distile su içinde çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika steril edilir. +4 °C'de muhafaza edilir. Tuz içermeyen ve % 6,5 tuz içeren nutrient buyyonlara ekimler yapılmış ve 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Buyyonlardaki üreme durumu bulanıklığa göre değerlendirilmiştir [Koneman ve ark., 1992].

3.5.6. Mannitol fermantasyonu testi

Karbonhidrat fermantasyon temel besiyeri

Bileşimi:	gr/lt
Proteaz Pepton	10,0 gr
Beef extract	1,0 gr
Sodyum klorür	5,0 gr
Brom cresol purple	0,02 gr

Hazırlanışı: Besiyeri pH:6,8'e ayarlanıp indikatör madde ilave edildikten sonra tüplere 9 ml pipetlenip 121°C'de 15 dakika steril edilir. +4 °C'de muhafaza edilir. Karbonhidrat temel besi yerine test edilecek mannitolden % 1 oranında ilave edilir. Mannitol içeren besi yerine mikroorganizmanın 24 saatlik taze kültüründen öze ile ekim yapılarak 30°C'de 24-72 saat inkübasyona bırakılır. Sarı renk oluşumu pozitif rengin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirilir [Koneman ve ark., 1992].



Resim 3.3. Mannitol fermantasyonu testi

A. Mannitol fermantasyonu (-)

B. Mannitol fermantasyonu (+)

3.6. Hareketli *Aeromonas*'ların Tür Ayırıcı Testleri

Potasyum Siyanürlü (KCN) besiyerinde üreme

KCN Broth

Bileşimi:	gr/lt
Proteaz pepton	3,0 gr
Disodyum fosfat	5,64 gr
Monopotasyum fosfat	0,225 gr
NaCl	5,0 gr
% 0,5 KCN solüsyonu	
pH 7,6	

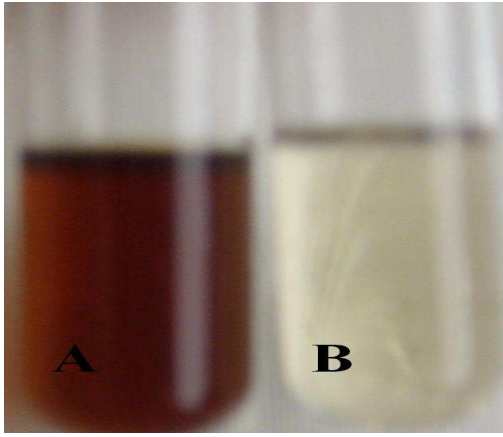
Hazırlanışı: Ortam içeriği distile suda çözünür ve ortam 121°C'de 15 dakika steril edilir. Distile su ile % 0,5'lik KCN solüsyonu hazırlanır ve oda sıcaklığına kadar soğutulur. Steril bir pipet ile her 100 ml bazal ortama 1,5 ml KCN solüsyonu ilave edilir. Ortam tüplere dağıtılır. Steril olarak hazırlanmış besiyerine suşlardan inokülasyon yapıp, 30°C'de 24 saatte inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda üreme olanlar pozitif, üreme olamayanlar negatif olarak değerlendirilmiştir [Koneman ve ark., 1992].

3.6.2. Eskülin hidrolizi testi

Eskülin hidrolizi besiyeri

Bileşimi:	gr/lt
Pepton	10,0 gr
Sodyum sitrat	1,0 gr
Eskulin	1,0 gr
Demir (III) sitrat	0,05 gr

Hazırlanışı: Formüle göre hazırlanan besiyerinin pH'sı 7,0'a ayarlanır, tüplere dağıtılan besiyeri 121°C'de 15 dakika steril edilir. +4°C'de muhafaza edilir. Eskülin hidrolizasyonu için hazırlanan besiyerine mikroorganizmanın taze kültüründen ekim yapılmış ve 30°C'de 24 saatte inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerde gözlenen siyah renk pozitif, renksiz üreyenler negatif olarak değerlendirilmiştir [Koneman ve ark., 1992].



Resim 3.4. Eskülin hidroliz testi.
A. Eskülin hidrolizi (+)
B. Eskülin hidrolizi (-)

3.6.3. Glikozdan gaz oluşturma

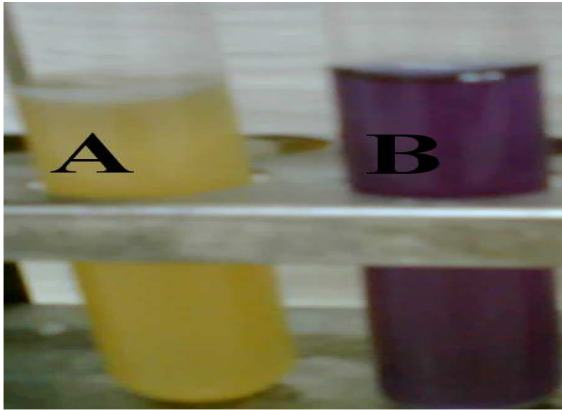
Karbonhidratlı temel besiyeri hazırlanarak durham tüpü ilaveli tüplere dağıtılır. % 10 olarak hazırlanan glikozdan 1/10 oranında tüplere ilave edilir. Suşlar inoküle edildikten sonra 30 °C'de 24-72 saatte inkübasyona bırakılmıştır. Durham tüplerinde gaz oluşturanlar pozitif, gaz oluşturmayanlar negatif olarak kabul edilmiştir [Koneman ve ark., 1992].



Resim 3.5. Glukozdan gaz oluşumu

3.6.4. Salisin fermentasyonu testi

Steril olarak hazırlanan karbonhidrat temel besiyerine % 10 oranında ilave edilir. Aktif kültür ile inoküle edilir. 30 °C’de 24-72 saat inkübasyon sonucunda sarı renkli tüpler pozitif, renk değiştirmeyenler negatif kabul edilmiştir [Koneman ve ark., 1992].



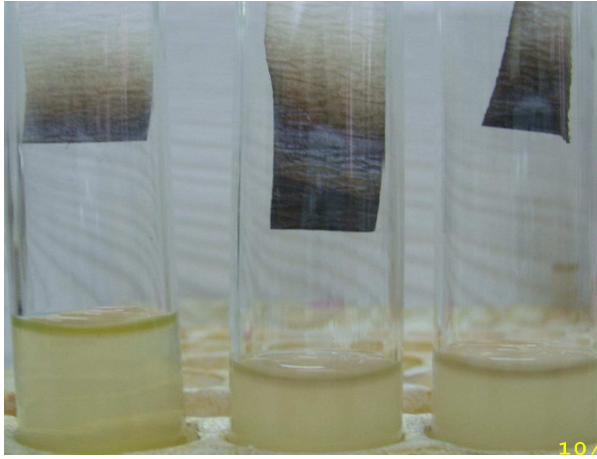
Resim 3.6. Salisin fermentasyonu testi.

A. Salisin fermentasyonu (-)

B. Salisin fermentasyonu (+)

3.6.5. Hidrojen Sülfid (H_2S) testi

Nutrient Broth hazırlanıp üzerine 0,0025gr/ml sistein ilave edilir. Hazırlanan besiyeri tüplere dağıtılır ve $121^{\circ}C$ 'de 15 dakika steril edilir. Tüplerin içine besiyerine temas etmeyecek şekilde kurşun asetat emdirilmiş steril şerit süzgeç kağıtları (Kağıt şeritler % 5 kurşun asetat solüsyonuna batırılır, havada kurutulur ve uygun bir kapta $121^{\circ}C$ 'de 15 dakika steril edilir.) sarkıtılır ve tüplerin ağzı sıkıca kapatılır. Tüpler $30^{\circ}C$ 'de inkübe edilir. Kurşun asetat emdirilmiş kağıdın ucundaki siyahlaşma pozitif, rengin değişmemesi negatif olarak değerlendirilmiştir [Koneman ve ark., 1992].



Resim 3.7. Sisteinden hidrojen sülfid (H_2S) oluşumu testi

3.6.6. Voges-Proskauer (VP) testi

Metil Red/ Voges-Proskauer Besiyeri (Merck 1.05712.0500)

Bileşimi:	gr/lt
Tamponlanmış pepton	7,0 gr
Glukoz	5,0 gr
K_2HPO_4	5,0 gr
pH $6,9 \pm 0,2$	

Hazırlanışı: MR/VP besiyerinden 14 gram tartılarak, 1 litre distile su içinde çözdürülür. Tüplere 5'er ml bölünerek 121 °C'de 15 dakika steril edilerek hazırlanır.

Voges-Proskauer ayıracı I

KOH 10,0 gr

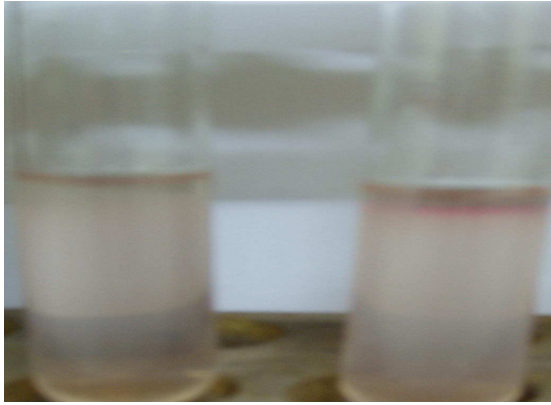
Distile su 100 ml

Voges-Proskauer ayıracı II

α -naftol 5,0 gr

Absolut etil alkol 100 ml

Steril hazırlanıp tüplere dağıtılmış MR-VP besiyerine % 40'lık KOH'tan 1ml % 5'lik alfanaftanol eriyiğinden 3 ml ilave edilir. Pembe kırmızı renk pozitif, rengin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirilmiştir [Koneman ve ark., 1992].



Resim 3.8. Voges-Proskauer testi

A. VP (-)

B. VP (+)

Yapılan tür ve cins düzeyindeki biyokimyasal testlerden sonra suşların doğruluğunu tespit etmek için API 20 NE (Biomerieux, France) bakteri tanımlama kiti kullanılmıştır.



a. *A. veronii* biovar *sobria*



b. *A. hydrophila/caviae*



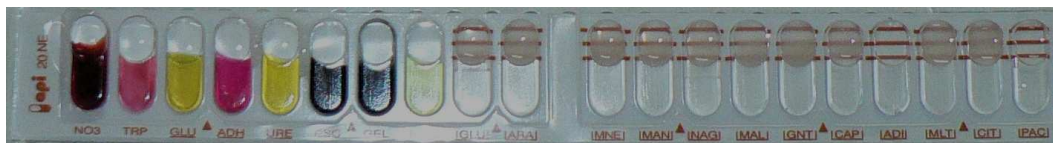
c. *A. veronii* biovar *sobria*



d. *A. veronii* biovar *sobria*



e. *A. veronii* biovar *sobria*



f. *A. hydrophila/caviae*

Resim 3.9. *Aeromonas* spp. tanımlanmış kitler. (API 20 NE/Biomuerux-France)

3.7. Biyofilm Ölçümü

3.7.1. Mikroplate ile biyofilm ölçümü

Biyofilm kültürü ve ölçümü için birkaç farklı metod geliştirilmiştir [Deighton ve ark., 2001; Arciola ve ark., 2002; Harraghy ve ark., 2006]. Biyofilm tayini öncelikle test tüpü duvarında biyofilm kültürü ve daha sonra boyama ile biyofilm tespiti şeklinde yapılmıştır [Christensen ve ark., 1982]. Daha sonra mikroplate kuyucukları diğer bir ölçüm aracı olarak kullanılmış ve sonuçlar spektrofotometre ile ölçülmüştür [Christensen ve ark., 1985]. Şu anda birkaç farklı method kullanılmaktadır. Bunlar tüp testi [Mathur ve ark., 2006] , mikroplate testi [Stepanovic, 2000], radiolabeling mikroskopi [Deighton ve ark., 2001] ve Congo Red Agar testi [Arciola ve ark., 2002] gibi testlerdir. Buna rağmen mikroplate metodu biyofilm incelenmesi için yapılan ölçümlerde diğerleri arasında en sık kullanılanıdır [Stepanovic ve ark., 2007].

Biyofilm testi için bakteriyal suşların depolanması

Araştırmada kullanılan *Aeromonas* suşları stok kültürden alınarak aktifleştirilmek üzere TSB' ye aktarıldıktan sonra inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 0,02 g/L ampisilin ekli GSP agara alınan suşlardan seçilen koloniler ile biyofilm çalışması yapılmıştır.

İnokülasyon

İnokülasyondan önce, GSP agardan alınan test edilecek suşlar sıvı ya da katı ortamda kültür edilmiştir. Suşlar çalışılacak ortama göre TSA (Tryptic Soy Agar), TSB (Tryptic Soy Broth), BHIA (Brain Heart Infision Agar) ve BHIB (Brain Heart Infision Broth)'de inkübasyona bırakılmıştır. Eğer sıvı ortamdan çalışılacaksa inkübasyon sonrası seçilen 3-4 özdeş koloni 5ml' lik sıvı besiyerine (TSB yada BHIB) süspansiyeye edilip, çalkalamaksızın 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra durgun faz kültürü vortekslenip, 1/100 oranında dilüsyon yapılmış ve dilüsyonu yapılan bakteri tekrar vortekslenmiştir.

Katı besiyeri ortamından çalışılacaksa, katı besiyerine (TSA ve BHIA) alınan suşlar inkübasyona bırakılmıştır ve inkübasyon sonrası özdeş morfolojiye sahip 3-4 koloni steril distile su yada fizyolojik tuzda süspansiyon edilmiştir. Bakteriyel süspansiyonun yoğunluğu 0.5 Mc Farland standartına eş bir yoğunluğa ayarlanıp (yaklaşık 10^8 cfu/ml), meydana gelen süspansiyon en az bir dakika vortekslenmiştir [Stepanovic ve ark., 2007].

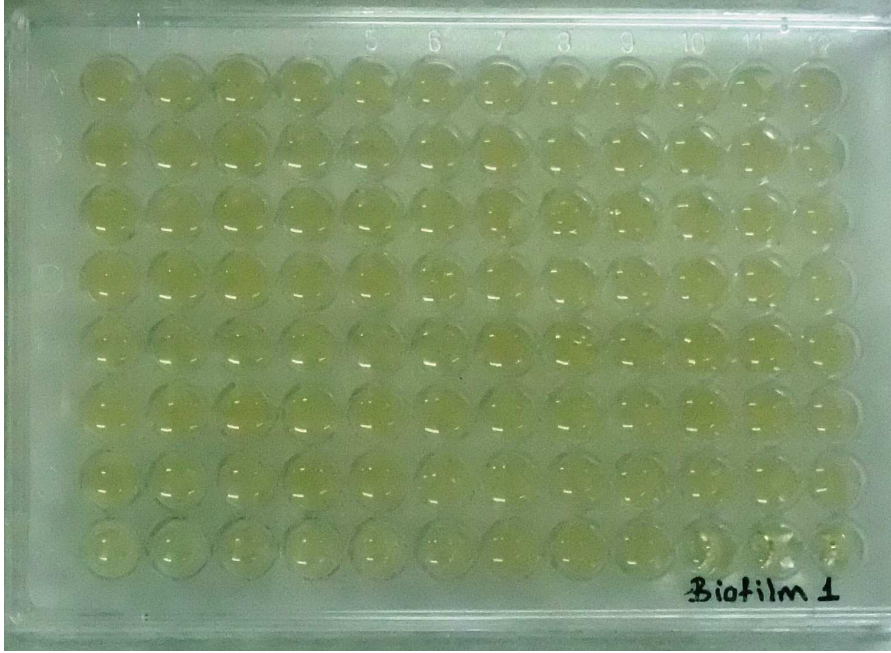
Biyofilm kültürü

Sıvı besiyerinde gelişen bakteriden hazırlanan kültür sıvı besiyerine (TSB ya da BHIB) 1/100 oranında dilüe edilip, her bir kuyucuğa 200 µl dökülür. Negatif kontrol kuyucuğu yalnız sıvı besiyeri ile doldurulmuştur.

Agarda gelişen bakteriden alınan suşlar ile hazırlanan kültür ise her bir mikropate kuyucuğu 180 µl sıvı besiyeri (TSB ya da BHIB) ve 20 µl bakteriyel süspansiyon olacak şekilde doldurulmuştur. Negatif kontrol sadece sıvı besiyeri ile doldurulmuştur.

Biofilm oluşumundaki fenotipik ifadenin in vitro koşullarda değişmeye oldukça müsait olmasından dolayı hataları minimize etmek için ve bilgilerin güvenilirliğini sağlamak için performe edilen testlerin her bir suş için en az 3 kez tekrarlanıp, buna ek olarak her bir test de üç kez tekrarlanmıştır.

İnokule edilen plateler kapağıyla kapatılıp ve uygun koşullar altında inkübasyona bırakılmıştır [Stepanovic ve ark., 2007].



Resim 3.10. *Aeromonas* izolatlarının mikropate içerisinde 30°C’de 24 saatlik İnkübasyonu

Yıkama

İnkubasyondan sonra kuyucukların içeriği atık konteynırına boşaltılıp her bir kuyucuk üç kez 300 µl’ lik steril tamponlanmış fosfat tuzu (PBS) ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi için mikropipet kullanılmıştır. Her yıkama aşamasından sonra fiske vurularak kuyucuklar boşaltılmıştır. Plateler kurumaya bırakmak üzere ters çevrilmiştir [Stepanovic ve ark., 2007].

Fiksasyon

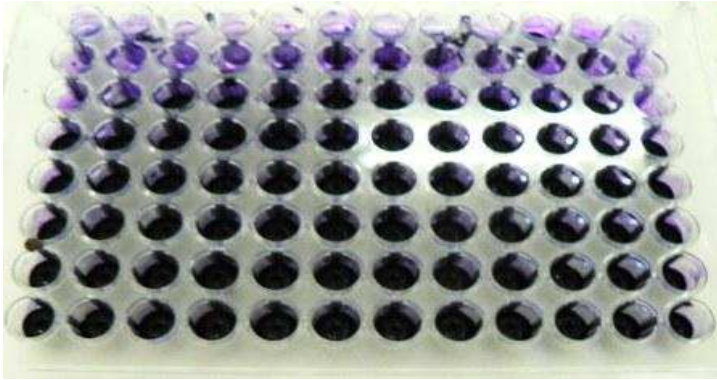
Yıkamadan sonra yapışan bakterilerin kalıntısı 150 µl metanol ile 20 dakikalık fiksasyondan sonra mikropateler boşaltılıp tek bir fiske vurulup bir gece ters pozisyonda oda sıcaklığında hava ile kurumaya bırakılmıştır [Stepanovic ve ark., 2007].



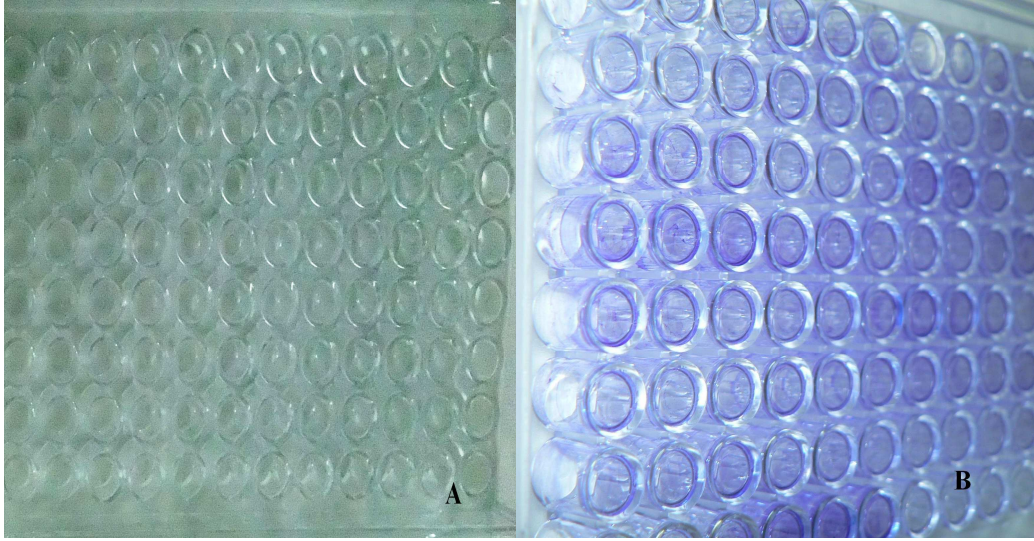
Resim 3.11. Yıkama sonrası metanol fiksasyonu.

Boyama

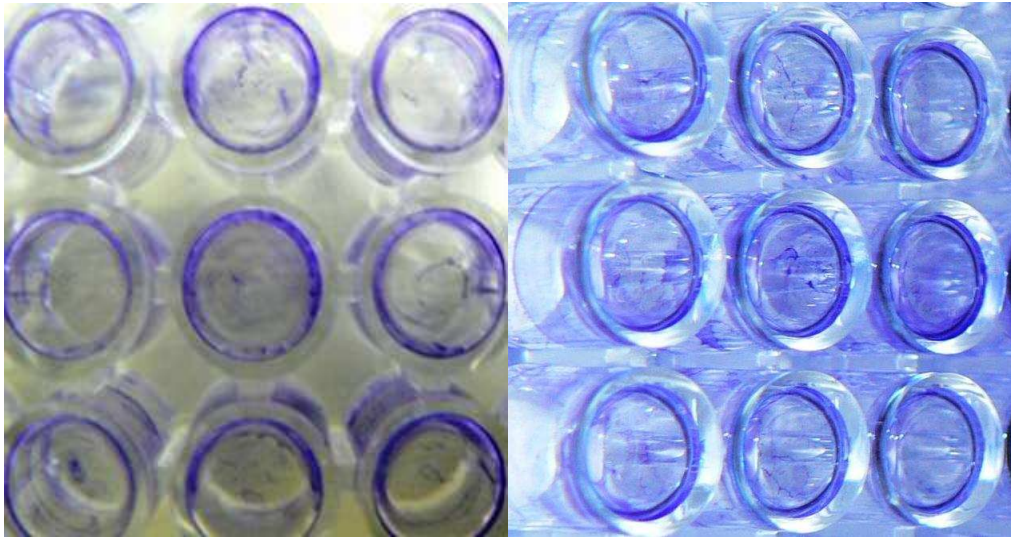
Oluşan biyofilm tabakası her bir mikroplate kuyucuğu 150 mikro litre kristal violet kullanılarak boyanmış (15 dak., oda sıcaklığında), boyamadan sonra boyanın fazlası pipetle çekilip geri kalan kısım mikroplateler akan su altına tutularak yıkanmıştır. Boya temizlenene kadar yıkamaya devam edilmiştir [Stepanovic ve ark., 2007].



Resim 3.12. Kristal viyole ile yapılan boyama.



Resim 3.13. Boyama öncesi (A) ve sonrası (B) ters çevrilip kurumaya bırakılan mikrolateler.

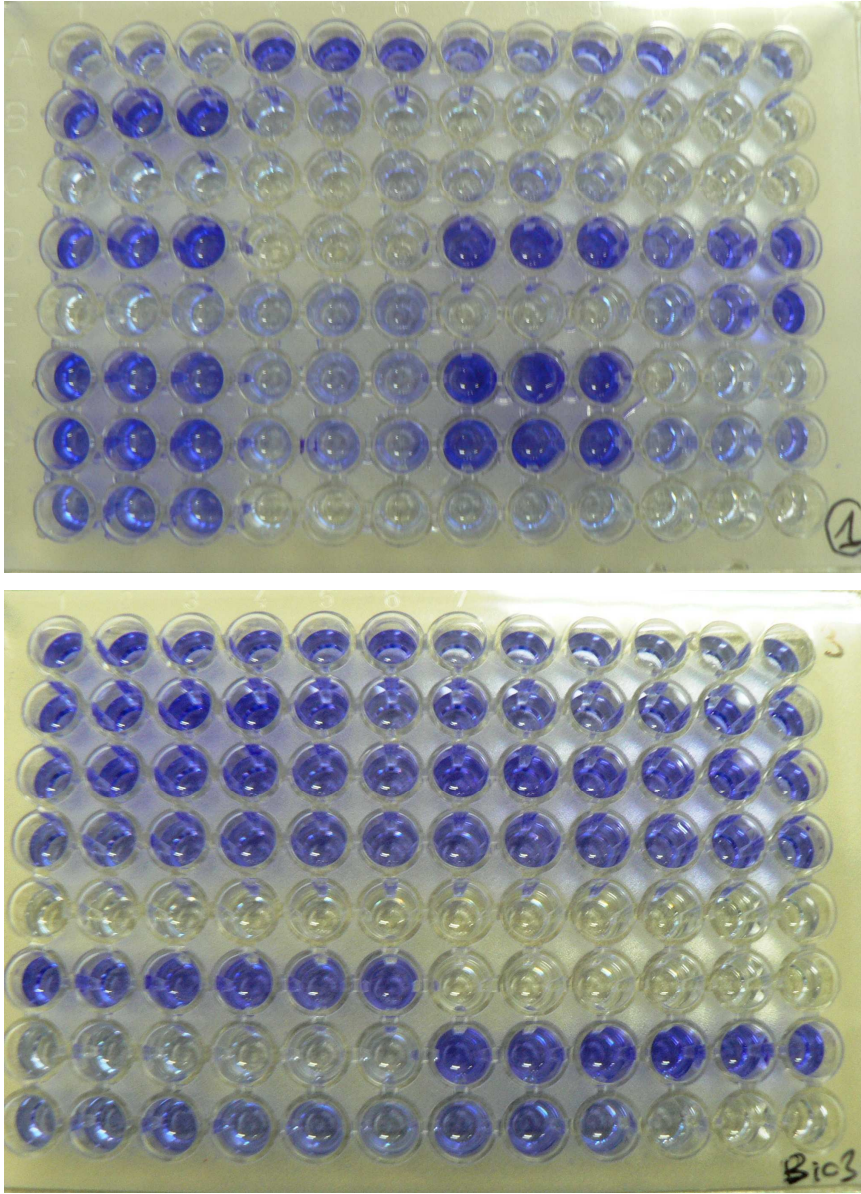


Resim 3.14. Mikroplate tabanındaki biyofilm oluşumunun görünümü.

Boyanın geri çözdürülmesi

Mikroplateler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra hücrelere bağlanan boya geri çözdürülmek üzere her kuyucuktaki boya % 33'lük glasiyel asetik asit ile çözdürülmüştür. Mikroplatelerin havayla temasını önlemek için kapakları kapatılıp oda sıcaklığında en az 30 dakika çalkalamaksızın beklenmiştir. Glasiyel asetik asit

eklenmesi kuyucukların hem tavan hem de duvarlarına yapışan bakterilerin indirekt ölçülmesinde olanak sağlamaktadır. Alternatif olarak % 95' lik etanol kullanılabilir [Stepanovic ve ark., 2007].



Resim 3.15. Tutunma olan yüzeylerde bakteri hücresinin tuttuğu boyanın geri çözdürülmesi.

Sonuçların ölçülmesi

Kristal violet ile boyanan kuyucuklardaki boya glasiyel asetik asit ile çözdürüldükten sonra her bir kuyucuktaki Optik yoğunluk (OD) 570 nm’ de microplate okuyucuda ölçülmüştür [Stepanovic ve ark., 2007].

Sonuçlar TSA ve TSB’ deki negatif kontrollerin ortalaması ile BHIA ve BHIB’ deki negatif kontrollerin ortalamasına göre değerlendirilmiştir. Buna göre; negatif kontroller sırası ile 0,095 ve 0,090 alındığında her bir aralık negatif kontrolün sırayla bir, iki ve dört katı olacak şekilde belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Biyofilm ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan aralıklar

TSA/TSB			BHIA/BHIB		
... <	(-)	< 0,095	... <	(-)	< 0,090
0,095<	(+)	< 0,190	0,090<	(+)	< 0,180
0,190<	(++)	<0,380	0,180<	(++)	<0,370
0,380<	(+++)	<...	0,370<	(+++)	<...

*(-); negatif, *(+); zayıf, *(++); orta, *(+++); iyi

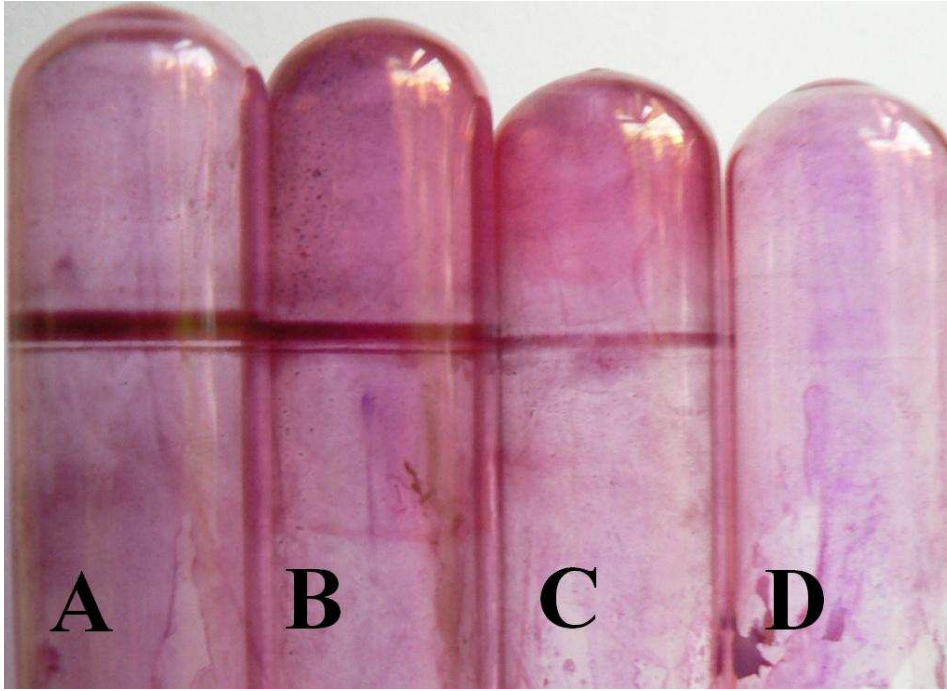
*TSA: Tryptic Soy Agar, *TSB: Tryptic Soy Broth *BHIA: Brain Heart Infision agar,

*BHIB: Brain Heart Infision Broth

3.7.2. Tüp testi (Cam yüzeyde tutunma)

Daha önce Christensen ve arkadaşları (1985) tarafından tanımlanan biyofilm oluşumunun ölçülmesinde kullanılan tüp testi bazı modifikasyonlarla performe edilmiştir. Test edilecek suşların TSA’ da ki inkübasyonundan sonra seçilen özdeş koloniler her bir tüpte 2 ml olan TSB’ ye inokule edilip tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası içeriği bir pipet yardımıyla boşaltılan tüpler 2 ml hacmindeki %0,25’ lik safranin ile boyanıp 1 dakika bekletilmiştir. Boyama sonrası fazla boya pipet yardımıyla boşaltıldıktan sonra tüpler ters pozisyonda bir gece oda

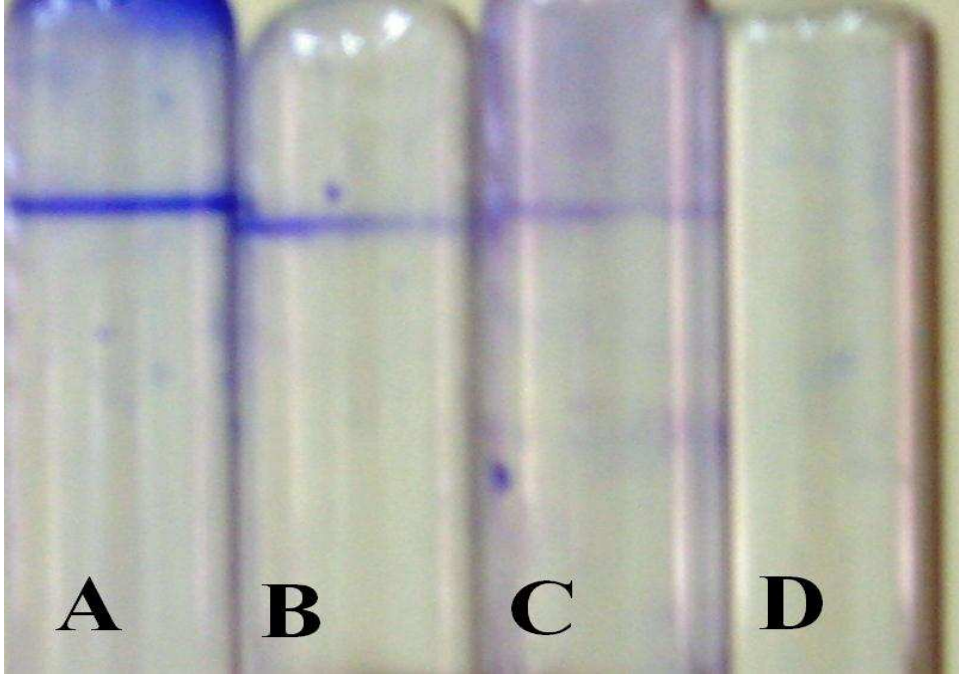
sıcaklığında bekletilerek, ertesi gün ölçümler tüpün iç yüzeyinde ki boyanma derecesine göre negatif (-), zayıf (+), orta dereceli (++) ve iyi (+++) olmak üzere değerlendirilmiştir [Stepanovic ve ark., 2000].



Resim 3.16. Safranin ile boyanan tüpte biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi.

A.İyi (+++), B.Orta (++), C. Zayıf (+), D. Negatif (-)

Tüpte biyofilm oluşumunun ölçülmesinde bir başka yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde ise, test edilecek suşların TSA’ da ki inkübasyonundan sonra seçilen özdeş koloniler her bir tüpte 2 ml olan TSB’ ye inokule edilip 30 °C’ de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası içeriği boşaltılan tüpler steril tamponlanmış fosfat tuzu (PBS) ile yıkandıktan sonra ters pozisyona bırakılıp kuruması beklenip, kuruduktan sonra %1’lik kristal viyole ile boyanıp 15 dakika bekletilmiştir. Boyama işleminden sonra içleri boşaltılan tüpler akan su altında yıkanıp ters pozisyonda kurumaya bırakılmış ve sonuçlar tüpün iç yüzeyinde ki boyanma derecesine göre negatif (-), zayıf (+), orta dereceli (++) ve iyi (+++) olmak üzere değerlendirilmiştir [Chistensen ve ark., 1982].



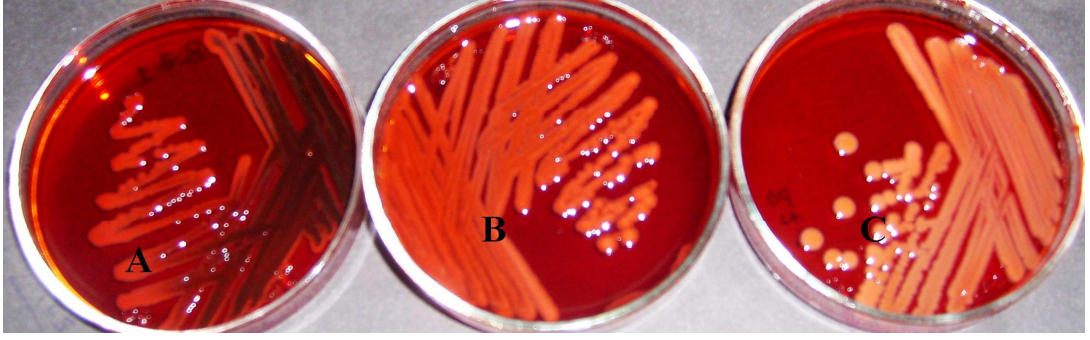
Resim 3.17. Kristal viyole ile boyanan tüpte biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi
A.İyi (+++), B.Orta (++), C. Zayıf (+), D. Negatif (-)

3.7.3. Congo Red Agar (CRA) ile biyofilm ölçümü

Congo red agar

Bileşimi:	g/lt
BHI broth,	37g/lt
Sakkaroz,	50g/lt
Agar,	10g/lt
Congo kırmızısı,	0,8 g/lt

Hazırlanan Congo Red Agar'a ekim yapıp kolonilerde gözlenen renk oluşumuna göre siyah-bordo (+++), kırmızı (++), pembe (+) ve beyaz (-) olmak üzere değerlendirilir [Freeman ve ark., 1989].



Resim 3.18. Congo Red Agar'da biyofilm ölçümü.
A. İyi (+++), B. Orta (++), C. Zayıf (+)

4.BULGULAR

Gıda ve çevresel örneklerden izole edilen ve tanımlanan hareketli *Aeromonas* türlerinin çalışılan örnek sayısı ve izolasyon sayılarının dağılımları Tablo 4.1’de görülmektedir.

Çizelge 4.1. Çeşitli kaynaklardan izole edilen hareketli *Aeromonas* izolatlarının çalışılan örnek sayısına göre dağılımı

Kaynak		Çalışılan örnek sayısı	İzolasyon sayısı
Gıda	Et	3	6
	Süt	5	5
	Peynir	18	6
Toplam		25	17
Çevresel	Balık	47	36
	Sediment	4	5
Toplam		51	41
Genel toplam		76	58

Bu araştırmada incelenen toplam 76 örneğin 25’i gıda, 51’i de çevresel örneklere aittir. 25 gıda örneğinden 17 izolat, 51 çevresel örnekten de 41 izolat elde edilmiştir. Ayrıca standart suşlar olan *A. hydrophila* (ATCC 7966) ve *A. caviae* (ATCC 15468) ile beraber toplam 60 izolat incelenmiştir.

Araştırmada incelenen gıda örnek çeşitleri kapsamında etten (kıyma) 6, süten 5 ve peynir örneklerinden de 6 adet olmak üzere toplamda elde edilen 17 adet izolat ile çalışılmıştır.

İncelenen çevresel örnek çeşitleri kapsamında balık örneklerinden 47 izolat, sediment örneklerinden 4 izolat olmak üzere toplam 51 adet çevresel izolat elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. Gıda ve çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas* izolatlarının türlere göre dağılımı.

Gıda örnekleri	İzolat sayısı	<i>Aeromonas spp.</i>		
		<i>A.hydrophila</i>	<i>A.veroni biovar sobria</i>	<i>A. caviae</i>
Et	6	5	1	-
Süt	5	5	-	-
Peynir	6	4	1	1
Toplam	17	14	2	1
Çevresel örnekler				
Balık	36	5	27	4
Sediment	5	3	2	-
Toplam	41	8	29	4
Genel toplam	58	22	31	5

Araştırmamızda izole edilen toplam 58 adet hareketli *Aeromonas* izolatının 17'si gıda örneklerinden, 41'i de çevresel örneklerden izole edilmiştir. 17 gıda izolatı türlere göre değerlendirildiğinde; 14'ü *A. hydrophila*, 1'i *A. caviae*, 2'si de *A. veronii biovar sobria*'dır. Bu grupta incelenen et (kıyma) örneklerinden yapılan izolasyon çalışmalarında toplam 6 izolatın 5'i *A. hydrophila*, 1' i *A. veronii biovar sobria*; süt örneklerinden izole edilen toplam 5 adet izolatın 5' i *A. hydrophila*; peynir örneklerinden izole edilen toplam 6 adet izolatın 4'ü *A. hydrophila*, 1' i *A. caviae*, 1' i *A. veronii biovar sobria* olarak bulunmuştur. Çevresel izolatlar türlere göre değerlendirildiğinde; 8'i *A. hydrophila*, 26'sı *A. veronii biovar sobria* ve 4' ü de *A. caviae*'dir. Çevresel örneklerde ise balıktan izole edilen 36 izolatın 5'i *A. hydrophila* 27' si *A. veronii biovar sobria* ve 4' ü *A. caviae*; sediment örneklerinden izole edilen 5 izolatın 3'ü *A. hydrophila*, 2' si *A. veronii biovar sobria* olarak tanımlanmıştır. İzole edilen toplam 58 *Aeromonas* izolatı türlere göre bulunma sıklıkları değerlendirildiğinde gıdalarda en fazla *A. hydrophila* 'ya (% 61,6) rastlanırken çevre izolatlarında ise en fazla *A. veronii biovar sobria* 'ya (% 70,73) rastlanmıştır.

Çizelge 4.3. İzole edilen *Aeromonas* türlerinin incelenen gıda örneklerine göre dağılımı

No	İzolat no.	<i>Aeromonas spp.</i>	Gıda örnekleri
1.	Ah12P*	<i>A. hydrophila</i>	Peynir
2.	Ah6dP	<i>A. hydrophila</i>	peynir
3.	Ah21P	<i>A. hydrophila</i>	peynir
4.	Ah3P	<i>A. hydrophila</i>	peynir
5.	Ah17K*	<i>A. hydrophila</i>	Kıyma
6.	Ah43K	<i>A. hydrophila</i>	Kıyma
7.	Ah14K	<i>A. hydrophila</i>	Kıyma
8.	Ah9K	<i>A. hydrophila</i>	Kıyma
9.	Ah10-1K	<i>A. hydrophila</i>	Kıyma
10.	Aha1S*	<i>A. hydrophila</i>	Süt
11.	Ahd1S	<i>A. hydrophila</i>	Süt
12.	Ahd2S	<i>A. hydrophila</i>	Süt
13.	Ahc2S	<i>A. hydrophila</i>	Süt
14.	Aha2S	<i>A. hydrophila</i>	Süt
15.	As10-2K	<i>A. veroni biovar sobria</i>	Kıyma
16.	As4P	<i>A. veroni biovar sobria</i>	peynir
17.	Ac28P	<i>A. caviae</i>	peynir

*P; peynir, *K; kıyma, *S; süt

Çizelge 4.4. İzole edilen *Aeromonas* türlerinin incelenen çevresel örneklerine göre dağılımı

No	Şuş isimleri	<i>Aeromonas spp</i>	Kaynak (balık)
1.	Ah2S*	<i>A. hydrophila</i>	solungaç
2.	AhZ1S	<i>A. hydrophila</i>	solungaç
3.	Ah3B*	<i>A. hydrophila</i>	bağırsak
4.	AhX2B	<i>A. hydrophila</i>	bağırsak
5.	Ah2D	<i>A. hydrophila</i>	Deri
6.	As1S	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
7.	As3S	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
8.	As4S	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
9.	As5S	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
10.	As6S	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
11.	As7S	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
12.	AsZ2S	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
13.	AsX1S	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
14.	AsX2S	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
15.	AsX3S	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
16.	As1B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	solungaç
17.	AsZ1B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	bağırsak
18.	AsZ2B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	bağırsak
19.	AsZ3B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	bağırsak
20.	AsZ4B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	bağırsak
21.	AsZ5B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	bağırsak
22.	AsZ6B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	bağırsak
23.	AsZ8B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	bağırsak
24.	AsX1B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	bağırsak
25.	AsX3B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	bağırsak
26.	AsX4B	<i>A. veroni biovar sobria</i>	bağırsak
27.	As1D*	<i>A. veroni biovar sobria</i>	Deri
28.	AsZ1D	<i>A. veroni biovar sobria</i>	Deri
29.	AsZ2D	<i>A. veroni biovar sobria</i>	Deri
30.	AsZ4D	<i>A. veroni biovar sobria</i>	Deri
31.	AsZ6D	<i>A. veroni biovar sobria</i>	Deri
32.	AsX1D	<i>A. veroni biovar sobria</i>	Deri

Çizelge 4.4. (Devam) İzole edilen *Aeromonas* türlerinin incelenen çevresel örneklerine göre dağılımı

33.	AcZ5D	<i>A.caviae</i>	Deri
34.	Ac4B	<i>A.caviae</i>	bağırsak
35.	AcZ3S	<i>A.caviae</i>	solungaç
36.	AcZ4S	<i>A.caviae</i>	solungaç
37.	AhSed.1.1	<i>A. hydrophila</i>	sediment
38.	AsSed.3.1	<i>A.veroni biovar sobria</i>	sediment
39.	AsSed.3.2	<i>A.veroni biovar sobria</i>	sediment
40.	AhSed.6.1	<i>A. hydrophila</i>	sediment
41.	AhSed.6.2	<i>A. hydrophila</i>	sediment

Çizelge 4.5. *A. hydrophila* ve *A.caviae* ATCC suşları

No	Suş isimleri	<i>Aeromonas spp.</i>	Kaynak
1.	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	(ATCC 7966)
2.	<i>A.caviae</i>	<i>A. caviae</i>	(ATCC 15368)

4.1. Mikroplate ile Biyofilm Ölçümü Sonuçları

Çizelge 4.6. Gıda örneklerinden izole edilen *Aeromonas* 'larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin TSA ve TSB'deki sonuçları

Besiyeri İzolat No	TSA	Ort.	TSB	Ort.
Ah12P*	0,705/0,797/0,706 0,432/0,487/0,447 0,769/0,727/0,706	0,525	0,555/0,510/0,514 0,314/0,401/0,305 0,355/0,401/0,374	0,405
Ah6dP	0,448/0,674/0,514 0,454/0,422/0,363 0,565/0,484/0,774	0,520	0,301/0,276/0,307 0,232/0,239/0,238 0,245/0,269/0,273	0,265
Ah21P	0,298/0,291/0,320 0,344/0,455/0,420 0,189/0,184/0,390	0,320	0,130/0,128/0,198 0,292/0,306/0,281 0,306/0,333/0,198	0,240
Ah3P	0,328/0,392/0,328 0,304/0,297/0,498 0,505/0,484/0,516	0,390	0,128/0,134/0,132 0,137/0,138/0,160 0,148/0,119/0,179	0,140
As4P	0,727/0,988/1,004 0,705/0,797/0,846 1,280/1,184/1,007	0,950	0,927/1,051/0,860 0,768/0,643/0,743 0,703/0,603/0,652	0,770
Ac28P	0,094/0,086/0,090 0,086/0,088/0,098 0,096/0,092/0,098	0,090	0,102/0,096/0,101 0,095/0,088/0,085 0,086/0,084/0,087	0,090
Ah43K*	0,346/0,337/0,335 0,508/0,519/0,492 0,478/0,366/0,443	0,425	0,183/0,196/0,180 0,156/0,150/0,149 0,219/0,250/0,271	0,195
Ah14K	0,179/0,182/0,214 0,281/0,299/0,274 0,149/0,220/0,231	0,255	0,155/0,254/0,155 0,126/0,132/0,214 0,261/0,245/0,247	0,195
Ah9K	0,365/0,469/0,312 0,363/0,386/0,334 0,333/0,416/0,505	0,370	0,294/0,212/0,259 0,204/0,202/0,206 0,132/0,148/0,129	0,200

*TSA: Tryptic Soy Agar, *TSB: Tryptic Soy Broth, *P: peynir, *K: kıyma

Çizelge 4.6. (Devam) Gıda örneklerinden izole edilen *Aeromonas*’larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm’de ölçümlerinin TSA ve TSB’deki sonuçları

Besiyeri İzolât No	TSA	Ort.	TSB	Ort.
Ah10-1K*	0,221/0,173/0,252 0,187/0,225/0,174 0,180/0,194/0,194	0,200	0,261/0,185/0,158 0,239/0,230/0,234 0,274/0,252/0,202	0,225
As10-2K	0,511/0,402/0,474 0,356/0,341/0,322 0,799/0,734/0,844	0,530	0,232/0,235/0,260 0,519/0,488/0,445 0,634/0,534/0,483	0,425
Aha1S*	0,152/0,183/0,304 0,238/0,231/0,205 0,497/0,288/0,250	0,220	0,100/0,099/0,125 0,216/0,153/0,256 0,242/0,257/0,300	0,195
Ahd1S	0,288/0,271/0,489 0,280/0,304/0,359 0,370/0,298/0,300	0,305	0,224/0,257/0,236 0,182/0,285/0,193 0,241/0,283/0,242	0,235
Ahd2S	0,298/0,306/0,255 0,313/0,277/0,309 0,400/0,258/0,278	0,285	0,248/0,208/0,239 0,164/0,263/0,177 0,178/0,173/0,264	0,210
Ahc2S	0,499/0,545/0,494 0,195/0,209/0,329 0,359/0,296/0,239	0,350	0,295/0,203/0,213 0,217/0,292/0,284 0,268/0,259/0,223	0,250
Aha2S	0,158/0,293/0,556 0,316/0,319/0,296 0,205/0,205/0,159	0,245	0,109/0,107/0,113 0,193/0,292/0,296 0,132/0,165/0,215	0,200
Aha1S	0,362/0,458/0,364 0,221/0,302/0,241 0,309/0,452/0,538	0,350	0,352/0,323/0,393 0,370/0,329/0,369 0,365/0,278/0,299	0,340

*TSA: Tryptic Soy Agar, *TSB: Tryptic Soy Broth, *S: Süt, *K: Kıyma

Çizelge 4.7. Gıda örneklerinden izole edilen *Aeromonas* 'larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin BHIA ve BHIB' deki sonuçları

Besiyeri İzolat No	BHIA	Ort.	BHIB	Ort.
Ah12P*	0,403/0,445/0,404 0,423/0,401/0,324 0,304/0,389/0,496	0,400	0,329/0,382/0,498 0,385/0,317/0,297 0,279/0,295/0,367	0,350
Ah6dP	0416/0,510/0,361 0,568/0,537/0,413 0,427/0,564/0,446	0,470	0,402/0,324/0,225 0,293/0,232/0,197 0,234/0,252/0,305	0,270
Ah21P	0,633/0,511/0,498 0,380/0,321/0,371 0,369/0,464/0,433	0,440	0,359/0,282/0,361 0,395/0,333/0,325 0,355/0,348/0,324	0,340
Ah3P	0,239/0,262/0,205 0,206/0,183/0,211 0,182/0,184/0,253	0,215	0,145/0,121/0,180 0,255/0,208/0,228 0,137/0,165/0,165	0,180
As4P	0,603/0,691/0,642 0,961/0,936/1,058 40,21/0,989/1,177	0,895	0,653/0,961/0,757 0,806/0,869/0,814 0,864/0,905/0,943	0,840
Ac28P	0,072/0,082/0,075 0,075/0,077/0,071 0,073/0,070/0,086	0,075	0,087/0,096/0,122 0,075/0,077/0,071 0,073/0,070/0,086	0,080
Ah43K*	0,400/0,341/0,379 0,370/0,324/0,380 0,248/0,426/0,250	0,340	0,225/0,177/0,207 0,288/0,243/0,203 0,196/0,170/0,202	0,205
Ah14K	0,120/0,252/0,151 0,141/0,148/0,114 0,121/0,159/0,180	0,150	0,253/0,190/0,258 0,267/0,187/0,198 0,181/0,194/0,219	0,210
Ah9K	0,353/0,447/0,411 0,284/0,287/0,234 0,337/0,308/0,281	0,305	0,212/0,315/0,188 0,284/0,287/0,242 0,337/0,308/0,281	0,270

*BHIA: Brain Heart Infision agar, *BHIB: Brain Heart Infision Broth

*P: Peynir, *K: Kıyma

Çizelge 4.7. (Devam) Gıda örneklerinden izole edilen *Aeromonas*’larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm’de ölçümlerinin BHIA ve BHIB’ deki sonuçları

Besiyeri İzolat No	BHIA	Ort.	BHIB	ORT
Ah10-1K*	0,343/0,311/0,385 0,228/0,256/0,225 0,149/0,214/0,275	0,265	0,373/0,388/0,359 0,191/0,188/0,208 0,260/0,266/0,310	0,300
As10-2K	0,681/0,533/0,660 0,451/0,353/0,399 0,330/0,473/0,429	0,480	0,475/0,475/0,459 0,355/0,380/0,321 0,265/0,388/0,390	0,390
Aha1S*	0,458/0,504/0,569 0,435/0,492/0,355 0,301/0,318/0,326	0,420	0,359/0,327/0,380 0,283/0,295/0,203 0,209/0,211/0,177	0,250
Ahd1S	0,397/0,357/0,323 0,284/0,223/0,163 0,268/0,152/0,250	0,265	0,360/0,266/0,267 0,282/0,201/0,199 0,183/0,216/0,240	0,245
Ahd2S	0,225/0,220/0,266 0,182/0,258/0,244 0,223/0,257/0,239	0,235	0,208/0,253/0,270 0,222/0,213/0,268 0,220/0,278/0,261	0,245
Ahc2S	0,298/0,240/0,281 0,299/0,268/0,345 0,317/0,270/0,207	0,270	0,250/0,191/0,290 0,229/0,301/0,303 0,244/0,278/0,293	0,270
Aha2S	0,089/0,085/0,077 0,119/0,112/0,105 0,110/0,100/0,108	0,118	0,128/0,116/0,132 0,194/0,169/0,184 0,173/0,208/0,286	0,175
Aha1S	0,308/0,346/0,394 0,510/0,301/0,262 0,293/0,227/0,243	0,320	0,146/0,200/0,194 0,189/0,177/0,157 0,195/0,192/0,176	0,180

*BHIA: Brain Heart Infision agar, *BHIB: Brain Heart Infision Broth

*S: Süt, *K: Kıyma

Çizelge 4.8. Çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas*'larda biyofilm oluşumunun 570 nm'de ölçümlerinin TSA ve TSB' deki sonuçları

Besiyeri İzolat No	TSA	Ort.	TSB	Ort.
As1S*	0,381/0,886/0,388 0,611/0,616/0,601 0,434/0,502/0,663	0,510	0,102/0,167/0,129 0,202/0,254/0,269 0,259/0,249/0,250	0,210
Ah2S	0,342/0,251/0,590 0,250/0,294/0,286 0,642/0,296/0,456	0,345	0,119/0,205/0,109 0,243/0,231/0,221 0,265/0,212/0,265	0,205
As3S	0,507/0,561/0,580 0,373/0,619/0,557 0,910/0,732/0,671	0,590	0,270/0,380/0,391 0,159/0,144/0,138 0,159/0,146/0,169	0,200
As4S	0,595/0,644/0,952 0,777/0,754/0,644 1,780/1,109/1,043	0,820	0,395/0,460/0,280 0,639/0,448/0,506 0,458/0,443/0,440	0,475
As5S	0,991/0,927/1,075 0,922/1,004/0,965 0,889/1,003/1,009	0,975	0,236/0,168/0,223 0,328/0,297/0,389 0,364/0,304/0,259	0,305
As6S	0,695/0,551/0,605 0,561/0,643/0,800 0,754/0,859/0,724	0,690	0,198/0,294/0,287 0,347/0,304/0,296 0,319/0,304/0,394	0,370
As7S	0,454/0,537/0,787 0,566/0,726/0,761 0,883/0,897/0,878	0,800	0,335/0,510/0,440 0,315/0,341/0,305 0,294/0,277/0,384	0,335
AhZ1S	0,773/0,545/0,423 0,475/0,441/0,326 0,691/0,616/0,567	0,540	0,412/0,410/0,470 0,376/0,372/0,339 0,340/0,312/0,387	0,380
AsZ2S	0,615/0,700/0,539 0,561/0,468/0,481 0,718/0,586/0,658	0,590	0,473/0,487/0,434 0,496/0,336/0,300 0,426/0,336/0,304	0,400

*TSA: Triptic Soy Agar, *TSB: Triptic Soy Broth, *S: Solungaç (balık)

Çizelge 4.8. (Devam) Çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas*' larda biyofilm oluşumunun 570 nm'de ölçümlerinin TSA ve TSB' deki sonuçları

Besiyeri İzolat No	TSA	Ort.	TSB	Ort.
AcZ3S*	0,099/0,089/0,101 0,083/0,101/0,101 0,071/0,097/0,077	0,090	0,084/0,097/0,094 0,066/0,087/0,103 0,102/0,085/0,085	0,090
AcZ4S	0,084/0,085/0,089 0,071/0,097/0,101 0,096/0,077/0,095	0,090	0,096/0,093/0,094 0,092/0,079/0,077 0,100/0,090/0,090	0,090
AsX1S	1,085/0,963/0,274 0,723/0,832/0,524 0,731/0,499/0,805	0,855	0,708/0,740/0,690 0,300/0,500/0,650 0,329/0,398/0,415	0,525
AsX2S	0,505/0,523/0,512 0,265/0,321/0,431 0,444/0,411/0,440	0,465	0,355/0,402/0,321 0,343/0,391/0,362 0,355/0,392/0,369	0,365
AsX3S	0,388/0,322/0,430 0,305/0,365/0,374 0,464/0,568/0,455	0,610	0,250/0,443/0,482 0,320/0,248/0,245 0,268/0,282/0,256	0,285
As1B*	1,156/0,923/0,994 0,599/0,654/0,685 0,701/0,598/0,765	0,785	0,442/0,419/0,428 0,395/0,469/0,491 0,403/0,397/0,439	0,430
Ah3B	0,365/0,406/0,491 0,245/0,255/0,244 0,316/0,301/0,398	0,335	0,127/0,216/0,267 0,113/0,112/0,111 0,111/0,205/0,158	0,145
Ac4B	0,092/0,086/0,093 0,093/0,094/0,092 0,094/0,075/0,080	0,090	0,104/0,095/0,101 0,075/0,075/0,074 0,073/0,077/0,083	0,085
AsZ1B	0,668/0,740/0,731 0,819/0,898/0,827 1,019/1,359/0,912	0,875	0,599/0,687/0,643 0,429/0,417/0,345 0,449/0,423/0,515	0,500

*TSA: Triptic Soy Agar, *TSB: Triptic Soy Broth,

*B: Bağırsak (balık) *S: Solungaç (balık)

Çizelge 4.8. (Devam) Çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas*' larda biyofilm oluşumunun 570 nm'de ölçümlerinin TSA ve TSB' deki sonuçları

Beseiyeri İzolat No	TSA	Ort.	TSB	Ort.
AsZ2B*	0,761/0,712/0,613 0,707/0,640/0,690 0,703/0,770/0,933	0,725	0,540/0,742/0,893 0,362/0,374/0,324 0,342/0,322/0,279	0,465
AsZ3B	0,746/0,475/0,578 0,518/0,654/0,523 0,565/0,440/0,502	0,555	0,276/0,298/0,241 0,530/0,556/0,420 0,580/0,690/0,589	0,460
AsZ4B	0,676/0,639/0,638 0,459/0,472/0,530 0,760/0,699/0,628	0,670	0,459/0,501/0,456 0,257/0,210/0,245 0,227/0,284/0,279	0,280
AsZ5B	0,334/0,444/0,327 0,520/0,601/0,419 0,481/0,550/0,565	0,470	0,387/0,397/0,402 0,359/0,254/0,494 0,305/0,308/0,345	0,360
AsZ6B	0,296/0,219/0,215 0,330/0,445/0,238 0,201/0,199/0,246	0,265	0,269/0,217/0,239 0,183/0,112/0,163 0,132/0,103/0,145	0,155
AsZ8B	0,446/0,513/0,639 0,539/0,415/0,462 0,976/0,842/0,916	0,640	0,245/0,212/0,202 0,304/0,325/0,265 0,383/0,346/0,393	0,300
AsX1B	0,423/0,523/0,658 0,388/0,451/0,564 0,449/0,438/0,547	0,495	0,286/0,272/0,212 0,293/0,281/0,286 0,353/0,297/0,370	0,295
AhX2B	0,687/0,673/0,661 0,824/0,565/0,725 0,775/0,757/0,787	0,715	0,207/0,267/0,261 0,232/0,235/0,289 0,312/0,345/0,298	0,280
AsX3B	0,183/0,227/0,222 0,305/0,354/0,294 0,271/0,458/0,210	0,260	0,130/0,135/0,108 0,184/0,190/0,178 0,180/0,180/0,174	0,175

*TSA: Tryptic Soy Agar, *TSB: Tryptic Soy Broth

*B: Bağırsak (balık)

Çizelge 4.8. (Devam) Çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas*' larda biyofilm oluşumunun 570 nm'de ölçümlerinin TSA ve TSB' deki sonuçları

Beseiyeri İzolat No	TSA	Ort.	TSB	Ort.
AsX4B	0,198/0,132/0,233 0,217/0,392/0,343 0,194/0,209/0,193	0,235	0,476/0,312/0,270 0,110/0,119/0,142 0,121/0,104/0,110	0,150
As1D*	0,674/0,593/0,444 0,523/0,569/0,745 0,700/0,728/0,838	0,590	0,308/0,446/0,375 0,268/0,218/0,240 0,268/0,230/0,317	0,285
Ah2D	0,363/0,348/0,333 0,355/0,541/0,490 0,336/0,314/0,260	0,370	0,254/0,145/0,224 0,237/0,210/0,177 0,220/0,274/0,235	0,220
AsZ1D	0,328/0,331/0,339 0,339/0,386/0,334 0,475/0,559/0,432	0,390	0,294/0,544/0,423 0,256/0,462/0,376 0,421/0,370/0,393	0,425
AsZ2D	0,319/0,27/0,338 0,446/0,370/0,416 0,646/0,532/0,702	0,450	0,357/0,476/0,350 0,352/0,317/0,237 0,342/0,288/0,251	0,330
AsZ4D	0,340/0,440/0,327 0,402/0,328/0,330 0,724/0,608/0,715	0,470	0,189/0,257/0,268 0,210/0,180/0,200 0,326/0,225/0,221	0,265
AcZ5D	0,064/0,062/0,072 0,092/0,098/0,085 0,076/0,086/0,095	0,080	0,094/0,063/0,061 0,073/0,075/0,086 0,100/0,105/0,099	0,085
AsZ6D	0,710/0,921/0,631 0,697/0,645/0,767 0,835/0,791/1,170	0,800	0,243/0,337/0,318 0,358/0,404/0,425 0,083/0,339/0,355	0,365
AsX1D	1,057/1,690/1,836 1,064/1,013/0,837 1,125/1,201/1,072	1,255	1,415/1,195/1,042 0,995/0,856/0,985 0,895/0,987/0,756	1,015

*TSA: Tryptic Soy Agar, *TSB: Tryptic Soy Broth

*B: Bağırsak (balık) *D: Deri (balık)

Çizelge 4.8. (Devam) Çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas*' larda biyofilm oluşumunun 570 nm'de ölçümlerinin TSA ve TSB' deki sonuçları

Beseiyeri izolat no	TSA	Ort.	TSB	Ort.
AhSed.6.1	0,646/0,613/0,636 0,857/0,773/0,671 0,715/0,604/0,828	0,705	0,383/0,304/0,305 0,401/0,327/0,420 0,534/0,364/0,610	0,405
AhSed.6.2	0,558/0,697/0,558 0,760/0,759/0,619 0,780/0,965/1,183	0,760	0,665/0,862/0,819 0,358/0,319/0,340 0,377/0,479/0,470	0,450
AsSed.3.1	0,514/0,693/0,722 0,656/0,464/0,518 0,656/0,781/0,668	0,630	0,222/0,233/0,188 0,279/0,285/0,195 0,219/0,278/0,336	0,250
AsSed.3.2	0,437/0,558/0,552 0,520/0,559/0,819 0,541/0,743/0,584	0,570	0,514/0,452/0,451 0,283/0,240/0,241 0,646/0,434/0,368	0,385
AhSed.1.1	0,386/0,206/0,288 0,284/0,242/0,300 0,381/0,391/0,302	0,295	0,370/0,223/0,370 0,279/0,285/0,295 0,219/0,378/0,336	0,305
<i>A. hydrophila</i> (ATCC)	0,222/0,239/0,319 0,389/0,349/0,377 0,253/0,224/0,272	0,300	0,212/0,205/0,182 0,226/0,201/0,208 0,204/0,27370,235	0,215
<i>A. caviae</i> (ATCC)	0,078/0,096/0,107 0,084/0,093/0,093 0,082/0,100/0,092	0,090	0,090/0,088/0,092 0,065/0,070/0,065 0,078/0,078/0,069	0,080
Kontrol	0,103/0,101/0,100 0,083/0,079/0,090 0,083/0,095/0,072	0,090	0,102/0,098/0,082 0,085/0,080/0,095 0,082/0,085/0,090	0,090

*TSA: Tryptic Soy Agar, *TSB: Tryptic Soy Broth

*SED: sediment

Çizelge 4.9. Çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas* 'larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin BHIA ve BHIB' deki sonuçları

Besiyeri İzolat No	BHIA	Ort.	BHIB	ORT
As1S*	0,440/0,420/0,390 0,215/0,359/0,288 0,222/0,325/0,491	0,330	0,270/0,242/0,233 0,275/0,220/0,288 0,183/0,199/0,188	0,220
Ah2S	0,312/0,262/0,298 0,316/0,334/0,400 0,347/0,342/0,253	0,320	0,158/0,175/0,123 0,172/0,182/0,193 0,173/0,186/0,185	0,170
As3S	0,382/0,486/0,410 0,562/0,610/0,446 0,451/0,443/0,479	0,475	0,228/0,307/0,211 0,276/0,281/0,261 0,304/0,248/0,259	0,265
As4S	0,705/0,697/0,662 0,876/0,859/0,673 0,535/0,810/0,832	0,735	0,593/0,496/0,471 0,457/0,548/0,673 0,657/0,506/0,581	0,555
As5S	0,627/0,577/0,638 0,588/0,523/0,578 0,740/0,520/0,551	0,590	0,422/0,649/0,547 0,505/0,557/0,563 0,523/0,690/0,575	0,565
As6S	0,740/0,863/0,535 0,522/0,753/0,578 0,880/0,658/0,696	0,590	0,518/0,578/0,618 0,6300,508/0,472 0,419/0,403/0,381	0,580 T
As7S	0,355/0,494/0,747 0,895/0,788/0,474 0,880/0,658/0,696	0,685	0,348/0,504/0,651 0,426/0,387/0,506 0,401/0,481/0,410	0,440
AhZ1S	0,352/0,342/0,334 0,426/0,593/0,507 0,519/0,365/0,433	0,455	0,341/0,310/0,220 0,324/0,316/0,311 0,278/0,243/0,194	0,280
AsZ2S	0,713/0,780/0,704 0,417/0,544/0,480 0,446/0,443/0,555	0,565	0,305/0,319/0,294 0,452/0,446/0,434 0,469/0,523/0,415	0,435
AcZ3S	0,101/0,103/0,109 0,099/0,086/0,085 0,078/0,080/0,085	0,090	0,082/0,081/0,098 0,102/0,090/0,085 0,090/0,092/0,095	0,090

*BHIA: Brain Heart Infision agar, *BHIB: Brain Heart Infision Broth

*S: Solungaç (balık)

Çizelge 4.9. (Devam) Çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas* 'larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin BHIA ve BHIB' deki sonuçları

Besiyeri İzolat No	BHIA	Ort.	BHIB	ORT
AcZ4S*	0,099/0,091/0,090 0,091/0,083/0,088 0,097/0,095/0,080	0,090	0,095/0,104/0,092 0,090/0,085/0,088 0,087/0,089/0,080	0,090
AsX1S	0,353/0,509/0,461 0,452/0,715/0,430 0,435/0,429/0,473	0,475	0,266/0,286/0,339 0,301/0,332/0,356 0,359/0,311/0,241	0,340
AsX2S	0,380/0,558/0,545 0,354/0,427/0,311 0,336/0,533/0,328	0,420	0,305/0,319/0,294 0,270/0,299/0,258 0,299/0,321/0,305	0,295
AsX3S	0,270/0,285/0,277 0,196/0,241/0,240 0,276/0,245/0,356	0,265	0,217/0,223/0,298 0,172/0,155/0,133 0,165/0,168/0,174	0,175
As1B*	0,412/0,486/0,462 0,515/0,440/0,665 0,362/0,472/0,358	0,465	0,477/0,406/0,470 0,330/0,439/0,299 0,380/0,533/0,431	0,420
Ah3B	0,235/0,308/0,216 0,223/0,206/0,203 0,322/0,318/0,217	0,250	0,149/0,177/0,181 0,179/0,104/0,118 0,194/0,113/0,152	0,150
Ac4B	0,087/0,103/0,085 0,083/0,082/0,078 0,076/0,085/0,089	0,085	0,071/0,086/0,072 0,070/0,074/0,082 0,085/0,100/0,082	0,080
AsZ1B	0,370/0,420/0,437 0,339/0,336/0,244 0,489/0,412/0,306	0,375	0,284/0,310/0,255 0,314/0,340/0,281 0,189/0,249/0,340	0,285

*BHIA: Brain Heart Infision agar, *BHIB: Brain Heart Infision Broth

*S: Solungaç (balık) *B: Bağırsak (balık)

Çizelge 4.9. (Devam) Çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas* 'larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin BHIA ve BHIB' deki sonuçları

Besiyeri İzolat No	BHIA	Ort.	BHIB	ORT
AsZ2B*	0,817/0,660/0,579 0,673/0,590/0,640 0,679/0,807/0,473	0,650	0,417/0,278/0,275 0,371/0,443/0,380 0,643/0,485/0,573	0,430
AsZ3B	0,357/0,462/0,349 0,227/0,321/0,424 0,421/0,314/0,279	0,340	0,188/0,132/0,248 0,301/0,241/0,276 0,222/0,241/0,278	0,250
AsZ4B	0,472/0,494/0,402 0,474/0,343/0,363 0,415/0,382/0,414	0,405	0,200/0,231/0,276 0,324/0,240/0,254 0,299/0,370/0,282	0,285
AsZ5B	0,453/0,495/0,571 0,522/0,576/0,632 0,688/0,553/0,364	0,540	0,212/0,199/0,264 0,303/0,274/0,315 0,219/0,200/0,194	0,250
AsZ6B	0,173/0,181/0,180 0,130/0,121/0,146 0,116/0,141/0,111	0,140	0,180/0,159/0,158 0,159/0,196/0,270 0,161/0,214/0,172	0,185
AsZ8B	0,364/0,368/0,297 0,330/0,320/0,437 0,343/0,357/0,347	0,350	0,417/0,419/0,386 0,336/0,365/0,297 0,237/0,217/0,212	0,295
AsX1B	0,471/0,568/0,555 0,488/0,559/0,525 0,465/0,600/0,619	0,540	0,358/0,392/0,337 0,202/0,218/0,203 0,282/0,325/0,485	0,295
AhX2B	0,417/0,382/0,387 0,415/0,432/0,397 0,387/0,356/0,298	0,385	0,348/0,410/0,329 0,328/0,298/0,316 0,305/0,378/0,298	0,335
AsX3B	0,188/0,116/0,155 0,122/0,122/0,141 0,128/0,297/0,205	0,165	0,105/0,104/0,102 0,105/0,106/0,108 0,109/0,109/0,111	0,105

*BHIA: Brain Heart Infision agar, *BHIB: Brain Heart Infision Broth

*B: Bağırsak (balık)

Çizelge 4.9. (Devam) Çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas* 'larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin BHIA ve BHIB' deki sonuçları

Besiyeri İzolat No	BHIA	Ort.	BHIB	ORT
AsX4B*	0,159/0,106/0,157 0,164/0,168/0,156 0,129/0,134/0,160	0,155	0,127/0,139/0,208 0,266/0,169/0,184 0,173/0,208/0,286	0,220
As1D*	0,347/0,429/0,241 0,562/0,429/0,452 0,542/0,466/0,503	0,470	0,197/0,165/0,323 0,266/0,169/0,184 0,173/0,208/0,286	0,220
Ah2D	0,412/0,377/0,380 0,490/0,529/0,500 0,518/0,409/0,425	0,450	0,373/0,315/0,394 0,332/0,292/0,308 0,440/0,349/0,326	0,345
AsZ1D	0,258/0,342/0,232 0,248/0,296/0,238 0,261/0,235/0,278	0,265	0,312/0,30/70,391 0,189/0,272/0,298 0,312/0,257/0,246	0,275
AsZ2D	0,329/0,252/0,223 0,291/0,251/0,344 0,268/0,295/0,268	0,270	0,304/0,309/0,320 0,288/0,220/0,224 0,226/0,256/0,250	0,255
AsZ4D	0,411/0,348/0,547 0,300/0,260/0,369 0,312/0,232/0,282	0,315	0,208/0,167/0,249 0,116/0,108/0,120 0,123/0,116/0,103	0,145
AcZ5D	0,085/0,072/0,097 0,074/0,070/0,068 0,080/0,090/0,088	0,080	0,089/0,083/0,088 0,071/0,067/0,067 0,081/0,070/0,082	0,085
AsZ6D	0,252/0,362/0,259 0,496/0,363/0,345 0,363/0,365/0,351	0,375	0,322/0,350/0,300 0,472/0,303/0,330 0,325/0,320/0,325	0,345
AsX1D	0,912/0,929/1,266 0,992/0,987/0,893 1,012/0,952/0,908	0,905	0,726/0,602/0,633 0,653/0,756/0,758 0,698/0,652/0,603	0,675

*BHIA: Brain Heart Infision agar, *BHIB: Brain Heart Infision Broth

*B: Bağırsak (balık) *D: Deri (balık)

Çizelge 4.9. (Devam) Çevresel örneklerden izole edilen *Aeromonas* 'larda yapılan biyofilm çalışmasının 570 nm'de ölçümlerinin BHIA ve BHIB' deki sonuçları

Besiyeri İzolat No	BHIA	Ort.	BHIB	ORT
AhSed.6.1	0,540/0,620/0,663 0,527/0,465/0,383 0,387/0,381/0,543	0,500	0,332/0,483/0,492 0,368/0,414/0,382 0,326/0,369/0,309	0,385
AhSed.6.2	0,591/0,604/0,617 0,661/0,595/0,310 0,351/0,447/0,461	0,490	0,383/0,426/0,301 0,365/0,370/0,410 0,417/0,440/0,365	0,390
AsSed.3.1	0,609/0,524/0,420 0,372/0,420/0,329 0,320/0,380/0,334	0,3810	0,202/0,298/0,215 0,332/0,478/0,436 0,279/0,285/0,295	0,365
AsSed.3.2	0,208/0,304/0,203 0,626/0,454/0,567 0,307/0,512/0,306	0,430	0,432/0,356/0,454 0,333/0,442/0,447 0,417/0,424/0,388	0,415
AhSed.1.1	0,270/0,201/0,217 0,301/0,373/0,329 0,259/0,224/0,328	0,285	0,178/0,199/0,114 0,190/0,161/0,176 0,153/0,191/0,167	0,170
<i>A. hydrophila</i> (ATCC)	0,350/0,247/0,292 0,365/0,334/0,403 0,377/0,413/0,338	0,345	0,268/0,255/0,319 0,244/0,291/0,255 0,236/0,248/0,246	0,280
<i>A. caviae</i> (ATCC)	0,073/0,075/0,085 0,084/0,092/0,010 0,082/0,073/0,086	0,085	0,070/0,092/0,085 0,097/0,089/0,096 0,098/0,095/0,095	0,090
Kontrol	0,083/0,090/0,082 0,089/0,076/0,092 0,078/0,085/0,089	0,085	0,084/0,095/0,101 0,087/0,086/0,084 0,075/0,075/0,071	0,085

*BHIA: Brain Heart Infision agar, *BHIB: Brain Heart Infision Broth

*Sed: sediment

Çizelge 4.10. Gıda ve çevresel örneklerden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunun besiyerlerine göre dağılımı

Biyofilm Oluşturma Dereceleri	ÜREME ORTAMLARI			
	<i>TSA</i>	<i>TSB</i>	<i>BHIA</i>	<i>BHIB</i>
Negatif	%10	%10	%10	%10
Zayıf pozitif	-	%8.3	%8,3	%13,33
Orta Derecede pozitif	%28.3	%53.3	%30	%55
Kuvvetli Pozitif	%61.6	%28.3	%51,6	%23.3

*TSA: Tryptic Soy Agar, *TSB: Tryptic Soy Broth

*BHIA: Brain Heart Infision agar, *BHIB: Brain Heart Infision Broth

Biyofilm çalışma sonuçlarına göre, tutunmadaki artışın besiyerlerine göre dağılımına bakıldığında biyofilm oluşumunun genel olarak katı besiyerlerinde sıvı besiyerlerine göre daha iyi olduğu görülmüştür. Kullanılan iki katı besiyerinden aynı suşlar TSA’da (%61,6), BHIA’ya (%51,6) göre biyofilm oluşumda daha iyi sonuç verirken, sıvı besiyerlerinde ise TSB’de (%28,3) BHIB’ye (%23,3) göre daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak biyofilm oluşumunda aynı suşlar üzerinde kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu sırasıyla TSA’da %61,6, BHIA’da %51,6, TSB’de %28,3, ve BHIB’de %23,3’dir.

Çizelge 4.11. Gıda ve çevresel örneklerden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunun TSA ve TSB’de türlere göre dağılımı

<i>Aeromonas</i> <i>spp.</i>	ÜREME ORTAMLARI			
	TSA		TSB	
<i>A. hydrophila</i>	Negatif (-)	-	Negatif (-)	-
	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	% 17,39
	Orta der. Pozitif (++)	% 56,52	Orta der. Pozitif (++)	% 73,91
	Kuvvetli pozitif (+++)	% 43,47	Kuvvetli pozitif (+++)	% 17, 39
<i>A. veronii</i> <i>biovar sobria</i>	Negatif (-)	-	Negatif (-)	-
	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	% 9,67
	Orta der. Pozitif (++)	% 12,90	Orta der. Pozitif (++)	% 48,38
	Kuvvetli pozitif (+++)	% 87, 09	Kuvvetli pozitif (+++)	% 41,93
<i>A. caviae</i>	Negatif (-)	% 100	Negatif (-)	% 100
	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	-
	Orta der. Pozitif (++)	-	Orta der. Pozitif (++)	-
	Kuvvetli pozitif (+++)	-	Kuvvetli pozitif (+++)	-

*TSA: Triptic Soy Agar, *TSB: Triptic Soy Broth

Bulgular sonucunda biyofilm oluşumunun türlere göre dağılımına bakıldığında *A. hydrophila* TSA’da zayıf pozitif biyofilm oluşumu göstermezken, %56,52 orta derecede ve %43,47 ise kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu göstermiştir. *A. veronii biovar sobria*’da ise yine TSA’da zayıf pozitif biyofilm oluşumu görülmezken %12,90 orta derecede ve %87,9 kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu görülmüştür. TSA’da kuvvetli pozitif biyofilm oluşumunun %87,9 ile en çok *A. veronii biovar sobria*’da, daha sonra ise %43,47 ile *A. hydrophila*’da olduğu görülürken, *A. caviae*’da biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir.

TSB’ de biyofilm oluşum durumuna bakıldığında ise, *A. hydrophila*’da TSB’de %17,39 zayıf, %73,91 orta ve %17,39 kuvvetli derecede pozitif biyofilm oluşumu görülürken, yine *A. veronii biovar sobria*’da %9,67 zayıf, %48,38 orta ve %41,93 kuvvetli derecede pozitif biyofilm oluşumu görülmüştür. Genel olarak bakıldığında TSB’de kuvvetli pozitif biyofilm oluşumunda *A. veronii biovar sobria* %41,93 ile birinci *A. hydrophila* ise %17,39 ile ikinci sıradayken, *A. caviae*’da yine tutunma gözlemlenmemiştir.

Çizelge 4.12. Gıda ve çevresel örneklerden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunun BHIA ve BHIB’de türlere göre dağılımı

<i>Aeromonas spp.</i>	ÜREME ORTAMLARI			
	BHIA		BHIB	
<i>A. hydrophila</i>	Negatif (-)	-	Negatif (-)	-
	Zayıf Pozitif (+)	% 8,69	Zayıf Pozitif (+)	% 21,73
	Orta der. Pozitif (++)	% 47,82	Orta der. Pozitif (++)	% 69,56
	Kuvvetli pozitif(+++)	% 39,13	Kuvvetli pozitif(+++)	% 8,69
<i>A. veronii biovar sobria</i>	Negatif (-)	-	Negatif (-)	-
	Zayıf Pozitif (+)	% 9,67	Zayıf Pozitif (+)	% 38,70
	Orta der. Pozitif (++)	% 22,58	Orta der. Pozitif (++)	% 54,83
	Kuvvetli pozitif(+++)	% 67,74	Kuvvetli pozitif(+++)	% 9,67
<i>A. caviae</i>	Negatif (-)	% 100	Negatif (-)	% 100
	Zayıf Pozitif (+)	-	Zayıf Pozitif (+)	-
	Orta der. Pozitif (++)	-	Orta der. Pozitif (++)	-
	Kuvvetli pozitif(+++)	-	Kuvvetli pozitif(+++)	-

*BHIA: Brain Heart Infision agar, *BHIB: Brain Heart Infision Broth

BHIA ve BHIB’ deki biyofilm oluşumunun türlere göre dağılımına bakıldığında ise, BHIA’da *A. hydrophila* %8,69 zayıf, %47,82 orta ve %39,13 kuvvetli derece pozitif biyofilm oluştururken, *A. veronii biovar sobria* ise %9,67 zayıf, %22,58 orta ve %67,74 kuvvetli derece biyofilm oluşturmuş, *A. caviae*’da ise biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir. BHIB’de ise *A. hydrophila* %21,73 zayıf, %69,56 orta ve %8,69 kuvvetli derecede biyofilm oluşumu gösterirken, *A. veronii biovar sobria* %38,70 zayıf, %54,83 orta ve %9,67 kuvvetli derecede biyofilm oluşumu göstermiş, *A. caviae*’da ise biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir. Genel olarak bakıldığında ise, *A. veronii biovar sobria* %67,74 ile kuvvetli derecede biyofilm oluşumunda birinci iken *A. hydrophila* %39,13 ile ikinci sıradadır.

4.2. Tüpte (Cam yüzeyde tutunma) Biyofilm Ölçümü Sonuçları

Çizelge 4.13. Gıda örneklerinden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde tüpte biyofilm testi sonuçları

No	Gıda izolatları	<i>Aeromonas spp.</i>	Camda yüzeyde biyofilm oluşum dereceleri
1.	Ah12P*	<i>A. hydrophila</i>	++
2.	Ah6dP	<i>A. hydrophila</i>	++
3.	Ah21P	<i>A. hydrophila</i>	++
4.	Ah3P	<i>A. hydrophila</i>	++
5.	Ah17K*	<i>A. hydrophila</i>	++
6.	Ah43K	<i>A. hydrophila</i>	++
7.	Ah14K	<i>A. hydrophila</i>	++
8.	Ah9K	<i>A. hydrophila</i>	++
9.	Ah10-1K	<i>A. hydrophila</i>	++
10.	Aha1S*	<i>A. hydrophila</i>	++
11.	Ahd1S	<i>A. hydrophila</i>	+++
12.	Ahd2S	<i>A. hydrophila</i>	+++
13.	Ahc2S	<i>A. hydrophila</i>	+++
14.	Aha2S	<i>A. hydrophila</i>	+++
15.	As10-2K	<i>A. sobria</i>	++

Çizelge 4.13. (Devam) Gıda örneklerinden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde tüpte biyofilm testi sonuçları

16.	As4P	<i>A. sobria</i>	+++
17.	Ac28P	<i>A. caviae</i>	+

*P: peynir, *K: kıyma, *S: süt

(+): zayıf pozitif, (++) : orta derecede pozitif, (+++): kuvvetli pozitif

Çizelge 4.14. Çevresel örneklerden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde tüpte biyofilm testi sonuçları

No	Çevresel izolatlar	<i>Aeromonas spp</i>	Camda yüzeyde biyofilm oluşum dereceleri
1.	Ah2S*	<i>A. hydrophila</i>	++
2.	AhZ1S	<i>A. hydrophila</i>	+++
3.	Ah3B*	<i>A. hydrophila</i>	++
4.	AhX2B	<i>A. hydrophila</i>	+++
5.	Ah2D	<i>A. hydrophila</i>	++
6.	As1S	<i>A. sobria</i>	+++
7.	As3S	<i>A. sobria</i>	++
8.	As4S	<i>A. sobria</i>	+++
9.	As5S	<i>A. sobria</i>	++
10.	As6S	<i>A. sobria</i>	++
11.	As7S	<i>A. sobria</i>	++
12.	AsZ2S	<i>A. sobria</i>	+++
13.	AsX1S	<i>A. sobria</i>	+++
14.	AsX2S	<i>A. sobria</i>	++
15.	AsX3S	<i>A. sobria</i>	+++
16.	As 1 B	<i>A. sobria</i>	+++
17.	AsZ1B	<i>A. sobria</i>	+++
18.	AsZ2B	<i>A. sobria</i>	+++
19.	AsZ3B	<i>A. sobria</i>	+++
20.	AsZ4B	<i>A. sobria</i>	+++
21.	AsZ5B	<i>A. sobria</i>	+++
22.	AsZ6B	<i>A. sobria</i>	+++
23.	AsZ8B	<i>A. sobria</i>	+++
24.	AsX1B	<i>A. sobria</i>	+++
25.	AsX3B	<i>A. sobria</i>	++

Çizelge 4.14. (Devam) Çevresel örneklerden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde tüpte biyofilm testi sonuçları

26.	AsX4B	<i>A. sobria</i>	+++
27.	As1D*	<i>A. sobria</i>	+++
28.	AsZ1D	<i>A. sobria</i>	++
29.	AsZ2D	<i>A. sobria</i>	++
30.	AsZ4D	<i>A. sobria</i>	++
31.	AsZ6D	<i>A. sobria</i>	+++
32.	AsX1D	<i>A. sobria</i>	+++
33.	AcZ5D	<i>A. caviae</i>	+
34.	Ac4 B	<i>A. caviae</i>	+
35.	AcZ3S	<i>A. caviae</i>	+
36.	AcZ4S	<i>A. caviae</i>	+
37.	AhSed.1.1	<i>A. hydrophila</i>	+
38.	AsSed.3.1	<i>A. sobria</i>	++
39.	AsSed.3.2	<i>A. sobria</i>	+
40.	AhSed.6.1	<i>A. hydrophila</i>	++
41.	AhSed.6.2	<i>A. hydrophila</i>	+++

(+): zayıf pozitif, (++) : orta derecede pozitif, (+++) : kuvvetli pozitif

*S: solungaç, *B: bağırsak, *D: deri, *Sed: sediment

Çizelge 4.15. *A. hydrophila* (ATCC 7966) *A. caviae* (ATCC 15468) suşlarının tüpte biyofilm testi sonuçları

No	Suş isimleri	<i>Aeromonas spp.</i>	Camda yüzeyde biyofilm oluşum dereceleri
1.	<i>A. hydrophila</i> (ATCC 7966)	<i>A. hydrophila</i>	++
2.	<i>A. caviae</i> (ATCC 15468)	<i>A. caviae</i>	+

Çizelge 4.16. Tüp (cam yüzeyde tutunma) testi sonuçlarının yüzde dağılımı

<i>Aeromonas spp.</i>	Biyofilm Oluşum Dereceleri			
	Negatif (%)	Zayıf pozitif (%)	Orta derecede pozitif (%)	Kuvvetli pozitif (%)
<i>A. hydrophila</i>	-	%4,34	%65,21	%30,43
<i>A. veronii biovar sobria</i>	-	%3,22	%35,48	%61,34
<i>A. caviae</i>	-	%100	-	-

*(-): negatif, (+): zayıf pozitif, (++) : orta derecede pozitif, (+++): kuvvetli pozitif

Tüpte biyofilm ölçümü sonucu 60 *Aeromonas* izolatının hiç birinde negatif sonuç veren bir suşa rastlanmazken, türlere göre dağılımına baktığımızda sırasıyla *Aeromonas hydrophila* %4,34 zayıf, %65,21 orta derecede ve %30,43 kuvvetli pozitif; *Aeromonas sobria* %3,22 zayıf, %35,48 orta derecede ve %61,34 kuvvetli pozitif *A. caviae* ise %100 zayıf pozitif tutunma göstermiştir. Çizelge 4.16'da de görüldüğü üzere en iyi tutunma suşlara göre sırasıyla %61,34 ile *A. veronii biovar sobria* ve % 30,43 ile *A. hydrophila*'dır.

4.3. Congo Red Agar (CRA) ile Biyofilm Ölçümü Sonuçları

Çizelge 4.17. Gıda örneklerinden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunun CRA’ daki sonuçları

No	Gıda İzolatları	<i>Aeromonas spp.</i>	CRA’da biyofilm oluşum dereceleri
1.	Ah12P*	<i>A. hydrophila</i>	+
2.	Ah6dP	<i>A. hydrophila</i>	++
3.	Ah21P	<i>A. hydrophila</i>	+
4.	Ah3P	<i>A. hydrophila</i>	+
5.	Ah17K*	<i>A. hydrophila</i>	+
6.	Ah43K	<i>A. hydrophila</i>	+
7.	Ah14K	<i>A. hydrophila</i>	+
8.	Ah9K	<i>A. hydrophila</i>	+
9.	Ah10-1K	<i>A. hydrophila</i>	+
10.	Aha1S*	<i>A. hydrophila</i>	+
11.	Ahd1S	<i>A. hydrophila</i>	+
12.	Ahd2S	<i>A. hydrophila</i>	+++
13.	Ahc2S	<i>A. hydrophila</i>	+
14.	Aha2S	<i>A. hydrophila</i>	+++
15.	As10-2K	<i>A. sobria</i>	++
16.	As4P	<i>A. sobria</i>	++
17.	Ac28P	<i>A. caviae</i>	+

*P: peynir, *K: kıyma, *S: süt

(+): zayıf pozitif, (++) : orta derecede pozitif, (+++): kuvvetli pozitif

Çizelge 4.18. Çevresel örneklerden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunun CRA’ da ölçülmesi

No	Çevresel İzolatlar	<i>Aeromonas spp</i>	CRA’da biyofilm oluşum dereceleri
1.	Ah2S*	<i>A. hydrophila</i>	+
2.	AhZ1S	<i>A. hydrophila</i>	+++
3.	Ah3B*	<i>A. hydrophila</i>	+
4.	AhX2B	<i>A. hydrophila</i>	++
5.	Ah2D	<i>A. hydrophila</i>	+
6.	As1S	<i>A. sobria</i>	+++
7.	As3S	<i>A. sobria</i>	++
8.	As4S	<i>A. sobria</i>	++
9.	As5S	<i>A. sobria</i>	++
10.	As6S	<i>A. sobria</i>	+
11.	As7S	<i>A. sobria</i>	++
12.	AsZ2S	<i>A. sobria</i>	+++
13.	AsX1S	<i>A. sobria</i>	+++
14.	AsX2S	<i>A. sobria</i>	++
15.	AsX3S	<i>A. sobria</i>	++
16.	As 1 B	<i>A. sobria</i>	+++
17.	AsZ1B	<i>A. sobria</i>	+++
18.	AsZ2B	<i>A. sobria</i>	++
19.	AsZ3B	<i>A. sobria</i>	++
20.	AsZ4B	<i>A. sobria</i>	++
21.	AsZ5B	<i>A. sobria</i>	+++
22.	AsZ6B	<i>A. sobria</i>	++
23.	AsZ8B	<i>A. sobria</i>	+
24.	AsX1B	<i>A. sobria</i>	++
25.	AsX3B	<i>A. sobria</i>	+++
26.	AsX4B	<i>A. sobria</i>	++
27.	As1D*	<i>A. sobria</i>	+++
28.	AsZ1D	<i>A. sobria</i>	++
29.	AsZ2D	<i>A. sobria</i>	++
30.	AsZ4D	<i>A. sobria</i>	+
31.	AsZ6D	<i>A. sobria</i>	++
32.	AsX1D	<i>A. sobria</i>	+++

Çizelge 4.18. (Devam) Çevresel örneklerden izole edilen hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunun CRA' da ölçülmesi

33.	AcZ5D	<i>A.caviae</i>	+
34.	Ac4B	<i>A.caviae</i>	+++
35.	AcZ3S	<i>A.caviae</i>	+
36.	AcZ4S	<i>A.caviae</i>	+
37.	Sed.1.1	<i>A. hydrophila</i>	+
38.	Sed.3.1	<i>A. sobria</i>	++
39.	Sed.3.2	<i>A. sobria</i>	++
40.	Sed.6.1	<i>A. hydrophila</i>	+
41.	Sed.6.2	<i>A. hydrophila</i>	+

(+): zayıf pozitif, (++): orta derecede pozitif, (+++): kuvvetli pozitif

*S: solungaç, *B: bağırsak, *D: deri

*Sed: sediment

Çizelge 4.19. *A. hydrophila* (ATCC 7966) *A.caviae* (ATCC 15468) suşlarında biyofilm oluşumunun CRA' da ölçülmesi

No	Suş isimleri	<i>Aeromonas spp.</i>	CRA'da biyofilm oluşum dereceleri
1.	<i>A. hydrophila</i> (ATCC 7966)	<i>A. hydrophila</i>	+
2.	<i>A.caviae</i> (ATCC 15368)	<i>A. caviae</i>	+

Çizelge 4.20. CRA testi biyofilm sonuçlarının yüzde dağılımı

<i>Aeromonas spp.</i>	Biyofilm Oluşum Dereceleri			
	Negatif (%)	Zayıf pozitif (%)	Orta derecede pozitif (%)	Kuvvetli pozitif (%)
<i>A.hydrophila</i>	-	%78,26	%13,04	%8,69
<i>A. veronii biovar sobria</i>	-	%9,38	%29,03	%59,37
<i>A.caviae</i>	-	%100	-	-

*(-): negatif, (+): zayıf pozitif, (++): orta derecede pozitif, (+++): kuvvetli pozitif

Congo Red Agar’da biyofilm ölçümü sonucu 60 *Aeromonas* izolatında negatif sonuç veren hiçbir suşa rastlanmazken, türlere göre dağılımına bakıldığında *A. hydrophila* %78,26 zayıf, %13,04 orta derecede ve %8,69 kuvvetli pozitif; *A. sobria* %9,38 zayıf, %29,03 orta derecede ve %59,37 kuvvetli pozitif, *A. caviae* ise %100 zayıf pozitif tutunma göstermiştir. Çizelge 4.18 ‘de de görüldüğü üzere en iyi tutunma suşlara göre sırasıyla %59,37 ile *Aeromonas sobria* ve %8,69 ile *Aeromonas hydrophila*’dır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu bir organizasyondur [Post ve ark., 2002]. Biyofilm aynı zamanda yüzeye tutunmuş olan mikroorganizmaların, besin düzeyi düşük olan çevrelerde besin akışını sağlayıp, bakterilerin hayatta kalma ve gelişim gösterme oranını artırarak bakteriye avantaj sağlarlar [Szewzyk ve ark., 2000].

Bu konuda yapılan araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur [Davey ve O'toole, 2000].

Biyofilmler inert veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Klinik, çevresel ve endüstriyel alanlarda bulunan bakteriler sıklıkla biyofilm oluşumuna yol açarlar. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları veya doğal akuatik sistemler yer alır. Biyofilm matrikslerinin içerisinde hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir [Donlan, 2002].

Biyofilm oluşturan bakteriler, planktonik bakteriler ile karşılaştırıldığında, biyofilm oluşumunun antibiyotik, reaktif oksijen türevleri ve deterjanlar gibi birçok antimikrobiyal ajana karşı daha dirençli oldukları görülmüş; alışlagelmiş antibiyotik ya da dezenfeksiyon yöntemlerinin biyofilmlerin giderilmesinde etkili olmadığı bildirilmiştir [Costerton ve ark., 1995; 1999].

Aeromonas'lar dünya genelinde hemen hemen tüm sucul habitatlarda bulunurlar. Sayıları kirlenmiş ve kirlenmemiş sucul çevrelerde hatta klorlanmış içme sularında dahi oldukça yüksektir [Araujo ve ark., 1991].

Aeromonas'lar etkili yüzey kolonizerleri olmalarının yanı sıra, hem su arıtma sistemlerinde hem de gıda işletim sistemlerinde biyofilm oluşumunda önem arz eden bakterilerdir. Bu nedenle son yıllarda *Aeromonas*'lar dünya genelinde üzerinde yoğunlaşılan bir bakteri olmuş ve potansiyel kaynakları araştırılmaya başlanmıştır. İçme suları ve gıdalar *Aeromonas* türleri için bir rezervuar olmalarından dolayı insan enfeksiyonlarında da önemli kaynaklardır. Bu mikroorganizmanın aslında sucul çevrelerin yerli florasına ait olmasından dolayı, su kontaminasyonu ile balıklardan, etlerden, sebzelerden, süt ve süt ürünlerinden de izole edilebildiğine dair literatürler mevcuttur [Rahim ve ark., 1984; Kooji ve Hijnen, 1988; Abeyta ve Wekell, 1988].

Meng-Ying ve arkadaşları (2009) çevre kirliliğindeki biyolojik bozulma ve ekosistemdeki besin döngülerinde önemli rol oynayan biyofilm ile ilişkili bazı mikroorganizmalar ile yaptıkları çalışmada, toprak ve atık su sistemlerinden izole ettikleri 18 izolat ile çalışmış. Ve bu izolatlardan 7'sinin yüksek derecede biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduklarını görmüşlerdir. Bu izolatlar içerisinde yer alan *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas caviae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas Plecoglossicida*, *Aeromonas hydrophila* ve *Comamonas testosteroni* gibi bakterileri içeren grupta *A. hydrophila*'nın biyofilm oluşumunda en yüksek sonucu verdiği görülmüştür. Bu çalışmada *A. hydrophila* ve *A. caviae* karşılaştırıldığında *A. caviae*'nin *A. hydrophila*'ya göre daha düşük bir biyofilm oluşumu gösterdiği görülmüştür [Meng-Ying ve ark., 2009]

Su arıtma sistemlerindeki boru yüzeylerinde biyofilm oluşturan bakteriler uzun süre kalıcı olabilirler ve biyofilm oluşumu su sistemlerinde patojen mikroorganizmalara rezervuar görevi yapabilir [Szewzyk ve ark., 2000]. Laboratuvar deneyleri *Helicobacter pylori* [Mackay ve ark. 1998], enterohemorajik *Escherichia coli* (EHEC) [Szewzyk ve ark., 1994], *Salmonella enterica serovar typhimurium* [Armon ve ark., 1997] ve *Campylobacter spp.* [Buswell ve ark. 1998] gibi su kökenli patojen bakterilerin uzun süre kalıcı biyofilmler oluşturdıklarını göstermiştir. Ancak bu patojenler geleneksel kültür yöntemleri ile kentlerin su sistemlerinden izole edilememiş fakat *Aeromonas*'lar izole edilmiştir. [Van Der Kooij ve Hijnen, 1988; Gavriel ve ark., 1998; Szewzyk ve ark., 2000]. Bu nedenle biyofilmler

Aeromonas'ların akümüasyonu ve kalıcılığı açısından avantajlı bir ortam sağlayan rezervuarlardır.

Yapılan son çalışmalarda sucul çevrelerde insan enfeksiyonları *Aeromonas*'larla ilişkilendirilmiştir [Baddour 1992; King ve ark., 1992; Ghanem ve ark., 1993]. Çalışmalarda *Aeromonas*'ların genellikle gastrointestinal enfeksiyonlar başta olmak üzere fırsatçı patojen olarak çeşitli enfeksiyonlara neden olduğu bu yüzden de çocuklar, yaşlılar ve immün sistemi baskılanmış kişiler için büyük risk oluşturduğu bilinmektedir [Biscardi ve ark., 2002]. *Aeromonas*'ların neden olduğu kalıcı enfeksiyonlar ve %30 varan oranda *Aeromonas* gastroenterit enfeksiyonlarından biyofilm oluşumunun sorumlu olduğu bildirilmiştir. [Costerton ve ark., 1999; Gracey ve ark., 1982; Rautelin ve ark., 2001]. İngiltere'de çocuk diyarel fecesinden izole edilen *A. caviae* suşunun yapılan çalışmalarda laringal epitelyal Hep-2 hücre dizisine tutunma gösterdiği görülmüştür [Wilcox ve ark., 1992].

Aeromonas türleri polar ve lateral flegella olmak üzere iki farklı flagellar sisteme sahiptir. Polar flagella yüzme hareketinden sorumlu iken fenotipte çoğunlukla ifade olan lateral flagella ise yüzeylere tutunmadan sorumludur [Gavin ve ark., 2002; Rabaan ve ark., 2001].

Kirov ve arkadaşları (2003) yapmış oldukları çalışmada *Aeromonas*'ların her iki flagellal (polar ve lateral) sisteminin tutunmada kritik rol oynadığını göstermiş ve elde edilen bulgular ışığında her iki flagella sistemin *Aeromonas*'ların biyofilm oluşumunu kolaylaştırdığını desteklemişlerdir. Ve sonuçlar göstermiştir ki; polar flagella yüzme hareketinde ve başlangıç tutunmasında, lateral flagella ise hücrelerin kolonizasyonunda rol oynamaktadır [Kirov ve ark., 2003].

Bakteri pilileri doku hücreleri gibi katı yüzeylerde tutunmayı kolaylaştıran ve bir çok patojen bakteride önemli bir virülans faktör olduğu bilinen ekstraselüler bir organeldir [Sauer ve ark., 2000]. Gram negatif bakterilerde tanımlanan dört tip piliden yalnız tip IV pili tutunma ve bakterinin virülans özelliğinden sorumludur [Mattick, 2002].

Type IV pilusunun insan enterositine tutunmada kritik bir önemi olduğu görülmüştür [Kirov ve ark., 1999]. Bu konuda yapılan son çalışmalar *Aeromonas*'ların flagellalarının plastik yüzeylerde (microplate ölçümü) biyofilm oluşturmalarını kolaylaştırdığı kadar epitelyal hücre dizisi Hep—2 ye de tutunmasını kolaylaştırdığını göstermiştir [Gavin ve ark., 2002; Gavin ve ark., 2003; Rabaan ve ark., 2001].

Son yıllarda *A. caviae* varyantları tip IV pilus oluşumu gösterdikleri ve bu oluşumun yüzme ve tutunma hareketinde etkisiz olurken hızlı ve oldukça güçlü bir biyofilm oluşumuna neden olduğu görülmüştür [Bechet ve Blondeau, 2003]. Böylece tip IV pilusun tutunmada önemli olduğu [Kirov ve ark., 1999]. Ve ikinci olarak biyofilm oluşumunda da flagellaların yerine önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir [Masada ve ark., 2002].

Amerika'da, Texas Tech Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada (2009) *Aeromonas*'larda tip IV pilinin biyofilm oluşumu üzerine etkisi araştırılmış ve *Aeromonas salmonicida*'nın biyofilm oluşumu ve doğal transformasyonunda önemli rol oynadığı tespit edilmiştir [Khan, 2009].

Biyofilm kültürü ve ölçümü için birkaç farklı yöntem geliştirilmiştir [Deighton ve ark., 2001; Arciola ve ark., 2002; Harraghy ve ark., 2006]. Bu yöntemlerden; tüp testi [Mathur ve ark., 2006] , mikroplate testi [Stepanovic, 2000], radiolabeling mikroskopi [Deighton ve ark., 2001] ve Congo Red Rgar testi [Arciola ve ark., 2002] gibi testler biyofilm tayini için kullanılmaktadır. Fakat mikroplate metodu biyofilm incelenmesi için yapılan ölçümlerde diğerleri arasında en sık kullanılanıdır [Stepanovic ve ark., 2007].

Bu çalışmada, *Aeromonas*'ların etkili yüzey kolonizerleri olmalarının yanı sıra, su arıtma ve gıda işletim sistemlerinde biyofilm oluşumunda önem arz eden bakteriler olmaları doğrultusunda bu mikroorganizmaların yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşumunun incelenmesi için gıda ve çevresel kaynaklardan izole edilen *Aeromonas*'lar cins ve tür ayrımı için yapılan biyokimyasal testlerden sonra API 20

NE tanımlama kitlerinden geçirilmiş ve izolatların doğruluğu tespit edilmiştir (Bkz. Resim 3.9). Çalışmamızda *Aeromonas* izolatlarında biyofilm oluşumunun ölçülmesi amacıyla farklı yöntemler kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plastik mikropate, tüp testi ve Congo Red Agar olmak üzere üç farklı yöntem kullanılmıştır.

Mikropate ile yapılan biyofilm çalışmasında izolatların her biri için test 9 kez tekrarlanıp, iki farklı ortamın sıvı (TSB ve BHIB) ve katı (TSA ve BHIA) fazları ile çalışılmış ve sonuçta katı ortamdan alınan bakterilerin sıvı ortamdan alınanlara oranla daha iyi biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.10).

Stepanovic ve arkadaşları (2007) *Staphylococcus*'larda mikropate yöntemiyle yaptıkları çalışmada, katı ortamda gelişen *Staphylococcus*'ların sıvı ortamda gelişenlere göre bakteri yüzeyi ile ilişkili moleküllerin ifadesinde farklılık olduğunu saptamışlardır. Buna bağlı olarak da biyofilm oluşumunda katı ortamda gelişen suşlardan alınan bakteri kolonileri ile yapılan çalışmada biyofilm oluşumunun daha etkili olduğu görülmüştür [Stepanovic ve ark., 2003].

Gavin ve arkadaşları (2002) *Aeromonas*'ların lateral flegellalarının hücrelere tutunma ve biyofilm oluşumunda önemi açısından yapmış oldukları çalışmada, *A. caviae* Sch3N ve *A. hydrophila* AH-3 doğal suşlarını sıvı (BHIB) ve katı (TSA) ortamlardan alarak elektron mikroskopunda yüzey organellelerinin gelişimine bakmışlardır (Bkz. Resim 2.1.). Ve sonuçta sıvı besiyerinden alınan suşlarda yalnız polar flagella oluşumu görülürken, katı besiyerinden alınan suşlarda polar flegellanın yanı sıra bir çok peritrik flegella oluşumu olduğu saptanmıştır. Buna bağlı olarakta etkili biyofilm oluşumunda katı yüzeylerden alınan suşlarda lateral flagella oluşumuna ve dolaylı olarakta biyofilm oluşumundaki etkiye dikkat çekmişlerdir [Gavin ve ark., 2002].

Thornley ve arkadaşları (1995) *A. caviae* suşunun Hep-2 hücre dizisine tutunmasının katı ortamda gelişimine bağlı olarak arttığını tespit etmişlerdir [Thornley ve ark., 1995].

Bu araştırmada mikrolate yöntemi ile yapılan çalışmada biyofilm oluşumunda kullanılan besi ortamlarından TSA, BHIA'ya göre TSB ise BHIB'ye göre daha yüksek sonuç vermiştir (Bkz. Çizelge 4.10).

Scoaris ve arkadaşları (2007) mikrolate yöntemini kullanarak *Aeromonas*'lar ile yapmış oldukları biyofilm çalışmasında *Aeromonas* suşlarının TSB'de iyi üreme gösterdiği ve 36 saat içinde yaklaşık 10^9 cfu/ml gibi maksimum bir değere ulaştığını ve 12. saatte tutunma gösteren bakteri sayısının 10^7 cfu/ml olduğunu tespit etmişlerdir [Scoaris ve ark., 2007].

Mathur ve arkadaşları (2006) *Staphylococcus* izolatları ile mikrolate yöntemiyle yapmış olduğu biyofilm çalışmasında kültür ortamı olarak TSB ve BHI besiyerlerini kullanmıştır. TSB'de %52,6 oranında biyofilm oluşumu görülürken, BHI'da ise bu oran %46,0'a düşmüştür [Mathur ve ark., 2006].

Stepanovic ve arkadaşlarının (2004) *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella spp.* izolatları ile mikrolate yöntemiyle yapmış oldukları biyofilm çalışmasında TSB, BHI ve Meat Brot (MB) olmak üzere üç farklı ortam kullanmışlardır. Sonuçta *Salmonella* türlerinde TSB'nin BHI ve MB'ye göre biyofilm oluşumunda en etkili ortam olduğu tespit edilirken, *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumunda en etkili besiyerinin BHI olduğu tespit edilmiştir [Stepanovic ve ark., 2004].

Bu araştırmada mikrolate yöntemiyle yapılan biyofilm çalışmasında *Aeromonas*'ların tür bazında tutunmalarına bakıldığında, kuvvetli pozitif değerde en fazla oranda tutunma *A. veronii biovar sobria*'da daha sonra ise *A. hydrophila*'dadır. Mikrolate ile yapılan biyofilm çalışmasında *A. caviae*'da ise biyofilm oluşumu gözlenmemiştir (Bkz. Çizelge 4.11. ve Çizelge 4.12.).

Gavin ve arkadaşları (2003) yapmış oldukları çalışmada hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunu incelemiş ve *A. veronii biovar sobria*' da *A. hydrophila* ve *A. caviae*' ya göre daha yüksek oranda biyofilm oluşumu gözlemlemişlerdir [Gavin ve ark., 2003].

Biyofilm ölçümü için yaptığımız tüp testinde (cam yüzeyde tutunma) ise *A. veronii biovar sobria* %61,43 ile yüksek oranda kuvvetli pozitif biyofilm oluşumunda birinci sırada yer alırken, *A. hydrophila* %30,43 ile ikinci sıradadır. Tüm *A. caviae* izolatlarının ise zayıf tutunma gösterdiği görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.16).

Meng-Ying ve arkadaşları (2009) yapmış oldukları çalışmada Luria Bertani (LB) ortamında kültür edilen *A. hydrophila* ve *A. caviae*'de Tüp yüzeyinde biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Sonuçta *A. hydrophila*'da yüksek derece biyofilm oluşumu görülürken, *A. caviae* ile karşılaştırıldığında *A. caviae*'nin cam yüzeyde zayıf biyofilm oluşumu gösterdiği bildirilmiştir [Meng-Ying ve ark., 2009].

Bechet ve Blondeau (2003) *A. caviae* ile yapmış oldukları çalışmada *A. caviae*'nin cam yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumunu incelemiş ve *A. caviae* LMG 13455 doğal suşunun farklı çevre şartlarına çok çabuk adapte olduğu ve buna bağlı olarak da sıklıkla fenotipte değişiklikler meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu suşla etkili bir biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir. Ancak bu suşun mutanları olan ve terminal oksidaz olmasıyla *A. caviae* LMG 13455'den ayrılan suş, doğal suşa oranla oldukça iyi derecede biyofilm oluşumu göstermiştir [Bechet ve Blondeau, 2003].

Biyofilm ölçümü için fenotipik olarak Congo Red Agar testi ile de tayin edilmiş ve sonuçta *A. veronii biovar sobria* izolatlarının %59,37 kuvvetli pozitif biyofilm oluşturduğu görülürken, *A. hydrophila* ise %8,69 kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu gösterdiği görülmüştür. Tüm *A. caviae* izolatları zayıf pozitif oluşum göstermiştir (Bkz. Çizelge 4.20).

Statner ve George'un (1987) *Aeromonas*'lar ile yapmış oldukları çalışmada, tüm izolatların Congo Red Agar üzerinde gelişim göstererek Congo Red boyasını farklı derecelerde aldıkları görülmüştür [Statner ve George, 1987].

Sonuçta, yapılan bu çalışma ile yakın zamana kadar üzerinde çok fazla durulmayan fakat insanlar ve hayvanlar için fırsatçı patojen olarak değerlendirilen *Aeromonas* türlerinin farklı yüzeylerde etkili kolonize olma ve biyofilm oluşturmalarından ötürü su arıtma ve gıda işletim sistemlerinde ki önemi dikkate alınarak biyofilm oluşumu üzerine daha fazla çalışmalar yapılması gerektiği ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

Abbey, Y. S. D., Etang, B. B., “ Virulence Factors From *Aeromonas* Species ”, *Microbios.*, 56: 71-77 (1988).

Abeyta, C. Jr., Wekell, M. M., “ Potantial sources of *Aeromonas hydrophila* ”, *J. Food Safety.*, 9: 11-22 (1988).

Albert, M. J. M., Ansaruzzaman, K. A., Talukder, A. K., Chopra, A.K., Kuhn, I., Rahman, M., Faruque, A. S., Islam, M. S., Sack, R. B., Mollby, R., “Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment”, *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3785-3790 (2000).

Allen, D. A., Austin, B., Colwell, R. R., “ *Aeromonas media*, a new species isolated from river water ”, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33: 599-604 (1983a).

Allen, D. A., Austin, B., Colwell, R. R., “ Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with freshwater fishery ”, *J. Gen. Microiol.*, 129: 2043-2062 (1983b).

Allison, D.G., Sutherland, I.W., “The role of exopolysac- charides in adhesion of freshwater bacteria”, *J. Gen. Microbiol.*, 133: 1319–1327 (1987).

Altwegg, M., Lucchini, G. M., Luthy-Hottenstein, J. and Rohnbach, M., “ *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp ”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 44-45 (1991).

Anderson, A, Rognner, U., Granum, PE., “What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?” , *I. J. Food Microbiol.*, 28(2):145-155 (1995).

Araujo, R. M., R. M. Arribas, and R. Pares., “Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution”, *J. Appl.Bacteriol.*, 71: 182-186 (1991).

Arciola. CR., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati M., Donati, E., Montanaro, L., “Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus”, *Biomaterials.*, 23: 4233-4239 (2002).

Armon, R., Starosvetzky, J., Arbel, T., Gren, M., “Survival of *Legionella pneumophila* and *Salmonella typhimurium* in biofilm systems”, *Wat Sci Technol.*, 35(11–12): 293–300 (1997).

Aytaç, S. A., Özbaş, A., “ *Aeromonas*’lar: Gıda Kaynaklı Yeni Patojenler ”, *Türk Hij. Biyol. Derg.*, 49: 169-180 (1992).

Baddour, M.D., "Extraintestinal *Aeromonas* infections", *Mayo Clin. Proc.*, 67: 496-498 (1992).

Béchet, M., Blondeau, R., "Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces", *J. Appl. Microbiol.*, 94(6):1072-1078 (2003).

Berrang, M. E., Brackett, R. E., Beuchat, L. R., "Growth of *Aeromonas hydrophila* on Fresh Vegetables Stored Under a Controlled Atmosphere ", *Appl. Environ. Microbiol.*, USA, 9: 5 (1989).

Biscardi, D., Castaldo, A., Gualillo, O. and de Fusco, R., "The occurrence of cytotoxic *Aeromonas hydrophila* strains in Italian mineral and thermal waters", *Sci. Total Environ.*, 292: 255–263 (2002).

Bunce, C., Wheeler, L., Reed, G., Musser, J., Barg, N., "Murine model of cutaneous infection with gram-positive cocci", *Infect. Immun.*, 60:2636-2640 (1992).

Burke, V., Robinson, J., Cooper, M., Beoman, J., Partridge, K., Peterson, D., Gracey, M., " Biotyping and virulence factors in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. ", *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 1146-1149 (1984).

Buswell, C. M., Herlihy, Y. M., Lawrence, L. M., McGuiggan, J. T., Marsh, P. D., Keevil, C. W., Leach, S. A., "Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining", *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 733-741 (1998).

Cahil, M. M., " Virulence factors in motile *Aeromonas* species ", *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 1-16 (1990).

Carnahan, A. M., Behram S. and Joseph, W. S., " Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species ", *J. Clin Microbiol.*, 29: 2843-2849 (1991).

Characklis, W.G., Marshall, K.C., " Biofilms", *John Wiley*, New York, USA. (1990).

Characklis, W.G., "Fouling biofilm development: A process analysis", *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1923–1960 (1981).

Christensen GD, SimpsonWA, Bisno AL, Beachey, EH., "Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces", *Infect Immun.*, 37:318–26 (1982).

Clark, N. M., Chenoweth, C. E., "*Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature", *Clin. Infect. Dis.*, 37:506-513 (2003).

Colwell, R. R., Austin, B., Allen D. A., “*Aeromonas media*, a new species isolated from river water”, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33: 599-604 (1983).

Costerton, JW, Geesey, GG., Cheng, KJ., “How bacteria stick”, *Sci. Am.*, 238:86-95 (1978).

Costerton, JW., Cheng, KJ., Geesey, GG., “Bacterial biofilms in nature and disease”, *Annu. Rev. Microbiol.*, 41:435 (1987).

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

Costerton, JW., Lewandowski, Z., Caldwell, DE., Korber, DR., Lappin-Scott HM., “Microbial biofilms”. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 711-45 (1995)

Criado, MT., Suarez, B., Ferreiros, CM., "The importance of bacterial adhesion in the dairy industry", *Food Technol.*, 48:123-126 (1994).

Davey, ME., O'Toole, GA., “Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 847-867 (2000).

Denes, A.R., Somers, E.B., Wong, A.C.L., Denes, F.S., “Plasma-Aided Treatment of Surfaces Against Bacterial Attachment and Biofilm Deposition”, *US Patent*, 6,096,564, (2000).

Denes, FS., Dong, B., Jiang, H., Manolache, S., Somers, E.B., Wang, Y., Wong, AL., “Plasma enhanced deposition of antibacterial layers to inhibit biofilm formation”, <http://www.wisc.edu> (erişim tarihi: 12.12.2002) (1999).

Deighton, MA., Capstick, J., Domalewski, E., Van Nguyen, T., “Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*”, *Methods. Enzymol.*, 336:177-95 (2001).

Dickson, J.S., Koohmaraie, M., “Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 832-836 (1989).

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

Donlan, RM., Costerton, JW., “Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 167-93 (2002).

Dooley, J. S., Lallier, G. R. and Trust, T. J., “Surface antigens of virulent strains of *Aeromonas hydrophila*”, *Vet. Immunol. Immunop.*, 12: 338-344 (1986).

Durack, DT., Beeson, PB., “Experimental bacterial endocarditis II. Survival of a bacteria in endocardial vegetations”, **Br. J. Exp. Pathol.**, 53: 50-3 (1972).

Dunsmore, DG., Twomey W., Whittlestone, G., Morgan, HW., “Desing and performance of systems for cleaning products contact surfaces of food equipment”, **J. Food Prot.**, 44: 220-240 (1981).

Farmer III, J. J., Arduino, M. J., Hickman-Brenner, F. W., “ The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*”, In a Balows et al. (Ed). The Prokaryotes, **Springer-Verlag.**, New York, 3: 889 (1992).

Fletcher, M., “Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance”, **J. Bacteriol.**, 170: (5) 2027–2030 (1988).

Freitas, A.C., Nunes, M. P., Milhomem, A. M., Ricciardi, I. D., “ Occurence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese in Rio De Janerio, Brazil ”, **J. Food Protect.**, 56 (1): 62-65 (1993).

Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T., “New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococc*”, **I. J. Clin. Pathol.**, 42: 872–874 (1989).

Gavin, R., Rabaan, A.A., Merino, S., Tomás, J.M., Gryllos, I., Shaw, J.G., “Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation”, **Mol. Microbiol.**, 43, 383-397 (2002).

Gavín, R., S. Merino, M., Altarriba, R., Canals, Shaw, J. G., Toma’s, J. M., “ Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp”, **Fems Microbiol. Lett.**, 224: 77–83 (2003).

Gavriel, A. A., Landre, J. P., Lamb. A. J., “Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland”, **J. Appl. Microbiol.**, 84: 383-392 (1998).

Genigeorgis, C. Biofilm: Their significance to cleaning in the meat sector. In: Burt, S. A. and Bauer, F. (Eds), “New Challenges in Meat Hygiene: Species problems in cleaning and disinfection, **Ecceamst**, European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology, 29-47 (1995).

Ghanem, E.S., Mussa, M.E., Eraki, H.M., “Aeromonas-associated gastroenteritis in Egypt”, **Zentralbl. Microbiol.**, 148(6): 441-447 (1993).

Gracey, M., Burke, V., Robinson, J., “Aeromonas-associated gastroenteritis”, **Lancet**, 2: 1304-1306 (1982).

Gray, S. J., Griffiths, A., “ Observation on *Aeromonas* species isolated from human faeces ”, **J. Infect.**, 20: 267-268 (1990).

Gray, S. J., Stickler, D. J. and Bryant, T. N., “ The incidence of virulence factors in mesophilic *Aeromonas* species isolated from farm animal and their environment ”, **Epidemiol. Infect.**, 105: 277-294 (1990).

Gryllos, I., Shaw, J. G., Gavín, R., Merino, S., Toma's, J. M., “Role of the *flm* locus in mesophilic *Aeromonas* species adherence”, **Infect. Immun.**, 69:65–74 (2001).

Greenberg, E. P., Costerton, J. W., Stewart, P. S., “Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections”, **Science**, 284:1318-1322 (1999).

Harraghy, N., Seiler, S., Jacobs, K., Hannig, M. Menger, MD., Herrmann, M., “Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections”, **Int. J. Artif. Organs.**, 29:368–78 (2006).

Hancock, I.C., “Microbial cell surface architecture. In: Mozes, N., Handley, P.S., Busscher, H.J., Rouxhet P.G. (Eds.)”, Microbial Cell Surface Analysis, **VCH Publishers**, Weinheim Federal Republic of Germany, pp. 23–59 (1991).

Hazen, T. C., Fliermans, C. B., Hirsch, R. P. and ESCH, G. W., “ Prevalance and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States ”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 36: 731-738 (1978).

Herald, P.J., Zottola, E.A., “Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values”, **J. Food Prot.**, 51: 445–448 (1988a.)

Herald, P.J., Zottola, E.A., “Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values”, **J. Food Prot.**, 53: 1549–1552, 1562 (1988b).

Holah, J., Kearney, L.R., “Introduction to biofilms in the food industry”, In *Biofilm: Science and Technology*, (ed.) Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B.. Nato ASI Series. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, 35–41 (1992).

Hood, S.K., Zottola, E.A., “Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel”, **J. Food Prot.**, 60: 1034–1037 (1997).

Howard, S. P., Buckley, J. T., “Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*”, **Mol. Gen. Genet.**, 204: 289-295 (1986).

Huys, G., P. Kampfer, M., Altwegg, I., Kersters, A., Lamb, R., Coopman, J., Luthy-Hottenstein, M., Vancanneyt, P., Janssen, K., Kersters., “*Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs”, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 1165-1171 (1997).

Iwanaga, M., A. Hokama., “Characterization of *Aeromonas sobria* TAP13 pili: a possible new colonization factor”, *J. Gen. Microbiol.*, 138: 1913-1919 (1992).

Janda, J. M., Abbott, S. L., “Human pathogens”, Austin B et al. (eds.). The genus *Aeromonas*. *Wiley*, London 151-173 (1996).

Janda, J. M., Duffey, P. S., “Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum”, *Rev. Infect. Dis.*, 10: 980-997 (1988).

Janda, J. M., “Recent advances in study of the taxonomy, pathogenicity and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 4: 397-409 (1991).

Jefferson K. K., “What drives bacteria to produce a biofilm?”, *Fems Microbiol. Lett.*, 236: 163-173 (2004).

Jones, G.W., Isaacson, R.E., “Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors”, *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 10: 229-260 (1983).

Joseph, S. W., Carnahan, A. M., “Update on the genus *Aeromonas*”, *ASM News*, 66: 218-223 (2000).

Joseph, S. W., “*Aeromonas* gastrointestinal disease: a case study in causation?”, Austin B et al. (eds.). The genus *Aeromonas*, *Wiley*, London, 311-335 (1996).

Kay, W. W., Trust, T. J., “Form and Functions of the Regular Surface Array (Slayer) of *Aeromonas salmonicida*”, *Experienta*, 47: 412-413 (1991).

Khan Mohammed Repon, B.S. “Role of TapY1 and PlsB in biofilm formation in *Aeromonas* species.” Master of science, *Faculty of Texas Tech University*, Texas, 1-25 (2009).

King, G.E., Werner, S.B., Kizer, K.W., “Epidemiology of *Aeromonas* infections in California”, *Clin. Infect. Dis.*, 15: 449-452 (1992).

Kirov, S. M., Anderson, M. J. and Mc Meekin, T. A., “A note on *Aeromonas* spp. from chickens as possible food-borne pathogens”, *J. Appl. Bacteriol.*, 68: 327-334 (1990).

Kirov, S. M., Hui, D. S., Hayward, L. J., “Milk as a Potential Source of *Aeromonas* gastrointestinal infection”, *J. Food. Protect.*, 56 (4): 306-312 (1993).

Kirov, S. M., Castrisios M., and Shaw J. G., “*Aeromonas* flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces”, ***Infect. Immun.***, 72:1939-1945 (2004).

Kirov, S. M., and Sanderson, K., “Characterization of a type IV bundle-forming pilus (SFP) from a gastroenteritis-associated strain of *Aeromonas veronii* biovar *sobria*”, ***Microb. Pathog.***, 21:23-34 (1996).

Kirov, S. M. Castrisios A. and Shaw J.G., “*Aeromonas* Flegella (Polar and Lateral) Are Enterocyte Adhesins That Contribute to Biofilm Formation on Surfaces”, ***American Society for micrbiol.***, 72:1939-45 (2003).

Koehler, J. M. and Ashdown, L. R., “ Comparison of Transport Media for Recovery of *Aeromonas* from Clinical Specimens ”, ***Lett. Appl. Microbiol.***, 16: 91-93 (1992).

Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckernberger P.C., Winn W.C. Jr., “Color Atlas and Testbook of Diagnostic Microbiology”, 4. baskı. ***Lippincott Comp.*** Philadelphia, (1992).

Kooij, D. V. D., Hijnen, W. A. M., “ Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water”, ***Appl. Environ. Microbiol.***, Netherlands, 10: 10 (1988).

Lallier, R., Bernard, F., Lalonde, G., “ Difference in the Extracellular Products of Two Strains of *Aeromonas hydrophila* Virulent and Weakly Virulent For Fish ”, ***Can. J. Microbiol.***, 30: 900-904 (1984).

Lederberg, J., Shope, R. E., Oaks, S. C., “Emerging infections: microbial threats to health in the United States”, ***National Academy Press***, Washington, D.C (1992).

Lehtola, M J, Torvinen, E, Kusnetsov, J, Pitkanen, T, Maunula, L, von Bonsdorff, CH, Martikainen, PJ, Wilks, SA, Keevil, CW, Miettinen, IT., “Survival of *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and *Caliciviruses* in Drinking Water-Associated Biofilms Grown under High-Shear Turbulent Flow”, ***Appl. Environ. Microbiol.***, 73: 2854-2859 (2007).

Lindsay D., A. von Holly, “Different Responses of Planktonic and Attached *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* to Sanitizer Treatment”, ***J. Food Protect.***, 62: (4) 368-379 (1999).

Ljungh, A., Eneroth, P., Wadstrom, T., ” Cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*”, ***Toxicon.***, 20: 787-794 (1982).

Mackay, W. G., Gribbon, L. T. Barer, M. R., Reid, D. C., “Biofilms in drinking water systems—a possible reservoir for *Helicobacter pylori*”, ***I. Wat. Sci. Technol.***, 38(12): 181-185 (1998).

Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., Hagny, P., “Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times”, **J. Food Prot.**, 53, 742–746 (1990).

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

Marshall K.C., Stout, R., Mitchell, R., “Mechanisms of the initial events in the sorption and control at surfaces”, **Am. Soc. Microbiol. News.**, 58: 202-207 (1971).

Masada, C. L., LaPatra, S. E., Morton, A. W., Strom, M. S., “An *Aeromonas salmonicida* type IV pilin is required for virulence in rainbow trout *Oncorhynchus Mykiss*”, **Dis. Aquat. Organ.**, 51: 13-25 (2002).

Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A., “Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods”, **Indian J. Med. Microbiol.**, 24: 25–9 (2006).

Mattila-Sandholm, T., Wirtanen, G., “Biofilm formation in the industry: A Review”, **Food Reviews International.**, 8 (4): 573-603 (1992).

Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B., “Biofilms”, Science and Technology, In: NATO ASI Series E, **Kluwer Academic Press**, Dordrecht, The Netherlands (1992).

Meng-Ying, LI., ZHAN, Ji., Peng, LU., Jing-Liang, XU., Shun-Peng, LI., “Evaluation of Biological Charactersitics of Bacteria Contributing to Biofilm Formation”, **Pedosphere**, 19: 554-561 (2009).

Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A., Toma’s, J.M., “The O:34-antigen lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas hydrophila*”, **FEMS Microbiol. Lett.**, 139, 97–101 (1996).

Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A. Toma’s., J. M., “The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains”, **FEMS Microbiol. Lett.**, 151:213–217 (1997).

Nichols, G. L., “Health significance of bacteria in distribution systems–review of *Aeromonas*”. London, **UK Water Industry Research Ltd** (Report DW–02/A) (1996).

Nishikawa Y., Kishi T., “ Isolation and characterization of motile *Aeromonas* from human, food and environmental specimens ”, **Epidem. Inf.**, 101: 213-233 (1988).

Notermans, S., Dormans, J.A.M.A., Mead, G.C., “Contribuof tion of surface attachment to the establishment of micro organisms in food processing plants: A review”, **Biofouling**, 5:1–16 (1991).

Palumbo, S. A., Bencivengo, M. M., Corral, F. D., Williams, A. C. and Buchanon, R.L., “ Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal orijin ”, **J. Clin. Microbiol.**, 27: 854-859 (1989).

Pati, JM., Allen, BL., McGavin, MJ., Hook, M., “MSCRAMM-mediated adherence o microorganisms to host tissues”, **Annu. Rev. Microbiol.**, 48:585-617 (1994).

Poppof, M., Genus III. *Aeromonas* Kluver, Van Niel A.D., In: “Bergey’s Manuel of Systematic Bacteriology”, vol 1. Ed: Krieg, N.R., Holt,J.G. Baltimore, **Williams and Wilkins.**, 545-548 (1984).

Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. “The role of biofilms in otolaryngologic infections”, **Curr. Opin. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.**, 12(3):185–90, (2004).

Rabaan, A. A., Gryllos I., Toma’s J. M., Shaw J. G.. “Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells”, **Infect. Immun.**, 69:4257–4267 (2001).

Rahim, Z., Sanyal, S. C., Aziz, K. M. S., Hug, M. I., Chowbhury, A.,. “ Isolation of enterotoxigenic, hemolytic and antibiotic resistant *Aeromonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh ”, **Appl. Environ. Microbiol.**, 48: 865-876 (1984).

Rautelin, H., Hänninen, ML., Sivonen, A., Turunen, U., Valtonen, V., “Chronic diarrhea due to single strain of *Aeromonas caviae*”, **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 14: 51–4 (1995).

Rippey, S. R., V. J. Cabelli., “Use of thermotolerant *Aeromonas* group for the trophic classification of freshwaters”, **Water Res.**, 23:1107-1114 (1989).

Roberts, T. A., Braid Parker, A. C., Tampkin, R. B., “ *Aeromonas*, Microorganism in Foods”, **Blackie Academic and Professional**, 5-19 (1996).

Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW and Davies DG, “*Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm”, **J. Bacteriol.** 184:1140- 1154 (2002).

Santos, Y., Toranzo, A. E., Barja, J. L., Nieto, T. P. and Villa, T. G., “ Virulance propertiesand enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish ”, **Infect. Immun.**, 56: 3285-3293 (1988).

Schubert, R. H. W “The relationship of aerogenic to anaerogenic aeromonads of the ‘*hydrophila-punctata*-group’ in river water depending on the load of waste”. **Zentralbl. Bakteriol. Hyg. 1 Abt. Orig. B.**, 160:237-245 (1975).

Scoaris D.de O., Colacite J., Nakamura C.V., Ueda-Nakamura T., Filho B. A. de A. and Filho B. P. D., “Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water”, *Antonie van Leeuwenhoek*, 93:1-2 (2008).

Statner,B., Jones,M.J., George,W.L., “Effect of incubation temperature on growth and soluble protein profiles of motile *Aeromonas* strains”, *J. Clin. Microbiol.*, 26, 392-393 (1988).

Stecchini, M. L., Domenis, C., “Incidence of *Aeromonas* species in influent and effluent of urban wastewater purification plants”, *Lett. Appl. Microbiol.*, 19:237-239 (1994).

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic I., Savic, B., Svabic- Vlahovic, M., “A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation”, *J. Microbiol. Methods.*, 40:175–9 (2000).

Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., Svabic-Vlahovic, M., “Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface”, *Lett. Appl. Microbiol.*, 38: 428–432 (2004).

Stewart PS., Costerton, JW., “Antibiotic resistance of bacteria in biofilms”, *The Lancet*, 358: 135-138 (2001).

Stepanovic S., Vukovic D., HOLA V., Ventura G.B., Djukic S., Irkovic I.C., Ruzicka F., “Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci* “, *APMIS*, 115: 891–9, (2007).

Subashkumar, R., Thayumanavan, T., Vivekanandhan, G., Lakshmanaperumalsamy, P., “Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in acute gastroenteritis among children”, *Indian. J. Med. Res.*, 123: 61-66 (2006).

Szewzyk, U., Manz, W., Amann, R. I., Schleifer, K. H., Stenström, T. A., “Growth and in situ detection of a pathogenic *Escherichia coli* in biofilms of a heterotrophic water-bacterium by use of 16S- and 23S-rRNA directed fluorescent oligonucleotide probes”, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 13: 169-176 (1994).

Szewzyk, U., Szewzyk, R., Manz, W., Schleifer, K. H., “Microbiological safety of drinking water”, *Annu. Rev. Microbiol.*, 54: 81-127 (2000).

Thornley, J. P., Shaw, J. G., Gryllos, I., Eley, A., “Adherence of *Aeromonas caviae* to human cell lines Hep-2 and Caco-2”, *J. Med. Microbiol.*, 45: 445–451 (1996).

Van der Goot, F.G., Pattus, F., Parker, M., Buckley, J. T., “The cytolytic toxin aerolysin: from the soluble form to the transmembrane channel”, *Toxicology* 87: 19-28 (1994).

Van der Kooij, D., Hijnen, W. A., “Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2842-2851 (1988).

Van Loosdrecht, M.C.M., Norde, W., Zehnder, A.J.B., “Physical and chemical description of bacterial adhesion”, *J. Biomaterial. Appl.*, 5: 91–106 (1990).

Vila, J., Ruiz, J., Gallardo, F., Vargas, M., Soler, L., Figueras, M. J, Gascon, J., “*Aeromonas spp.* and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance”, *Emerg. Infect. Dis.*, 9 :552-555 (2003).

Von Gravenitz, A., “ Research on *Aeromonas* and *Plesiomonas* ”, *Experintia*, 47: 402-444 (1991).

Xu, X. J., Ferguson, M. R., Popov, V. L., Houston, C. W., JPeterson, W., Chopra, A. K., “Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants”, *Infec. Immun.*, 66:3501-3509 (1998).

Wilcox, M. H., Cook, A. M., Eley, A., Spencer, R. C., “*Aeromonas spp.* as a potential cause of diarrhoea in children”, *J. Clin. Pathol.*, 45:959-963 (1992).

Wirtanen, G., Husmark, U., Mattila-Sandholm, T., “Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures inclosed food-processing systems”, *J. Food Prot.*, 59: 727–733 (1996).

Zobell CE., “The effect of solid surfaces upon bacterial activity”, *J Bacteriol.*, 46: 39-56 (1943).

Zottola, E.A., Sasahara, K.C., “Microbial biofilms in the food industry should they be a concern?”, *Int. J. Food Microbiol.*, 23: 125–148 (1994).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ORMANCI, Seral
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 31.07.1985 Çankaya
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (312) 3560382
e-mail : seral.ormanci@gazi.edu.tr.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2010
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Fatih Sultan Mehmet Süper Lisesi	2003

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Kitap okumak, Sinema, Müzik, Gezi, Bilgisayar teknolojileri