

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CaCl₂ VARLIĞINDA BAKTERİLERDE; LasB ELASTAZ, AMİLAZ, PROTEAZ
AKTİVİTESİ VE H₂O₂ DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeliş BUDAK KESKİN

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN

HAZİRAN 2021

**T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CaCl₂ VARLIĞINDA BAKTERİLERDE, LasB ELASTAZ, AMİLAZ, PROTEAZ
AKTİVİTESİ VE H₂O₂ DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Zeliş BUDAK KESKİN
36183611001**

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN

HAZİRAN 2021

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın yürütülmesinde 1811 numaralı projeye verdikleri maddi ve manevi desteklerinden dolayı İnönü Üniversitesi BAP birimine,

Tezimin her aşamasında bilgisini ve desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN'a,

Tezimin yazım aşamasında emeğini ortaya koyan eşim Sinan KESKİN'e,

Tezimin her döneminde yardımlarını esirgemeyen Cennet Canan KARADERİ'ye teşekkür ederim.

Zeliş BUDAK KESKİN



ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “CaCl₂ Varlığında Bakterilerde; LasB Elastaz, Amilaz, Proteaz Aktivitesi ve H₂O₂ Duyarlılığının Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Zeliş BUDAK KESKİN



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ONUR SÖZÜ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Amilaz.....	1
1.1.1 α -amilaz	1
1.1.2 β -amilaz	2
1.1.3 γ -amilaz	2
1.2 Biyofilm.....	3
1.3 Elastaz.....	5
1.4 Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	6
1.5 Kalsiyum (Ca ⁺²).....	7
1.6 Piyorubin.....	9
1.7 Proteazlar	9
1.7.1 Proteaz enziminin yapısı.....	11
1.7.2 Metallo proteazlar.....	11
1.8 <i>Bacillus cereus</i>	12
1.9 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.9.1 <i>P. aeruginosa</i> 'nın tarihçesi.....	13
1.9.2 <i>P. aeruginosa</i> 'nın morfolojisi ve genel özellikleri.....	13
1.9.3 <i>P. aeruginosa</i> 'nın mikrobiyolojik özellikleri	15
1.9.4 <i>P. aeruginosa</i> 'nın biyokimyasal özellikleri	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	20
3.2 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	20
3.3 Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Saklama ve Çalışma Koşulları	20
3.4 Çalışmada Kullanılan Tuz	20
3.5 Amilaz Analizi.....	21
3.6 Biyofilm Oluşum Kinetiği.	22
3.7 Elastaz Analizi	22
3.8 H ₂ O ₂ Duyarlılık Analizi	23
3.9 Kanlı Agarda Hemoliz.....	24
3.10 Piyorubin Analizi.....	24
3.11 Proteaz Analizi.....	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	26
4.1 Bakterilerin Kalsiyum (Ca ⁺²) Varlığında Deney Tüp Fotoğrafları.....	26
4.2 Bakterilerin Amilaz Aktivitesi.....	26
4.3 Bakterilerin Biyofilm Oluşum Kinetiği	28
4.4 Bakterilerin Elastaz Aktivitesi	29
4.5 Bakterilerin H ₂ O ₂ Duyarlılığı	31
4.6 Kanlı Agarda Hemoliz	33
4.7 Bakterilerde Piyorubin Üretimi	35
4.8 Bakterilerin Proteaz Aktiviteleri	37

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	38
5.1 Bakterilerde Amilaz Aktivitesi.....	38
5.2 Bakterilerde Biyofilm Oluşum Kinetiği	38
5.3 Bakterilerde Elastaz Aktivitesi	39
5.4 Bakterilerin H ₂ O ₂ Duyarlılığı	39
5.5 Kanlı Agarda Hemoliz.....	40
5.6 Bakterilerde Piyorubin Üretimi	40
5.7 Bakterilerin Proteaz Aktiviteleri.....	41
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ	48



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: α -amilazın 3 boyutlu yapısı	2
Şekil 1.2: Biyofilm oluşum mekanizması	3
Şekil 3.1: Glikoz standardı	22
Şekil 3.2: ECR standardı	23
Şekil 3.3: Tirozin standardı	25
Şekil 4.1: Bakterilerin a) Kontrol b) 0.05 M c) 0.1 M d) 0.15 M Ca^{+2} varlığında NB besi ortamında deney tüp fotoğrafları	26
Şekil 4.2: Bakterilerin amilaz aktivitesi	27
Şekil 4.3.1: <i>P. aeruginosa</i> 'nın metilen mavisi eklenmiş petri ortamı fotoğrafı	28
Şekil 4.3.2: Tüp ortamında kristal viyole ile boyanmış biyofilm oluşumları	28
Şekil 4.3.3: Bakterilerin biyofilm oluşum kinetiği	29
Şekil 4.4.1: <i>P. aeruginosa</i> 'da a) ECR varlığında b) ECR olmadan kontrol, <i>B. cereus</i> 'da c) ECR varlığında d) ECR olmadan kontrol katı besiyerinde üremeleri	30
Şekil 4.4.2: LasB aktivitesinin a) <i>B. cereus</i> 'da b) <i>P. aeruginosa</i> 'da soldan sağa; kontrol, 0.05 M Ca^{+2} , 0.1 M Ca^{+2} ve 0.15 M Ca^{+2} varlığında tüp ortamındaki görünümü.	30
Şekil 4.4.3: Bakterilerin elastaz aktivitesi	31
Şekil 4.5.1: Bakterilerin H_2O_2 varlığında duyarlılıkları (a) ve b) <i>B. cereus</i> , c) ve d) <i>P. aeruginosa</i>	32
Şekil 4.5.2: Bakterilerin H_2O_2 duyarlılığı	32
Şekil 4.6.1: Kanlı agarda hemoliz fotoğrafları a) <i>B. cereus</i> 'da 0.15 M ve b) 0.1 M Ca^{+2} varlığında, <i>P. aeruginosa</i> 'da c) Kontrol d) 0.1 M Ca^{+2} varlığında	33
Şekil 4.6.2: Bakterilerin kanlı agarda hemoliz çapı	33
Şekil 4.6.3: Bakterilerin kanlı agarda komple çapı	34
Şekil 4.6.4: Kanlı agarda bakteri koloni çapı	35
Şekil 4.7.1: <i>P. aeruginosa</i> 'da piyorubin analizi. Soldan sağa; Kontrol, 0.05 M Ca^{+2} , 0.1 M Ca^{+2} , 0.15 M Ca^{+2} varlığında piyorubin analizi	36
Şekil 4.7.2: <i>P. aeruginosa</i> 'da piyorubin optik yoğunluğu	36
Şekil 4.8: Bakterilerin proteaz aktiviteleri	37

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1: Bakterilerin amilaz aktivite değerleri.....	27
Tablo 4.2: Bakterilerin biyofilm optik yoğunluk değerleri	29
Tablo 4.3: Bakterilerin elastaz aktivite değerleri	31
Tablo 4.4: Bakterilerin H ₂ O ₂ duyarlılık ölçümleri.....	32
Tablo 4.5: Bakterilerin kanlı agarda hemoliz çapı ölçüm değerleri	34
Tablo 4.6: Bakterilerin kanlı agarda komple çap ölçüm değerleri	34
Tablo 4.7: Kanlı agarda bakteri koloni çapı ölçüm değerleri.....	35
Tablo 4.8: <i>P. aeruginosa</i> 'da piyorubin optik yoğunluk değerleri.....	36
Tablo 4.9: Bakterilerin proteaz aktivite değerleri	37



SEMBOLLER VE KISALTMALAR

NB	: Nutrient Broth
MHA	: Mller Hinton Agar
NA	: Nutrient Agar
BHI	: Brain Heart Infusion
mm	: milimetre
µm	: Mikrometre
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nM	: Nanometre
OD	: Optik Dansitite
rpm	: Dk'daki dönme hızı
PBS	: Fosfat Tampon zltisi
TCA	: Trikloroasetik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ECR	: Elastin Kongo Red

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

CaCl₂ Varlığında Bakterilerde; LasB Elastaz, Amilaz, Proteaz Aktivitesi ve H₂O₂
Duyarlılığının Araştırılması
Zeliş BUDAK KESKİN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

48+ IX sayfa

2021

Danışman: Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN

Bu çalışmada, Gr (-) *Pseudomonas aeruginosa* ve Gr (+) *Bacillus cereus* kullanılarak farklı konsantrasyonlardaki CaCl₂ varlığında, 37 °C, statik koşullarda ve NB ortamında üretilen bakterilerin LasB Elastaz, Amilaz, Proteaz Aktivitesi ve H₂O₂ duyarlılığı karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Bakterilerin farklı konsantrasyonlardaki Ca⁺² varlığında sekonder metabolit üretimleri üzerine yaptığımız bu çalışmada; *B.cereus* için amilaz aktivitesi ve biyofilm üretiminin maksimum artışı 0.15 M Ca⁺² varlığında, elastaz aktivitesine inhibitör etki, H₂O₂'ye karşı duyarlılığın artması ve hemoliz aktivitesinin artması 0.1 M Ca⁺² varlığında, proteaz aktivitesindeki artış ise 0.05 M Ca⁺² varlığında gerçekleşmiştir. *P. aeruginosa* için maksimum amilaz aktivitesi, biyofilm üretimi, H₂O₂'ye karşı direncin artması, hemoliz aktivitesinin artması, piyorubin üretimi ve proteaz aktivitesindeki artışlar 0.1 M Ca⁺² varlığında gerçekleşirken, elastaz aktivitesine karşı inhibitör etki en çok 0.15 M Ca⁺² varlığında gerçekleşmiştir. Ca⁺² varlığı bakterilerin sekonder metabolit üretimlerini artırmıştır. Bu yapılan çalışmaların ve elde edilen sonuçların, literatürdeki eksikliği dolduracağına ve yeni bakış açılarına katkı sağlayacağına inanıyoruz. Çünkü bu kadar yüksek Ca⁺² konsantrasyonlarında metabolit üretimi ilk kez bizim tarafımızdan araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ca⁺², *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, sekonder metabolitler

ABSTRACT

Master Thesis

Bacteria in the presence of CaCl₂; Investigation of H₂O₂ Sensitivity with LasB Elastase, Amylase, Protease Activity

Zeliş BUDAK KESKİN
Inonu University
Faculty Science and Art
Department of Biology

48+IX pages

2021

Supervisor: Assoc. Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN

In this study, LasB elastase, amylase, protease activity and H₂O₂ sensitivity of bacteria grown in the presence of CaCl₂ at different concentrations, at 37 °C, in static conditions and in NB media using Gr (-) *Pseudomonas aeruginosa* and Gr (+) *Bacillus cereus* were comparatively investigated. In this study, we conducted on secondary metabolite production of bacteria in the presence of different concentrations of Ca⁺²; For *B. cereus*, the maximum increase in amylase activity and biofilm production in the presence of 0.15 M Ca⁺², inhibitory effect on elastase activity, increased sensitivity to H₂O₂ and increased hemolysis activity in the presence of 0.1 M Ca⁺², and the increase in protease activity in the presence of 0.05 M Ca⁺² has been realized. For *P. aeuroginosa*, the maximum amylase activity, biofilm production, increased resistance to H₂O₂, increased hemolysis activity, pyorubin production and increases in protease activity occurred in the presence of 0.1 M Ca⁺², while the inhibitory effect against elastase activity was mostly in the presence of 0.15 M Ca⁺². The presence of Ca⁺² increased the secondary metabolite production of bacteria. We believe that these studies and the results obtained will fill the gap in the literature and contribute to new perspectives. Metabolite production at such high Ca⁺² concentrations was investigated by us for the first time.

Keywords: Ca⁺², *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, seconder metabolits

1. GİRİŞ

1.1 Amilaz

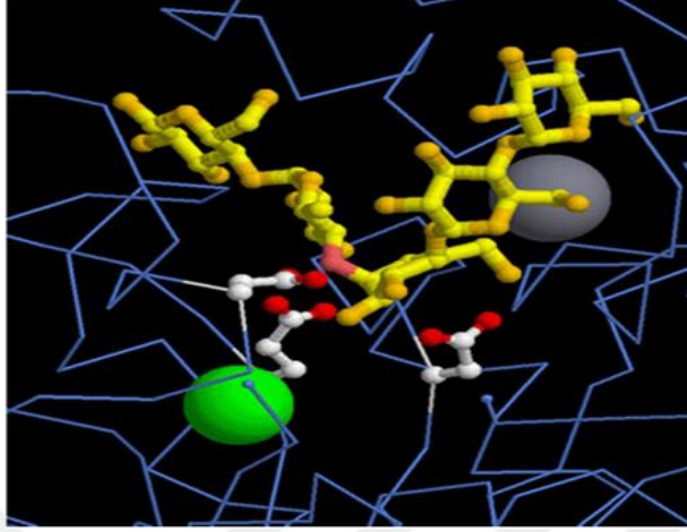
Amilazlar bakteri, maya ve mantar gibi birçok mikroorganizmanın nişasta substratları üzerindeki büyümeleri esnasında salgılanarak, dekstrin, maltoz ve glikoz gibi nişasta ürünlerinin oluşumunu sağlar. Amilazlar iki kategoriye ayrılarak incelenir: endoamilazlar ve ekzoamilazlar. Endoamilazlar, nişasta molekülünün hidrolizini rastgele katalize eder. Bu kataliz sonucunda çeşitli zincir uzunluklarında doğrusal ve dallı oligosakkaritler oluşur. Ekzoamilazlar, indirgeyici olmayan uçtan hidrolize uğrattırır ve sonuç olarak düşük molekül ağırlıklı maltoz ve glikoz molekülleri oluşur (Keharom ve diğ, 2016). Amilazların ilk hidroliz ürünleri 5 ila 7 glikoz birimlerinden oluşan oligosakkaritlerdir. Amilazlar, nişasta türevlerinin üretiminde önemli bir enzimdir ve gıda, tekstil, kağıt, deterjan üretimi gibi endüstriyel alanlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır (Khannous ve diğ, 2014).

1.1.1 α -amilaz

α -amilaz (E.C.3.2.1.1), glikoz ve maltoz gibi ürünler elde etmek için nişastadaki α -1,4-glikozidik bağlarının hidrolizini katalizleyen bir hidrolaz enzimidir. Kalsiyum metalo enzimdir, yani aktivitesi bir metal kofaktörü olan Ca^{+2} 'ye bağlıdır. 2 tip hidrolaz vardır: Endohidrolaz ve ekzohidrolaz (Van der Maarel ve diğ, 2002). Endohidrolazlar; substrat molekülünün iç kısmına etki ederken, ekzohidrolazlar terminal indirgeyici olmayan uçlara etki eder. Bu nedenle, terminal glikoz uç molekülleri ve α -1,6-bağları, α -amilaz ile ayrılamaz çünkü α -amilaz nişastaya etki eder (Van der Maarel ve diğ, 2002).

α -amilaz, optimum pH 7'de iyi aktivite göstermektedir ve optimum gelişme sıcaklığı mikroorganizmanın türüne göre değişmektedir (Uçar, 2011).

α -amilazın 3 boyutlu yapısı Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1: α -amilazın 3 boyutlu yapısı (Barutçu, 2017).

1.1.2 β -amilaz

β -amilaz (E.C 3.2.1.2), bir polisakarit zincirinin indirgeyici olmayan ucundan, ardışık maltoz birimleri oluşturmak için α -1,4-glikozidik bağlarının hidrolizini sağlayan bir ekzohidrolazdır. Glikojen veya amilopektin gibi dallı polisakkaritlerde dallı yan bağları parçalayamadığından eksik hidroliz sonucunda dekstrin birimleri kalır. β -amilazın temel kaynakları, gelişmiş bitkiler ve tatlı patates tohumlarıdır. Meyvelerin olgunlaşması sırasında, β -amilaz, nişastadan olgunlaşmış meyve tatlılığı veren maltoz şekerinin oluşumunu sağlar. Enzimin optimal pH değeri 4.0 ila 5.5 arasındadır. β -amilaz, endüstriyel alanların yanı sıra demleme ve damıtma endüstrisinde fermantasyon ve yüksek maltoz şurupları üretmek için de kullanılır (Sundarram ve Murty, 2014).

1.1.3 γ -amilaz

γ -amilaz (E.C 3.2.1.3) amilaz ve amilozun indirgenmeyen ucundaki son α -1,4- glikozidik bağları ve α -1,6- glikozidik bağlarını kırar. Asidik ortamlarda en etkili enzim γ -amilaz olup, optimum pH değeri 3'tür (Sundarram ve Murty, 2014).

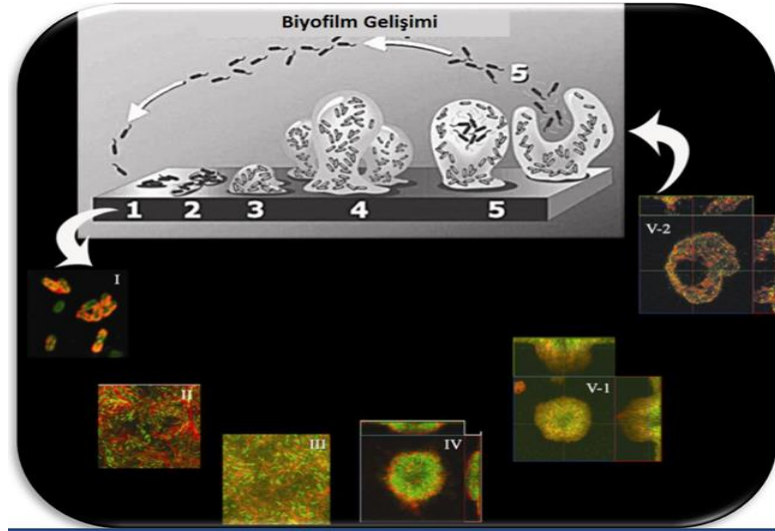
α -amilazlar ve β -amilaz üretiminde kullanılan mikroorganizmalar: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. polmyxa*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. lincheniformis*, *B. steriothermophilu*, *B. megaterium*, *Streptomyces sp.*, *Pseudomonas sp.* (Parmar ve Pandya, 2012).

1.2 Biyofilm

Bakteri toplulukları, yüzeylerinde bulunan çok ince ekstraselüler polimer fibriller aracılığı ile birbirlerine tutunarak biyofilm yapısını oluştururlar. Biyofilm oluşturabilen bakterilerin farklı ortamlarda hayatta kalma şansı biyofilm oluşturamayanlara göre daha yüksektir. Biyofilm oluşumunun son aşaması olan olgunlaşma basamağından sonra bakterilerin, hem antibiyotiklere hem de konak canlıının bağışıklık sistemine karşı daha dayanıklı oldukları için yayılmaları ve enfeksiyonlara yol açmaları daha kolay olur (Donlan ve Costerton 2002).

Bakterilerde biyofilm oluşuktan sonra; metabolizma yavaşlar, hareket azalır ve virülanslık artar. Biyofilm tabakası içinde kanallar oluşturularak bu kanallarla hem besin alımı hem de atıkların atılması işlemleri gerçekleştirilir. Biyofilm oluşumu *las* sistemi kontrolünde gerçekleşir (Şekil 1.2). Biyofilm oluşumu:

- * katı veya sıvı bir yüzeye tutunma,
- * mikrokolonizasyon,
- * hücre dışı polisakkarit bileşenlerin üretilmesi,
- * bakterilerin olgunlaşması ve yayılması basamaklarını içerir (Maçin, 2014).



Şekil 1.2: Biyofilm oluşum mekanizması (Maçin, 2014).

Biyofilm aslında mikroorganizmaları barındıran korunaklı bir yapıdır. Mikroorganizmaların biyofilm yapısında iken planktonik hallerine göre, antimikrobiyal ajanlara karşı 10 ile 1000 kat oranında daha dirençli oldukları bildirilmiştir (Singer ve diğ, 2010).

Biyofilm üreten bakteriler antiseptik çözeltiler içinde canlılıklarını uzun süre koruyabildikleri için; buldukları biyofilm içeren ortamdan uzaklaştırılmaları gerekir çünkü bu uzaklaştırma işleminden sonra dirençli oldukları antimikrobiyal maddelere karşı yeniden duyarlı olurlar (Akalin, 2014).

Bakteriyel biyofilmler, hücre topluluğuna antimikrobiyal bileşiklerden ve dehidrasyondan koruma sağlamanın yanı sıra, hücreler arası sinyal etkileşimlerini destekler ve besin alımını optimize etmeye yardımcı olur. Bulunulan ortam içinde, su ve besinlerin varlığı gibi faktörler biyofilm oluşumunu sınırlayabilir (Cruz ve diğ, 2012).

Biyofilm oluşumu bakterilere, hücreden bağımsız ve hücreye bağlı çok çeşitli virülans belirleyicilerinin üretimi, metabolik çok yönlülük ve esneklik verir. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa*'nın güçlü bağışıklık sistemi savunmalarından ve anti-*psödomonal* ilaçlardan kaçmasına izin verir. Biofilm oluşumundan *N-asetil homoserin lakton* geni sorumludur (AHL). AHL güdümlü Quorum Sensing, *LasI / R* ve *RhlI / R* olarak adlandırılan iki alt gen sisteminden oluşur. Bu genler;

* proteaz,

* elastaz,

* lipaz,

* piyosiyenin,

* pyoverdin,

* ramnolipid,

*HCN üretimi gibi önemli virülans faktörlerinin düzenlenmesinden de sorumludur (Sethupathy ve diğ, 2016).

1.3 Elastaz

Elastaz enzimatik aktivite için nötral pH'a gereksinim duyan Zn^{+2} bağımlı bir proteinazdır. Molekül ağırlığı 39.5 kDa ve izoelektrik noktası pH 5.9'dur. Elastaz, *B. subtilis*'in nötral proteinazıdır (Moriyama ve Tsuzuki, 1977).

Elastaz, LasA (serin proteaz) ve LasB (çinko metalloproteaz) olarak iki formda bulunan ve *Pseudomonas* enfeksiyonlarında elastini sinerjik olarak parçalayabilen enzimdir. Elastaz aynı zamanda proteinleri de hidroliz eden bir serin proteazdır. Dokulardaki elastikyeti oluşturan protein olan elastinin ana parçalayıcısıdır (Sökmen ve Sağkal, 2017). Virülanslıkla ilişkisi açık olan bu enzim özellikle elastin içeren dokularda ve akciğer parankiminde hasara neden olmaktadır. Bu enzimler (LasA ve LasB) kompenan bileşikleri parçalayarak nötrofillerin kemotaksis ve fonksiyonlarını inhibe ederler. Böylece akut enfeksiyonlarda doku hasarına ve daha fazla yayılıma sebep olurlar (Vijay ve diğ, 2014).

LasB elastazın yapımını düzenleyen ve bu nedenle de "las sistemi" olarak adlandırılan birincil sistem; *Las I* (3-oxoC12-HSL-L, uzun zincirli AHL sentezinden sorumlu AI (oto-inducer) sentaz geni ve *Las R* ("transcriptional activator" proteinini kodlayan gen) genlerinden oluşmaktadır. Bu sistem biyofilm oluşumunu ve LasB elastaz, LasA proteaz, ekzotoksin A gibi diğer ekstraselüler virülans etmenlerinin en uygun düzeyde üretimini kontrol eder (Akalin, 2014).

Elastazın yapısı diğer bazı serin proteazlarına oldukça benzerdir. Elastaz, alanin, serin ve glisin gibi küçük nötral aminoasitleri de hidroliz eder. Elastaz, üç ana amino asit içeren aktif bir bölgeye sahiptir, bunlar; nükleofilik kataliz oluşturmak için birlikte çalışan katalitik triadı oluşturan aspartat, histidin ve serin amino asitleridir (Vijay ve diğ, 2014).

Elastaz, *E. coli* ve diğer Gram (-) bakterilerin dış membran protein A'yı (OmpA) parçalar. Aynı zamanda *Shigella* virülans faktörlerini parçalamanın önemli immünolojik rolüne de sahiptir. Bu, hedef proteinlerdeki peptid bağlarının yıkılmasıyla gerçekleştirilir. Ayrılan spesifik peptid bağları, glisin, alanin ve valin gibi küçük hidrofobik amino asitlerin karboksi tarafındaki bağlayıcılarıdır (Vijay ve diğ, 2014).

Elastazın substratı (elastin) parçaladığı reaksiyon sırasında, iki faz oluşur ve bunlar peptid bağının amino tarafının serbest bırakıldığı bir aşama ve substratın asıl tarafının serbest bırakıldığı bir kararlı durum fazı oluşumu sağlar (Vijay ve diğ, 2014).

P. aeruginosa, immün sistemi zayıflamış konakçılarda ciddi ve ölümcül enfeksiyonlara neden olduğu bilinen fırsatçı bir patojendir. Elastaz, *P. aeruginosa* tarafından üretilen ve patogeneze katkıda bulunduğu düşünülen birkaç hücre dışı enzimden biridir. Bir virülans faktörüdür. *Pseudomonas* elastazı, enzimatik reaktivite için çinko ve stabilite için kalsiyum gerektiren nötr bir metaloproteazdır. *Pseudomonas* elastazı, *Bacillus thermoproteolyticus* tarafından üretilen çinko metaloproteaz olan termolizin ile yüksek derecede sekans ve fonksiyonel homoloji gösterir (Olson ve Ohman, 1992).

lasB geni tarafından kodlanan elastaz, 53 kDa'lık bir pro-enzim olarak sentezlenir, iç zardan translokasyon, bir sinyal sekansının çıkarılmasına ve 51 kDa pro-elastaz oluşumu ile sonuçlanır. Pro-elastaz daha sonra otoproteolitik işleme mekanizmaları yoluyla olgun 33 kDa formuna kadar işlenir. Elastaz üretiminin düzenlenmesinde demir, amonyum klorür, glikoz ve çinko gibi çeşitli çevresel faktörler rol oynamaktadır (Olson ve Ohman, 1992).

P. aeruginosa elastazının elastolitik aktivitesi, *lasA* tarafından da büyük ölçüde artırılır. *E. coli*' de *lasA*'nın ekspresyonu, yaklaşık 41 kDa'lık bir proteinin üretilmesi ile sonuçlanır. Bununla birlikte, son çalışmalar *LasA*'nın *P. aeruginosa*'dan 21 kDa'lık bir yapı olarak salgılandığını göstermektedir. *LasA*'nın elastin üzerinde belirgin bir proteolitik aktivitesi olmamasına rağmen elastin içindeki normal olarak erişilemeyen bölgelerin elastazın elastolitik aktivitesine maruz kalmasını sağlayarak elastazın elastolitik aktivitesine yardımcı olur (Olson ve Ohman, 1992).

1.4 Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

H₂O₂, oksijen molekülleri arasında tek bağla oluşan en basit yapılı peroksittir ve serbest radikal oluşumuna neden olur. Yağda çözünen bir molekül olduğu için oluşum yerinden uzakta olan Fe⁺² içeren hücre zar yapılarında da hasara yol açabilir (Özcan ve diğ., 2015).

H₂O₂, yüksüz bir moleküldür ve bu nedenle biyolojik membranlara karşı yayılmaya hazır formdadır. H₂O₂, canlı hücrelerinin fizyolojik bir bileşenidir ve sürekli olarak üretilmektedir. H₂O₂'nin intraselüler konsantrasyonun sıkı bir şekilde kontrol edilmesi için çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler vardır. H₂O₂, özellikle hücre sinyallemesine dâhil olan proteinlerin aktivitesini konformasyonel ve fonksiyonel

değişikliklere neden olan sistein kalıntılarının oksidasyonu yoluyla aktivitesini düzenlemektedir (Demirbanka, 2019).

Ökaryotik kondrosarkom ve kondrosit hücrelerde; H₂O₂'nin, intraselüler durağan durum konsantrasyonu 1 µM'ın üzerine ulaştığında, oksidatif strese sebep olduğu düşünülmektedir. Hem bu durumun hem de H₂O₂'nin fizyolojik fonksiyonlarını ve toksik etkisini belirlemek için yapılan çalışmalarda; çok düşük seviyelerinin (3 µM'dan 15 µM'a kadar) büyümeyi teşvik ettiği, biraz daha yüksek seviyelerinin (120 µM'dan 150 µM'a kadar) geçici olarak hücre büyümesini durdurduğu, orta seviye konsantrasyonlarının (250 µM'dan 400 µM'a kadar) kalıcı olarak hücre büyümesini engellediği ve çok yüksek konsantrasyonlarının (≥1 mM) ise nekrotik hücre ölümlerine sebep olduğu belirlenmiştir (Demirbanka, 2019).

1.5 Kalsiyum (Ca⁺²)

Ökaryotik hücrelerde Ca⁺² iyonları; hücre döngüsü, ulaştırma, hareketlilik, gen ekspresyonu ve metabolizma gibi birçok hücresel işlemi düzenleyen hücre içi haberci görevine sahiptir. Hücreler, hücre içi serbest Ca⁺² konsantrasyonundaki geçici değişikliklerle çeşitli uyarılara cevap vermektedir. Ca⁺² bakterilerde; spor oluşumu, kemotaksis, heterosistif farklılaşma, madde taşıma ve virülanslık gibi çeşitli fizyolojik süreçleri de etkiler. Ca⁺² geçici maddeleri azot açlığına, çevresel strese ve karbonhidrat metabolizmasının metabolitlerine yanıt olarak üretilir. Dahası, *E. coli*, *B. subtilis* ve *P. aeruginosa*'daki proteomik ve transkriptomik analizler, yüzlerce genin ekspresyonunun, yükselmiş dış Ca⁺²'a yanıtta Ca⁺²'deki değişikliklerle modüle edildiğini ortaya koydu. Bu değişikliklerden etkilenen süreçler arasında sürünme, tip III sekresyonu, polisakkarit üretimi, demir alımı, kinolon sinyalleri ve genel stres tepkileri yer alır (Domingueza ve diğ., 2015).

Ökaryotlara benzer şekilde, prokaryotik hücreler de sitozolik Ca⁺² iyonlarının sıkı kontrolünü sağlarlar. Ancak bakterilerin Ca⁺² homeostazını nasıl koruduğunun arkasındaki moleküler mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Gangola ve Rosen (1987), *E. coli*'deki bağlı Ca⁺² seviyesinin, serbest Ca⁺²'den 100 ila 1000 kat daha yüksek olduğunu ileri sürmüştür, son çalışmalar çeşitli bakterilerde ökaryotik hücrelerde bulunan seviyelere benzer olarak serbest sitozolik Ca⁺² seviyelerinin oldukça düşük olduğunu göstermiştir (100–300 nM). Bunlar gibi gradyan sistemleri, taşıyıcıların, kalsiyum bağımlı proteinlerin

(CaBP) ve diğere proteinlerin veya hücresele kompartımanların adaptif yanıtı katılabileceğini düşündüren Ca^{+2} 'nin sıkı kontrolünü gerektirir.

Bazı bakteriler Ca^{+2} 'u membrana bağılı yapılar olarak depolayabilir. Prokaryotik asidokalsizomlar, H^+ -ATP-az taşıyıcılarını ve asitleştirilmelerinden sorumlu vakuolar proton translokasyon pirofosfataz içeren ökaryotik yapılarına çok benzerdir (Domingueza ve diğ, 2015).

Gram (-) bakterilerde periplazmik boşluk, dış zar ile sitoplazmik zar arasındaki bölgeyi içerir. Bu bölmenin varlığı Gram (+) bakterilerde de gösterilmiştir. X-ışını haritalama ve elektron kaybı spektroskopisi, yüksek Ca^{+2} konsantrasyonlarının, *E. coli*'nin hücresele zarfı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Periplazma, bu bölmede Ca^{+2} depolanmasında rol oynayabilen oligosakkaritler ve anyonik proteinler içerir. Jones ve arkadaşlarına (2002) göre, dış zar ve periplazma Ca^{+2} regülasyonunda önce Ca^{+2} girişine bariyer olarak, ikinci olarak Ca^{+2} 'yi tamponlayarak veya depolayarak önemli bir rol oynayabilir. Belirli koşullar altında periplazmanın, canlı *E. coli* hücrelerinin periplazmasındaki Ca^{+2} 'un N-terminal OmpT sinyal kullanıp hedeflenen Ca^{+2} ölçülerek harici ortama göre 3-6 kat Ca^{+2} depolanabileceğini gözlemlerler. Bu sonuçlar, bakteriyel hücrelerin Ca^{+2} konsantrasyonunu, hücre bölmeleri içerisinde farklı mekanizmalar kullanarak düzenleme yeteneğine sahip olabileceği hipotezini desteklemektedir (Domingueza ve diğ, 2015).

Prokaryotlarda Ca^{+2} taşıma sistemi üçe ayrılır:

1) Gradyanla çalışın Ca^{+2} eşanjörleri,

2) ATPazlar,

3) Protein olmayan polihidroksibutirat polifosfatlar (PHB-PP) kanalları.

1) Ca^{+2} eşanjörleri bir dizi bakteri cinsinde tanımlanmıştır ve prokaryotlarda Ca^{+2} taşınması için önemli bir mekanizma olduğu düşünülmüştür. Ca^{+2} eşanjörleri; iyonların elektrokimyasal gradyanında depolanın enerjiyi kullanan ve gradyana bağılı olarak her iki yönde de çalışabilen düşük afiniteli Ca^{+2} taşıyıcılarıdır.

2) ATPazlar, çoğunlukla ATP enerjisini kullanarak katyonları sitozolden ihraç eden yüksek afiniteli pompalardır.

Daha önce yapılan çalışmalar, yüksek Ca^{+2} 'da büyümenin *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu artırdığını ve aljinat, hücre dışı proteazlar ve piosiyanın de dâhil olmak üzere salgılanan virülans faktörlerinin biosentezini indüklediğini göstermiştir ancak Ca^{+2} regülasyonunun moleküler mekanizmaları tanımlanmamıştır (Guragain ve diğ, 2013).

Kalsiyum seviyeleri *Vibrio cholerae*'daki biyofilm yapılarını, *Yersinia pestis*'te ve *P. aeruginosa*'da tip III salgılama aparatının ve efektör proteinlerin ekspresyonunu ve *Pectobacterium carotovorum*'da hidrolitik enzimlerin (poligalakturonaz ve pektat liyazi) üretimini modüle eder (Cruz ve diğ, 2012).

V. cholera, daha yüksek Ca^{+2} konsantrasyonlarından geçiş yaptığında, deniz suyunda bulunanlar gibi daha düşük bir konsantrasyonda, biyofilmler dağılır, bu da bir O-antijen polisakaritten Ca^{+2} kaybının biyofilmlerin bozulmasına ve tek tek hücrelerin salınmasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Bu dengesizleştirici etki, magnezyum ilavesiyle gözlemlenmediğinden Ca^{+2} için spesifik olabileceği düşünülmüştür. Biyofilm matris stabilitesindeki rollerine ek olarak, Ca^{+2} iyonları bakteri gen ekspresyonunu etkileyebilir (Sarkisova ve diğ, 2005).

Pek çok bakteri, Ca^{+2} 'yi bağladığı gösterilen *P. aeruginosa* PA4107 ve muhtemelen PlcR dahil olmak üzere karakteristik EF el motiflerine sahip kalmodulin benzeri proteinler için genler içerir. *P. aeruginosa*'da, bazı hücre dışı proteinlerin salgılanması ve / veya stabilitesi Ca^{+2} 'den etkilenir. Tip III salgılama sistemi tarafından salgılanan toksinler Ca^{+2} ile bastırılır. Tip II salgı yolu tarafından salgılanan hücre dışı elastaz, LasB ve LasA miktarlarının ilave Ca^{+2} varlığında arttığı ifade edilmektedir (Sarkisova ve diğ, 2005).

1.6 Piyorubin

Piyorubin, sadece *Pseudomonas* cinsine ait suda çözünen, kırmızımsı bir pigmenttir. Birçok bakteriyel pigmentin üretiminde, çevreyi algılama mekanizmasında (Quorum sensing) rolü olan açillenmiş homoserin laktonların (AHL) varlığı rol oynamaktadır. Bakteriyel pigmentlerin varlığı, biyofilm oluşumuna neden olan epigenetik faktörlerin üzerinde de etkilidir. Mikroorganizmalar, farklı ortamlarda farklı coğrafik bölgelerde çok çeşitli pigmentler üreterek buldukları olumsuz koşullara daha dayanıklı hale gelmektedirler (Maçin, 2014).

Pigmentlerin genel olarak bakterilere sağladığı yararlar;

- * mikroorganizmayı çeşitli biyolojik ajanlara,
- * yüksek doz ultraviyole ışınlarına,
- * oksidan maddelere,
- * ağır metal iyonlarına,
- * aşırı sıcak ve aşırı soğuğa,
- * diğer mikroorganizmaların antimikrobiyal aktivitelerine karşı koruma,
- * demir gibi iyonların elde edilmesi ve fotosentezle besin üretimi gibi yararları vardır (Özdal, 2019).

1.7 Proteazlar

Endüstriyel üretimde birçok enzim kullanılmakta ve bu enzimlerin büyük çoğunluğu bitki ve hayvanlardan elde edilenlerle karşılaştırıldığında; yüksek aktiviteli olmaları, istenmeyen ara ürün oluşturmamaları, yüksek stabilite göstermeleri, ucuz olmaları ve kısa zamanda çok miktarda üretilebilmeleri gibi nedenlerle mikroorganizmalardan elde edilmektedir (Horikoshi, 1999). Bu nedenle araştırmacılar; mikrobiyal çeşitliliği daha detaylı inceleyerek daha kullanışlı enzimler üretebilen mikroorganizmaların keşfine yönelmektedir (Özcan ve Çorbacı, 2017).

Bu enzimlerden biri olan proteazlar, proteinlerin peptit bağlarını kırarak etki gösterirler.

Proteazların kullanım alanları arasında;

- * deterjan,
- * gıda,
- * kozmetik,
- * ilaç,
- * tıbbi teşhis ve X- ışını filmleri üzerindeki jelatinin bozunması,
- * deri ve tekstil sanayisinde,
- * atıkların işlenmesinde,
- * doku düzenlenmesinde,

- * protein katabolizmasında,
- * hücre gelişimi ve hücre göçü olaylarında,
- * membranlardan proteinlerin geçişi gibi pek çok çeşitli alan bulunmaktadır.

Endüstriyel proteaz üreticisi mikroorganizmalar arasında; *Clostridium*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinsleri bulunmaktadır ancak *Bacillus* türleri ticari olarak proteaz üretmek için daha çok tercih edilmiştir (Özcan ve Çorbacı, 2017).

Proteazlar genellikle sulu olmayan ortamlarda kullanılır, çünkü bu ortamlar substratların veya ürünlerin çözünürlüğünü artırabilir ve ürünün geri kazanılmasını kolaylaştırabilir (Geok ve diğ, 2002).

1.7.1 Proteaz enziminin yapısı

Hücre içinde gerçekleşen önemli reaksiyonlardan biri olan hidroliz reaksiyonları; organik maddeleri canlılar için kullanılabilir ve yararlı hale getiren reaksiyonlardır (Shen ve Chou 2009).

Proteinler ve polipeptit zincirleri proteazlar tarafından hidroliz edilirler. Proteazlar, belirli sıcaklık ve belirli pH aralıklarında çalışan protein yapılı enzimlerdir. Besinlerle alınan proteinler, proteazlar sayesinde polipeptit zincirlerinin amid bağlarının hidroliz edilmesiyle parçalanırlar. (Mizuno, 2003).

1.7.2 Metallo proteazlar

Çinko proteazlar olarak da bilinen bu proteazların çoğunluğu nötr pH'da aktivite gösteren, 15 ile 35 kDa molekül ağırlığında olan küçük monomerik enzimlerdir. Metallo proteazlarla ilgili birçok çalışma yapıldığından dolayı bu enzimler en iyi anlaşılan enzimler arasındadır (Gerze, 2003).

Metallo proteazların katalitik etkisi diğer proteazlardan farklıdır. Aktiviteleri için iki değerlikli özellikle çinko gibi metallerle ihtiyaç duyarlar. Metallo proteazların doku morfogenezi ve farklılaşmasında rolü vardır. Ayrıca kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılabilirler. Bakterilerdeki termolizin ve yılan zehrinde bulunan hemorajik toksin bilinen en yaygın metallo proteazlardır. Metalloproteazlar EDTA gibi şelat yapıcı ajanlar varlığında inhibe olurlar. Çinko metali enzim aktivitesi için gerekli iken kalsiyum metali protein yapısının korunması için gereklidir (Yıldırım, 2014).

Birçok metallo proteaz, katalitik çinko iyonları tarafından karakterize edilmesine rağmen, bazı enzimlerde bu fonksiyon manganez, kobalt, nikel veya bakır gibi farklı kofaktörler tarafından yürütülür. Bazı metallo proteazlarda ise iki metal iyonu aynı anda katalitik olarak etki gösterir. Metal iyonları; proteaz enziminin His, Asp, Glu veya Lys amino asit bulunan bölgelerinden çevrelenerek kompleks oluştururlar (Sari, 2011).

Mikroorganizmalardan yüksek oranda enzim verimi elde etmek için bazı yöntemlere başvurulur. Örneğin; mutasyonla yeni mutantlar elde edilebilir veya mikroorganizmalar doğrudan buldukları ortamdan izole edilebilir ya da mikroorganizmanın üretildiği kültür ortamı değiştirilebilir. Özellikle kültür ortamında bulunan inorganik tuzlar, nitrojen ve karbon kaynakları ve diğer büyüme faktörleri, bakterilerin enzim üretme kapasiteleri üzerinde önemli etkiye sahiptir. Bazı metal iyonları (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Ag^{+3} , Pb^{+3} , Hg^{+2}) ve surfaktanlar proteaz üretimi için uyarıcı bir etkiye sahiptir (Konak, 2012).

1.8 *B. cereus*

B. cereus'un genel özellikleri;

Bacillaceae familyasının *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olan *B. cereus*,

- * *Cereus* adını tahıl anlamındaki cereal'dan alır,
- * Bitki örtüsü ve toprak zemini üzerinde yaygın bir şekilde bulunmaktadır,
- * Sporları elipsoidal şekilde ve santral veya subterminal yapıdadır,
- * Peritrik flegellaları sayesinde hareketlidir,
- * Aerobik özellikte ve kemoorganotroftir,
- * Optimum gelişme sıcaklığı, suşlara göre 28-35 °C arasında değişmekle birlikte genellikle 30 °C'dir. En yüksek üreme sıcaklığı yine suşlara göre 37-48 °C arasında değişir. En düşük üreme sıcaklığı da suşa bağlı olarak 10-18 °C arasındadır,
- * Vejetatif forma dönmesi için gereken optimum sıcaklık 30 °C, minimum -1 °C ve maksimum 59 °C'dir,
- * Gelişebildiği pH aralığı 4.9-9.3 olup optimum 7.0'dir,
- * Nitrat redüksiyonu pozitif, lesitinaz, jelatinaz, proteaz ve amilaz aktivitesine sahip olup polimiksine dirençlidir,

- * Birçok suşu % 7.5 NaCl ortamında üreyebilir,
- * Sporları, 100 °C'nin altındaki sıcaklıklarda canlı kalabilmektedir,
- * Aerobik spor sayısı kışın daha yüksek orandadır,
- * Ekstraselüler proteolitik enzimler salgılar,
- * *B. cereus*'un donmuş ve pastörize ürünlerde de canlı sporlarının bulunması ve depolama sırasında düşük sıcaklıklarda bile bu sporların gelişebilmeleri bu bakteri hakkındaki endişeleri artırmıştır (Çilak ve Halkman, 2018; Pluta ve diğ, 2019; Kalkan, 2006; Sağlam ve Şeker, 2016).

1.9 *P. aeruginosa*

1.9.1 *P. aeruginosa*'nın tarihçesi

- * *P. aeruginosa*'nın yara enfeksiyonlarına neden olduğu ilk kez Doggett tarafından gösterilmiştir,
- * 1850'de Sédillot, cerrahi yaralarda mavi-yeşil akıntının geliştiğini ve bunun enfeksiyon ile ilişkili olduğunu söylemiştir,
- * 1862'de Luke, mavi-yeşil irinde çomak şeklinde mikroskobik canlıların olduğunu gözlemlemiştir,
- * 1882'de Gessard, bakteriyi ilk kez izole etmiştir ve *Bacillus pyocyaneus* olarak adlandırmıştır,
- * Daha sonra diğer mikrobiyologlar da çeşitli enfeksiyon bölgelerinden mikroorganizmayı izole etmişlerdir,
- * Bakteri, günümüzde kullandığımız adı almadan önce; *Bacterium aeruginosum*, *Bacterium aerugineum*, *Micrococcus pyocianus*, *Pseudomonas pyocianea*, *Bacterium pyocianum*, *Pseudomonas polycolor* gibi isimler ile anılmıştır (Sebit, 2015).

1.9.2 *P. aeruginosa*'nın morfolojisi ve genel özellikleri

- * *P.aeruginosa*, Pseudomonadaceae ailesi içerisinde yer alan en önemli patojendir,
- * Gram (-), düz ya da hafif kıvrık çubuk morfolojisinde olup aerob bir bakteridir,
- * Polar yerleşimli flagellası sayesinde hareketlidir,
- * Uzunluğu 1-3 µm ve genişliği 0,5-10 µm arasındadır,
- * Karakteristik özelliği suda çözünen piyosiyanın adı verilen fenazin pigmenti üretimidir,
- * Piyorubin, piyoverdin, piyosiyanın, pyohelin, pyomelanin pigmentlerini üretebilir,
- * Piyoverdin suda çözünen mavi renkli bir pigment olan piyosiyanın ile birleştiğinde *P.aeruginosa* için karakteristik olan parlak mavi-yeşil rengi oluşturur,
- * Düşük pH değerlerinde ($\leq 4,5$) canlılığını sürdürmez,
- * Aerob olmakla beraber denitrifikasyon özelliğinde olduğundan anaerob üreyen türlerine de rastlanabilir,
- * *P. aeruginosa* genel besiyerlerinde kolaylıkla ürer,
- * % 5'lik koyun kanlı agarda β hemoliz oluşturur,
- * 37 °C'de 24 saat sonra iki tip koloni oluşturur. Birinci tip koloniler büyük, düzgün, parlak, nemli ve yaygındır. İkinci tip koloniler; küçük, konveks ve düzensiz şekildedir,
- * Uygun besiyerinde optimum 30-37 °C'lerde ve hafif alkali ortamlarda gelişir. 41 °C'de üreyebilme yeteneği *P. aeruginosa* için önemli bir özellik olup arka arkaya 3 pasajda 42 °C'de üreyebilmesi ayırt edicidir,
- * Suşların çoğu; nitrat ve nitritlerden nitrojen gazı oluştururlar,
- * *P.aeruginosa* türleri virulans faktörlere sahiptir. Bunlar:
 - * Proteaz,
 - * LasA elastaz,
 - * LasB elastaz,
 - * Alkalen proteaz,
 - * Hemolizinler,
 - * Fosfolipaz C,

- * Ramnolipid,
- * Ekzotoksin A,
- * Ekzoenzim S,
- * Piyosyanin,
- * Biofilm (Yılmaz, 2012; Sebit, 2015; Kayar, 2009; Şen ve Halkman, 2006).

1.9.3 *P. aeruginosa*'nın mikrobiyolojik özellikleri

- * Spor ve kapsül oluşturmazlar,
- * *Pseudomonas* bakterilerinin psikotrof, mezofil ve psikrofil türleri vardır,
- * Tek bir karbon kaynağı varlığında bile üreyebilen nadir bakterilerden oldukları için organik üreme faktörlerine de gereksinimleri yoktur,
- * Demir alımı için siderofora sahiptir (Maçın, 2014).

1.9.4 *P. aeruginosa*'nın biyokimyasal özellikleri

- * Laktoz ve sakkarozu kullanamayıp, glikozu oksidatif yolla parçalayarak asit yaparlar,
- * Oksidaz pozitif olmaları ile *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinden ayrılırlar,
- * Katalaz ve sitrat reksiyonları pozitifdir,
- * Nitratı nitrite redükte ederler,
- * Kanlı agarda hemoliz yaparlar. Kanlı agarda üreyen klinik izolatlar sıklıkla beta hemolitiklerdir,
- * Asetamini deamine ederek amonyak oluştururlar,
- * Nişastaya etki etmezler,
- * Sıvı besiyerinde yüzeyde zar oluşturacak şekilde yoğun ve homojen bir üreme gösterirler ve zarın hemen altında mavi yeşil pigmentleri kolaylıkla ayırt edilir (Şen ve Halkman, 2006; Kayar, 2009).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Khannous ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları bir çalışmada, zeytin atık suyu ile düzenli olarak kirlenmiş toprak örnekleri ve *Pseudomonas luteola* ile çalışmışlar. Maksimum amilaz aktivitesinin pH 5.5 ile 6.5 arasında ve sıcaklık değerinin 33 ile 37 °C arasında iken 9.48 U.mL⁻¹'ye ulaştığını saptamışlar (Khannous ve diğ, 2014).

Parmar ve Pandya (2012); 18 toprak bakterisi türü ile amilaz üretimi çalışmışlar. Bu 18 tür bakterinin *Bacillus* sp. alt türleri olduğu tespit edilmiş. Amilaz üretimi için daldırılmış fermantasyon tekniği uygulanmış ve amilaz aktivite değer aralıkları 0.045-1.35 U.dk⁻¹.mL⁻¹ olarak tespit edilmiş, 48 saat sonra amilazın maksimum aktivitesi 1.35 (U.dk⁻¹.mL⁻¹) olduğu belirtilmiştir (Parmar ve Pandya, 2012).

Raju ve Divakar (2013)'ın yaptıkları bir çalışmada; bahçe toprağından elde edilen *P. aeruginosa* suşunda; 37 °C'de 48 saatlik inkübasyon süresinden sonra maltoz takviyeli ortamda maksimum amilaz üretimi (180 ± 2.6 U.mL⁻¹) olarak bulunmuş (Raju ve Divakar, 2013).

Khemakhem ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları bir çalışmada; çemen otu (*Trigonella foenum graecum*) tohumlarından elde edilen maltojenik bir amilazın maksimum aktivitesi pH 5 ve 60 °C'de ve bu koşullar altında spesifik enzim aktivitesi 258 U.mg⁻¹ olarak bulunmuş. Bu amilazın, geniş bir pH stabilite yelpazesi sergilediği için, büyük bir ticari değer ve endüstriyel uygulamalar için iyi bir beklentiye yol açtığını ifade etmişler (Khemakhem ve diğ, 2013).

Liu ve Xu (2008); yeni izole edilmiş bir *Bacillus* sp. YX1'den nişastayı sindiren yeni bir α-amilazın saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu bildiren çalışmalarında maksimum α-amilaz aktivitesinin (53 U.mL⁻¹) 45 °C'de 44 saat inkübasyondan sonra elde edildiğini göstermişler (Liu ve Xu, 2008).

Kıymacı ve arkadaşlarının (2018) laktik asidin *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşumuna etkisini araştırdıkları bir çalışmada; OD₅₂₀ nm'de yapılan ölçüm sonuçları incelendiğinde, kontrol olarak kullanılan *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumu

0.94783 olarak bulunmuştur. İzolatlar arasında en düşük ve en yüksek biyofilm oluşumu sırasıyla 0.02253 ve 1.95445 olarak bulunmuş (Kıymacı ve diğ, 2018).

Hosseinidoust ve arkadaşları (2013), genotipik olarak tek tip bir *P. aeruginosa* kültüründen çeşitli faj ortamlarında dirençli varyantların ortaya çıkmasına ve ilk popülasyonun beş ana koloni grubuna çeşitlenmesine yol açtığı çalışmalarında biyofilm üretim değerleri; OD₅₇₀'de yapılan okumada: kontrol grubunda 1.22, diğer fajlarda sırasıyla; 0.46, 1.42 ve 1.15 olarak kaydedilmiş (Hosseinidoust ve diğ, 2013).

Bose ve arkadaşları (2009), 179 klinik *Staphylococci* izolatu (179 *Staphylococcus spp.*'den 111'i *S. epidermidis* ve 68'i *S.aureus*'du) içinden; farklı metodlarla üretilen bakterilerin % 15.64, % 12.30, % 4.47'si yüksek biyofilm üretimi gösterdiğini bulmuşlar (Bose ve diğ, 2009).

Zheng ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları bir çalışmada; *P. putida* MnB1'in H₂O₂'yi indirgediğini ve proliferasyon için hızla iyileştiğini, ancak hücre içi oksidatif stres durumunun, H₂O₂ tükenmesinden sonra hızlı biyofilm oluşumu ile sürdürüldüğünü bulmuşlar (Zheng ve diğ, 2018).

Mathur ve arkadaşları (2006) yaptıkları bir çalışmada; biyofilm oluşumunun tespiti için 152 klinik *Staphylococcus spp.* doku kültürü plakası (TCP), Tüp yöntemi (TM) ve Congo kırmızı agar (CRA) yöntemi ile taranmış; 152 *Staphylococcus spp.* 88 (% 57.8), TCP yönteminde optimize edilmiş koşullar altında biyofilm üretmişler ve suşlar ayrıca yüksek 22 (% 14.47) ve orta 60 (% 39.4) olarak sınıflandırılırken, 70 (% 46.0) izolatta zayıf veya hiç biyofilm üretimi olmamış (Mathur ve diğ, 2006).

Vijay ve arkadaşlarının (2014), yaptıkları araştırmada *Lactobacillus fermentii*'den elde edilen elastazın maksimum enzim aktivitesi için en uygun pH'ı 8 ve sıcaklığın 80 °C'de olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca; elastaz enzimini Alzheimer hastalığının bazı semptomlarının tedavisinde kullanmayı amaçlamışlardır (Vijay ve diğ, 2014).

Caballero ve arkadaşlarının (2001) yaptıkları bir çalışmada, *P. auroginosa*'nın elastaz A ve elastaz B enzimlerinin elastolitik aktivite gösterdiğini ve elastaz B'nin elastolitik aktivitesinin elastaz A'ninkinden altı kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır (Caballero ve diğ, 2001).

Kıymacı ve arkadaşlarının (2018) laktik asidin *P. aeruginosa* izolatlarının yeterli çoğunluk algılama (Q.S.) sistem sinyal molekülleri ve virülans faktörlerinin üretimi üzerindeki

inhibitör etkisinin araştırmışlar. Bu çalışmada; *P. aeruginosa* klinik izolatlarının elastaz üretimi incelendiğinde *P. aeruginosa*'nın elastaz aktivitesi PAO1 suşunun 0.4275, diğer izolatların en düşük elastaz aktivitesini 0.01597 ve en yüksek elastaz aktivitesini ise 0.528203 olarak bulmuşlardır (Kıymacı ve diğ, 2018).

Fitriani ve Güven (2018)'in yaptıkları bir çalışmada; *Halobacillus trueperi* adlı halofilik bakterinin 11.85 U.mg⁻¹ ile en yüksek spesifik proteaz aktivitesine sahip olduğunu göstermişler (Fitriani ve Güven, 2018).

Özcan ve Çorbacı (2017)'nin, Karadeniz'in çökelti örneklerinden izole edilmiş iki *Streptomyces* suşunun pH ve sıcaklık kararlılıklarının saptanması ve hücre dışı proteaz enzim üretim kapasitelerinin belirlenmesinin amaçlandığı çalışmalarından elde edilen sonuçlara bakıldığında, bu organizmaların proteaz için spesifik enzim aktiviteleri 14.45 ve 18.46 U.mg⁻¹ şeklinde olup, iyi birer proteaz üreticisi olabilecekleri sonucuna varılmış (Özcan ve Çorbacı, 2017).

Gerze (2003)'nin, *B. subtilis megatherium* ve *B. polymxa* bakteri türlerinden elde edilen proteaz enziminin kısmi saflaştırılması ve özelliklerinin incelenmesi amacıyla ilgili olarak yaptığı çalışmada; *B. subtilis megatherium* türü için spesifik aktivite değerlerinin 168 saat sonuna kadar yaklaşık 12 U.mg⁻¹ civarında olduğu ve bu saatten sonra düşmeye başladığı, *B. polymxa* türü için yapılan saflaştırma çalışmasının sonuçlarına göre ham homojenatın spesifik aktivitesi 15.9 U.mg⁻¹, % 80'lik doyurma sonrası spesifik aktivitenin ise 30.3 U.mg⁻¹ olduğu hesaplanmış (Gerze, 2003).

Görmez ve Gülmüş (2018), Erzurum sıcak su kaynaklarından bakteriyel izolasyonlar yaparak bu izolatların proteaz enzim aktiviteleri incelenmiş ve izolatların proteaz enzim aktiviteleri hesaplanmış, en yüksek aktivite gösteren izolat *Bacillus pumilus* NK14 (91.17 U.mL⁻¹) olarak tespit edilmiş. *B. pumilus* NK14 izolatının enzim aktivitesi için en uygun sıcaklık aralığının 45-65 °C (optimum 50 °C) olduğu gözlenmiş (Görmez ve Gülmüş, 2018).

Machreki ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları bir çalışmada, *P. aeruginosa* ATCC27853 suşunun, 12 ay boyunca sterilize deniz suyunda inkübasyonundan sonra piyorubin üretimini incelemişler. İnkübe edilmemiş *P. aeruginosa* ATCC27853 (OD₅₂₀= 0.083) ile karşılaştırıldığında deniz suyunda 8 ay süreyle inkübe edilen A81 suşu (OD₅₂₀= 0.0991) ile pyorubin üretim oranlarında önemli bir artış elde edildiğini bulmuşlar (Machreki ve diğ, 2019).

Lo ve arkadaşlarının (2016) yaptıkları bir çalışmada; bakteriyel flagellar biyosentez genlerinin ana düzenleyicisi olan ve Sigma 28 olarak da adlandırılan transkripsiyon faktörü FliA'nın flagellar gen transkripsiyonunu düzenlemeye ek olarak, *P. aeruginosa*'da piyorubin üretimini 3 kat artırdığını bulmuşlar (Lo ve diğ, 2016).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

CaCl₂, kristal viyole, kazein, folin, Tris HCl, EDTA, TCA, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, Na₂CO₃, H₂SO₄, nişasta, antron, distile su, etil alkol, elastin kongo red (ECR), metilen mavisi, sükröz.

3.2 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Deneylerimizde Nutrient Broth, Nutrient Agar, Luria-Bertani, Mueller Hinton ve Brain Heart Infusion besiyerleri kullanılmıştır.

3.3 Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Saklama ve Çalışma Koşulları

1. *P. aeruginosa* (ATCC 27853)

2. *B. cereus* (ATCC 10876)

Çalışmalarımızda kullandığımız bu bakteriler, 25 gün aralıklarla üretilmişlerdir. LB plaklarına öze ile pasajlama yapılarak 24 saat, 37 °C’de etüvde bekletilip, ertesi gün plaklar etüvden çıkarılarak +4 °C’de saklanmıştır.

Petriden öze ile 3 mL NB bulunan tüplere ekim yapılarak 18 saat 37 °C’de gece boyu üretildiler. Daha sonra bu kültürlerden 100 µL alınıp 3.5 mL NB bulunan tüplere ekim yapıldı. 24 saat 37 °C’de statik olarak üretildiler. Bu tüplerden alınan kültürler ile deneylere devam edildi.

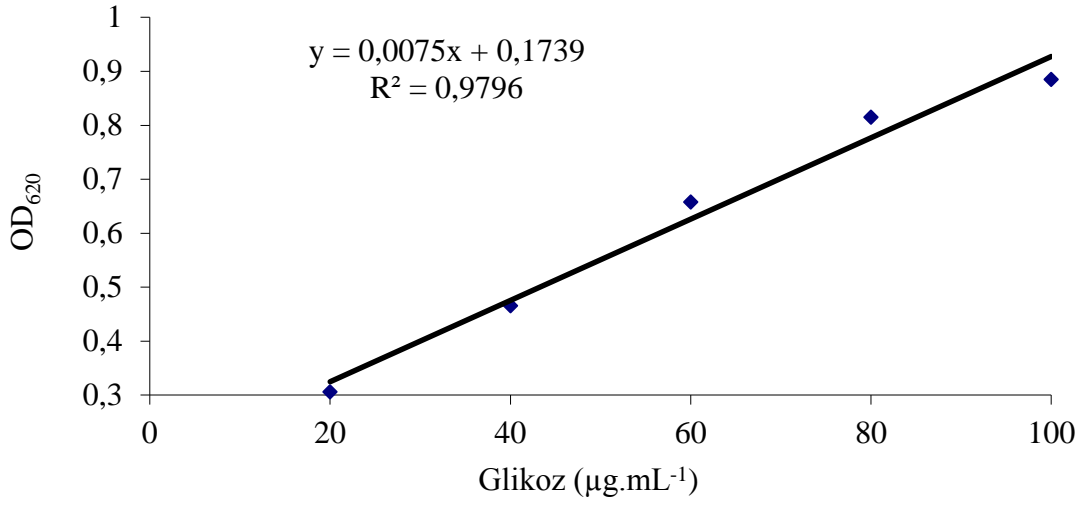
3.4 .Çalışmada Kullanılan Tuz

Çalışmalarımızda stres kaynağı oluşturmak amacıyla CaCl₂ kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (0.05 M, 0.1 M ve 0.15 M) CaCl₂ kullanılarak sekonder metabolit aktiviteleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

3.5 Amilaz Analizi

- * 24 saat inkübasyondan sonra tüpler;
- * 13500 rpm'de oda ısısında 5 dk santrifüj edilir,
- * 0.5 mL süpernatant yeni tüplere alınır ve üzerine,
- * 0.5 mL % 2 nişasta (0.01 M pH 7 fosfat tamponu içinde), 37 °C 15 dk inkübasyona bırakılır,
- * Sonrasında buzdolabında 5 dk bekletilir,
- * Antron yöntemi ile şeker tayini yapılır. Bunun için;
- * 1.5 mL antron reaktifi,
- * 15 µL örnek,
- * 985 mL distile su eklenir,
- * 30 saniye vortekslenir,
- * Musluk suyunda 2-3 dk soğutulur,
- * Tüpler, 10 dk kaynar suda tutulur,
- * Musluk suyunda 2-3 dk soğutulur,
- * OD₆₂₀'de köre (1.5 mL antron, 2 mL su) karşı okunur.

Bir birim α -amilaz aktivitesi, dakika başına glikoza eşdeğer bir μ mol indirgeyici şekeri serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Geok ve diğ, 2003; Raju ve Divakar, 2013). Çalışmada kullanılan glikoz referans grafiği Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Glikoz standardı.

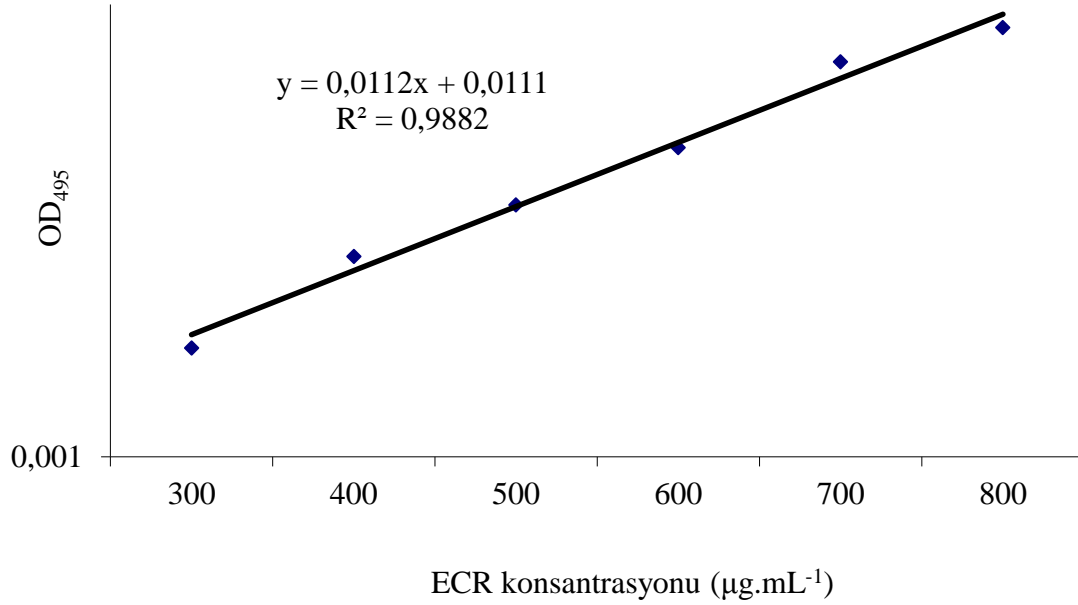
3.6 Biyofilm Oluşum Kinetiği

- * 24 saat üretilen tüplerin içerikleri boşaltılır,
- * Bu tüpler, 3 kez dH₂O ile yıkanır,
- * Tüplere, % 1'lik kristal viyole eklenir,
- * 10 dakika beklenir,
- * 3 kez dH₂O ile yıkanır,
- * + 4 °C'de bekletilen % 95'lik etil alkolden tüm tüplere 4 mL eklenir,
- * 5 dakika beklenir,
- * Tüp içerikleri köre (% 95 etil alkol) karşı OD₅₅₀'de okunur (Jiménez ve diğ, 2015; Kalaiarasan ve Narasimha, 2016; Mirani ve diğ, 2018; Zhang ve diğ, 2018).

3.7 Elastaz Analizi

- * 24 saat üretilen bakteri kültüründen 1 mL alınır,
- * 1 mL tampon (1 mg/mL ECR, 200 mM Trizma base tamponu pH 8.8 içinde),
- * 37 °C'de 30 dakika 150 rpm'de inkübasyona bırakılır,

- * Reaksiyonu durdurmak için üzerine; 0.1 mL 100 mM EDTA eklenir,
- * 13500 rpm'de, oda ısısında 5 dk. santrifüj edilir,
- * OD₄₉₅'de köre karşı (tampon) okumaları ve ECR standard grafiğinden (Şekil 3.2) miktar hesaplamaları yapılır (Kong ve diğ, 2005; Vijay ve diğ, 2014; Jose ve diğ, 2017).



Şekil 3.2: ECR standardı.

3.8 H₂O₂ Duyarlılık Analizi

- * 100 µL kültürden Mueller Hinton Agar (MHA) plaklarına yayma yöntemiyle ekim yapılır,
- * Hemen bu kültürlerin üzerine belli aralıklar ile boş antibiyogram diskleri konulur,
- * Bu disklerin üzerine de 4 µL % 30'luk H₂O₂ damlatılır,
- * H₂O₂ damlatılan petriler, 24 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılır, sonrasında;
- * Disklerin etrafındaki zonların fotoğrafları çekilerek çapları ölçülüp değerlendirme yapılır (Zheng ve diğ, 2018).

3.9 Kanlı Agarda Hemoliz

- * % 5'lik koyun kanlı agarına 4 µL gece boyu üretilen kültürlerden eklenir,
- * 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılır,
- * Ertesi gün alınıp fotoğrafları çekilerek çap ölçümleri yapılır.

3.10 Piyorubin Analizi

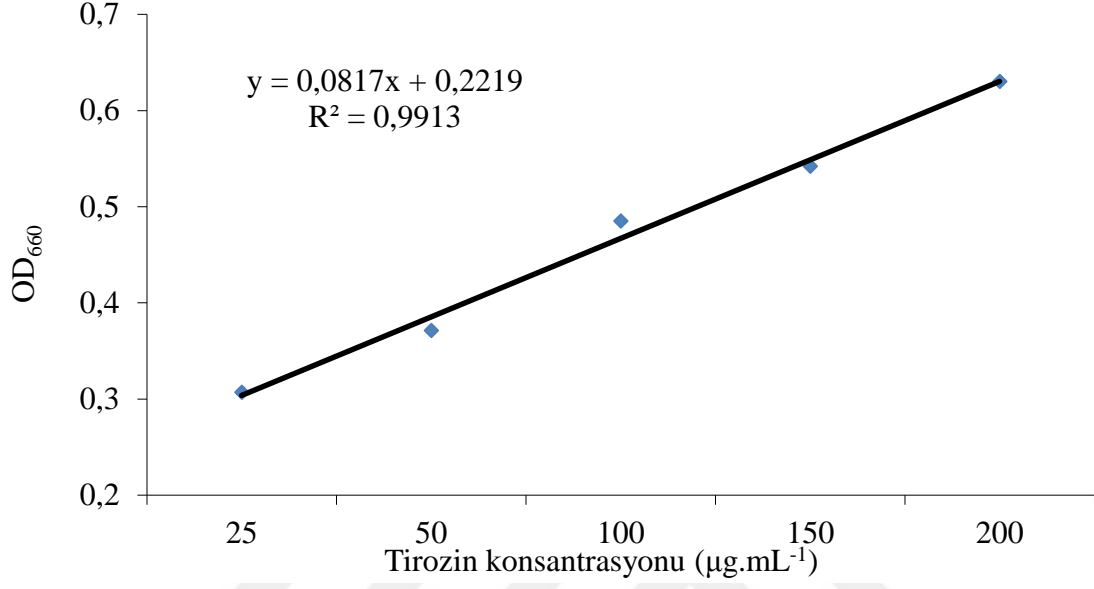
- * 24 saatlik kültürler, 13500 rpm'de 5 dk santrifüj edilir,
- * 1 mL süpernatant yeni tüpe alınır,
- * Üzerine 1.5 mL kloroform eklenir,
- * 500 µL 0.2 N, HCl konulup 30 saniye vortekslenir,
- * Sıvı kısım alınarak köre (HCl) karşı OD₅₂₅'de okuma yapılır (Hosseinidoust ve diğ, 2013; Kalaiarasan ve Narasimha, 2016; Lo ve diğ, 2016; Maroui ve diğ, 2016).

3.11 Proteaz Analizi

- * 24 saatlik kültürler, 13500 rpm'de oda ısısında 5 dk santrifüj edilir,
- * 1 mL süpernatant alınır,
- * Süpernatant üzerine 1 mL kazein (0.05 M fosfat tamponu içinde, pH 7) eklenir,
- * Bu karışım; 37 °C'de 10 dk çalkalamalı inkübasyona bırakılır,
- * İnkübasyon sonunda 1 mL % 10'luk TCA eklenerek reaksiyon durdurulur,
- * 30 saniye vortekslenir,
- * 37 °C'de 20 dk çalkalamalı inkübasyona bırakılır,
- * 13500 rpm'de oda ısısında 10 dk santrifüj edilir,
- * Bu karışımdan 1 mL süpernatant alınarak yeni tüplere eklenir,
- * Tüplerin üzerine 2 mL 0,5 M Na₂CO₃ ve 1 mL folin (1/3 sulandırılarak) eklenir,
- * 37 °C'de 20 dk inkübasyona bırakılır,

* OD₆₆₀'da köre karşı (su, TCA, Na₂CO₃, folin) okuma yapılır (Geok ve diğ, 2003; Özcan ve Çorbacı, 2017; Fitriani ve Güven, 2018).

* Sonuçlar tirozin standardına (Şekil 3.3) göre analiz edilir.

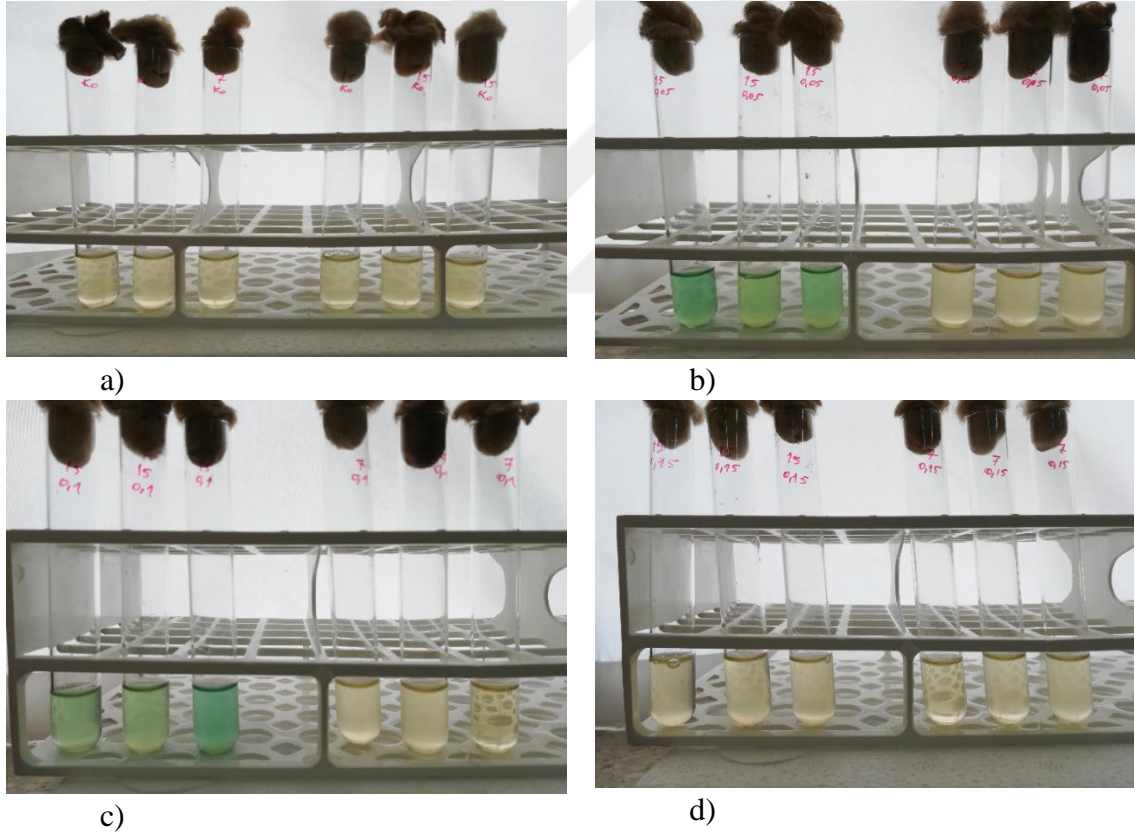


Şekil 3.3: Tirozin standardı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Bakterilerin Ca⁺² Varlığında Deney Tüp Fotoğrafları

Nutrient Broth (NB) besiyerinde gece boyu üretilen *B. cereus* ve *P. aeruginosa*'da farklı Ca⁺² konsantrasyonlarında gözlenen renk değişimleri aşağıda gösterilmiştir. Kontrol grubu Şekil 4.1a'da gösterilmiştir. 0.05 M ve 0.1 M Ca⁺² varlığında *P. aeruginosa*'da yeşil renk oluşumu gözlenmektedir (Şekil 4.1b ve c). Ancak 0.15 M Ca⁺² varlığında herhangi bir renk oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.1d).

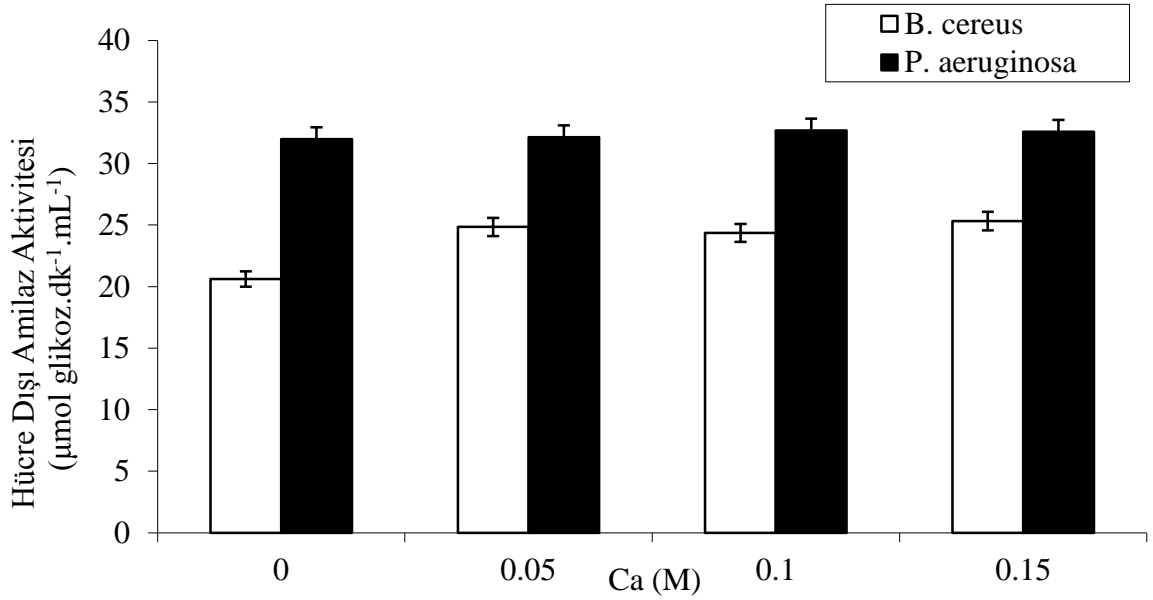


Şekil 4.1: Bakterilerin a) Kontrol b) 0.05 M c) 0.1 M d) 0.15 M Ca⁺² varlığında NB besi ortamında deney tüp fotoğrafları

4.2 Bakterilerin Amilaz Aktivitesi

Hücreler NB ortamında 37 °C'de statik olarak üretilmiştir. OD₆₂₀'de absorbanları okunarak amilaz aktivitesi tespit edildi. Hücrelerin OD₆₂₀'deki absorban değerlerine göre;

B. cereus en yüksek amilaz aktivitesi 0.15 M Ca^{+2} varlığında $25.32 \mu\text{mol glikoz.dk}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ olarak göstermiştir. 0.05 M Ca^{+2} varlığında amilaz aktivitesi artırmış, 0.1 M'da azalmış, 0.15 M'da artmaya devam etmiştir. *P. aeruginosa*'nın ise en yüksek amilaz aktivitesi 0.1 M Ca^{+2} varlığında $32.67 \mu\text{mol glikoz.dk}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. 0.05 M ve 0.1 M Ca^{+2} varlığında amilaz aktivitesi artarken; 0.15 M Ca^{+2} varlığında azalmaya başlamıştır. Ortalama amilaz üretimleri *B. cereus* için $24.84 \mu\text{mol glikoz.dk}^{-1}.\text{mL}^{-1}$, *P. aeruginosa* için $32.45 \mu\text{mol glikoz.dk}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu çalışma kapsamında en yüksek amilaz üretimleri karşılaştırıldığında; *P. aeruginosa*, *B. cereus*'a göre 1.29 kat daha fazla amilaz aktivitesi göstermiştir (Şekil 4.2).



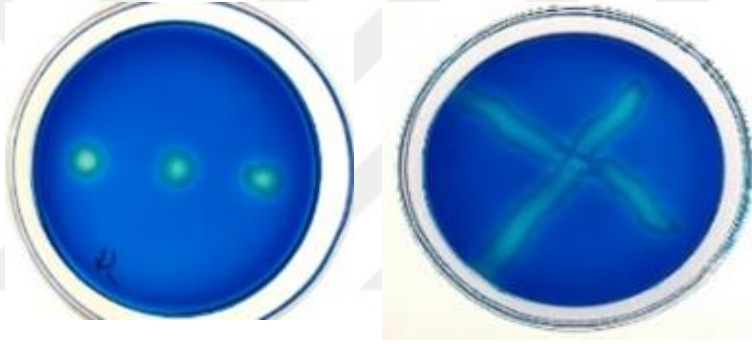
Şekil 4.2: Bakterilerin amilaz aktivitesi.

Tablo 4.1: Bakterilerin amilaz aktivite değerleri ($\mu\text{mol glikoz.dk}^{-1}.\text{mL}^{-1}$).

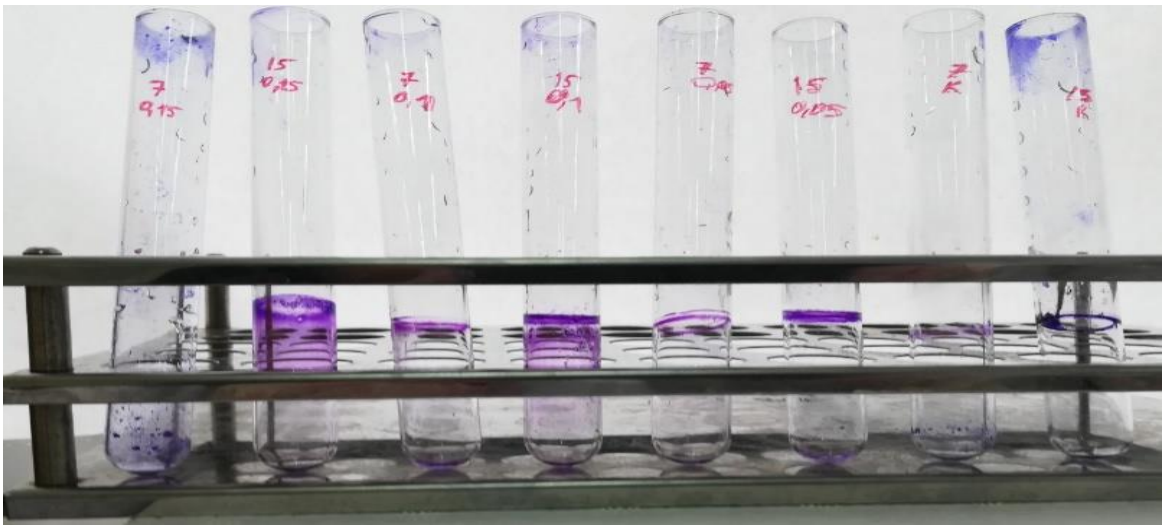
Ca(M)	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	20.61	31.98
0.05	24.84	32.13
0.1	24.37	32.67
0.15	25.32	32.57

4.3 Bakterilerin Biyofilm Oluşum Kinetiği

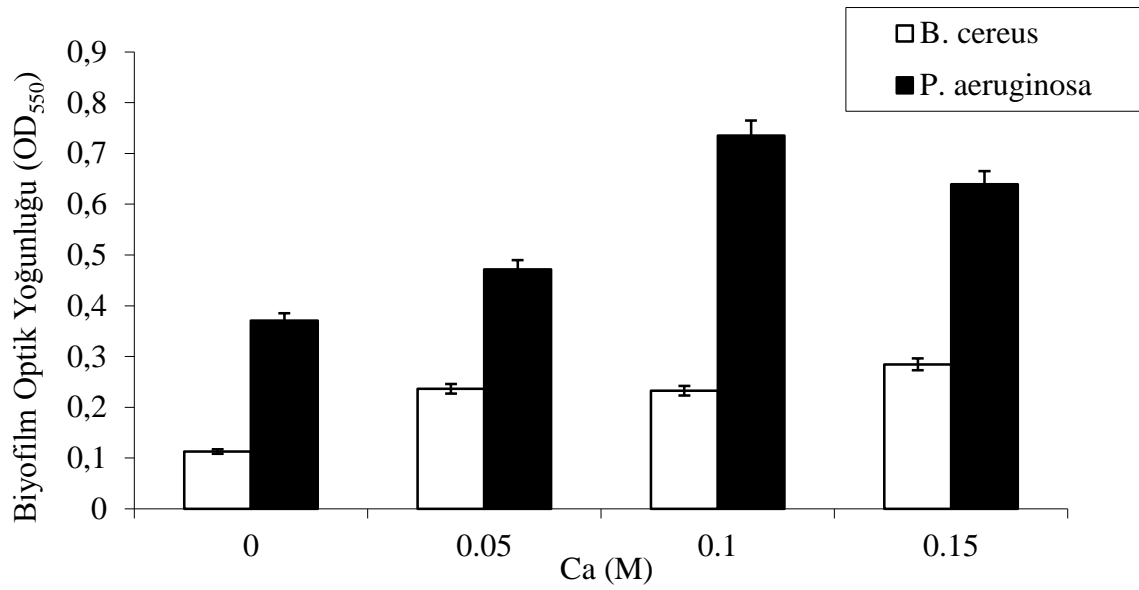
P. aeruginosa'nın metilen mavisi varlığında petride üremeleri Şekil 4.3.1'de gösterilmiştir. Hücreler NB ortamında 37 °C'de statik olarak üretilmiştir. % 1'lik kristal viyole kullanılarak oluşturdukları biyofilmlerin absorbans değerleri OD₅₅₀'de okunmuş ve tüp ortamında kristal viyole ile boyanmış biyofilm yapısı Şekil 4.3.2'de gösterilmiştir. Hücrelerin OD₅₅₀'deki absorbans değerlerine göre; *B. cereus* en yüksek biyofilm üretimini 0.15 M Ca⁺² varlığında 0.28, *P. aeruginosa* ise en yüksek biyofilm üretimi 0.1 M Ca⁺² varlığında 0.73 olarak göstermiştir. Ortalama biyofilm üretimleri; *B. cereus* için 0.25, *P. aeruginosa* için ise 0.62 olarak bulunmuştur. Bu çalışma kapsamında en yüksek biyofilm üretimleri karşılaştırıldığında; *P. aeruginosa*, *B. cereus*'a göre 2.58 kat daha fazla biyofilm oluşumu gerçekleştirmiştir (Şekil 4.3.3).



Şekil 4.3.1: *P. aeruginosa*'nın metilen mavisi eklenmiş petri ortamı fotoğrafı.



Şekil 4.3.2: Tüp ortamında kristal viyole ile boyanmış biyofilm oluşumları.



Şekil 4.3.3: Bakterilerin biyofilm oluşum kinetiği.

Tablo 4.2: Bakterilerin biyofilm optik yoğunluk değerleri.

Ca(M)	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	0.11	0.37
0.05	0.24	0.47
0.1	0.23	0.73
0.15	0.28	0.64

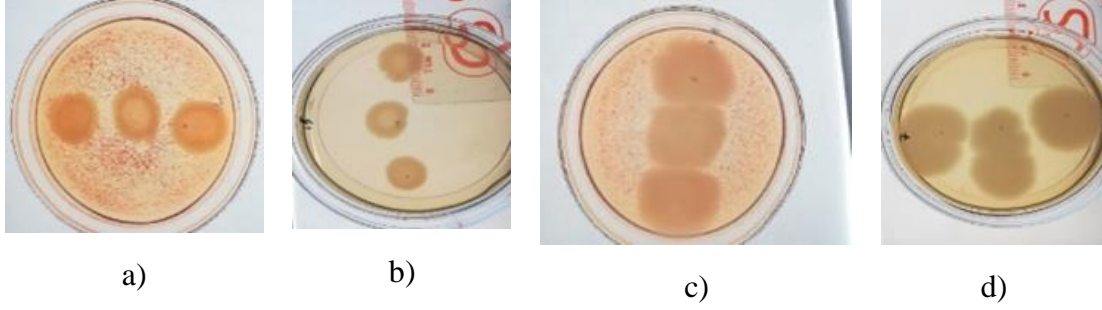
4.4 Bakterilerin Elastaz Aktivitesi

Bakterilerin katı besiyerinde petri ortamında ve ECR varlığında üreme morfolojileri Şekil 4.4.1 a-d'de gösterilmiştir.

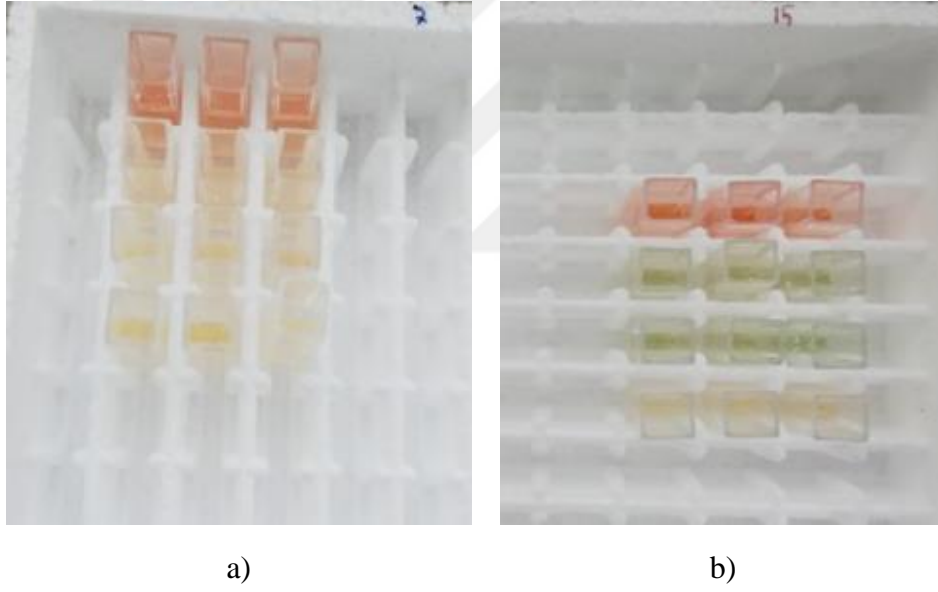
Bakteriler, NB ortamında 37 °C'de statik olarak üretilmiştir. OD₆₂₀'de absorbansları (Şekil 4.4.2 a-b) okunarak elastaz aktivitesi tespit edildi. Hücrelerin OD₆₂₀'de absorbans değerlerine göre; *B. cereus* en yüksek elastaz aktivitesini 0.05 M Ca⁺² varlığında 3.50 µg ECR.mL⁻¹.dk⁻¹, en düşük elastaz aktivitesini 0.1 M Ca⁺² varlığında 2.72 µg ECR.mL⁻¹.dk⁻¹olarak göstermiştir. *P. aeruginosa* ise en yüksek elastaz aktivitesini 0.05 M Ca⁺² varlığında 5.82 µg ECR.mL⁻¹.dk⁻¹, en düşük elastaz aktivitesini 0.15 M Ca⁺² varlığında 4.30 µg ECR.mL⁻¹.dk⁻¹ olarak göstermiştir.

Ortalama elastaz aktiviteleri *B. cereus* için 2.83 µg ECR.mL⁻¹.dk⁻¹, *P. aeruginosa* için 4.83 µg ECR.mL⁻¹.dk⁻¹olarak bulunmuştur. Bu çalışma kapsamında en yüksek elastaz

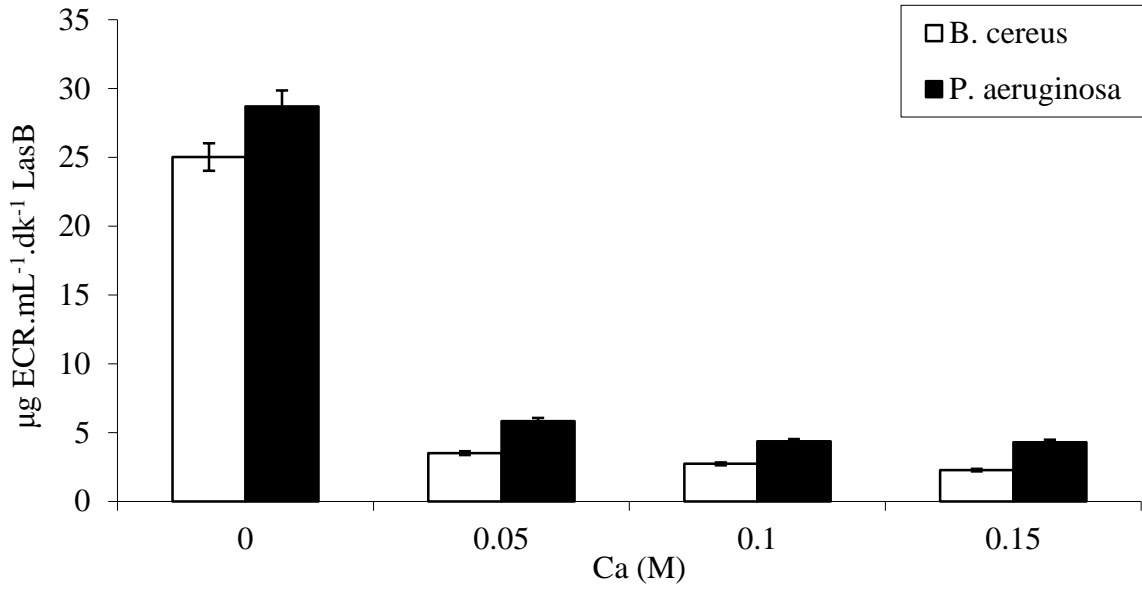
aktiviteleri karşılaştırıldığında; *P. aeruginosa*, *B. cereus*'a göre 1.66 kat daha fazla elastaz aktivitesi göstermiştir (Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.1: *P. aeruginosa*'da a) ECR varlığında b) ECR olmadan kontrol, *B.cereus*'da c) ECR varlığında d) ECR olmadan kontrol katı besiyerinde üremeleri.



Şekil 4.4.2: LasB aktivitesinin a) *B. cereus*'da b) *P. aeruginosa*'da soldan sağa; kontrol, 0.05 M Ca²⁺, 0.1 M Ca²⁺ ve 0.15 M Ca²⁺ varlığında tüp ortamındaki görünümü.



Şekil 4.4.3: Bakterilerin elastaz aktivitesi.

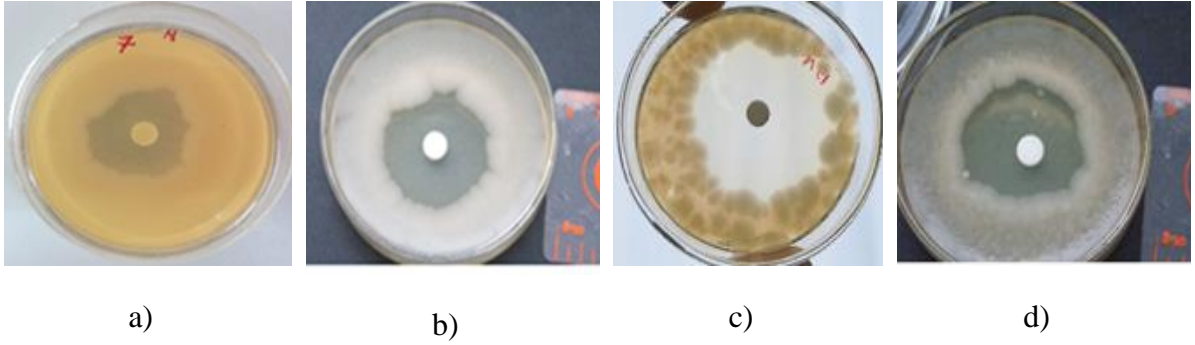
Tablo 4.3: Bakterilerin elastaz aktivite değerleri (µg ECR.mL⁻¹.dk⁻¹).

Ca(M)	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	25.02	28.71
0.05	3.50	5.82
0.1	2.73	4.37
0.15	2.28	4.31

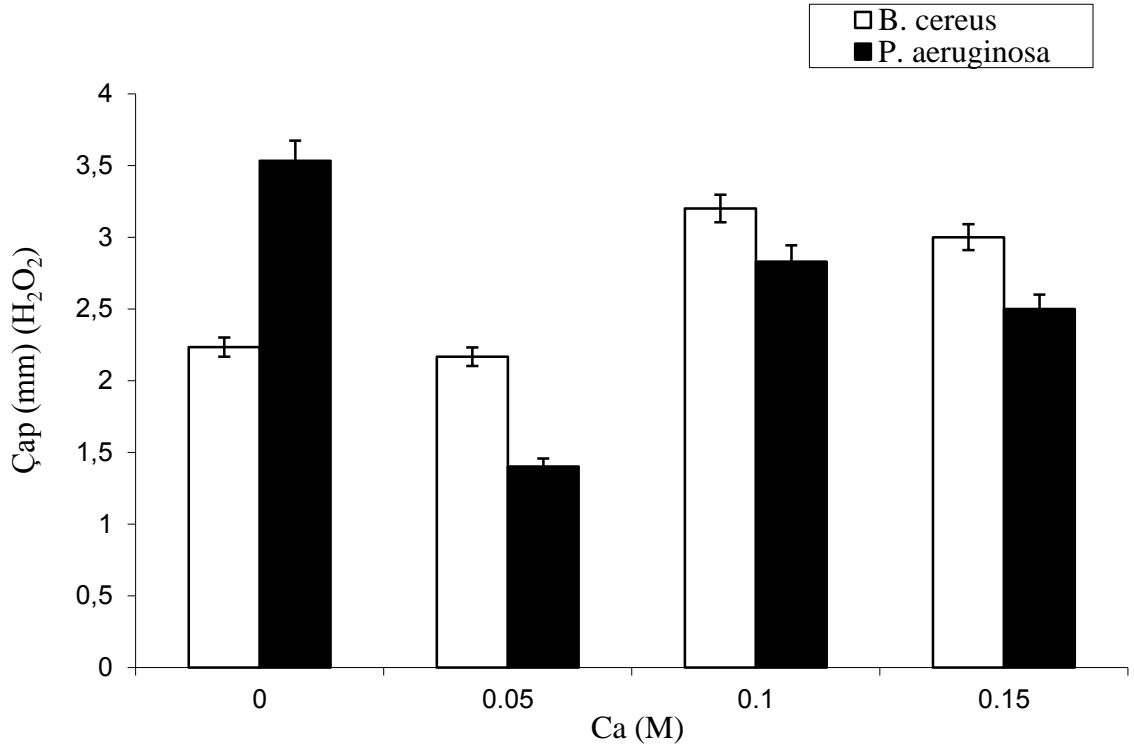
4.5 Bakterilerin H₂O₂ Duyarlılığı

100 µL kültürler Mueller Hinton Agar (MHA) plaklarına eklendikten sonra, 6 mm çapında steril antibiyogram disklerine 4 µL % 30'luk H₂O₂ damlatılarak bu kültürlerin üzerlerine yerleştirildi. 24 saat 37 °C'de üretildikten sonra çap ölçümleri yapılarak H₂O₂ duyarlılığı saptanmıştır (Şekil 4.5.1 a-d). Çapın büyümesi duyarlılık, küçülmesi direnç göstergesidir.

H₂O₂ damlatıldıktan sonra; *B.cereus*'ta en büyük çap ölçümü 0.1 M Ca⁺² varlığında 3.6 mm. en küçük çap ölçümü 0.05 M Ca⁺² varlığında 2.1 mm olarak ölçüldü. *P. aeruginosa*'da en büyük çap ölçümü 0.1 M Ca⁺² varlığında 3 mm, en küçük çap ölçümü 0.05 M Ca⁺² varlığında 1 mm olarak ölçüldü. Ortalama çap ölçümleri; *B. cereus* için 2.79 mm, *P. aeruginosa* için 2.24 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.5.2). Sonuç olarak en büyük çap ölçümleri karşılaştırıldığında; *P. aeruginosa*, H₂O₂'ye karşı *B. cereus*'tan 1.2 kat daha fazla direnç göstermiştir (Şekil 4.5.2).



Şekil 4.5.1: Bakterilerin H_2O_2 varlığında duyarlılıkları (a) ve b) *B. cereus*, c) ve d) *P. aeruginosa*.



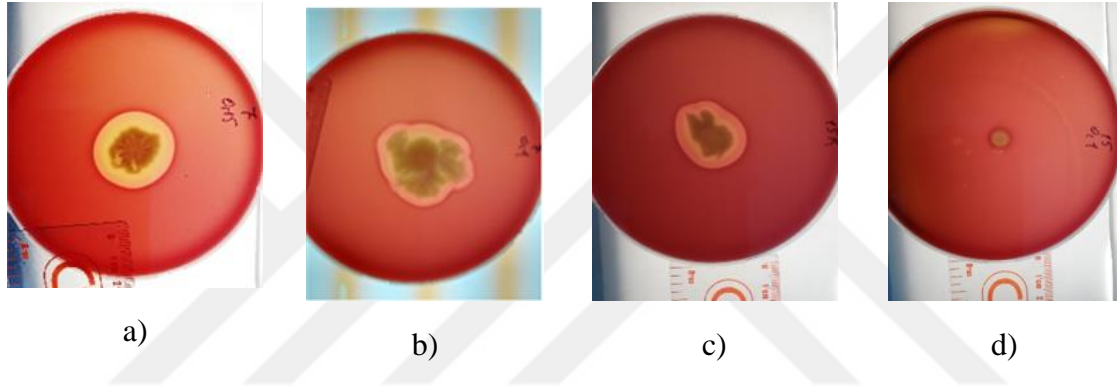
Şekil 4.5.2: Bakterilerin H_2O_2 duyarlılığı.

Tablo 4.4: Bakterilerin H_2O_2 duyarlılık ölçümleri (mm).

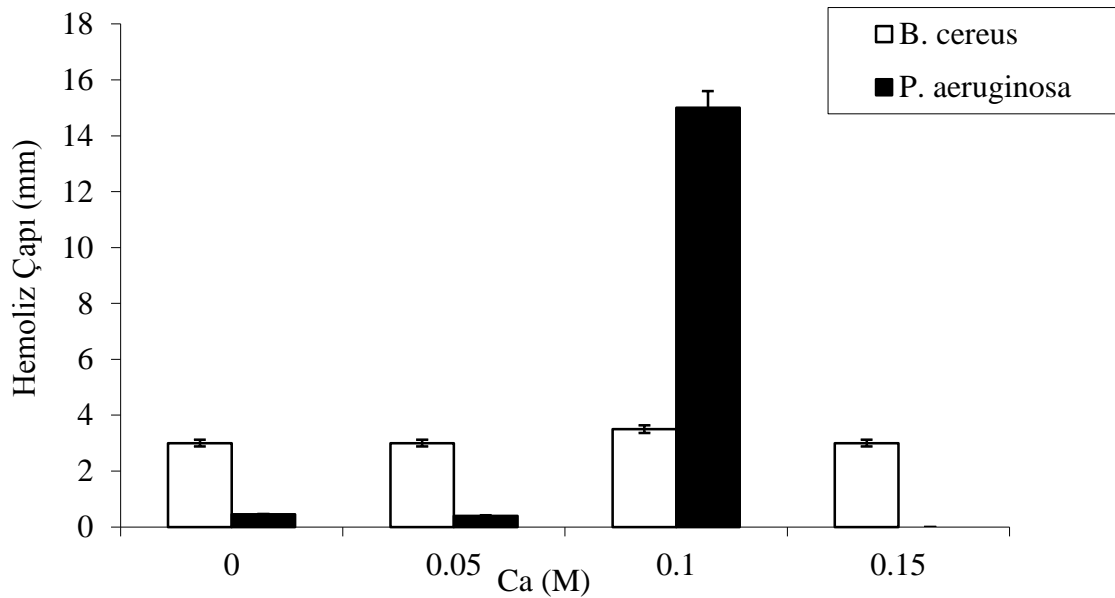
Ca(M)	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	2.23	3.53
0.05	2.17	1.4
0.1	3.2	2.83
0.15	3	2.5

4.6 Kanlı Agarda Hemoliz

% 5'lik koyun kanlı agarına gece boyu üretilen kültürlerden 4 µL eklendi. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün alınıp fotoğrafları çekilerek çap ölçümleri yapıldı (Şekil 4.6.1 a-d). Yapılan ölçüm sonuçlarına göre; 0.1 M Ca⁺² varlığı *P. aeruginosa*'da hemoliz çapını artırırken aynı zamanda bakteri koloni çapını da artırmıştır. *B. cereus*'da ise 0.1 M Ca⁺² varlığında hemoliz çapı artmış, bakteri çapı ise 0.5 M Ca⁺² varlığında artmıştır. En yüksek hemoliz çap ölçümleri karşılaştırıldığında *P. aeruginosa*'nın, *B.cereus*'a göre 4.3 kat daha fazla hemoliz yaptığı görülmüştür (Şekil 4.6.2, Şekil 4.6.3, Şekil 4.6.4).



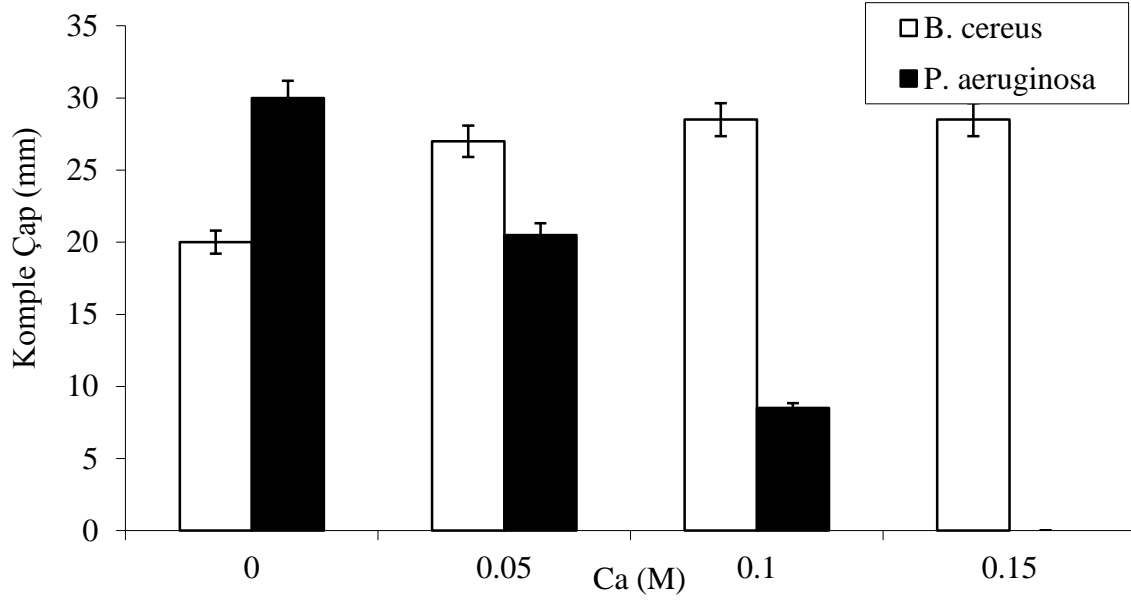
Şekil 4.6.1: Kanlı agarda hemoliz fotoğrafları a) *B.cereus*'da 0.15 M ve b) 0.1 M Ca⁺² varlığında, *P.aeruginosa*'da c) Kontrol d) 0.1 M Ca⁺² varlığında.



Şekil 4.6.2: Bakterilerin kanlı agarda hemoliz çapı.

Tablo 4.5: Bakterilerin kanlı agarda hemoliz çapı ölçüm değerleri (mm).

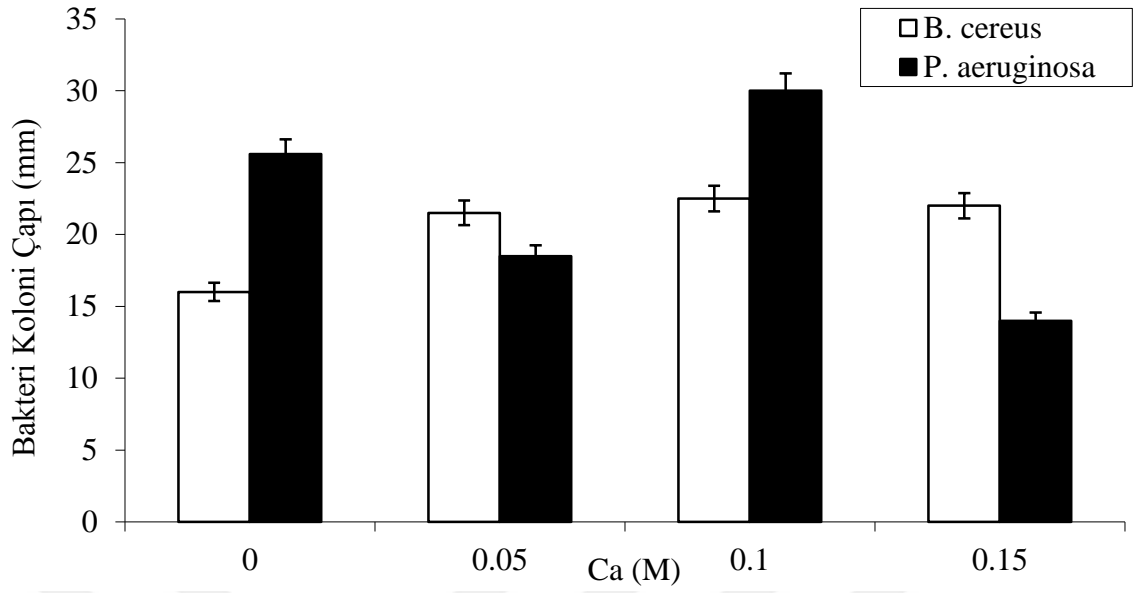
Ca(M)	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	3	0.45
0.05	3	0.4
0.1	3.5	15
0.15	3	0



Şekil 4.6.3: Bakterilerin kanlı agarda komple çapı.

Tablo 4.6: Bakterilerin kanlı agarda komple çap ölçüm değerleri (mm).

Ca(M)	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	20	30
0.05	27	20.5
0.1	28.5	8.5
0.15	28.5	0



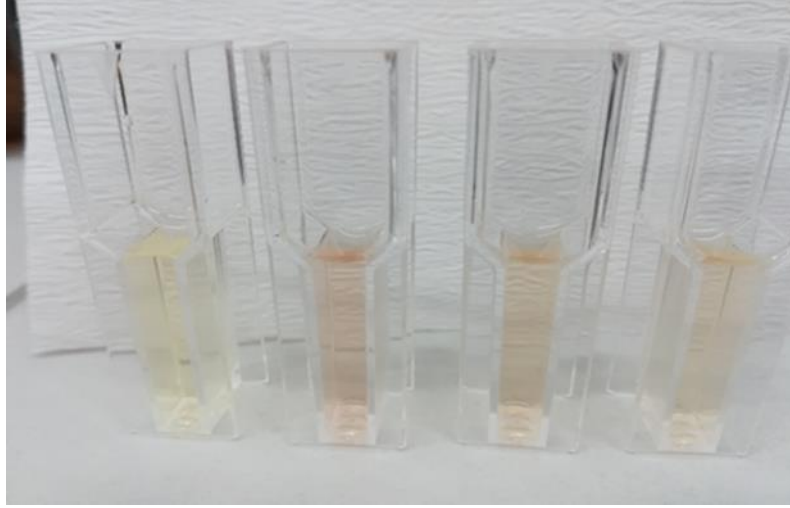
Şekil 4.6.4: Kanlı agarda bakteri koloni çapı.

Tablo 4.7: Kanlı agarda bakteri koloni çapı ölçüm değerleri (mm).

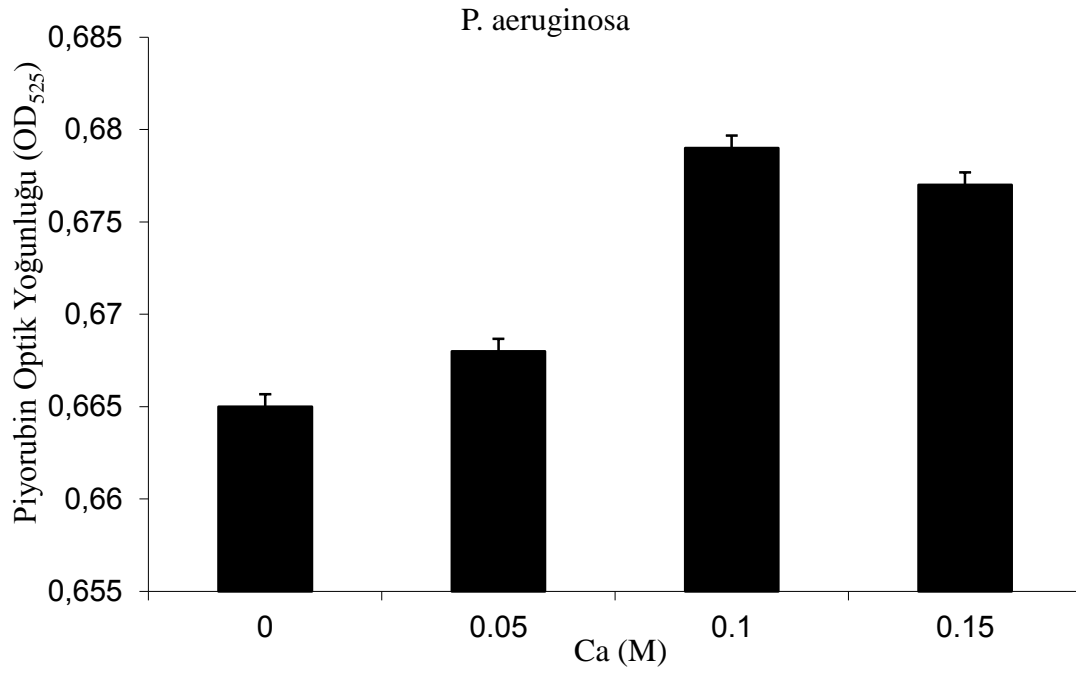
Ca(M)	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	16	25.6
0.05	21.5	18.5
0.1	22.5	30
0.15	22	14

4.7 Bakterilerde Piyorubin Üretimi

Hücreler NB ortamında 37 °C’de statik olarak üretilmiştir. OD₅₂₅’te absorbansları okunarak (Şekil 4.7.1) piyorubin üretimi tespit edildi. Hücrelerin OD₅₂₅’te absorbans değerlerine göre; *B. cereus* piyorubin üretmezken, *P. aeruginosa* ise en yüksek piyorubin üretimini 0.1 M Ca⁺² varlığında 0.679 olarak, en düşük piyorubin üretimini 0.05 M Ca⁺² varlığında 0.668 olarak gerçekleştirmiştir. *P. aeruginosa*’da ortalama piyorubin üretimi 0.674 olarak bulunmuştur (Şekil 4.7.2).



Şekil 4.7.1: *P. aeruginosa*'da piyörubin analizi. Soldan sağa; Kontrol, 0.05 M Ca²⁺, 0.1 M Ca²⁺, 0.15 M Ca²⁺ varlığında piyörubin analizi.



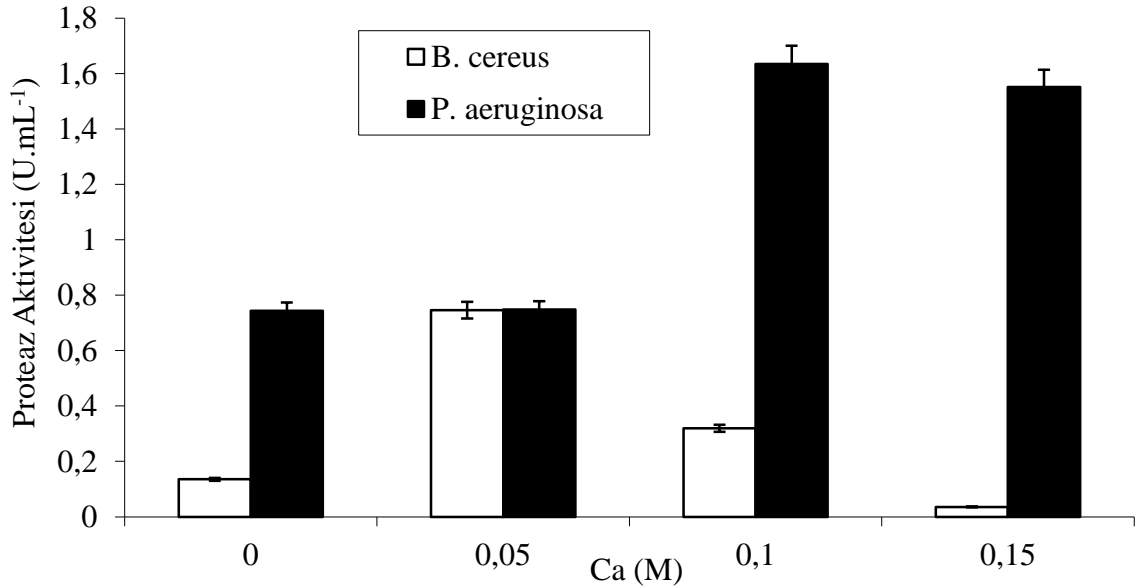
Şekil 4.7.2: *P. aeruginosa*'da piyörubin optik yoğunluğu.

Tablo 4.8: *P. aeruginosa*'da piyörubin optik yoğunluk değerleri.

Ca(M)	<i>P.aeruginosa</i>
0	0.665
0.05	0.668
0.1	0.679
0.15	0.677

4.8 Bakterilerin Proteaz Aktiviteleri

Hücreler NB ortamında 37 °C’de statik olarak üretilmiştir. OD₆₆₀’da absorbansları okunarak proteaz üretimleri tespit edildi. Hücrelerin OD₆₆₀’da absorbans değerlerine göre; *B. cereus* en yüksek proteaz üretimi 0.05 M Ca⁺² varlığında 0.75 U.mL⁻¹, en düşük proteaz üretimi 0.15 M Ca⁺² varlığında 0.036 U.mL⁻¹olarak gerçekleştirmiştir. *P. aeruginosa* ise en yüksek proteaz üretimi 0.1 M Ca⁺² varlığında 1.63 U.mL⁻¹, en düşük proteaz üretimi 0.05 M Ca⁺² varlığında 0.75 U.mL⁻¹olarak gerçekleştirmiştir. Ortalama proteaz üretimleri *B. cereus* için 0.37 U.mL⁻¹, *P. aeruginosa* için 1.31 U.mL⁻¹olarak bulunmuştur. Bu çalışma kapsamında en yüksek proteaz üretimleri karşılaştırıldığında; *P. aeruginosa*, *B. cereus*’tan 2.19 kat daha fazla proteaz aktivitesi göstermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Bakterilerin proteaz aktiviteleri.

Tablo 4.9: Bakterilerin proteaz aktivite değerleri (U.mL⁻¹).

Ca(M)	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
0	0.13	0.74
0.05	0.75	0.75
0.1	0.32	1.63
0.15	0.03	1.55

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez kapsamındaki bu çalışmada Ca^{+2} varlığında, 24 saat süre ile statik ortamda ve $37^{\circ}C$ 'de *P. aeruginosa* ve *B. cereus*'un genel olarak sekonder metabolit üretimleri incelenmiştir.

5.1 Bakterilerde Amilaz Aktivitesi

Amilazlar, kalsiyum yokluğunda işlevsiz kalan kalsiyum metalo enzimleridir (Raju ve Divakar, 2013). Tez kapsamındaki bu çalışmada; amilaz üretimi yapan kültürlerin en yüksek ve en düşük amilaz etkinlikleri gösterilmiştir (Şekil 4.2). Bu çalışmada; statik $37^{\circ}C$ 'de NB ortamında en yüksek amilaz aktivitesi *P. aeruginosa*'da $0.1 M Ca^{+2}$ varlığında $32.68 \mu\text{mol glikoz.dk}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ ve en düşük amilaz aktivitesi *B. cereus*'da $0.1 M Ca^{+2}$ varlığında $24.37 \mu\text{mol glikoz.dk}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Yapılan literatür araştırmalarında tez kapsamındaki çalışmaya benzer çalışmalar bulunamadığı için burada karşılaştırma yapılamamıştır. Ca^{+2} eklendikten sonra en yüksek amilaz aktivitelerine bakıldığında; *B. cereus* için $0.15 M Ca^{+2}$ varlığında amilaz aktivitesi kontrol grubuna göre 1.2 kat artmıştır. *P. aeruginosa*'da ise $0.1 M Ca^{+2}$ varlığında amilaz aktivitesi kontrol grubuna göre 1.02 kat artırmıştır. Sonuç olarak Ca^{+2} eklenmesi her iki bakteride de amilaz aktivitesini artırmıştır.

5.2 Bakterilerde Biyofilm Oluşum Kinetiği

Tez kapsamındaki bu çalışmada; statik $37^{\circ}C$ 'de NB ortamında gerçekleştirilen biyofilm oluşum kinetiğinde OD_{550} 'deki en yüksek değer *P. aeruginosa*'da $0.1 M Ca^{+2}$ varlığında 0.73 ve en düşük değer *B. cereus*'da $0.1 M Ca^{+2}$ varlığında 0.23 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4.3). Kıymacı ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları bir başka çalışmada ise laktik asidin *P. aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşumuna etkisini araştırılmış, *P. aeruginosa* PAO1 suşunun biyofilm oluşumu 0.95 olarak bulunmuştur. 141 izolat arasında OD_{520} nm'de yapılan okumalarda en düşük ve en yüksek biyofilm oluşumu sırasıyla 0.02 ve 1.95 olarak değişmektedir. Bu çalışma ile tez kapsamındaki biyofilm oluşum kinetiği karşılaştırıldığında; *P. aeruginosa*'da Ca^{+2} varlığında daha yüksek biyofilm oluşturduğu

gözlenmektedir. Ca^{+2} eklendikten sonra en yüksek biyofilm oluşum kinetiklerine baktığımızda; *B. cereus* için 0.15 M Ca^{+2} varlığında biyofilm oluşum kinetiği kontrol grubuna göre 2.5 kat artmıştır. *P. aeruginosa*'da ise 0.1 M Ca^{+2} varlığında biyofilm oluşum kinetiğinin kontrol grubuna göre 1.97 kat artmıştır. Sonuç olarak Ca^{+2} eklenmesi her iki bakteride de biyofilm oluşum kinetiğini artırmıştır.

5.3 Bakterilerde Elastaz Aktivitesi

Pseudomonas elastazı, enzimatik reaktivite için çinko ve stabilite için kalsiyum gerektiren nötr bir metaloproteazdır (Olson ve Ohman, 1992). Tez kapsamındaki bu çalışmada; statik 37 °C'de NB ortamında, OD₆₂₀'de okunan absorbans değerlerine (Şekil 4.4.3) göre en yüksek elastaz aktivitesi *P. aeruginosa*'da 0.05 M Ca^{+2} varlığında 5.82 $\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ bulunmuştur. En düşük elastaz aktivitesi *B. cereus*'da 0.15 M Ca^{+2} varlığında 2.28 $\mu\text{g.mL}^{-1}.\text{dk}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Kıymacı ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları bir çalışmada ise; laktik asidin *P. aeruginosa* izolatlarının QS sinyal molekülleri ve virülans faktörlerinin üretimi üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmış. Sonuçta, *P. aeruginosa* klinik izolatlarının OD₅₂₀ nm'de yapılan okumalarda elastaz üretimi incelendiğinde *P. aeruginosa*'nın elastaz aktivitesi PAO1 suşunun 0.43, diğer izolatların en düşük elastaz aktivitesi 0.016 ve en yüksek elastaz aktivitesi ise 0.52 olarak bulunmuştur. Sonuçlara göre, laktik asidin subMIC konsantrasyonlarında, *P. aeruginosa* PAO-1 suşunun elastaz aktivitesi % 47 oranında inhibe olmuş, diğer izolatların elastaz aktivitesindeki azalma yüzdesi % 0.4 ile % 49 arasında değişmiştir. Tez kapsamındaki bu çalışmada Ca^{+2} eklendikten sonra *B. cereus* için en yüksek elastaz aktivitesi 0.05 M Ca^{+2} varlığında kontrol grubuna göre % 14 azalma göstermiştir. *P. aeruginosa*'da ise 0.05 M Ca^{+2} varlığında kontrol grubuna göre % 20 azalma göstermiştir. Bu çalışma ile tez kapsamındaki çalışma karşılaştırıldığı zaman farklı konsantrasyonlarda Ca^{+2} varlığının elastaz aktivitesine olan inhibitör etkisinin laktik asite göre daha az olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak Ca^{+2} eklendikten sonra her iki bakterinin de elastaz aktiviteleri azalmıştır.

5.4 Bakterilerin H₂O₂ Duyarlılığı

Tez kapsamındaki bu çalışmada ise; 24 saat 37 °C'de üretildikten sonra yapılan çap ölçümlerine göre; en yüksek H₂O₂ aktivitesi *B. cereus*'da 0.1 M Ca^{+2} varlığında 3.6 mm, en

düşük H₂O₂ aktivitesi *P. aeruginosa*'da 0.05 M Ca⁺² varlığında 1 mm olarak ölçülmüştür. En yüksek çap ölçümleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre; 0.1 M Ca⁺² varlığının H₂O₂'ye karşı *P. aeruginosa*'da direnci 1.2 kat artırdığını, *B. cereus*'da ise duyarlılığı 1.37 kat artırdığı görülmüştür. Ca⁺² varlığında; *P. aeruginosa*'nın H₂O₂'ye karşı daha dirençli, *B. cereus*'un ise daha duyarlı olduğu Şekil: 4.5.2'de gösterilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında, bizim yaptığımız çalışmaya benzer bir çalışmaya rastlanılmadığı için burada tartışılmamıştır.

5.5 Kanlı Agarda Hemoliz

P. aeruginosa; kanlı agarda hemoliz yapar. Kanlı agarda üreyen klinik izolatlar sıklıkla beta hemolitiklerdir (Kayar, 2009). Tez kapsamındaki bu çalışmada; % 5'lik koyun kanlı agarına 4 µL gece boyu üretilen kültürlerden eklenip 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra çekilen fotoğraflardan alınan çap ölçümleri yapılmıştır. Buna göre, çapın artması hemoliz etkinliğinin arttığını gösterdiği için; en yüksek hemoliz çapı *P. aeruginosa*'da 0.1 M Ca⁺² varlığında 15 mm, en düşük hemoliz çapı yine *P. aeruginosa*'da 0.05 M Ca⁺² varlığında 0.4 mm olarak ölçülmüştür. *B. cereus*'da ise 0.05 M Ca⁺² varlığında herhangi bir değişiklik gözlenmezken 0.1 M Ca⁺² varlığında 3.5 mm, 0.15 M Ca⁺² varlığında ise yine herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. En geniş hemoliz çap ölçümleri karşılaştırıldığında *P.aeruginosa*'nın, *B.cereus*'a göre 4.3 kat daha fazla hemoliz yaptığı gözlenmiştir. En geniş hemoliz çap ölçümlerine baktığımız zaman Ca⁺² eklendikten sonra 0.1 M Ca⁺² varlığında *B. cereus* kontrol grubuna göre 1.17 kat daha fazla hemoliz yapmıştır. *P. aeruginosa* ise 0.1 M Ca⁺² varlığında kontrol grubuna göre 33 kat daha fazla hemoliz yapmıştır. Sonuç olarak Ca⁺² eklenmesi her iki bakteride de hemolizi artırmıştır. En geniş bakteri koloni çap ölçümlerine baktığımızda Ca⁺² eklendikten sonra 0.1 M Ca⁺² varlığında *B. cereus* kontrol grubuna göre 1.4 kat daha fazla gelişim göstermiştir. *P. aeruginosa* ise 0.1 M Ca⁺² varlığında kontrol grubuna göre 1.18 kat daha fazla gelişim göstermiştir. Sonuç olarak Ca⁺² eklenmesi her iki bakterinin de petride daha geniş alanda yayılmasını sağlamıştır. Literatürde Ca⁺² varlığında hemoliz aktivitesi ile ilgili benzer çalışmalara rastlanmadığı için burada tartışılmamıştır.

5.6 Bakterilerde Piyorubin Üretimi

Tez kapsamındaki bu çalışmada; NB ortamında 37 °C'de statik olarak üretilen kültürlerin OD₅₂₅'de okunan absorbans değerlerine göre *B. cereus* piyorubin üretmemiştir. *P.*

aeruginosa ise en yüksek piyorubin üretimini 0.1 M Ca^{+2} varlığında 0.679 olarak, en düşük piyorubin üretimini 0.05 M Ca^{+2} varlığında 0.668 olarak gerçekleştirmiştir. 0.1 M Ca^{+2} varlığı, *P. aeuroginosa*'nın piyorubin üretimini daha çok artırmıştır. Machreki ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları bir çalışmada; *P. aeruginosa* ATCC27853 suşunun, 12 ay boyunca sterilize deniz suyunda inkübasyonundan sonra piyorubin üretimini incelemişler. İnkübe edilmemiş *P. aeruginosa* ATCC27853 ($OD_{520} = 0.083$) ile karşılaştırıldığında deniz suyunda 8 ay süreyle inkübe edilen A81 suşu ($OD_{520} = 0.0991$) ile piyorubin üretim oranlarında önemli bir artış elde edildiğini bulmuşlar. Tez kapsamındaki bu çalışmada 0.1 M Ca^{+2} varlığı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman *P. aeuroginosa*'nın piyorubin üretimini 1.02 kat artırmıştır. Machreki ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları çalışmada ise piyorubin üretimi 1.2 kat artmıştır. Bu çalışma ile tez kapsamındaki çalışmayı karşılaştırdığımız zaman deniz suyunda inkübasyon stresinin, Ca^{+2} varlığı stresine göre piyorubin üretimini daha çok artırdığı tespit edilmiştir.

5.7 Bakterilerin Proteaz Aktiviteleri

Bazı metal iyonları (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Ag^{+3} , Pb^{+3} , Hg^{+2}) ve surfaktanlar proteaz üretimi için uyarıcı bir etkiye sahiptir (Konak, 2012). Tez kapsamındaki bu çalışmada; NB ortamında 37 °C'de statik olarak üretilen kültürlerin OD_{660} 'da okunan absorbans değerlerine göre en yüksek proteaz üretimi *P. aeruginosa*'da 0.1 M Ca^{+2} varlığında 1.63 U.mL⁻¹ olarak ölçülmüştür. En düşük proteaz üretimi ise, *B. cereus*'da 0.1 M Ca^{+2} varlığında 0.03 U.mL⁻¹ ölçülmüştür. Görmez ve Gülmüş'ün (2018) yaptıkları bir çalışmada, Erzurum sıcak su kaynaklarından elde edilen bakteri izolatlarının proteaz enzim aktiviteleri incelendiğinde, en yüksek aktivite gösteren izolat *Bacillus pumilus* NK14 (91,17 U.mL⁻¹) olarak tespit edilmiş, Ca^{+2} iyonu ile enzim aktivitesinin 1.1 kat arttığını göstermişler. Tez kapsamındaki bu çalışmada Ca^{+2} eklenmesi sonucunda en yüksek proteaz üretimleri incelendiğinde; 0.05 M Ca^{+2} varlığında *B. cereus* kontrol grubuna göre 5.7 kat daha fazla proteaz aktivitesi göstermiştir. *P. aeuroginosa* ise 0.1 M Ca^{+2} varlığında kontrol grubuna göre 2.2 kat daha fazla proteaz aktivitesi göstermiştir. Görmez ve Gülmüş'ün (2018) yaptıkları çalışma ile tez kapsamındaki bu çalışma karşılaştırıldığı zaman *B. cereus* için 0.05 M Ca^{+2} varlığının, *P. aeuroginosa* için ise 0.1 M Ca^{+2} varlığının proteaz aktivitesini daha çok artırdığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak; her iki bakterinin de farklı konsantrasyonlarda Ca^{+2} varlığında amilaz aktiviteleri artarken bu artışın *B. cereus*'ta 0.15 M Ca^{+2} varlığında, *P. aeuroginosa*'da ise 0.1 M Ca^{+2} varlığında daha çok olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumlarının, her iki bakteri için de farklı konsantrasyonlarda Ca^{+2} varlığında arttığı gözlemlenmekle beraber bu artışın, *B. cereus*'ta en çok 0.15 M Ca^{+2} varlığında, *P. aeuroginosa*'da ise 0.1 M Ca^{+2} varlığında olduğu tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda Ca^{+2} varlığında elastaz aktivitesi her iki bakteride de azalmıştır. Bu azalma *B. cereus*'ta en çok 0.1 M Ca^{+2} varlığında, *P. aeuroginosa*'da ise 0.15 M Ca^{+2} varlığında gerçekleşmiştir. Bakterilerin H_2O_2 duyarlılıklarına baktığımızda; *B. cereus*'un duyarlılığı 0.05 M Ca^{+2} varlığında azalırken, 0.1 ve 0.15 M Ca^{+2} varlığında artmıştır. *P. aeuroginosa*'da ise her üç konsantrasyonda da duyarlılığı azalmakla beraber bu azalış en çok 0.05 M Ca^{+2} varlığında gerçekleşmiştir. Ca^{+2} varlığı *B. cereus*'un H_2O_2 'ye karşı duyarlılığını artırırken, *P. aeuroginosa*'nın H_2O_2 'ye karşı direncini artırmıştır. Hemoliz aktiviteleri her iki bakteri için de 0.1 M Ca^{+2} varlığında artmıştır. *P. aeuroginosa*'nın piyorubin üretimine baktığımızda her üç konsantrasyonda da arttığı, en çok artışın ise 0.1 M Ca^{+2} varlığında olduğu bulunmuştur. Proteaz aktivitelerine baktığımızda *B. cereus* için; 0.05 ve 0.1 M Ca^{+2} varlığında proteaz aktivitesinin arttığı, 0.15 M Ca^{+2} varlığında ise azaldığı görülmüştür. *P. aeuroginosa*'nın proteaz aktivitesi her üç konsantrasyonda da artmakla birlikte bu artışın en çok 0.1 M Ca^{+2} varlığında olduğu tespit edilmiştir.

Bakterilerin farklı konsantrasyonlardaki Ca^{+2} varlığında sekonder metabolit üretimleri üzerine yaptığımız bu çalışmada; *B. cereus* için amilaz aktivitesi ve biyofilm üretiminin maksimum artışı 0.15 M Ca^{+2} varlığında, elastaz aktivitesine karşı inhibitör etki, H_2O_2 'ye karşı duyarlılığın artması ve hemoliz aktivitesinin artması 0.1 M Ca^{+2} varlığında, proteaz aktivitesindeki artış ise 0.05 M Ca^{+2} varlığında gerçekleşmiştir. *P. aeuroginosa* için maksimum amilaz aktivitesi, biyofilm üretimi, H_2O_2 'ye karşı direncin artması, hemoliz aktivitesinin artması, piyorubin üretimi ve proteaz aktivitesindeki artışlar 0.1 M Ca^{+2} varlığında gerçekleşirken, elastaz aktivitesine karşı inhibitör etki en çok 0.15 M Ca^{+2} varlığında gerçekleşmiştir. Ca^{+2} varlığı bakterilerin sekonder metabolit üretimlerini artırmıştır.

Bu yapılan çalışmaların ve elde edilen sonuçların, literatürdeki eksikliği dolduracağına ve yeni bakış açılarına katkı sağlayacağına inanıyoruz. Çünkü bu kadar yüksek Ca^{+2} konsantrasyonlarında metabolit üretimi ilk kez bizim tarafımızdan araştırılmıştır.

KAYNAKLAR

- Akahn, R.B.** (2014). Bazı Boronik Asit Türevlerinin *Pseudomonas aeruginosa*'da Virülens Faktörlerinin Üretimine Etkisinin Araştırılması (Yüksek lisans tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Bose, S., Khodke, M., Basak, S. & Mallick, S.K.** (2009). Detection of biofilm producing *Staphylococci*: Need Of The Hour, *Journal of Clinical and Diagnostik Research*, 3, 1915-1920.
- Caballero, A.R., Moreau, J.M., Engel, L.S. Marquart, M.E., Hill, J.M. & O'Callaghan, R.J.** (2001). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases, *Analytical Biochemistry*, 290, 330-337.
- Cruz, L.F., Cobine, P.A. & Fuentea, L.** (2012). Calcium increases *Xylella fastidiosa* surface attachment, biofilm formation and twitching motility, *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (5), 1321-1331.
- Çilak, G.Ö. & Halkman, A.K.** (2018). Çeşitli besiyerlerinin *Bacillus cereus* sporlanmasındaki etkisi üzerine bir araştırma, *The Journal of Food*, 43 (2): 347-355.
- Demirbanka, F.G.Ö** (2019). Kadmiyum ve hidrojen peroksitin kondrosarkom ve kondrosit hücrelerinde süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ve transkript seviyesi üzerine etkisinin incelenmesi (Doktora tezi). Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Domínguez, D.C., Guragain, M. & Patrauchan, M.** (2015). Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes, *Cell Calcium*, 57, 151-165.
- Donlan, R.M. & Costerton, J.W.** (2002). Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clinical Microbiology*, 15 (2), 167-193.
- Fitriani, S. & Güven, K.** (2018). Isolation, screening, partial purification and characterization of protease from halophilic bacteria isolated from Indonesian fermented food, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C*, 7 (2), 130-142.
- Gangola, P. & Rosen, B.P.** (1987). Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*, *Journal of Biological. Chemistry*. 262, 12570-12574.
- Geok, L.P., Razak, C.N.A., Rahman, R.N.Z.A., Basri, M. & Salleh, A.B.** (2003). Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer, *Biochemical Engineering Journal*, 13, 73-77.
- Gerze, A.** (2003). Proteaz Enziminin *Bacillus subtilis megatherium* ve *Bacillus polymxa* Bakteri Türlerinden Kısmi Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi (Yüksek lisans tezi). İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Görmez, A. & Gülmüş, E.Ö.** (2018). *Bacillus pumilus* NK14 izolatının proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi ve enzimin leke çıkarıcı etkisinin tespiti, *Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies*, 2 (2), 07-12.
- Guragain, M., Patrauchan, M., Lenaburg, D.L., Moore, F.S., & Reutlinger, I.** (2013). Calcium homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* requires multiple transporters and modulates swarming motility, *Cell Calcium*, 54, 350-361.
- Horikoshi, K.** (1999). Alkaliphiles: Some application of their products for biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63 (4), 735-750.
- Hosseinioust, Z., Tufenkji, N. & Ven, T.G.M.** (2013). Predation in homogeneous and heterogeneous phage environments affects virulence determinants of *Pseudomonas aeruginosa*, *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (9), 2862-2871.
- Jimenez, L.L., Fuste, E., Garriga, B.M., Dominguez, A.J., Vinuesa, T. & Vinas, M.** (2015). Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms, *Lasers Medical Science*, 30, 1519-1526.
- Jones, H.E., Holland, I.B. & Campbell A.K.** (2002). Direct measurement of free Ca^{+2} shows different regulation of Ca^{+2} between the periplasm and cytosol of *Escherichia coli*, *Cell Calcium* 32, 183-192.
- Jose, D., Manjusha, K., Jose, S., Mohandas, A. & Singh, B.** (2017). Purification and characterization of highly active LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCCB 123, *Indian Journal of Experimental Biology*, 55, 303-310.
- Kalaiarasan, E. & Narasimha, H.B.** (2016). Antimicrobial resistance patterns and prevalence of virulence factors among biofilm producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 4 (11), 26-28.
- Kalkan, S.** (2006). Çiğ sütte *Bacillus cereus* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar (Yüksek lisans tezi). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kayar, E.** (2009). İzmir’ de Çeşitli Marketlerde Satışa Sunulan Et ve Et Ürünlerinde *Pseudomonas aeruginosa* Aranması ve Tanımlanması (Yüksek lisans tezi). Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Keharom, S., Mahachai, R. & Chanthai, S.** (2016). The optimization study of α -amylase activity based on central composite design-response surface methodology by dinitrosalicylic acid method, *International Food Research Journal*, 23 (1), 10-17.
- Khannous, L., Jrad, M., Dammak, M., Miladi, R., Dammak, M., Chaaben, N., Khemakhem, B., Gharsallah, N., & Fendri, I.** (2014). Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions, *Lipids in Health and Disease*, 13 (9).
- Khemakhem, B., Fendri, I., Dahecha, I., Belghuith, K., Kammoun, R., & Mejdoub, H.** (2013). Purification and characterization of a maltogenic amylase from Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds using the Box Benken Design (BBD), *Industrial Crops and Products*, 43, 334-339.

- Kıymacı, M.E., Altanlar, N., Gumustas, M., Ozkan, S.A. & Akin, A.** (2018). Quorum sensing signals and related virulence inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a potential probiotic strain's organic acid, *Microbial Pathogenesis*, 121, 190-197.
- Konak, Ş.** (2012). Bazı Polinükleer Metal Komplekslerinin Alkalen Proteaz, Plazmid DNA Üzerine Etkilerinin Araştırılması, (Doktora tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Kong, K.F., Jayawardena, S.R., Indulkar, S.D., Puerto, A., Koh, C.L., Hoiby, N. & Mathee, K.** (2005). *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB lactamases, proteases, quorum sensing and other virulence factors, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (11), 4567-4575.
- Liu, X. D. & Xu, Y.** (2008). A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX1: Purification and characterization, *Bioresource Technology*, 99, 4315-4320.
- Lo, Y.L., Shen, L., Chang, C.H., Bhuwan, M., Chiu, C.H. & Chan, H.Y.** (2016). Regulation of motility and phenazine pigment production by FliA Is Cyclic-di-GMP dependent in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Plos One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155397>
- Machreki, Y., Kouidhi, B., Machreki, S., Chaieb, K. & Sáenz, Y.** (2019). Analysis of a long term starved *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 in seawater microcosms, *Microbial Pathogenesis*, 134, 130595.
- Maçın, S.** (2014). Pigmentli ve pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virulans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak karşılaştırılması (Doktora tezi). Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara.
- Maroui, I., Aboukacem, A., Timinouni, M. & Beljah, A.** (2016). Virulence profiles of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Central Morocco, *African Journal of Microbiology Research*, 10 (14), 473-480.
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T. & Rattan, A.** (2006). Detection of Biofilm Formation among the clinical isolates of *staphylococci*: An evaluation of three different screening methods, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24 (1), 25-9.
- Mirani, Z.A., Fatima, A., Urooj, S., Aziz, M., Khan, M.N. & Abbas, T.** (2018). Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*, *Iranian Journal Basic Medical Sciences* 21 (7), 760-769.
- Mizuno, H., Mal, T.K., Tong, K.I., Ando, R., Furuta, T., Ikura, M. & Miyawaki, A.** (2003). Photo-induced peptide cleavage in the Green-to-Red Conversion of a fluorescent protein, *Molecular Cell*, 12 (1), 1051-1058.
- Morihara, K. & Tsuzuki, H.** (1977). Production of protease and elastase by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients, *Infection and immunity*, 15 (3), 679-685.

- Olson, J.C. & Ohman, D.E.** (1992). Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions, *Journal Of Bacteriology*, 174 (12), 4140-4147.
- Özcan, K. & Çorbacı, C.** (2017). *Streptomyces* sp. K22 ve K30 suşlarından lipaz ve proteaz enzim üretimi, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi* 7 (2), 128-135.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. & Yönden, Z.** (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6 (3), 331-336.
- Özdal, M.** (2019). *Bakteriyel pigmentlerin üretimi ve farmakolojik kullanım alanları*. Fen Bilimleri ve Matematik Alanında Yeni Ufuklar. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü.
- Parmar, D. & Pandya, A.** (2012). Characterization of amylase producing bacterial isolates, *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 1 (6), 42-47.
- Pluta, A.B., Pluta, A., Garbowska, M. & Stefanska, I.** (2019). Prevalence and toxicity characterization of *Bacillus cereus* in food products from Poland, <https://doi.org/10.3390/foods8070269>
- Raju, E.V.N. & Divakar, G.** (2013). Production of amylase by using *Pseudomonas aeruginosa* isolated from garden soil, *International Journal of advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 2 (1).
- Sağlam, D. & Şeker, E.** (2016). Gıda Kaynaklı Bakteriyel Patojenler, *Kocatepe Veterinary Journal*, 9 (2), 105-113.
- Sari, E.** (2011). *Bacillus circulans* M34'ten Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Yüksek lisans tezi). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sarkisova, S., Patrauchan, M., Berglund, D., Nivens, D. & Franklin, M.** (2005). Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Journal of Bacteriology*, 187 (13), 4327-4337.
- Sebit, B.** (2015). Çoklu İlaç Dirençli Klinik İzolatlarda Biyofilm Oluşumu ve Biyosidal Aktivite (Yüksek lisans tezi). Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Sethupathy, S., Prasath, K.G., Ananthi, S., Mahalingam, S., Ananthi, S., Balan, S.Y. & Pandian, S.K.** (2016). Proteomic analysis reveals modulation of iron homeostasis and oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by curcumin inhibiting quorum sensing regulated virulence factors and biofilm production, *Journal of Proteomics*, 145, 112-126.
- Shen, H. & Chou, K.** (2009). Identification of proteases and their types, *Analytical Biochemistry*, 385 (1), 153-160.
- Singer, S.W., Erickson, B.K., VerBerkmoes, N.C., Hwang, M., Shah, M.B., Hettich, R.L. & Thelen, M.P.** (2010). Posttranslational modification and sequence variation of redox-active proteins correlate with biofilm life cycle in natural microbial communities, *International Society for Microbial Ecology*, 4 (11), 1398-1409.

- Sundurram, A. & Murty, T.P.K.** (2014). α -Amylase Production and Applications, *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2 (4), 166-175.
- Sökmen, B.B. & Sağkal, Y.** (2017). Elastaz aktivitesine Giresun yöresindeki bazı yenilebilir bitkilerin farklı çözücülerdeki ekstraktlarının inhibisyon etkilerinin incelenmesi, *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 7 (2), 10-18.
- Şen, A. & Halkman, A.K.** (2006). Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 04 (02), 2-13.
- Uçar, A.** (2011). *Aspergillus* sp. tarafından üretilen amilaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu. (Yüksek lisans tezi). Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Van Der Maarel, M. J. E. C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L.** (2002). Properties and applications of starchconverting enzymes of the α -amylase family, *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155.
- Vijay, A., Babu, S. & Gudlapally, J.** (2014). Isolation and extraction of elastase producing bacteria from natural habitat (Water-Soil Sample) and targeting it to APP, A Cause of Alzheimer's disease, *Helix*, 2, 516-520.
- Yıldırım, V.** (2014). *Aeribacillus pallidus* C10'dan Alkalin Proteaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği (Yüksek lisans tezi). Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yılmaz, Z.** (2012). Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Çeşitli Antibiyotiklerin "Quorum Sensing" ve Virulans Faktörleri Üretimine İnhibitör Etkisinin Belirlenmesi (Yüksek lisans tezi). İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Zhang, Y., Kong, J., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H. & Yao, W.** (2018). Essential oil components inhibit biofilm formation in *Erwinia caratovora* and *Pseudomonas fluorescens* via anti-quorum sensing activity, *LWT – Food Science and Technology*, 92, 133-139.
- Zheng, Y., Li, Y., Long, H., Zhao, X., Jia, K., Li, J., Wang, L., Wang, R., Lu, X. & Zhang, D.** (2018). bifA regulates biofilm development of *Pseudomonas putida* MnB1 as a primary response to H₂O₂ and Mn²⁺, *Frontiers in Microbiology*, 9, 1490.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Zeliş BUDAK KESKİN

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2000, Balıkesir Üniversitesi, Necatibey Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği
- **Yüksek Lisans** : 2021, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji

MESLEKİ DENEYİM:

- 2000 yılından itibaren Milli Eğitim Bakanlığı'na bağlı devlet okulunda biyoloji öğretmeni olarak çalışmaktadır.

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN ÇALIŞMALAR

Keskin, Z.B. & Kahraman, H. (2022). Effect of Ca^{+2} on *P. aeruginosa* and *B. cereus* metabolites, *Brazilian Journal of Biology*, 82, <https://doi.org/10.1590/1519-6984.243189>.