**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# *Salmonella* Typhimurium BİYOFİLM YAPILARINDA eDNA'NIN ROLÜ VE BİYOFİLM İLE MÜCADELEDE ENZİM VE ANTİBİYOTİK UYGULAMASI YOLUYLA BİYOFİLM YAPILARININ ZAYIFLATILMASI

**Çiğdem Elif ÇELİK**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA**
**2018**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

**Çiğdem Elif ÇELİK** tarafından hazırlanan "***Salmonella* Typhimurium Biyofilm Yapılarında eDNA'nın Rolü ve Biyofilm ile Mücadelede Enzim ve Antibiyotik Uygulaması Yoluyla Biyofilm Yapılarının Zayıflatılması**" adlı tez çalışması **29/01/2018** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman :** Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

**Jüri Üyeleri:**

**Başkan :** Prof. Dr. Yavuz BEYATLI
Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye :** Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

**Üye :** Prof. Dr. Emine Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN**

**Enstitü Müdürü**

## ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

29/01/2018



Çiğdem Elif ÇELİK

# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

*Salmonella* Typhimurium BİYOFİLM YAPILARINDA eDNA'NIN ROLÜ ve BİYOFİLM İLE MÜCADELEDE ENZİM ve ANTİBİYOTİK UYGULAMASI YOLUYLA BİYOFİLM YAPILARININ ZAYIFLATILMASI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Çalışmamızda gıda kökenli bir patojen olan *Salmonella* cinsine ait bir serovaryetenin iki suşunda (*S.* Typhimurium SL1344 ve DMC4) biyofilm oluşumu üzerine eDNA'nın rolünün belirlenmesi ve çeşitli nükleazların konvansiyonel antibiyotiklerle kombine edilerek biyofilm ile mücadelede etkinliklerinin tanımlanması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda gerçekleştirilen denemeler sonucunda, denemeye alınan her iki suşta da kullanılan antibiyotiklerin biyofilm oluşumunu büyük oranda eradike etmesine rağmen, deoksiribonükleazların (DNaz I ve Benzonase®) *Salmonella* biyofilmlerinin eradikasyonunda etkin ajanlar olmadığı saptanmıştır. Bunun yanı sıra antibiyotikler ve enzimler kombine edilerek *Salmonella* biyofilmlerine uygulandığında, biyofilm biyokütlesine yine enzimlerden ziyade antibiyotiklerin etki gösterdiği belirlenmiştir. Çeşitli enzimlerle muamele edilen ve enzim muamelesi yapılmayan nükleik asitlerin varlığında geliştirilen *Salmonella* biyofilmlerinde eDNA'nın biyofilm miktarını azalttığı; bunun yanında özellikle nükleazlarla muamele edilen nükleik asitlerin bulunduğu kuyularda biyofilm miktarının arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar *Salmonella* biyofilmlerinin olgunlaşması üzerinde hücre dışı DNA'nın (eDNA ve gDNA) inhibisyon etkisine sahip olduğunu kanıtlamaktadır.

**Ocak 2018, 101 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm, eDNA, Antibiyotikler, Endonükleazlar

## ABSTRACT

Master Thesis

THE ROLE OF eDNA ON BİOFİLM STRUCTURES OF *Salmonella* Typhimurium and COMBAT WİTH BİOFİLM STRUCTURES VİA ENZYME and ANTİBİOTİC TREATMENT TO WEAKENİNG OF THE BİOFİLM

Çiğdem Elif ÇELİK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Prof. Mustafa AKÇELİK

In our study, it was aimed to determine the role of eDNA in the formation of biofilms in two strains (*S*. Typhimurium SL1344 and DMC4) of a serovar of a genus *Salmonella,* a foodborne pathogen, and to identify the activities of various nucleases in combat with biofilms by combining them with conventional antibiotics. As a result of the experiments carried out in this direction, it was determined that deoxyribonucleases did not act as effective agents in the eradication of *Salmonella* biofilms, although the antibiotics used in both tested strains eradicated biofilm formation. Furthermore, when antibiotics and enzymes were combined and applied to *Salmonella* biofilms, it was determined that antibiotics were more effective than enzymes on biofilm biomass. In *Salmonella* biofilms developed in the presence of nucleic acids treated with various enzymes and not subjected to enzyme treatment, it has been found that the amount of biofilm is increased in the wells when the eDNA reduces the amount of biofilm, as well as the nucleic acids treated with nucleases in particular. These results demonstrate that *Salmonella* extracellular DNA (eDNA and gDNA) have an inhibitory effect on maturation of *Salmonella* biofilms.



**January 2018, 120 pages**
**Key Words:** Biofilm, Extracellular DNA, Antibiotics, Endonucleases

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca gücünü ve desteğini hep arkamda hissettiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Birlikte çalıştığımız süre boyunca tecrübelerini aktarırken hoşgörü ve sabrını esirgemeyen ve bana güçlü bir kadın olmayı öğreten değerli hocam Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Laboratuvar çalışmalarımda kendilerinden pek çok şey öğrendiğim değerli Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma;

Çalışmalarımın deneysel aşamalarını öğrenirken bilgisini ve desteğini esirgemeyen başta Fatma Neslihan YÜKSEL olmak üzere Neslihan TAŞKALE KARATUĞ, Caner ÖZDEMİR'e, eğitim sürecimin bana kazandırdığı üç kıymetli arkadaşıma: Onur BENDER, Olgu ÖRS, Sinem UĞUR'a ve 26 yılı birlikte paylaştığımız canım dostum A. Esra YAŞAR'a,

Sonsuz sevgisini sunan anne yarım, teyzem Süheyla BİLKİ'ye, varlıklarıyla ruhumu zenginleştiren, bana sürekli destek ve motivasyon sağlayan güzel ablam Gözdem Mine KONUKÇU, abim Onur KONUKÇU ve birtanecik prensim Doruk KONUKÇU'ya, en büyük dostum, sırdaşım, her günümü güzel kılan kardeşim Ecem Ayşe ÇELİK'e ve son olarak geleceğimi oluşturmaya çalıştığım şu günlerde beni her durumda maddi manevi destekleyen, yeri geldiğinde gözyaşlarımı silen yeri geldiğindeyse benimle kahkahalarla gülen, hayattaki en büyük şansım ve en kıymetli yoldaşlarım anneciğim Ayla DOĞANSOY ÇELİK ve babacığım Ekrem ÇELİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çiğdem Elif ÇELİK
Ankara, Ocak 2018

# İÇİNDEKİLER

**TEZ ONAY SAYFASI**
**ETİK** ..... **i**
**ÖZET** ..... **ii**
**ABSTRACT** ..... **iii**
**TEŞEKKÜR** ..... **iv**
**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ** ..... **vii**
**ŞEKİLLER DİZİNİ** ..... **ix**
**ÇİZELGELER DİZİNİ** ..... **xiii**
**1. GİRİŞ** ..... **1**
**2. KURAMSAL TEMELLER** ..... **4**
**2.1 *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri** ..... **4**
**2.2 Biyofilmin Genel Özellikleri** ..... **8**
**2.2.1 Biyofilm matriksi ve matriks bileşenleri** ..... **10**
**2.2.1.1 Ekzopolisakkaritler** ..... **12**
**2.2.1.2 Sürfaktanlar** ..... **14**
**2.2.1.3 Proteinler** ..... **15**
**2.2.1.4 Hücre dışı DNA (eDNA)** ..... **16**
**2.2.2 Biyofilm oluşum aşamaları** ..... **21**
**2.3 *Salmonella* Cinsi Bakterilerin Biyofilm Yapısı ve Önemi** ..... **23**
**2.4 Enzim ve Antibiyotik Uygulamaları ile *Salmonella* Biyofilmlerinin Eradikasyonu** ..... **29**
**3. MATERYAL VE YÖNTEM** ..... **31**
**3.1 Materyal** ..... **31**
**3.1.1 Bakteriler** ..... **31**
**3.1.2 Besiyerleri** ..... **32**
**3.1.3 Çözeltiler** ..... **33**
**3.1.4 Tez çalışmasında kullanılan antibiyotiklerin stok çözeltilerinin hazırlanması** ..... **35**
**3.1.4.1 Kanamisin** ..... **36**
**3.1.4.2 Ampisilin** ..... **36**
**3.1.4.3 Tetrasiklin** ..... **36**
**3.1.4.4 Nalidiksik asit** ..... **36**
**3.1.5 Tez çalışmasında kullanılan enzimler** ..... **37**
**3.2 Yöntem** ..... **37**
**3.2.1 Planktonik hücrelerin eDNA üretiminin belirlenmesi** ..... **37**
**3.2.2 Planktonik hücrelerden genomik DNA izolasyonu** ..... **38**
**3.2.3 Biyofilm üretim düzeylerinin ve biyofilm yapısında bulunan eDNA miktarının belirlenmesi** ..... **39**
**3.2.4 Biyofilm yapıları üzerine antibiyotiklerin, Benzonase®'ın ve DNaz I enziminin etkisinin belirlenmesi** ..... **41**
**3.2.5 Biyofilm yapısından eDNA'nın izolasyonu** ..... **43**
**3.2.6 İzole edilen nükleik asitlerin DNaz I, Benzonase®, Proteinaz K ve RNaz A ile muamelesi** ..... **43**

**3.2.7 Enzim muamelesine tabi tutulan nükleik asitlerin biyofilm yapısına etkisinin belirlenmesi ..... 44**
**3.2.8 İstatistiki analizler ..... 45**
**4.ARAŞTIRMA BULGULARI ..... 46**
**4.1 Planktonik Hücrelerin eDNA Üretiminin Belirlenmesi ..... 46**
**4.2 Planktonik Hücrelerden Genomik DNA İzolasyonu ..... 47**
**4.3 Biyofilm Üretiminin ve Biyofilm Yapısında Bulunan eDNA Miktarının Belirlenmesi ..... 48**
**4.3.1 Biyofilm üretim miktarının belirlenmesi ..... 48**
**4.3.2 Biyofilmde Bulunan eDNA Miktarının Belirlenmesi ..... 50**
**4.4 Biyofilm Yapıları Üzerine Antibiyotiklerin, Benzonase®'ın ve DNaz I Enziminin Etkisinin Belirlenmesi ..... 52**
**4.4.1 Biyofilm yapıları üzerine antibiyotiklerin etkisinin belirlenmesi ..... 52**
**4.4.2 Biyofilm yapıları üzerine DNaz I ve Benzonase® enziminin etkisinin belirlenmesi ..... 56**
**4.5 Biyofilm Yapısından eDNA'nın İzolasyonu ..... 64**
**4.5.1 Biyofilm yapısından izole edilen eDNA'nın agaroz jelde görüntülenmesi ..... 64**
**4.5.2 Farklı inkübasyona sürelerindeki biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'nın miktarının belirlenmesi ..... 65**
**4.6 İzole Edilen Nükleik Asitlerin DNaz I, Benzonase®, Proteinaz K ve RNaz A ile Muamelesi ..... 67**
**4.7 Enzim Muamelesine Tabi Tutulan Nükleik Asitlerin Biyofilm Yapısına Etkisinin Belirlenmesi ..... 68**
**5.TARTIŞMA VE SONUÇ ..... 82**
**KAYNAKLAR ..... 87**
**ÖZGEÇMİŞ ..... 101**

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|---|
| β | beta |
| % | yüzde |

**Kısaltmalar**

| | |
|---|---|
| µg | mikrogram |
| µL | mikrolitre |
| µM | mikrometre |
| AHL | açillenmiş homoserin laktonlar |
| Bap | biofilm associated protein |
| bcs | bacterial cellulose synthesis |
| C | celcius |
| CFU | colony-forming unit |
| csg | curli synthesis gene |
| CSP | kompetent uyarıcı peptid |
| CTAB | setil trimetilamonyum bromid |
| Da | dalton |
| $ddH_2O$ | didistile su |
| DNA | deoksiribonükleik asit |
| *E.* | *Escherichia* |
| eDNA | hücre dışı DNA |
| EDTA | etilendiamin tetraasetik asit |
| EPS | extracellular polymeric substances |
| g | gram |
| HCl | hidrojen klorür |

| | |
|---|---|
| kb | kilobaz |
| KCl | potasyum klorür |
| $KH_2PO_4$ | potasyum mono fosfat |
| kob | koloni oluşturma birimi |
| LB | Luria Bertani |
| mL | mililitre |
| mm | milimetre |
| $Na_2HPO_4$ | di sodyum hidrojen fosfat |
| NaCl | sodyum klorür |
| ng | nanogram |
| nm | nanometre |
| OD | optik dansite |
| PQS | kinolon sinyal molekülleri |
| rdar | red, dry and rough (kırmızı, kuru ve pürüzlü) |
| rpm | (revolutions per minute) dakikadaki devir sayısı |
| RT-PCR | reverse transcription-polymerase chain reaction |
| *S.* | *Salmonella* |
| SCV | *Salmonella*-containing vacuole |
| SDS | sodyum dodezil sülfat |
| SF | serum fizyolojik |
| TE | tris EDTA |
| U | unit |
| UV | ultraviyole |

# ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *S. enterica* serovarlarının gardiyan (Housekeeping) genlerinin dizi analizine göre oluşturulan filogenetik ağaç ve serovaryetelerin bir kısmının sebep olduğu hastalıklar (Rivera-Chávez vd. 2014'den uyarlanmıştır) ..... 4

Şekil 2.2 *S.* Typhimurium'un yüzey yapılarının görüntüsü ( https://www.cdc.gov 2017a) ..... 5

Şekil 2.3 Anthony van Leeuwenhoek tarafından İngiliz Kraliyet Akademisi'ne gönderilen raporda bulunan animalkül şekilleri (Martin 2016) ..... 8

Şekil 2.4 Doğadaki biyofilmlerin sintrofik etkileşimleri (Gupta vd. 2016) ..... 10

Şekil 2.5 Yaşam alanı olarak biyofilm matriksi (Flemming 2016) ..... 11

Şekil 2.6 Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde eDNA salınım mekanizmaları (Das vd. 2013) ..... 20

Şekil 2.7 Bakteriyel biyofilm oluşum aşamaları (Gupta vd. 2016) ..... 21

Şekil 2.8 *Salmonella* invazyon mekanizmaları (Hurley vd. 2014) ..... 24

Şekil 3.1 İzole edilen eDNA konsantrasyonlarının belirlenmesinde referans alınan λDNA standart eğri grafiği ..... 41

Şekil 4.1 *S.* Typhimurium suşlarının planktonik formlarının ürettiği eDNA miktarları ..... 46

Şekil 4.2 *S.* Typhimurium suşlarının genomik DNA'larının (gDNA) agaroz jel görüntüsü ..... 47

Şekil 4.3 *S.* Typhimurium suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde oluşturdukları biyofilm miktarlarının spektrofotometrik ölçüm sonuçları ..... 50

Şekil 4.4 *S.* Typhimurium SL1344 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA miktarı ..... 51

Şekil 4.5 *S.* Typhimurium DMC4 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA miktarı ..... 51

Şekil 4.6 *S.* Typhimurium SL1344 suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri ..... 53

Şekil 4.7 *S.* Typhimurium SL1344 suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri ..... 53

Şekil 4.8 *S.* Typhimurium SL1344 suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri ..... 54

Şekil 4.9 *S.* Typhimurium DMC4 suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri ..... 55

Şekil 4.10 *S.* Typhimurium DMC4 suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri ..... 55

Şekil 4.11 *S.* Typhimurium DMC4 suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri ..... 56

Şekil 4.12 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 58

Şekil 4.13 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 58

Şekil 4.14 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 59

Şekil 4.15 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 60

Şekil 4.16 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 60

Şekil 4.17 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 60

Şekil 4.18 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 61

Şekil 4.19 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 62

Şekil 4.20 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 62

Şekil 4.21 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 63

Şekil 4.22 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 63

Şekil 4.23 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..... 64

Şekil 4.24 SL1344 ve DMC4 kodlu *Salmonella* suşlarından izole edilen DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü ..... 65

Şekil 4.25 SL1344 kodlu *S*. Typhimurium kontrol suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları ..... 66

Şekil 4.26 DMC4 kodlu *S*. Typhimurium suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları ..... 67

Şekil 4.27 Enzim muamelesine tabi tutulan 100 µg/mL başlangıç konsantrasyonundaki *S*. Typhimurium nükleik asitlerinin agaroz jel görüntüsü ..... 68

Şekil 4.28 20 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 70

Şekil 4.29 50 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 71

Şekil 4.30 100 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 72

Şekil 4.31 20 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 73

Şekil 4.32 50 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 74

Şekil 4.33 100 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 75

Şekil 4.34 20 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 48h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 76

Şekil 4.35 50 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 48h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 77

Şekil 4.36 100 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 48h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 78

Şekil 4.37 20 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 48h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 79

Şekil 4.38 50 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 48h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri ..... 80

Şekil 4.39 100 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri..... 81

# ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Salmonella* suşları ..... 31
Çizelge 3.2 Luria Bertani Broth ve Agar ..... 32
Çizelge 3.3 Luria Bertani Broth ..... 32
Çizelge 3.4 Fosfat tamponlu tuz çözeltisi ..... 33
Çizelge 3.5 Tris/EDTA ..... 33
Çizelge 3.6 CTAB/NaCl ..... 34
Çizelge 3.7 % 10'luk SDS Çözeltisi ..... 34
Çizelge 3.8 % 33'lük Glasiyel Asetik Asit Çözeltisi ..... 34
Çizelge 3.9 Kloroform İzoamil Alkol ..... 35
Çizelge 3.10 Fenol Kloroform İzoamil Alkol ..... 35
Çizelge 3.11 Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları ..... 35
Çizelge 3.12 Çalışmada kullanılan enzimler ve konsantrasyonları ..... 37
Çizelge 3.13 Standart eğri grafiği oluşturmak amacıyla kullanılan λDNA dilüsyonları ..... 40
Çizelge 4.1 *S.* Typhimurium suşlarının biyofilm üretim düzeylerinin hesaplanması ..... 48
Çizelge 4.2 *Salmonella* Typhimurium SL1344 suşunun 4h, 12h ve 24h inkübasyon sonunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri ..... 49
Çizelge 4.3 *Salmonella* Typhimurium DMC4 suşunun 4h, 12h ve 24h inkübasyon sonunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri ..... 49

# 1. GİRİŞ

Büyük bir komensal bakteri florasına ev sahipliği yapan gastrointestinal sistem, besinlerin parçalanması ve gastrointestinal epitel aracılığıyla emilimi konusunda önemli görevler üstlenmektedir. Yarı geçirgen özellikteki epitel bariyer, besin maddelerinin geçişine ve kan dolaşımına izin verirken, aynı zamanda gıda kaynaklı bakterilere karşı fiziksel ve kimyasal bir engelleyici görevi görür. Organizmanın tüm savunma yöntemlerine rağmen, birçok bakteri türü alınan önlemlerden kaçınmanın ve konak dokusuna ulaşarak çeşitli hastalıklara sebep olmanın bir yolunu bulmuştur. *Salmonella* cinsi de bu bakterilerden biridir. *Salmonella* türleri, memeliler başta olmak üzere kuşlarda ve sürüngenlerde dahi enfeksiyona sebep olan enteropatojenik bakterilerdir ve her yıl dünyada 155.000 kişinin ölümüne sebep olmaktadırlar (Majowicz vd. 2010). *Enterobacteriaceae* familyasına dahil *Salmonella* cinsi; *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür içermektedir. Patojen olan *S. enterica* türü ise flagella ve lipopolisakkarit antijenlerine göre sınıflandırılan 2.500'den fazla serovaryeteyi içerir (Bennett vd. 2004).

Bakterilerin dünya üzerindeki yaşam alanları pek çok bakımdan çeşitlilik göstermektedir. Bakteriler, dünyamızdaki tek yaşam formu oldukları milyonlarca yıl boyunca çeşitli ekosistemlerde varlıklarını sürdürmüştür. Bir ekosistemden diğerine akan sucul sistemlerde bakteriyel hücreler evrimleşmiş ve bir yüzeyle karşılaşıncaya kadar planktonik formda yaşamlarını sürdürmüşlerdir (Costerton 1995). Bir yüzeye tutunarak bir araya gelen bakteri hücreleri durağan bir yaşam formu oluşturarak ve etraflarını kendi ürettikleri polimerik matriks ile sararak kendilerine yalnızca güvenli bir yaşam alanı oluşturmakla kalmamış, aynı zamanda enerji kazanımı sağlayabildikleri ve besin depolayabildikleri bir yaşam formu oluşturmuşlardır. Biyofilmler, en basit tanımla biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunan, içeriğindeki bakteriler tarafından sentezlenen polimerik matrikse gömülü multimikrobiyal topluluklardır. Dünyadaki mikrobiyal biyokütlenin % 99'u biyofilm formunda bulunur ve bu yaşam biçimi doğadaki bakterilerin baskın yaşam biçimidir (Garrett vd. 2008).

Biyofilm oluşum süreci bir seri fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametre tarafından koordine edilmektedir. Biyofilm oluşum süreci; planktonik mikrobiyal hücrelerin pili ya da flagella gibi uzantılarıyla yüzeye tutundukları dönüşümlü tutunma, yüzeye tutunan hücrelerin mikrokoloniler oluşturarak sabit bir forma geçtiği dönüşümsüz tutunma, mikrobiyal hücrelerin birbirleriyle biyofilme özgü genlerin ifadesiyle sağlanan çeşitli sinyaller aracılığıyla iletişim kurmaya başladığı ve mikroorganizmaların biyofilm ağını dengede tutmak için ekstraselüler polimerik matriks salgıladığı ve polimerik matriks üretitminin artışı sonucu biyofilm biyokütlesinin artmasıyla içeriğindeki mikroorganizmalara en üst seviyede koruma sağladığı, biyofilmin olgunlaşması ve mikroorganizmaların flagellin proteininin ekspresyonunu artırarak biyofilmlerden ayrıldığı, dağılma aşaması olmak üzere dört temel aşamadan oluşur (Stoodley vd. 2002).

Biyofilmi oluşturan mikrobiyal hücreler kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik matriks (EPS) ile üç boyutlu, mantar benzeri yapıda bir yaşam alanı oluşturmaları sebebiyle habitat biçimlendiricileri olarak isimlendirilirler (Corning 2002). Bu biyojenik yaşam alanı oluşumu dinamik bir süreçtir ve biyofilmler, üretilen matriks ile yeni özellikler kazanırlar. Bu ekstraselüler matriksin yapısını; polisakkaritler, proteinler, glikolipidler ve hücre dışı DNA (eDNA) oluşturur. Bu komponentler genel olarak bakteriyel hücrelerin yüzeye tutunumu ve biyofilmlerin inşasında (polisakkaritler), biyofilmi oluşturan bakteri hücreleri arasındaki iletişimin sağlanmasında (proteinler), bakterilerin virülans özellikler kazanımında (glikolipidler), bakteri hücreleri arasındaki yatay gen transferinde, yüzey hidrofobisitesinin düzenlenmesinde, biyofilmin üç boyutlu mimari yapısının iskeletinin oluşturulmasında (eDNA) görev alırlar (Gupta vd. 2016).

Gerçekleştirdiğimiz tez çalışmamızda; gıda kökenli patojen bir bakteri cinsi olan Gram negatif *S.* Typhimurium'un ürettiği biyofilm yapılarında eDNA miktarının ve eDNA'nın *Salmonella* biyofilmlerindeki rolünün belirlenmesi amaçlanan çalışmaların gerçekleştirilmesinin yanı sıra, literatürde ilk defa *Salmonella* biyofilm yapılarının eradikasyonunda DNaz I enzimine kıyasla daha yüksek aktiviteye sahip Benzonase® enziminin biyofilmler üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca yine literatürde ilk defa *S.* Typhimurium biyofilm yapılarının zayıflatılması amacıyla çeşitli nükleazlar ile

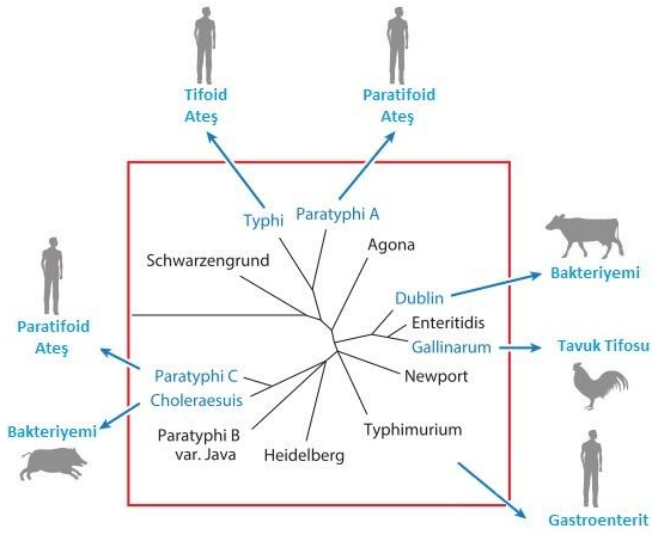
konvansiyonel antibiyotiklerin kombine biçimde uygulanması suretiyle biyofilm ile mücadelede yeni yolların belirlenmesi hedeflenmiştir.

# 2. KURAMSAL TEMELLER

## 2.1 *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

*Salmonella* ilk kez 1884 yılında domuz bağırsağından izole edilmiş ve adını Amerikalı mikrobiyolog D.E. Salmon'dan almıştır (Smith 1894, Su ve Chiu 2006).

*Enterobacteriaceae* familyasına dahil *Salmonella* cinsi bakteriler; enterik ateş, enterokolit, salmonelloz gibi ciddi enfeksiyon hastalıklarıyla ilişkilendirilen önemli patojenlerdir. *Salmonella* cinsi *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere yalnızca iki türden oluşur. *S. enterica* ise; *enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae* ve *indica* olmak üzere altı alt türe ayrılır (Minor ve Popoff 1987, Tindall vd. 2005, Issenhuth-Jeanjean vd. 2014). *S.* Typhi, *S.* Paratyphi gibi bazı *Salmonella* serotipleri doğada konak olarak yalnızca insanları seçerken, Pullorum ve Gallinarum kanatlılarda, Dublin sığırlarda, Choleraesuis domuzlarda ve insanlarda, Typhimurium ve Enteritidis ise insan, sığır, kanatlılar, koyun, domuz, at ve yabani kemirgenlerde hastalığa sebep olmaktadır (Şekil 2.1).




Şekil 2.1 *S. enterica* serovarlarının gardiyan (Housekeeping) genlerinin dizi analizine göre oluşturulan filogenetik ağaç ve serovaryetelerin bir kısmının sebep olduğu hastalıklar (Rivera-Chávez vd. 2014'den uyarlanmıştır)

*Salmonella* cinsi Gram negatif, spor oluşturmayan 0.4-0.6 µm büyüklüğünde fakültatif anaerobik basillerdir. Glukoz fermentasyonu sırasında nitratı indirgeyerek asit üretirler. Çoğunlukla laktoz fermente etmeyen bu mikroorganizmalar peritriş flagella bulundurmalarının bir sonucu olarak hareketlidirler (Bennett vd. 2004). *S. enterica* serovar Typhimurium'da flagella, molekül ağırlığı yaklaşık 50,000 Da olan, flagellin adı verilen tek bir proteinin polimeridir. Peritriş flagella hücre yüzeyi üzerinde dağılmış beş ya da altı tane filament olarak tanımlanmaktadır (Schuhmacher vd. 2015). Filamentin şekli; proteinin aminoasit dizisi, sıcaklık, pH ve iyonik güce bağlı olarak flagellin monomerlerinin düzenine bağlıdır. Monomerler, yaklaşık 20 nm çapında bir silindirin yüzeyi boyunca uzanan 11 protofilament oluşturur ve oluşan kısa veya uzun protofilamentler ile yüzeye bağlanır (Ryu vd. 2003). Birçok çalışmada flagella sayısının çevresel koşullara bağlı olarak değişebileceği gösterilmiş ve bakterilerin yüzeyle temasını kolaylaştırmak için yüzey boyunca flagella sayısının arttığını ileri sürülmüştür ( Ryu vd. 2003, Ping 2010). Ancak *Salmonella* cinsinde yüzeye temas halinde ya da göç durumunda, flagella sayısının değişmediği gözlenmiştir (Partridge ve Harshey 2013) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 *S.* Typhimurium'un yüzey yapılarının görüntüsü ( https://www.cdc.gov 2017a)

*Salmonella* cinsi bakteriler bazı ekstrem durumlar haricinde 5–47 $^{o}$C sıcaklık aralığında üreme gösterirler. Canlılıklarını sürdürebildikleri pH değeri ise 3.7-9.5 aralığında olup, maksimum % 8 oranında tuz içeren sucul ortamlarda yaşayabilirler (http://www.fda.gov 2011).

*Salmonella* serovarlarının konak vücudunda üremesi için en uygun koşulları kalın bağırsaklar sağlar (Barthel vd. 2003). İnsanlarda lif gibi karmaşık karbonhidratlar ya da gluten diyet proteinleri, konağın ince bağırsağındaki enzimler tarafından sindirilemez ve kolona ulaşırlar. Burada mikrobiyota için yüksek enerjili besin maddelerinin önemli bir kaynağı olurlar. Ayrıca goblet hücreleri tarafından üretilen müsinler de bu bakteriler için besin çeşitliliği oluşturmaktadır (Rivera-Chávez ve Bäumler 2014).

*S.* Typhimurium ve *S.* Enteriditis gibi non-tifoid *Salmonella* serovarları enfeksiyon oluşturma sürecinde hayatta kalma içgüdüleri gereği bağışıklık tepkilerini; bağırsak epitelini istila ederek ve makrofajlar içerisinde hayatta kalabilmek için virülans faktörlerini kullanarak gösterirler. *Salmonella*, bağırsak duvarının lümen yüzeyindeki uygun bağlanma kısımları için bağırsak mikroflorasıyla rekabet etmek zorundadır. Bu sebeple *Salmonella* epitel hücrelerinin yüzeylerinde de bulunabilen immünoglobulin A ile etkileşimden kaçınmalıdır. Epitel hücreleriyle temas eden *Salmonella* hücresinin, hücre yüzeyinde 0.3-1 nm uzunluğunda 60 nm çapında protein yapıda uzantılar geliştirdiği ve epitel hücre yüzeyine bu uzantılarla tutunduğu bilinmektedir. De novo protein sentezinden bağımsız olan bu uzantılar, kısa ömürlüdürler ve epitel hücrelerin membran katlanmalarıyla dahi dökülebilirler (Ginocchio vd. 1994, Galán 1996). Bakterinin epitel hücre yüzeyine tutunmasının ardından, patojen ile konukçu hücre arasındaki sinyal iletimiyle, *Salmonella*'nın enterositler ve M hücrelerine invazyonu gerçekleşir. Epitel hücreleri *Salmonella* invazyonuna tepki olarak sitokinler üretir ve üretilen bu sitokinler enterosit ve makrofajların apoptozuna neden olur. Apoptoz sonucu oluşan yanıt enterotoksin olarak algılanır ve bu enfeksiyon süreci konakta *Salmonella* kaynaklı ateş ve diyareyle sonuçlanır (Tsolis vd. 1999).

Afrika gibi gelişmemiş ülkelerde nüfusa dayalı takip verileri çok kısıtlı olmasına rağmen, dünyada *Salmonella* enfeksiyonlarının görülme sıklığının arttığı tespit

edilmiştir. *Salmonella* türleri her yıl tüm dünyada yaklaşık 93.8 milyon gıda kaynaklı vakaya neden olmakta ve bu vakaların 155.000 tanesi yaşamını kaybetmektedir (Hendriksen vd. 2011).

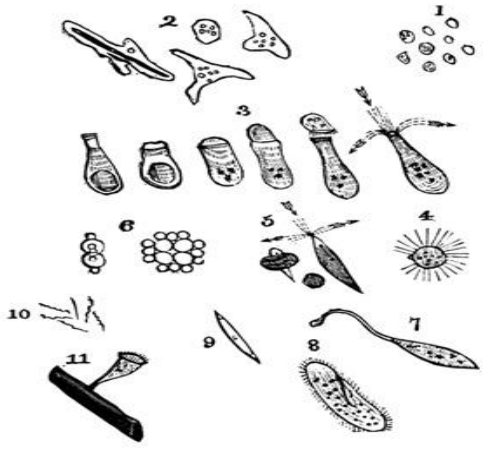
İnsan *Salmonella* enfeksiyonları; enterik (tifo) ateş, enterokolit ve non-tifoid mikroorganizmalar tarafından oluşturulan sistemik enfeksiyonlar gibi çeşitli klinik durumlara neden olabilir. Tifoid *Salmonella* enfeksiyonu etkeni *S.* Typhi, konak dokularında istila ve hayatta kalma becerileri yüksek bir serovaryetedir ve oldukça ciddi semptomları olan enterik ateşe neden olur. Enterik ateşin klinik bulguları 7 ila 28 gün arasında değişen bir inkübasyon periyodu sonrasında ortaya çıkar ve semptomları ishal, uzun süreli yüksek ateş, karın ağrısı, baş ağrısı ve bitkinlik şeklindedir. Enterik ateşin tedavisi kloramfenikol, ampisilin veya trimetoprim-sulfametoksolaz uygulanmasına dayanır. Non-tifoid *Salmonella* serovarlarının neden olduğu insan enfeksiyonlarıysa enterokolit ile sonuçlanır. Enterokolit, invaziv patojenle temastan 8 ila 72 saat sonra ortaya çıkar ve bulantı, kusma, ateş, titreme, diyare gibi belirtiler gösterir. Bu hastalığın tedavisinde antibiyotik kullanımından ziyade, sıvı takviyesi ve dinlenme yoluyla tedavi önerilir. Non-tifoid serovarların sebep olduğu insan enfeksiyonları sistemik enfeksiyonlara dönüşebilir ve çeşitli kronik koşullardan kaynaklanan süreci hızlandırabilir. İnsan konaklarında HIV gibi önceden varolan fizyolojik, anatomik ve immünolojik bozukluklar; konakçı savunma mekanizmalarının, invaziv *Salmonella* varlığına etkili bir şekilde cevap verememesi nedeniyle hastalıkların daha da ciddileşmesine ve daha uzun sürmesine neden olabilir. Ayrıca *Salmonella* serovaryeteleri nadiren de olsa endokardit, arterit, menenjit, pnömoni, piyomiyozit, kolesistit, piyelonefrit, prostatit gibi hastalıklarda da rol oynayabilir (Bennett vd. 2004, D'Aoust vd. 2007).

Antibiyotik kullanımının yaygınlaşması diğer bakteri türleri gibi gıda kaynaklı bakterilerin de antibiyotiklere direnç kazanmasına neden olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2014 tarihli raporunda çeşitli bölgelerden izole edilen *Salmonella* cinsi bakterilerin DNA replikasyonu için gerekli enzim DNA giraz ve topoizomeraz aktivitesini baskılayarak etki eden florokinolon (siprofloksasin, gemifloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, ofloksasin) grubu antibiyotiklere direnci araştırılmıştır.

Dünyanın diğer bölgelerinden izole edilen *Salmonella* serovarlarının florokinolon direnci % 5'in altındayken; Doğu Akdeniz Bölgesinde % 35-49, Amerika'da ise % 96 olduğu tespit edilmiştir (Anonymous 2014). Ayrıca 1998 yılında iki kişinin ölümüyle sonuçlanan *Salmonella* salgınında izole edilen ve tanımlayıcı faj tipi DT104 olan *S.* Typhimurium DT104 serovaryetesi incelendiğinde, bu suşun; ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamid ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençli olduğu saptanmıştır (Ølbak vd. 1999).

## 2.2 Biyofilmin Genel Özellikleri

İlk olarak 300 yılı aşkın bir süre önce Hollandalı bilim insanı Anthony van Leeuwenhoek diş yüzeyinden kazıyarak aldığı örneği ilkel bir mikroskopla incelediğinde, diş yüzeyinde oluşan tabakanın, çıplak gözle görünmeyen ve hareket eden canlıların birikimi olduğunu farketmiştir. Bu mikroskobik canlıların çok küçük hayvanlar olduğunu düşünen Leeuwenhoek onlara 'animalkül'adını vermiştir. Leeuwenhoek bulgularını şekillerle göstererek Londra Kraliyet Akademisi'ne gönderdiği 12 Eylül 1684 tarihli raporunda bir insanın diş yüzeyinde oluşan animalküllerin sayısının Birleşik Krallık'ta yaşayan insan sayısından çok daha fazla olduğuna dikkat çekerek, biyofilm yapısını gözlemleyen ilk kişi olmuştur (Morrey 2013) (Şekil.2.3).




Şekil 2.3 Anthony van Leeuwenhoek tarafından İngiliz Kraliyet Akademisi'ne gönderilen raporda bulunan animalkül şekilleri (Martin 2016)

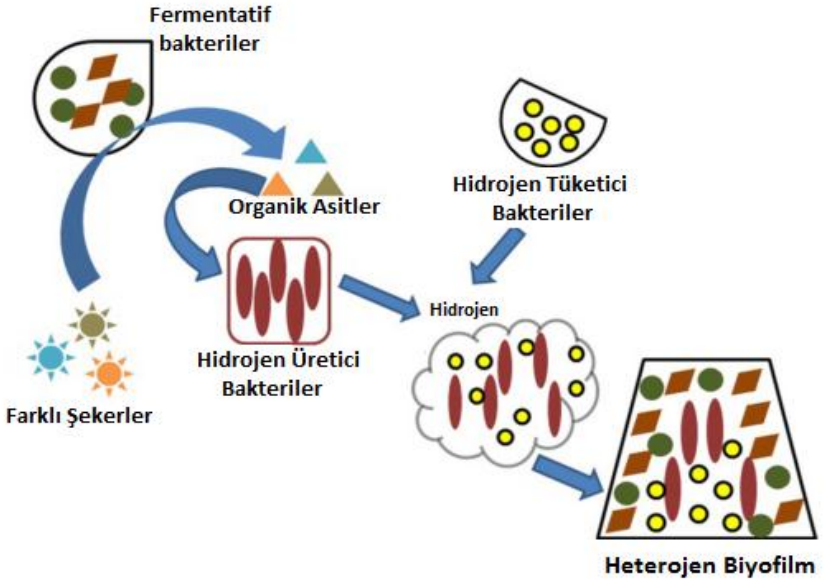
Bu tarihten iki yüzyıl sonra Amerikalı mikrobiyolog Arthur Henrici laboratuvarında bulunan bir akvaryuma mikroskobik lamlar yerleştirerek bu slaytlar üzerinde alglerin gelişimini incelemeyi amaçlamış, ancak bir süre sonra şaşırtıcı biçimde bu lamlar üzerinde alglere ek olarak alışılmadık bir morfolojide, ince ve düzgün biçimde lamı kaplayan bakteri topluluklarının da geliştiğini saptamıştır. Böylece Henrici su bakterilerinin yalnızca planktonik formda bulunmadığı, bir yüzeyde birikerek yüzeye tutundukları yeni bir morfolojiden ve cam üzerinde gelişen kolonilerin daha hızlı çoğalmasını sağlayan mukoid bir kılıftan bahsederek, biyofilm matriksinin varlığını belirlemiştir (Henrici 1932). Birkaç yıl sonra Zobell deniz suyunu steril cam şişelerde topladığında, cam şişelerin yüzeyinde deniz suyuna oranla daha fazla bakterinin bulunduğunu keşfetmiştir (Zobell 1943). 1978 yılında Costerton vd. 'glikokaliks'içine gömülü bakterilerin yüzeye tutunmasından bahsetmiş (Costerton vd. 1987) ve ilk kez 1981 yılında biyofilm terimini kullanarak bu yapıyı tanımlamıştır.

Mikrobiyoloji tarihi boyunca bakterilerin, yalnız (planktonik) ve sosyal olmayan canlılar olduğu düşünülmüştür. Ancak bunun aksine doğada yaşayan bakteriler, bir ekstraselüler matriks üretip biyofilm yapısı oluşturarak hem kendi türünden hem de başka türlerden bakterilerle birlikte simbiyotik bir ilişki içerisinde ve çevresel streslere, antibiyotiklere, konak immün yanıtına karşı dirençli bir yaşam formu oluşturmaktadır. Böylece biyofilm içerisindeki bakteriler en sert ve elverişsiz çevre koşullarında dahi homeostaz sağlamaktadırlar (Nadell vd. 2008).

Kapsamlı bir tanımla biyofilmler, biyotik ya da abiyotik yüzeylere, arayüzeylere ve birbirlerine bir matriks aracılığıyla geri dönüşümsüz biçimde bağlı hücrelerle karakterize edilen mikrobiyal sesil toplulukların, kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik matrikse gömülü biçimde gen ifadesi ve dolayısı ile fenotipik olarak planktonik formlardan farklılaşmış çok hücreli benzeri kompleks yapılarıdır (Donlan ve Costerton 2002).

Biyofilmler, kendisini oluşturan bakteri türlerini barındırma durumuna göre homojen ve heterojen biyofilmler olarak ikiye ayrılır. Homojen biyofilmler aynı türden bakterilerin oluşturduğu mikrobiyal topluluklardır ve doğada çok fazla görülmezler. Biyofilmler

içerisindeki bakterilerin gerçekleştirdiği her bir biyokimyasal süreç birden fazla bakteri türünün birlikte hareket etmesini gerektirir. Bu sebeple doğada biyofilmler çoğunlukla heterojen formdadır ve birden fazla bakteri türünü içerisinde barındırır (Flemming vd. 2016) (Şekil 2.4).



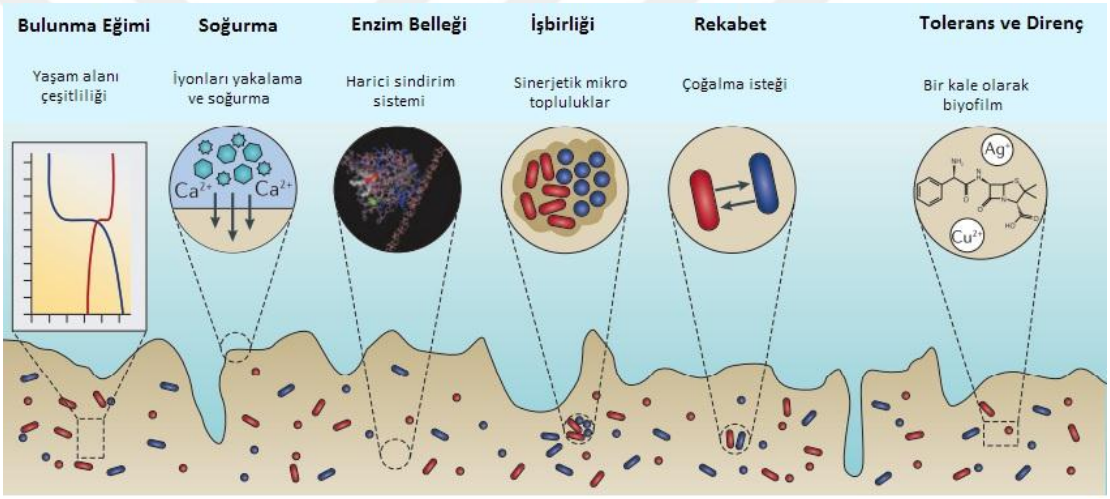

Şekil 2.4 Doğadaki biyofilmlerin sintrofik etkileşimleri (Gupta vd. 2016)

Birden fazla türün oluşturduğu mikrokonsorsiyumlar, nispeten karmaşık ancak bir o kadar koordine bir biçimde işlev görür. Örneğin, anaerobik sindirim sırasında kompleks organik maddelerin metan ve karbondioksite bozunması, en az üç bakteri türü tarafından gerçekleştirilir. Fermentatif bakteriler kompleks organik bileşiklerin katabolizmasını başlatarak organik bileşiklerden asit ve alkol üretir. Bu substratlar daha sonra asetojenik bakteriler tarafından tüketilir. Metanojenleri asetat, karbondioksit ve hidrojeni metana dönüştürerek enerji elde eder (Şekil 2.4). Böylece biyofilmler, sintrofik ilişkinin kurulması için mükemmel bir ortam sunar (Davey ve O'toole 2000, Gupta vd. 2016).

### 2.2.1 Biyofilm matriksi ve matriks bileşenleri

Biyofilmi oluşturan mikrobiyal hücreler kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik matriks (EPS) ile üç boyutlu, mantar benzeri yapıda, karmaşık ancak bir o kadar koordine

yaşam alanı oluşturmaları sebebiyle, habitat biçimlendiricileri olarak isimlendirilirler (Jones vd. 1994, Corning 2002). Biyofilm oluşum süreci esnasında ortaya çıkan mimari yapı, hücre aktiviteleri ve hücrelerin kendilerini örgütleme özellikleri kazanımı eş zamanlı olarak ortaya çıkar. Bu biyojenik yaşam alanı oluşumu dinamik bir süreçtir ve biyofilmler, üretilen matriksle yeni özellikler kazanırlar. Bakteriler matriks üreterek, kendilerini koruma altına alan bir barınak sağlaması, besin maddelerinin birikimini hızlandırması, biyofilmin fizikokimyasal ortamının değişimi ve içindeki organizmalar arasındaki hem işbirliği hem de rekabet olarak gelişen etkileşimleri ile fiziksel olarak tamamen farklı bir yaşam alanı oluştururlar (Singer vd. 2010) (Şekil 2.5, Flemming vd. 2016).




Şekil 2.5 Yaşam alanı olarak biyofilm matriksi (Flemming 2016)

Bir biyofilmin temel yapısal birimleri olan mikrokoloniler, kendi ürettikleri ekstraselüler polimerik matrikse gömülü topluluklardır. Ekstraselüler polimerik matriks ise mikroorganizmaların gömülü olduğu mikrobiyal orjinli biyopolimerlerdir. Biyofilmler, % 10-25 oranında mikrobiyal hücrelerden % 79-90 oranındaysa ekstraselüler polimerik matriksten (EPS) oluşur. EPS moleküllerinin organizasyonu, matriksi oluşturan bileşenler arasındaki etkileşime ve biyofilm içerisindeki organizmaların fizyolojik aktivitelerine bağlıdır. EPS molekülleri biyofilm mimarisinin oluşumuna aracılık eder. Biyofilmi oluşturan mikrokolonilerin organize biçimde EPS üreterek gerçekleştirdikleri bu süreç sürekli ve dinamiktir. Biyofilm mimarisinde yoğun olarak gözlenen kanal ve gözenekler mikrokoloniler arasında su, suda çözünmüş

besinler ve iyonların iletimine olanak sağlar. Böylece biyofilmler içerisinde sirküler bir sistem oluşur (Patel 2005, Wilking vd. 2013). Ekstraselüler matriksin % 97'den fazlasını su oluştururken, % 3'lük kısmını suda çözünebilen jel yapıdaki ekzopolisakkaritler, sürfaktanlar, proteinler ve eDNA ile suda çözünmeyen selüloz, fimbriya, pili flagella ve amiloidler oluşturur (Flemming 2016).

#### 2.2.1.1 Ekzopolisakkaritler

Mikrobiyal hücreler tarafından sentezlenen ekzopolisakkaritler; bileşimleri, dolayısıyla kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından büyük farklılıklar gösterir. Matriks ekzopolisakkaritlerinin çoğu 500-2000 kDa molekül ağırlığında ve oldukça uzun polimerler şeklindedir. Biyofilm oluşum sürecinde ekzopolisakkaritlerin eksikliğinde bakteriler yüzeye tutunabilir ancak çok katmanlı biyofilmler oluşturamazlar, bazı durumlardaysa polisakkaritler yüzey tutunumu için de gereklidir (Lembre vd. 2012). Biyofilmler içerisinde en çok bulunan ve en kapsamlı biçimde incelenen ekzopolisakkaritler aljinat, selüloz ve poli-N-asetil glukozamindir. Aljinat, kahverengi algler ve *Azotobacter vinelandii* ya da *Pseudomonas aeruginosa* gibi farklı bakteri türleri tarafından üretilen bir polisakkarittir. *P. aeruginosa* kromozomunda aljinat üretimi ve iletiminde görev alan yirmi dört tane gen bulunur. Aljinat biyosentezinin regülasyonunda on altı ve aljinat polimerlerinin taşınımında ise sekiz gen rol oynamaktadır (Gacesa 1998). Aljinatlar iki değerlikli şelatlayıcı katyonların varlığında jel bir yapı oluşturabilirler. Aljinat jellerinin mekanik özellikleri polimerde bulunan guluronik asit miktarına bağlı olarak değişir. Dahası, aljinat jelleri, jelatin gibi proteinlerin varlığında *in vitro* olarak da oluşturulabilir (Stokke vd. 2000). Çok sayıda matriks ekzopolisakkariti sentezleyebilen *P. aeruginosa* kistik fibroza sahip hastaların akciğerlerinde koloni oluşturan tek patojen bakteri türüdür. Bu bakterilerin oluşturduğu koloniler başlangıçta mukoid olmayan bir formda olmalarına rağmen zamanla mukoid fenotipe dönüşürler (Govan ve Deretic 1996). Konağın immün sisteminin saldırıları sonucu oluşan oksidatif stresin mukoid olmayan bakterilerin mukoid forma geçişini tetiklediği ileri sürülmektedir (Mathee vd. 1999). Mukoid fenotip aljinat, mannuronik asit ve gluronik asitin fazla üretilmesinden kaynaklanmaktadır (Evans ve Linker 1973). Aljinat sentezini sağlayan genler tam olarak ifade olabildiklerinde, oluşturdukları

mukoid biyofilm tobramisin antibiyotiğine 1000 kat daha dirençli hale gelir (Hentzer vd. 2001). Mukoid olmayan fenotipteki *P. aeruginosa* kolonileriyse aljinattan yoksundur. Bunun yerine bu kolonilerde, matriksin glukozca zengin komponentlerinin sentezinden sorumlu *pelA-G* genlerini içeren *pel* lokusu ile galaktoz ve mannozca zengin komponentlerin sentezini sağlayan *pslA-O* genlerini içeren *psl* lokusu bulunur (Friedman ve Kolter 2004a, 2004b, Jackson vd. 2004). Pel ve psl polisakkaritlerinin ikisi de biyofilm oluşumu sırasında hücre-hücre ve hücre-yüzey etkileşimine katkı sağlamaktadır (Friedman ve Kolter 2004b) Ayrıca *psl* lokusu bakterilerin biyotik yüzeylere tutunmasını sağlar. Bu yolla, *P. aeruginosa*'nın insan akciğerinde biyofilm oluşturarak tutunmasını sağlayan polisakkaritin psl olduğu gösterilmiştir (Ma vd. 2006).

Biyofilmlerin çoğunda bulunan bir diğer ekzopolisakkarit olan selüloz *Salmonella, E. coli, Acetobacter, Agrobacterium ve Rhizobium* gibi bakteri türleri tarafından üretilir (Zogaj vd. 2001). Selüloz, *Salmonella* ve *E. coli* hücre dışı matriksinin önemli bir bileşenidir. Doğrusal glukozdan oluşan selüloz elyaflarının üretimi, glikoz zincirleri arasındaki hidrojen bağlarıyla sağlanmaktadır. Oluşan kristal görünümlü selüloz tabakalar çok kararlıdır ve sayıları bulunduğu ortamın niteliğine göre çeşitlilik gösterir. *Salmonella ve E. coli'*de bakteriyel selüloz sentezi *bcs* operonu tarafından koordine edilen *bcsA, bcsB, bcsC* ve *bcsZ* genleri tarafından gerçekleştirilir. Bu genler susturulduğunda bazı *E. coli* türlerinin biyofilm oluşturma yeteneğini kaybettiği belirlenmiştir ( Re ve Ghigo 2006, Lembre vd. 2012).

Biyofilm oluşumunda önem arz eden bir diğer ekzopolisakkarit olan ve PGA ya da PNAG olarak adlandırılan β-1,6-*N*-asetil-D-glukozamin, *E. coli, Staphylococcus epidermidis, Actinobacillus pleuropneumaniae, Yersinia pestis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gibi çeşitli bakteriler tarafından biyofilm matrikslerinin inşasında kullanılır (Heilmann vd. 1996, Wang vd. 2004, Izano vd. 2007, Izano vd. 2008). N-Asetil glukozaminin sentezi ve iletimi, *Staphylococcus* türlerinde *icaADBC*, Gram-negatif bakterilerde *pgaABCD* ve *Yersinia* türlerinde ise *hmsHFRS* lokuslarındaki genler tarafından kontrol edilir. *N*-asetilglukozamin polimerlerinin sentezini katalize etmekle sorumlu glikoziltransferaz kodlayan genler *pgaC* ve *hmsR* (Vuong vd. 2004) iken, *N*-asetilglukozamin polimerlerinin deasetilasyonundan sorumlu genler *pgaB* ve

*hmsF* genleridir (Darby vd. 2002). PNAG temelde statik büyüme koşullarında gelişen hücrelerle ilişkilidir ve bu polimer deasetilasyonla hücre yüzeyinde taşınabilir hale gelmektedir (Itoh vd. 2008). *E. coli'*de *N*-asetilglikozamin hem bakterilerin yüzeye tutunması hem de çok katmanlı biyofilm oluşumu için gereklidir (Wang vd. 2004). Dahası, bu polimerleri parçalayan metaperiyodat kimyasalı uygulandığında biyofilm içerisindeki hücrelerin dağılmasıyla; hücre-yüzey bağlarının yanısıra hücre-hücre bağlarının da bu polisakkaritlerle gerçekleştiği saptanmıştır (Wang vd. 2004). Bu yapı (*icaADBC* lokusu) *S. epidermidis* türünde de medikal implantlarla ilişkili biyofilm enfeksiyonlarının yerleşmesinde önemli rol oynamaktadır (Fluckiger vd. 2005, Li vd. 2005). *S. epidermidis*'te bu lokusun, bakterinin patojenitesi ve bağışıklık faktörlerinden kurtulması için gerekli olduğu belirlenmiştir (Vuong vd. 2004). Ayrıca pire ısırığı sonucu bakteri biyofilminin aktarımında ve *Y. pestis*'in insan konaklarına iletiminde *hmsHFRS* lokusunun önemli bir faktör olduğu tespit edilmiştir (Hinnebusch ve Erickson 2008).

#### 2.2.1.2 Sürfaktanlar

Bakteri ve funguslar, hidrofilik bileşiklerin emilimini ve tüketimini destekleyen ve suda çözünebilen sürfaktanlar üretir. Biyosürfaktan olarak gruplandırılan bu maddeler; glikolipidler, yağ asitleri, nötral lipidler ve fosfolipidlerdir (Santos vd. 2016). Biyofilm matriksinin temel bileşenlerinden biri olan glikolipidler üzerine yapılan çalışmalarda en çok *P. aeruginosa* biyofilmlerine yoğunlaşılmıştır. Bu bakteri türünün patojenitesinde önemli rol oynayan hücre dışı komponentler; yağ asitleri içerisindeki fosfolipidleri hidroliz eden enzim fosfolipaz C, konak hücresine veya hücre metabolizmasına zarar vererek toksik etki gösteren ekzotoksin A, reaktif oksijen radikallerinin üretilmesine yol açan mekanizmaları harekete geçirerek konakta doku hasarına sebep olan piyosiyanin, peptid bağlarını hidrolize ederek proteinlerin sindirilmesine neden olan proteazlar ve hidrofobik substratların alınımını sağlayan, bakterinin virülansı ve motilitesi üzerinde etkisi olan sürfaktan özellikteki ramnolipidlerdir (McClure ve Schiller 1992). *P. aeruginosa* monoramnolipid ve diramnolipid olmak üzere iki çeşit ramnolipid üretir. Bakterilerde lipopolisakkarit ve aljinat sentezinde görev alan *algC* geni ramnolipid üretiminde de görev alır. Ancak *alg* operonundan kodlanan diğer *alg* genleri ramnolipid

ya da lipopolisakkarit üretiminde rol almazlar (Olvera vd. 1999). *P. aeruginosa*'da ramnolipid üretiminden sorumlu diğer genler *lasI* ve *rhlI* genleridir ve hücre-hücre iletişiminde önemli görevler üstlenmektedirler. Bu genlerin ifadesiyle üretilen ramnoliplerin, enfeksiyonun yayılmasında ve mikroorganizmaların kan dolaşımına katılmasında etkili olduğu bilinmektedir (Pearson vd. 2000). Ramnolipidlerin petrol hidrokarbonlarının biyolojik bozunumuna etkisi endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır. Ramnolipidler doğal bitki örtüsü için potansiyel toksik madde olarak tanımlansa da (Marecik vd. 2012) hidrokarbon çözünürlüğünü artırarak biyolojik bozunumu kolaylaştıran bu bileşiklerin, birçok toksik bileşiğin toksisitesini azalttığını kanıtlayan çalışmalar da bulunmaktadır ( Chrzanowski vd. 2009, Chrzanowski vd. 2011). Birçok bakteri ve maya türü n-alkanları kullanarak çoğalırken, büyük oranda yağ asidi ve fosfolipid üretirler. Yağ asidi ve fosfolipid sürfaktanları özellikle tıbbi süreçler için elzemdir. Örneğin; fosfolipid-protein kompleksinin eksikliği prematüre bebeklerde solunum yetmezliğinin ana sebeplerindendir (Gautam ve Tyagi 2006). Ayrıca tütün mozaik virüsüyle enfekte *Nicotiana glutinosa* bitkisinin tedavisinde ve patateste virüs-x'in neden olduğu hastalığın kontrolü için ramnolipidlerin % 1 emülsiyonu kullanılmaktadır (Bloomberg 1991).

#### 2.2.1.3 Proteinler

Biyofilm yapı ve fonksiyonu üzerine yapılan araştırmalar sonucu proteinlerin öneminin sanıldığından daha büyük olduğu görülmüştür. Biyofilm matriksindeki proteinler kıvrımlı fimbriya, Bap (biyofilm ile ilişkili proteinler) ailesi, lektinler ve ototransporter proteinler olmak üzere dört başlık altında incelenebilir. Kıvrımlı fimbriya ve pili bakterilerin protein yapıdaki yapışkan uzantılarıdır. *E. coli* ve *Salmonella* türleri, biyofilm matriksinin inşasında önemli görevler üstlenen kıvrımlı fimbriya üretir (Gerstel vd. 2003). Kıvrımlı fimbriya *E. coli*'de hücre-yüzey ve hücre-hücre tutunması, çevresel etkenlere karşı direnç ve biyofilm oluşumuna katkı sağlayan amiloid fiber yapısıdır. Kıvrımlı fimbriyanın üretilmesinde; kıvrımlı fimbriyanın alt birimlerini kodlayan *csgBAC* ve transkripsiyonel aktivatör olarak işlev yapan *csgDEFG* operonu görev alır. Ayrıca biyofilmlerle planktonik kültürler kıyaslandığında, fimbriyal gen ifadesinin ve hücre reseptörlerinin sayısının biyofilmlerde çok daha fazla olduğu

gözlenmiştir (Hammar vd. 1995). Fonksiyonel ve yapısal benzerlikleri olan yüzey proteinlerinin bir başka grubunun biyofilm oluşumunu desteklediği gösterilmiştir. Bu proteinler BAP ailesi olarak adlandırılmaktadır. Bakterinin hücre yüzeyinde bulunan yüksek molekül ağırlıklı bu proteinler bakterinin biyofilm oluşturma kapasitesinde ve bakteriyel enfeksiyon sürecinde rol almaktadır (Lasa ve Penadés 2006). Hücre-yüzey proteinleri ve biyofilm matriksinin önemli bir komponenti olarak biyofilm ile ilişkili proteinler, biyofilm oluşumunda önemli görevler üstlenmektedir (Fong ve Yildiz 2007). Lektinler olarak bilinen proteinler diğer hücrelerin yüzeyindeki şeker parçaları ya da matriks komponentleriyle bağlanarak, hücre-matriks veya hücre-hücre etkileşimlerine aracılık eder. Özellikle fukoz ve türevlerine özgü LecB proteininin biyofilm oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Hücre dışı membranla ilişkili olan bu protein, biyofilm içerisindeki hücrelerin yüzeylerine bağlanır ve fukoz içeren ligandlara etki ederek hücre-hücre etkileşimini destekler (Tielker vd. 2005). Ayrıca bu proteinler matriksin polisakkarit komponentlerine bağlanarak biyofilmin genişlemesine de olanak sağlar (Fong vd. 2006). Ototransporter proteinlerse herhangi bir taşıma sistemine ihtiyaç duymaksızın hücre yüzeyine ulaşabilen proteinlerdir (Girard ve Mourez 2006). Bu proteinler kendi ailelerinden olan diğer ototransporter proteinlerle birleşerek, hücre-hücre etkileşimini ve hücrelerin agregasyonunu sağlar (Klemm vd. 2006). İlginç bir biçimde hücre yüzeyinde fimbriyaların bulunması bu proteinlerin hücrelerarası etkileşimini, muhtemelen üç boyutlu kısıtlamalar sebebiyle, engeller (Sherlock vd. 2005).

#### 2.2.1.4 Hücre dışı DNA (eDNA)

Biyofilm matriksinin en önemli yapıtaşlarından biri de hücre dışı DNA (eDNA)'dır. *P. aeruginosa* biyofilmlerine DNaz I uygulamasının biyofilm oluşumunu inhibe etttiği bulgusuyla, eDNA ilk kez 2002 yılında keşfedilmiş (Whitchurch vd. 2002) ve o tarihten itibaren özellikle biyofilm kontrolü çalışmalarında ilgi odağı haline gelmiştir. Yapılan bir çalışmada genomik DNA ile hücre dışı DNA kıyaslandığında, aralarında büyük sekans farklılıkları olmadığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada her iki nükleik asidin sekans analizi gerçekleştirildiğinde; 16S rRNA genlerinin çoğunun ortak olarak bulunduğu, ancak çoğunlukla prokaryot genomlarında görülen korunmuş tekrar

bölgelerinin hücre dışı DNA'da bulunmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca her iki nükleik asit dizisinde 16S rDNA bölgeleri çoğaltılmak istendiğinde, genomik DNA'da çoğalma gerçekleşmiş ancak eDNA'da gerçekleşmemiştir (Böckelmann vd. 2006). Hücre dışı DNA'nın salınım mekanizması ve biyofilmler içerisindeki rolü çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

eDNA'nın *S. aureus* biyofilmlerinde önemli bir yapısal bileşen olduğu keşfedilmesine rağmen, rolü ve yapısal organizasyonu hakkındaki bilgiler kısıtlıdır. Huseby vd. (2010), *S. aureus*'un nötral sfingomiyelinaz ve virulans faktörü olan beta toksinin, eDNA varlığında kendi kendine kovalent çapraz bağlar oluşturduğunu ve çözünmeyen bir *in vitro* nükleoprotein matriksi ürettiğini göstermiştir. Bu etkinin sfingomiyelinaz aktivitesinden ziyade, ligaz aktivitesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Dahası, beta toksinin, bir tavşan modelinde enfeksiyöz endokarditteki rolü ile gösterildiği gibi, eDNA'nın *in vivo* biyofilm oluşumunu artırdığı saptanmıştır. Bu bulgulardan hareketle araştırıcılar, beta toksinin, yalnızca eDNA varlığında çapraz bağlanma ile oluşan temel üzerine stafilokok biyofilmlerinin inşa edilebildiği sonucuna varmışlardır (Huseby vd. 2010).

Çizelge 2.1 eDNA'nın özellikleri ve biyofilm içerisindeki görevleri (Aldecoa vd. 2017)

| eDNA Fonksiyonu | Biyofilm Oluşumunda eDNA'nın İşlevi |
|---|---|
| **Salınım** | eDNA Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde profajlar, fenazinler, proteinler, enzimler, peptidler, antibiyotik ve kimyasalların sebep olduğu hücre lizizi eDNA salınımını tetikler. |
| **Genetik Materyal Değişimi** | eDNA bakteri hücreleri arasındaki gen transferini destekler. |
| **Besin Kaynağı** | eDNA bakteriyel toplulukların gelişebilmesi için karbon, nitrojen ve fosfor kaynağı olarak kullanılır. |
| **Bakteriyel Hücre Yüzey Özellikleri** | eDNA bakteri hücre yüzeyinin hidrofobisitesini değiştirebilir. |
| **Adezyon ve Agregasyon** | eDNA hem planktonik hem de biyofilm formundaki mikroorganizmaların hücre-yüzey ve hücre-hücre tutunumunu destekler. |
| **Biyofilm Mimarisi** | eDNA EPS'nin yapısal bitünlüğünü sağlayan bir iskelet olarak işlev görür ve biyofilmin üç boyutlu mimarisini belirler. |
| **Antibiyotiklerden Korunma** | eDNA biyofilmlerdeki bakteri hücrelerini aminoglikozitler gibi pozitif yüklü antibiyotiklerden korur. |
| **Biyofilm Oluşumunda eDNA Odaklı Mekanizma** | eDNA bakteriyel adezyonu, agregasyonu ve biyofilm oluşumundan sorumlu asit-baz etkileşimlerini destekler. |
| **Biyopolimerlerle İlişkisi** | EPS içerisinde bulunan polisakkaritler, proteinler, enzimler ya da metabolitler ile bağlanabilir. |

Nükleik asitleri parçalayan DNase I etkinliği ile eDNA'nın biyofilmlerdeki rolünü açıklamaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. DNase I, bakterilerin üremeye başladığı süreçte kültür ortamında bulunduğu zaman, biyofilm oluşumunu genellikle inhibe etmekte, ancak biyofilm DNase I yokluğunda geliştiğinde, enzim sonradan eklense dahi oluşan biyofilmin degradasyonunda daha az etkili olmaktadır. DNase I enziminin biyofilm inhibisyonu üzerine iki muhtemel mekanizma öngörülmektedir. Enzim, bakteri yüzeyi ile ilişkili olan ve biyomateryal yüzeylere tutunmayı sağlayan nükleik asitleri çözerek hücre-yüzey etkileşimini baskılayabilir. Alternatif olarak bazı bakterilerin oluşturduğu özellikle genç biyofilmlerde bakteri hücrelerini çevreleyen ve onları birbirine bağlayarak hücre-hücre bağlantısını sağlayan eDNA'yı parçalayabilir (Hall-Stoodley vd. 2008). Bu sebeple etkili konsantrasyondaki DNase I enziminin biyofilm ile mücadelede hem hızlı hem de etkin terapötik ajan olarak güçlü bir aday olduğu düşünülmektedir (Kaplan 2009, Montanaro vd. 2011).

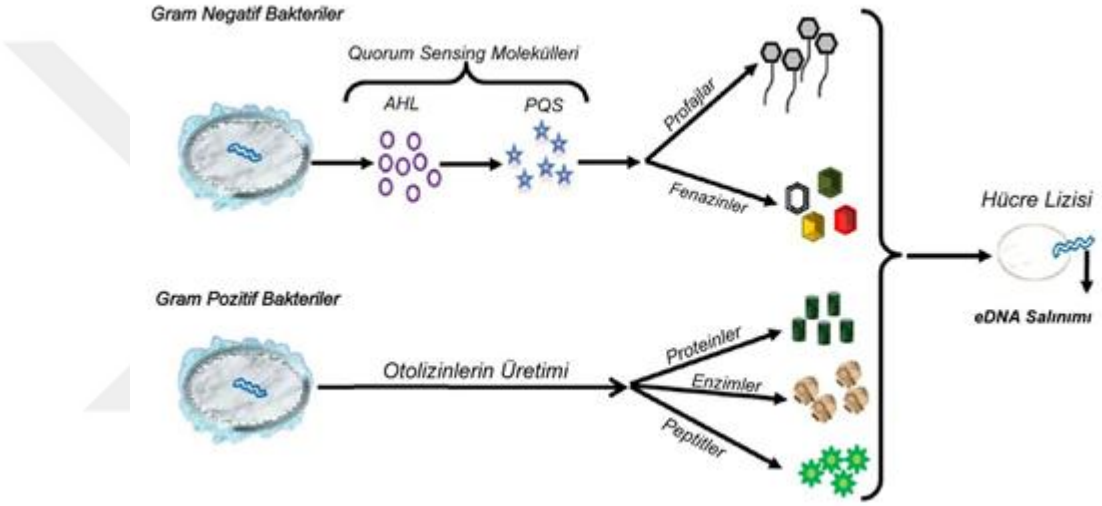
Biyofilm oluşumuna ve biyofilm yapısının stabilizasyonuna katılmanın yanında, salınan eDNA gen aktarım mekanizmalarında da önemli bir yere sahiptir. Bu genetik aktarım virulansın hızla yayılmasının yanı sıra, antibiyotik direnç genlerinin yatay gen transferiyle aktarımı için de bir fırsat yaratır. Biyofilmler içerisinde bulunan bakteri topluluklarındaki ekstraselüler DNA, doğal transformasyon için yetkin bakteriler aracılığı ile, bir bakteri genomundan diğerine genetik bilginin aktarıldığı bir süreç olan yatay gen aktarımı yoluyla genetik bilgi değişiminin sağlanabildiği dinamik bir gen havuzu oluşturur. Yatay gen aktarımının etkisi, virülans özelliklerinin bakteriyel kazanımı ve antimikrobiyal ilaç direnci ile örneklenmektedir. Genleri değiş tokuş edebilen bakterilerin bir örneği Streptokok pnömonilerinde görülmektedir. Kompetent olan hücreler, ekzojen DNA'yı fizyolojik olarak kendi genomlarına entegre edebilme kapasitesi içerirler. Bu durum salgılanan bir kompetent uyarıcı peptit (CSP) ve CSP kökenli sinyal iletim yolağı tarafından düzenlenir. Streptokok pnömonisinde, CSP ortamda 1 ng/ml ila 10 ng/ml arasındaki bir eşiğe ulaştığında, biyofilm içerisindeki bakterilerin bir bölümü parçalanır ve salınan DNA geri kalan popülasyon tarafından kullanılır. CSP sisteminin çeşitli streptokok türlerinde biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğu saptanmıştır (Kausmally vd. 2005). Ekzojen DNA, doğal olarak kompetent olan bakterilerde yatay gen transferi için önemli bir mekanizmayı temsil eder. Bir

biyofilm içerisindeki bakteri popülasyonu esasen homolog olduğu kabul edildiğinde, genetik bilgiyi popülasyon yoluyla aktarmanın nihai amacı belli değildir. Spoering ve Gilmore, kardeş hücrelerden alınan DNA'nın, prokaryotlarda rekombinasyon ile fayda sağlayabileceğini savunmuştur; çünkü DNA alımı, rastgele ortaya çıkan bazı yararlı mutasyonların bakteri popülasyonunda birikmesine neden olur ve bu durum bakterinin evrimsel süreci için önem teşkil eder (Spoering ve Gilmore 2006).

Yatay gen transferi yoluyla antibiyotik direncinin ortaya çıkması ve yayılması, bir biyofilm içerisinde salınan eDNA kaynaklı olabilir. Kazanılan antibiyotik direnci, duyarlı bakteri izolatlarından mutasyon ya da direnç genlerinin aktarımı sonucu ortaya çıkabilir. Ancak, bakteri popülasyonundaki mutant hücrelerin oranı genellikle çok düşüktür, direnç genlerinin yayılımı yalnızca uzun süreli antimikrobiyal tedavi sırasında ender görülen mutantların pozitif seleksiyonu ile değil, aynı zamanda mutantlar tarafından eDNA'nın salınması ve kardeş bakteri hücreleri tarafından DNA moleküllerinin alınımıyla da gerçekleşir. Yüksek hücre yoğunluğuna sahip biyofilm üretimi ve eDNA salınımı, yatay gen aktarımı ile antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına sinerjik olarak katkıda bulunur (Sykes 2010).

Gram negatif ve Gram pozitif mikroorganizmaların yaşam döngüsünde eDNA salınımı hem quorum sensing (Yeter sayı algılama sistemi / QS) bağımlı hem de quorum sensing bağımsız mekanizmalar tarafından kontrol edilen, bakteri populasyonundaki hücrelerin bir kısmının parçalanması yoluyla gerçekleşir. Bu mekanizmalar logaritmik ve erken stasyoner fazda aktif hale gelirler (Price-Whelan vd. 2006). Hücre dışı DNA salınım mekanizmaları, Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde farklılık gösterir. Gram negatif *P. aeruginosa,* kistik fibroz hastalarının akciğerlerinde kronik enfeksiyona sebep olan fırsatçı patojen bir türdür ve yüksek oranda eDNA üretir. Öyle ki enfeksiyona maruz kalmış kistik fibroz hastalarının balgamları incelendiğinde eDNA'nın balgamı viskoz hale getirdiği ve bu hastalarda solunum zorluğuna neden olduğu bilinmektedir. Balgamın viskozitesini azaltmak için hastalara solunum cihazı yoluyla aerosol hale getirilmiş DNaz I enzimi verilmektedir (Bakker ve Tiddens 2007). *P. aeruginosa*'da eDNA üretimi QS-bağımlı ya da QS-bağımsız mekanizmalarla gerçekleşmektedir. QS-bağımlı mekanizmalarda flagella ya da tip IV pili tarafından kontrol edilen uyarılmış

profaj aracılığıyla hücre lizisi gerçekleşir ve bu mekanizmalar bazal düzeydeki eDNA salınımından sorumludur (Allesen-Holm vd. 2006). Açillenmiş homoserin laktonlar (AHL) ya da *Pseudomonas* kinolon sinyal molekülleri (PQS) gibi quorum sensing molekülleri, profaj ve fenazin hücre lizis faktörlerinin üretimini kontrol ederek, hücre lizisine neden olur ve eDNA salınımını tetikler. Fenazinler *P. aeruginosa*'nın reaktif oksijen molekülleri üretmesine sebep olarak, diğer bakteri ve fungusları öldürmesi ve bu bakterilere koruma sağlaması sebebiyle antibiyotik olarak sınıflandırılırlar (Price-Whelan vd. 2006) (Şekil 2.6).



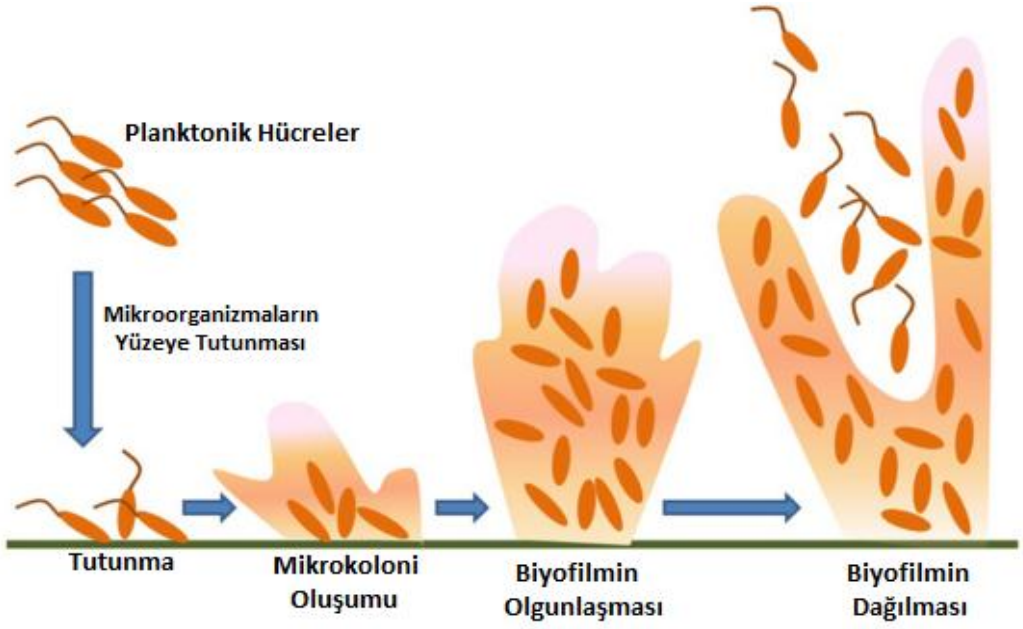

Şekil 2.6 Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde eDNA salınım mekanizmaları (Das vd. 2013)

Gram pozitif bakterilerdeyse QS-bağımlı mekanizmalar aracılığıyla kontrol edilen bakteri hücreleri, çoğunlukla otolizinler tarafından tahrip edilir. *S. epidermidis*'te eDNA salınımı *atlE* geni tarafından kodlanan otolizin AtlE proteini aracılığıyla gerçekleşmektedir. AtlE protein *S. epidermidis*'in hücre yüzeyine konumlanarak ortamda bulunan bakteri popülasyonunun bir kısmını lize eder ve böylece eDNA salınımını tetikler. Ayrıca *S. epidermidis* cinsi bakterilerde *atlE* geni baskılandığında kitlesel hücre tahribinin büyük ölçüde indirgendiği ve eDNA üretimininse en az % 90 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Qin vd. 2007).

### 2.2.2 Biyofilm oluşum aşamaları

Biyofilm oluşum süreci bir seri fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametre tarafından kontrol edilmektedir. Biyofilm oluşum aşamaları, dönüşümlü tutunma, dönüşümsüz tutunma, biyofilmin olgunlaşması ve biyofilmin dağılması olmak üzere dört temel aşamadan oluşmaktadır (Stoodley vd. 2002) (Şekil 2.7).

Farklı çalışmalarda; bakteri hareketliliğinin, hücre zarı proteinlerinin, hücre dışı polisakkaritlerin ve sinyal moleküllerinin biyofilm oluşumunda önemli rol oynadığını gösterilmiştir. Biyofilm oluşumunun ilk basamağında planktonik mikrobiyal hücreler tutunmadan önce fimbriya veya flagella gibi uzantılarıyla yüzey boyunca hareket ederler. Bakterilerin tutunacakları biyotik ya da abiyotik yüzeyin sıcaklık, pH, basınç, besin olarak kullanılabilecek organik ve inorganik bileşikler bakımından elverişli olması gerekmektedir (Marić ve Vraneš 2007). Mikrobiyal hücrelerin bir yüzeye tutunması adezyon olarak adlandırılırken, mikrobiyal hücreler arasındaki tutunma kohezyon olarak adlandırılır. Bakterilerin yüzeylere adezyonu van der Waals bağları, sterik ve elektrostatik etkileşimler yoluyla gerçekleşmektedir. İlk etkileşim kurulurken, bakteri ve yüzey arasındaki sabit bağ, spesifik hücre zar proteinleri olan adezinler tarafından korunur. (Garrett vd. 2008).




Şekil 2.7 Bakteriyel biyofilm oluşum aşamaları (Gupta vd. 2016)

Biyofilm oluşumunun en önemli aşaması olan dönüşümsüz tutunma aşamasında ilk tutunmayı sağlayan flagella, fimbriya ve pili gibi uzantıların, yüzeyin elektriksel tabakasının fiziksel itici kuvvetlerinden daha güçlü duruma geldiği ve bakteriler ile yüzey arasındaki etkileşimi güçlendirdiği bilinmektedir. Dönüşümsüz tutunma gerçekleşirken mikrobiyal hücre ve yüzey arasında dipol-dipol bağları, hidrojen bağları, iyonik bağlar, kovalent bağlar ve hidrofobik etkileşimlerle polimerik fibril yapıda bir köprü oluşur. Geri dönüşümsüz olarak tutunan bakterilerin ortamda bulunan besinleri kullanarak gelişmesi ve bölünmesiyle mikrokoloniler oluşmaya başlar. Bakteri hücrelerinin çoğalmasıyla büyüyen mikrokoloniler birleşir ve yüzeyi kaplarlar (Kumar ve Anand 1998).

Biyofilmi oluşturan mikrobiyal hücrelerin ekstraselüler polimerik bir matriks üretmeleriyle biyofilmin olgunlaşması aşaması başlar. İçeriğinde polisakkaritler, fosfolipidler, proteinler ve nükleik asitler barındıran ekstraselüler matriks koruyucu bir kılıf gibi, birleşen mikrokolonileri çevreler. Böylece biyofilmin üç boyutlu mantar benzeri yapısı oluşur. Bu mantar benzeri yapı içerisinde su ve besin geçişine izin veren kanallar, porlar ve gözeneklerle karmaşık görünen, ancak bir o kadar düzenli mimari yapı oluşur. Bu kanallar ayrıca bakteri hücrelerinin birbirleriyle iletişimini sağlayan quorum sensing moleküllerini de taşır. Quorum sensing sistemi bakterilerin gen ekspresyonunu hücre yoğunluğuna bağlı olarak koordine etmesini sağlar. Bu sistem, bakteriler tarafından salgılanan ve hücre dışı ortamda biriken otoindüktör adlı küçük moleküller tarafından aktif hale getirilir. Böylece quorum sensing sistemi otoindüktör moleküllerinin konsantrasyonu belli bir seviyenin üstüne çıktığı zaman devreye girer (Karatan ve Watnick 2009). Biyofilm oluşumu ile quorum sensing arasındaki ilişki yoğun olarak *P. aeruginosa* biyofilmlerinde çalışılmıştır. *P. aeruginosa* biyofilmlerinin oluşumunda *lasl* ve *rhll* adlı iki genin ekpresyonunun önemi vurgulanmıştır. *lasl* geninin planktonik mikrobiyal hücrelerin yüzeye tutunmasından ve mikrokoloni oluşumunundan sorumlu olduğu, *rhll* geninin ise biyofilmin üç boyutlu yapısının oluşmasında etkili olduğu saptanmıştır. Yine *P. aeruginosa* biyofilmleri üzerine gerçekleştirilen başka bir çalışmada, *P. aeruginosa* biyofilmlerinin planktonik forma kıyasla farklı bir protein profili sergilediği ve tespit edilebilen proteomun yarısından fazlasının biyofilmlerde altı ila sekiz kat daha fazla ifade olduğu gözlenmiştir (Sauer vd.

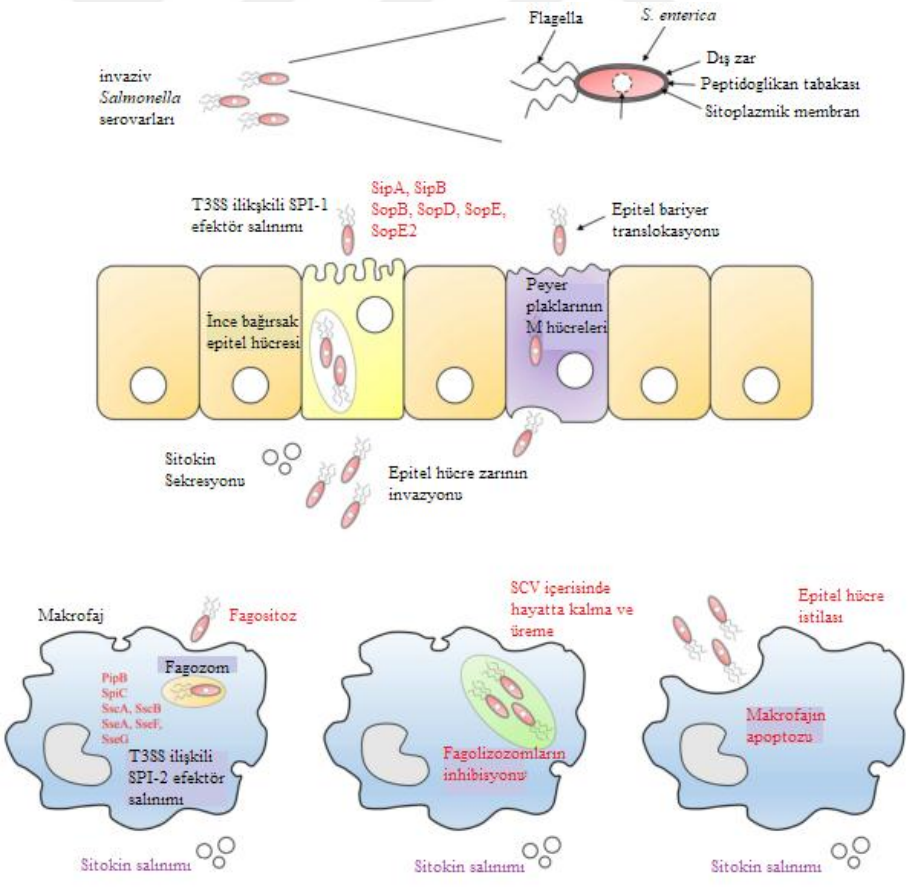
2002). *P. aeruginosa*'nın planktonik formuna kıyasla biyofilmlerinde translasyon, membran taşınımı, metabolizma, salgılama ve gen regülasyonuna katılan genlerin ifadelerinin arttığı belirlenmiştir (Whiteley vd. 2001).

Olgunlaşan biyofilmin dağılması aşamasında, biyofilmi oluşturan hücreler biyofilmden ayrılarak dağılır ve yeni koloniler oluşturmak üzere göç ederler. Biyofilm yaşam döngüsünün belki de en önemli aşaması olan dağılma aşaması, bakteri hücresinin sağ kalımı ve enfeksiyon salgını için büyük önem arzetmektedir. Biyofilm oluşumunun diğer aşamalarında olduğu gibi; dağılma aşamasında da sinyal iletim yolakları, çevresel sinyaller ve efektörlerin katılımıyla karmaşık bir süreç gerçekleşmektedir (Karatan ve Watnick 2009). Dağılma aşaması kabuk değiştirme, erozyon ve aşınma olmak üzere üç fiziksel mekanizma ile açıklanır. Kabuk değiştirme biyofilm kütlesinin bir kısmının rastgele kaybı şeklinde gerçekleşir. Erozyon fiziksel kuvvetler ya da hücre içi salgı mekanizmalarıyla biyofilmi oluşturan mikrobiyal hücrelerin toplu ölümleri şeklinde gerçekleşir. Aşınma ise biyofilmi çevreleyen ekstraselüler matriksin bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak biyofilmin dağılmasıdır. Biyofilmin dağılma süreci ayrıca hidrodinamik kuvvetler, ekstraselüler matriksin enzimler aracılığıyla parçalanması ve flagellin proteininin ekspresyonunun artması gibi faktörler sebebiyle de tetiklenebilir (Boyd ve Chakrabarty 1994, Watnick ve Kolter 2000).

## 2.3 *Salmonella* Cinsi Bakterilerin Biyofilm Yapısı ve Önemi

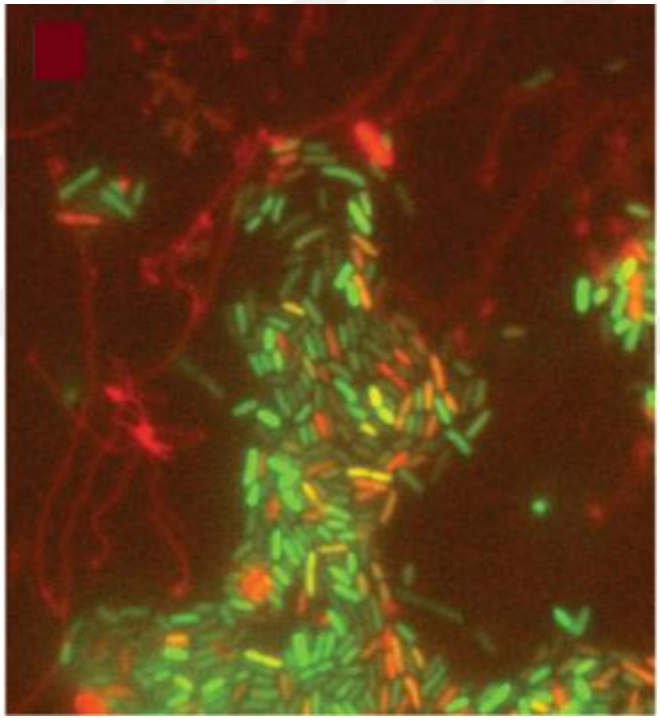
Dünya üzerinde milyonlarca insanı enfekte ederek gastroenterit, salmonelloz ve enterik ateş gibi hastalıklara sebep olan *Salmonella* cinsi bakteriler doğada yaygın olarak bulunan bakteriyel patojenlerdir ve çeşitli gıdalarda canlılıklarını sürdürürler. Tavuk eti başta olmak üzere et ürünleri, yumurta ve süt ürünleri *Salmonella* cinsi bakterilerin en yaygın bulaşı araçlarıdır. Son yıllarda meyve ve sebze gibi taze ürünler de, kontaminasyonun gıda zinciri boyunca birçok aşamada oluşabileceği iletim araçları olarak endişeye sebep olmaktadır (Pui vd. 2011). *Salmonella*'nın invazyon yöntemi ise, diğer bakterilere göre büyük farklılık göstermektedir. *Salmonella* ile kontamine yiyeceklerin konak tarafından tüketilmesi sonrasında bu bakteri bağırsak epitel bariyerinin dentritik hücrelerini ve enterositlerini istila ederek, bağırsaklarda kolonize

olur. Bu bariyeri geçme konusunda kompleks zar yapısı sebebiyle başarılı olan *Salmonella* türleri, proksimal bölgedeki makrofajlarla karşı karşıya kalır ve ince bağırsakları çevreleyen peyer plaklarının M hücreleri ile yer değiştirerek, bakteriyel adezin T3SS-1 tarafından kodlanan SPI-1 efektör proteinlerini salgılayarak ya da yine bir bakteriyel adezin olan fimbriyayı kullanarak makrofajları aktif şekilde istila eder. *Salmonella*, makrofajlar içerisinde SCV (*Salmonella* içeren vakuol) olarak bilinen fagozom ve lizozomdan farklı bir membrana bağlı bölme içerisine yerleşir (Hurley vd. 2014). *Salmonella* yerleştiği SCV membranının lipid ve proteinlerinin içeriğini değiştirir ve *Salmonella* patojenite adası 1 (SPI-1) tip III salgı sistemi efektörlerini kullanarak SCV ile temas halinde bulunan sitoiskelet elementlerini manipüle eder. Böylece bu hücresel kompartımanda, *Salmonella* konağın antimikrobiyal savunma mekanizmalarına rağmen hayatta kalabilir ve çoğalabilir (Kolodziejek ve Miller 2015) (Şekil 2.8).




Şekil 2.8 *Salmonella* invazyon mekanizmaları (Hurley vd. 2014)

Gerçekleştirilen bir çok çalışma *Salmonella*'nın metal, plastik ya da kauçuk yüzeylere tutunma ve bu yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğuna işaret etmektedir (Sinde ve Carballo 2000, Stepanović vd. 2004). Biyofilm oluşumunun temel aşamaları *Salmonella* biyofilmlerinde de gerçekleşmektedir. Bu aşamalar hücrelerin yüzeye tutunmasını takiben oluşan mikrokolonilerin birleşmesi, mikrobiyal hücrelerin EPS üretimi ile üç boyutlu mantar benzeri yapının oluşumu sürecini içeren biyofilmin olgunlaşması (Şekil 2.9) ve biyofilm bütünlüğünün bozulmasıyla hücrelerin yeni konaklar bulmak üzere dağılması şeklinde gerçekleşen yaşam döngüsünü içerir (Stepanović vd. 2004)



Şekil 2.9 *Salmonella* biyofilmlerinde görülen üç boyutlu mantar benzeri yapı (Johnson vd. 2013)

*Salmonella* biyofilmlerinin ekstraselüler matriks komponentleri bakterinin bulunduğu çevresel koşullara ve besin çeşitliliğine göre farklılık göstermektedir. Rdar (red, dry and rough; kırmızı, kuru ve pürüzlü) morfotipi, EPS bileşimi ve regülasyonu bakımından *Salmonella* biyofilmlerinde baskın olarak görülmektedir. Rdar kolonileri ağırlıklı olarak protein içeren bileşiklerden ve ekzopolisakaritlerden oluşur. Protein yapıdaki bileşenler,

yapışkan kıvrımlı fimbriya ve BapA proteinini içerir (Latasa vd. 2005, Castelijn vd. 2012). *Salmonella* genomunda *csgBAC-csgDEFG* operonları tarafından kodlanan kıvrımlı fimbriya, konakçı kolonizasyonu, biyofilmin sürdürülebilirliği, invazyon ve motilite gibi süreçlerde önemli derecede agregan özellik gösteren amiloid benzeri hücre yüzey proteinleridir. *Salmonella* biyofilmleri incelendiğinde; kıvrımlı fimbriyanın biyofilm oluşumu sırasında hücrenin yüzeyle ilk temasını ve tutunmasını sağlamasının yanında, hücre-hücre etkileşimlerini de teşvik ediyor olması sebebiyle biyofilmer için çok büyük öneme sahip olduğu tespit edilmiştir (Barnhart ve Chapman 2006). Hücre dışı matriks yapısında büyük oranda selüloz bulunan *Salmonella* biyofilmleri, O-antijenik kapsül (O-Ag kapsülü) ile lipopolisakkaritler gibi farklı ekzopolisakkaritler de içerir. *Salmonella* cinsi bakterilerin epitel hücreleri üzerinde biyofilm oluşturabilmeleri için fimbriyalar [tip 1 (fim), uzun polar fimbriya (lpf), plazmid kodlu fimbriya (pef), bovin kolonizasyon faktörü (bcf), kıvrımlı fimbriya (csg)], selüloz ve kolanik asit elzemdir (Ledeboer ve Jones 2005, Ledeboer vd. 2006). O-Ag-kapsülü ve fimbriyanın alt birimleri ise *Salmonella* biyofilmlerinin hidrofobik safra taşları üzerinde biyofilm oluşturabilmeleri için büyük önem arzetmektedir (Crawford vd. 2010). *Salmonella* cinsi bakterilerin bitki yüzeylerine tutunarak biyofilm oluşturabilme yetenekleri ise selüloz, O-Ag-kapsülü, kıvrımlı fimbriya ve flagellanın ifade düzeyine bağlıdır (Barak ve Liang 2008, Berger vd. 2009). Kolanik asit *Salmonella* biyofilmlerinin ekstraselüler matriksinde kapsüler hücre dışı polisakkarit olarak bulunur. *Salmonella*'nın, epitel hücreleri üzerinde üç boyutlu yapılar oluşturması ve HEp-2 hücrelerinin yüzeyindeki ince biyofilm tabakasının oluşumu için kolanik asitin gerekli olduğu bilinmektedir (Ledeboer vd. 2006). Benzer şekilde, kolanik asit *E. coli* biyofilmlerinin karmaşık üç boyutlu mimarisine katkıda bulunur (Danese vd. 2000). Dahası, kolanik asidin, LB ortamında oluşturulan *Salmonella* biyofilmlerinde sıkı bir pelikül yapısı oluşumu bakımından da önem taşıdığı gösterilmiştir (Solano vd. 2002).

*S.* Typhimurium genomunda, kıvrımlı fimbriyaya (csg) ek olarak, biyofilm oluşumunda önemli olduğu gösterilen 12 tane farklı fimbriyal operon bulunmaktadır. Örneğin; tip 1 fimbriyaların, HEp-2 hücreleri ve tavuk bağırsak dokusu kullanılarak, *Salmonella* bakterilerinin epitel hücre katmanlarına tutunması ve biyofilm oluşumu için gerekli olduğu saptanmıştır (Boddicker vd. 2002).

Yapılan bir çalışmada, epitel hücreleri üzerinde biyofilm oluşum kapasitesi, *fimH* adezin geninin farklı alellerini eksprese eden *S.* Typhimurium suşları için önemli derecede değiştiği, ve mutant *fimH* genine sahip bakteriler biyofilm oluşturma özelliklerini kaybettiği belirlenmiştir. Bu gen, tip 1 fimbriyaların üzerinde yer alan ve hücreleri mannoz kalıntılarının tutunması için yönlendiren FimH adezin proteinini kodlar. Biyofilm oluşumunda fimbriyanın öneminin vurgulandığı bir diğer çalışmada HEp-2 hücreleri üzerindeki tek katmanlı biyofilm oluşumunun, beş metabolik gen kümesi (*pef, csg, lpf, bcf ve sth*) tarafından düzenlendiği ve bu genlerin merkezi metabolizma, konjugatif DNA transferi, antibiyotik direnci, hücre içi hayatta kalma ve kolanik asit biyosentezi gibi çeşitli süreçleri de gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Ledeboer vd. 2006, Re ve Ghigo 2006). *E. coli*'ye çok sayıda antibiyotik direnci kazandıran konjugatif pOLA52 plazmidinin *S.* Typhimurium biyofilmlerinde fimbriyal ekspresyonun artmasına sebep olarak biyofilm oluşumunu da artırdığı saptanmıştır. Bu durum, biyofilm oluşumu için önemli genlerin potansiyel aktarımı açısından birden fazla türün oluşturduğu biyofilmlerde hücreler arasındaki yakınlığın ve konjugasyonun potansiyel önemini vurgular. Ayrıca, eşlenik aktarım mekanizmaları, yapışma faktörlerinın fazla ekspresyonu (konjugatif pili) sebebiyle biyofilm olgunlaşmasına olanak sağlar (Ghigo 2001, Reisner vd. 2003).

*S. aureus* yüzey proteini Bap ile homoloji gösteren, prolin-treonin aminoasitleri bakımından zengin olan ve 386 kDa molekül ağırlığına sahip BapA proteini *S.* Enteritidis'in rdar morfotipinin oluşumunda ikinci önemli bileşendir (Cucarella vd. 2001). BapA proteininin, LB koşulları altında hava-sıvı arayüzünde bakteri birikimi ve daha sonra pelikül oluşumu için önemli olduğu gösterilmiştir. Hücre-yüzey ilişkisini artırdığı tespit edilen BapA proteini, *bapABCD* operonu tarafından kodlanan BapBCD tip I protein sekresyon sistemi yoluyla salgılanmaktadır ve BapA proteininin salınımının *Salmonella* biyofilmlerinin gelişimi için kesinlikle gerekli olduğu belirtilmektedir. BapA proteininin aşırı ifade edilmesi, *Salmonella*'nın pelikül ve biyofilm yapısında büyük oranda artışa sebep olmaktadır. Bunun yanında *BapA* geni baskılanan *Salmonella* cinsi bakterilerin LB besi ortamında pelikül yapısı oluşturamadıkları belirlenmiştir. Bu gözlemler ile, BapA proteininin bireysel hücrelerin homofilik etkileşimler yoluyla

yüzeye doğrudan bağlanmasında veya kıvrımlı fimbriya aracılı ilişkilerin güçlendirilmesinde rol oynayabileceği öngörülmektedir (Latasa vd. 2005).

*Salmonella* biyofilmlerini oluşturan hücre dışı matriksin en önemli bileşeni selülozdur. *BcsABZC-bcsEFG* genleri tarafından kodlanan ve bir β-1-4-D-glikoz polimeri olan selüloz, biyofilm ile ilişkili önemli bir polisakkarittir. Karakteristik rdar morfotipi ile ilişkili olan selüloz, yapışkan dokudan sorumlu uzun menzilli hücre-hücre etkileşimlerini desteklemektedir (Solano vd. 2002, Zogaj vd. 2003).

Doğada en çok bulunan organik polimerlerden biri olan selüloz nispeten basit bir yapıya sahiptir ve genellikle bitki hücre duvarıyla ilişkilendirilirken, aslında biyofilm oluşumu sırasındaki koruyucu, mimari ve düzenleyici fonksiyonu sebebiyle bazı bakteri türleri tarafından sentezlenebilir (Ude vd. 2006, Gualdi vd. 2008) Selülozun biyofilm matriksindeki görevi ilk kez *S.* Typhimurium biyofilmlerinde belirlenmiştir ancak *S.* Typhimurium gibi *E. coli* genomunda da korunmuş selüloz sentaz gen kümeleri keşfedilmiştir (Zogaj vd. 2001). *E. coli* suşlarında selüloz üretimi detaylı incelendiğinde, selüloz sentezinde yer alan proteinlerin iki ayrı operandan kodlandığını ortaya çıkmıştır: *yhjR-bcsQABZC* ve *bcsEFG* BcsA ve BcsB proteinleri, zar içerisinde bulunan selüloz sentaz kompleksinin iki alt birimini oluşturur ve UDP-glukozu selüloza dönüştürür (Quéré ve Ghigo 2009).

Selüloz biyofilm oluşumu için açıkça gerektiği halde *E. coli* MG1655 suşunda aşırı selüloz üretimi, biyofilm oluşumu ve hücre agregasyonu üzerinde negatif bir etkiye sahiptir. Aşırı sentezlendiğinde, selülozun kıvrımlı fimbriyaları aşırı selüloz ile kaplayıp maskeleyerek kıvrımlı fimbriya aracılı yapışmaya dayanan biyofilm türlerinin oluşumunu engellediği öne sürülmüştür. Burada, selülozun aşırı ekspresyonunun, *E. coli*'nin kuruma direncini arttırdığı ve büyük curli alt birim CsgA'yı kodlayan genin silinmesinin kuruma direncinde bir azalmaya neden olduğu ortaya çıkmaktadır. Böylece kıvrımlı fimbriya ve selülozun *E. coli*'yi çevresel streslere karşı korumak için birlikte çalışabileceği öne sürülmüştür (Gualdi vd. 2008). Bu konuda gerçekleştirilen bir çalışmada, *E. coli* biyofilm oluşumunun, bakterileri hem nematod *Caenorhabditis elegans* hem de yırtıcı Gram negatif bakteri *Myxococcus xanthus*'a karşı koruduğunu

gösterilmiş ve bu koruyucu özelliğin hem selüloz hem de kıvrımlı varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir (DePas vd. 2014).

## 2.4 Enzim ve Antibiyotik Uygulamaları ile *Salmonella* Biyofilmlerinin Eradikasyonu

*Salmonella* cinsi bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin eradikasyonu için çeşitli çalışmalar yapılmakta ve bu amaçla bakteriyofajlar, bakteriyosinler, quorum sensing inhibtörleri, doğal kaynakların yanı sıra konvansiyonel antibiyotikler ve enzimler de kullanılmaktadır.

Zhang vd. (2013), birbirleriyle konjuge olabilen kitosan polisakkariti ile aminoglikozid grubu antibiyotiklerden streptomisini kullanarak, hem her bir ajanı ayrı ayrı, hem birlikte hem de konjuge formda muamele etmiş ve bu ajanlar varlığında 24 saatlik biyofilm oluşturmak suretiyle kıyaslama yapmışlardır. Sonuçlar incelendiğinde streptomisin antibiyotiğinin ve kitosan-streptomisin konjugasyonunun hem biyofilm kütlesini hem de biyofilm içerisindeki canlı hücre miktarını azalttığı tespit edilmiştir (Zhang vd. 2013).

Xu vd. (2008), gerçekleştirdikleri çalışmada insan izolatı ve güçlü biyofilm üreticisi olan 5 adet *S.* Typhimurium suşunun oluşturduğu biyofilmler üzerine gentamisin, sefotaksim ve siprofloksasin antibiyotiklerinin etkilerini incelemiş ve biyofilm yapılarının antibiyotik konsantrasyonuna bağlı olarak etkilendiğini saptamışlardır. Araştırıcılar bu yolla antibiyotikler için etkin biyofilm eradikasyon konsantrasyonları önermişlerdir (Xu vd. 2008).

Chandra vd. (2017), tarafından yürütülen bir başka çalışmada *S.* Typhimurium serovaryeteleri tarafından oluşturulan biyofilmler üzerine; DNA tamiri esnasında DNA ligasyonunu inhibe ederek etki gösteren kinolon grubu antibiyotiklerden enrofloksasin, prokaryotik ribozomların 16S ve 30S alt birimine bağlanarak doğru aminoasitlerin üretilememesine sebep olan aminoglikozid grubu antibiyotiklerden streptomisin, amikasin ve gentamisin antibiyotikleri ile mikrobiyal ribozomların 30S altbirimine

bağlanarak yeni amino asitlerin oluşan peptid zincirlerine katılmasını engelleyerek etki gösteren tetrasiklin antibiyotikleri ile muamele edilmiş ve antibiyotiklerin biyofilm oluşumuna etkisi incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında her bir antibiyotiğin *S.* Typhimurium biyofilmlerini en az % 30 oranında inhibe ettiği ve bu oranın kinolon grubu antibiyotiklerde % 50 düzeyine çıktığı tespit edilmiştir (Chandra vd. 2017).

*Salmonella* biyofilmlerine enzimlerin ve eDNA'nın etkisinin belirlenmesini amaçlayan araştırmalarda, *Salmonella* suşlarının hem DNaz I hem de hücre dışı DNA varlığında geliştirilen biyofilmleri, hiçbir ajan kullanılmaksızın geliştirilen biyofilmlerle kıyaslanmıştır. Elde edilen bulgular, hücre dışı DNA varlığında geliştirilen 6, 12, 24 ve 48 saatlik biyofilmlerin negatif kontrol grubuna oranla önemli ölçüde zayıf geliştiğine işaret etmiştir. Bunun yanında 50 µg/ml ve 100µg/ml DNaz I varlığında ve DNaz I uygulanmaksızın cam diskler üzerinde sıvı-hava ara fazında geliştirilen biyofilmlerin üç boyutlu görüntüleri incelendiğinde; DNaz I ugulanan biyofilmlerin, uygulanmayanlara kıyasla daha kalın olduğu ve biyofilm kütlelelerinin enzim konsantrasyonuna bağlı olmaksızın önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Wang vd. 2014).

Wang vd. (2016), ise kültürleri birleştirilerek kokteyl haline getirdikleri yedi *Salmonella* serovaryetesini (*S.* Typhimurium, S. Enteritidis, *S.* Infantis, *S.* Stanley, *S.* Agona, *S.* Derby and *S.* Indiana); proteinaz K, dispaz II, selülaz, glukozid amilaz ve subtilisin enzimleri varlığında paslanmaz çelik yüzeylerde 20 °C'de 132 saat inkübe etmiş ve bu enzimlerin biyofilm üzerine etkilerini araştırmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, örneklerin seri dilüsyonları gerçekleştirilerek canlı hücre sayımı yapıldığında; proteinaz K, dispaz II, selülaz ve subtilisin enzimleriyle muamele edilmiş örneklerde canlı hücre miktarında enzim konsantrasyonuyla orantılı biçimde azalma gerçekleştiği, glukozid amilaz enziminin ise her bir konsantrasyonda hemen hemen aynı derecede etki gösterdiği tespit edilmiştir (Wang vd. 2016).

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1 Materyal

### 3.1.1 Bakteriler

Tez çalışmasında kullanılan *Salmonella* suşları (n=2; 1 adet DMC4 kodlu, 1 adet *S.* Typhimurium SL1344 suşu) Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı bünyesinde oluşturulan kültür koleksiyonundan sağlandı. Stok kültürler -80 ºC'de % 60 gliserol ilave edilen Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerinde saklandı. Biyofilm çalışması süresince denenecek kültürler, NaCl içermeyen LB sıvı besiyerinde [bacto-tryptone 10 g/L (Merck, Almanya), maya ekstraktı 5 g/L (Merck, Almanya)], 37 °C'de bir gece geliştirildikten sonra denemeye alındı (Römling vd. 1998). Kültür koleksiyonundan elde edilen ve biyofilm üretim kabiliyeti olan suşların listesi çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Salmonella* suşları

| Suş Kodu | Suş Adı |
|---|---|
| **DMC4** | Typhimurium |
| **M43*** | Typhimurium SL1344 |

*M43 *Salmonella* Typhimurium SL1344 (referans suş)

### 3.1.2 Besiyerleri

Çizelge 3.2 Luria Bertani Broth ve Agar (Merck, Germany)

| İçerik | g/L |
|---|---|
| Tripton | 10 g |
| Maya Ekstraktı | 5 g |
| Sodyum Klorid | 10 g |
| Agar | 15 g |

Besiyeri içeriği 800 mL dd$H_2O$ içerisinde çözüldükten sonra besiyeri hacmi yine dd$H_2O$ ile 1000 mL'ye tamamlanır. Ortam pH'sı 7.0 ± 0.02'ye ayarlandıktan sonra sıvı besiyeri cam tüplere dağıtılarak, katı besiyeriyse agar ilavesinden sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilir. Katı besiyeri 55˚C'ye kadar soğutulduktan sonra petrilere dağıtılır

Çizelge 3.3 Luria Bertani Broth (/-NaCl)

| İçerik | g/L |
|---|---|
| Tripton (Fluka, France) | 10 g |
| Maya Ekstraktı (Merck, Germany) | 5 g |

Besiyeri içeriği 800 mL dd$H_2O$ içerisinde çözüldükten sonra besiyeri hacmi yine dd$H_2O$ ile 1000 mL'ye tamamlanır. Ortam pH'sı 7.0 ± 0.02'ye ayarlandıktan sonra sıvı besiyeri cam tüplere dağıtılarak otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilir.

### 3.1.3 Çözeltiler

Çizelge 3.4 Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)

| İçerik | g/L |
|---|---|
| NaCl | 8 g |
| KaCl | 0,2 g |
| Na2HPO4 | 1,44 g |
| KH2PO4 | 0,24 g |

Ortam içeriği 800 mL dd$H_2O$ içerisinde çözüldükten sonra çözelti hacmi yine dd$H_2O$ ile 1000 mL'ye tamamlanır. Ortam pH'sı 7.2 ± 0.02'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilize edilir.

Çizelge 3.5 Tris/EDTA

| İçerik | g/L |
|---|---|
| Tris | 1,21 g |
| EDTA | 0,37 g |

Ortam içeriği 1000 ml distile su içerisinde çözülür. Çözeltinin pH'sı 7.0 ± 0.02 ayarlanır. Sterilizasyon işlemi 121 °C'de 15 dakika süre ile gerçekleştirilir.

Çizelge 3.6 CTAB/NaCl

| İçerik | g/100 mL |
|---|---|
| NaCl | 4,1 g |
| CTAB | 10 g |
| $ddH_2O$ | 100 ml |

NaCl 80 mL distile su içerisinde çözülür. 10 g CTAB yavaş yavaş eklenir. CTAB'ın çözünmesi için çözelti aralıklarla 65 °C'ye kadar ısıtılır. Son aşamada toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Çizelge 3.7 % 10'luk SDS Çözeltisi

| İçerik | g/100 mL |
|---|---|
| SDS | 10 g |
| $ddH_2O$ | 100 ml |

SDS 80 ml distile su içerisinde aralıklarla 65 °C'ye kadar ısıtılarak çözülür. Son aşamada toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır**.**

Çizelge 3.8 % 33'lük Glasiyel Asetik Asit Çözeltisi

| İçerik | 100 mL |
|---|---|
| Glasiyel Asetik Asit | 33 ml |
| $ddH_2O$ | 67 ml |

Çizelge 3.9 Kloroform İzoamil Alkol

| İçerik | 100 mL |
|---|---|
| Kloroform | 96 ml |
| İzoamil Alkol | 4 ml |

Çizelge 3.10 Fenol Kloroform İzoamil Alkol

| İçerik | 100 mL |
|---|---|
| Fenol | 50 ml |
| Kloroform | 48 ml |
| İzoamil Alkol | 2 ml |

### 3.1.4 Tez çalışmasında kullanılan antibiyotiklerin stok çözeltilerinin hazırlanması

Çizelge 3.11 Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları

| Antimikrobiyal Madde | Sembol | Antibiyotik Ailesi | Konsantrasyon (µg/ml) |
|---|---|---|---|
| Kanamisin | KAN | Aminoglikozid | 15 |
| Ampisilin | AMP | B-Laktam | 10 |
| Tetrasiklin | TET | Tetrasiklin | 10 |
| Nalidiksik Asit | NAL | Kinolon | 15 |

### 3.1.4.1 Kanamisin

Çalışmada kullanılan kanamisin (SIGMA-ALDRICH/K1876-5G) antibiyotiğinin 15 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi hazırlanırken 0.15 g toz kanamisin 10 ml steril dd$H_2O$ ile çözelti haline getirilmiş ve 0,22 µm çaplı membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir ( https://www.sigmaaldrich.com 2017b).

### 3.1.4.2 Ampisilin

Çalışmada kullanılan ampisilin (SIGMA-ALDRICH/A9518) antibiyotiğinin 10 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi hazırlanırken 0.1 g toz ampisilin 10 ml steril dd$H_2O$ ile çözelti haline getirilmiş ve 0,22 µm çaplı membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir ( https://www.sigmaaldrich.com 2017c).

### 3.1.4.3 Tetrasiklin

Çalışmada kullanılan tetrasiklin (SIGMA-ALDRICH/87128) antibiyotiğinin 12 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi hazırlanırken 0.12 g toz tetrasiklin % 95'lik etanol ile çözelti haline getirilmiştir ( https://www.sigmaaldrich.com 2017d).

### 3.1.4.4 Nalidiksik asit

Çalışmada kullanılan nalidiksik asit (SIGMA-ALDRICH/N8878-25G) antibiyotiğinin 15 mg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltisi hazırlanırken 0.15 g toz nalidiksik asit 10 ml steril dd$H_2O$ ile çözelti haline getirilmiş, 0,3 M NaOH eklenerek antibiyotiğin çözünebileceği pH koşulları sağlanmış ve 0,22 µm çaplı membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir ( https://www.sigmaaldrich.com 2017e).

### 3.1.5 Tez çalışmasında kullanılan enzimler

Çizelge 3.12 Çalışmada kullanılan enzimler ve konsantrasyonları

| Enzim | Konsantrasyon |
|---|---|
| Deoksiribonükleaz (Thermo/EN0521) | 2 U/µl |
| Benzonase® (Sigma/E1014) | 2 U/µl |
| Ribonükleaz A (Sigma/R4875) | 20 µg/ml |
| Proteinaz K (Sigma/P6556) | 20 µg/ml |

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Planktonik hücrelerin eDNA üretiminin belirlenmesi

Planktonik hücreler tarafından üretilen eDNA örneklerine çeşitli enzimlerin etkilerinin incelenmesi çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacı ile planktonik hücrelerin ürettiği eDNA, fenol:kloroform çöktürmesi yöntemi ile izole edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri 400 ml LB besi ortamında, 200 rpm çalkalamalı koşullarda ve 37 °C'de 24 saat süresince geliştirilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri hücreleri çöktürülmüş ve süpernatantta bulunan eDNA izole edilmiştir. Bu çalışma kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir: 1,5 ml'lik steril mikrofüj tüplerine aktarılan aktif *Salmonella* kültürlerinin santrifüj uygulaması ile bakteri hücreleri çöktürülmüş ve süpernatant steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak 50 µl protein presipitasyon solüsyonu ile karıştırılmıştır. Süpernatant ve solüsyonun öne arkaya hareket ettirilerek karışması sağlandıktan sonra 5 dk, 12000 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmış ve elde edilen 700 µl süpernatant, 70 µl 2.5 M NaCl ve 700 µl % 96'lık etanol ile karıştırılarak -20 °C'de yaklaşık 24 saat bekletilmiştir. Ertesi gün, 4 °C'de 12000 rpm'de 25 dk santrifüj uygulaması ile eDNA çöktürülmüş ve vakumlu santrifüj cihazı ile (Thermo

Fisher Scientific, DNA SpeedVac System) 43 °C'de 3 dakika süresince kurutulmuştur. Son aşamada çökeltilen eDNA 100 µL Tris-EDTA (TE) tampon ile muamele edilerek çözülmüş ve çalışılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Tang vd. 2013).

Quant-iT PicoGreen® dsDNA reaktifi, çift sarmallı DNA'nın ölçülmesi amacıyla kullanılan ve oldukça hassas biçimde ölçüm yapan fluoresan nükleik asit boyasıdır. Çok az konsantrasyonlardaki DNA'nın dahi saptanabilmesi nedeniyle PicoGreen® DNA miktar tayini çalışmalarında ve çeşitli biyolojik uygulamalarda kullanılmaktadır.

Gerçekleştirdiğimiz çalışmaları büyük bir titizlikle yürütmek amacı ile izole ettiğimiz bütün eDNA izolatlarının konsantrasyonları PicoGreen® dsDNA reaktifi ile ölçülmüştür. Bu amaçla çalışmamızda, her denemede taze hazırlanan 1 µl Pico Green® boyasının 199 µl TE tampon içerisinde dilüe edildiği solüsyon ve DNA örneği 1:1 oranında karıştırılmış ve eDNA konsantrasyonu spektrofotometrede (LightCycler 480 / Roche) ölçülmüştür. Üretilen eDNA miktarının hesaplanması amacıyla, *S.* Typhimurium örnekleri ile 3 paralel 3 tekrar şeklinde eDNA üretim miktarı hesaplamaları gerçekleştirilmiştir (Tang vd. 2013).

### 3.2.2 Planktonik hücrelerden genomik DNA izolasyonu

Çalışmamızda *Salmonella* suşları LB sıvı besi ortamına % 1 oranında inoküle edilmiş ve 37 °C'de 200 rpm çalkalamalı koşullarda bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 1,5 mL kültür steril mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve 12000 rpm'de 2 dakika süresince santrifüj edilerek bakteri hücreleri çöktürülmüştür. Süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra çökeltilen hücreler 567 µL TE tampon içerisinde pipet aracılığı ile çözülmüştür. Üzerine 30 µL % 10 SDS ve 3 µL proteinaz K eklenerek karıştırılmış ve 37 °C'de 1 saat süreyle su banyosunda bekletilmiştir. Ortama 100 µL 5 M NaCl ilave edilerek içerik karıştırılmıştır. Daha sonra içeriğe 80 µL CTAB/NaCl çözeltisi ilave edilen ve beyaz partikül yapısı oluşuncaya kadar pipet yardımı ile iyice karıştırılan tüpler, 65 °C'de 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ortam 0,75 mL kloroform/izoamil alkol ile karıştırılmış ve 12000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek tüplerde oluşan üst faz yeni

mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Alınan üst faz üzerine 0,75 mL fenol/kloroform/izoamil alkol ilave edilerek yeniden 12000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda tüplerde oluşan süpernatant yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılarak üzerine hacmin 0,6'sı (~350 µL) oranında soğuk izopropanol ilave edilmiştir. İlavenin ardından hassas bir biçimde karıştırılmış olan tüpler -20 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmış ve üst sıvı dikkatli bir biçimde uzaklaştırılmıştır. Çökeltilen DNA üzerine 350 µL % 70'lik etanol eklenmiş ve 12000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra üst sıvı dikkatlice ortamdan uzaklaştırılarak genomik DNA örneği oda sıcaklığında kurutulmuştur. DNA çökeltisi 100 µL TE tampon çözeltisi içerisinde yaklaşık 1 saat süreyle bekletilmiş ve ardından pipet yardımı ile çözülmüştür (Wilson, 2000).

### 3.2.3 Biyofilm üretim düzeylerinin ve biyofilm yapısında bulunan eDNA miktarının belirlenmesi

*S.* Typhimurium suşları tarafından üretilen eDNA ve biyofilm miktarının hesaplanması çalışmalarında 96-kuyulu polistiren plateler kullanılmıştır (Tang vd. 2013). Bir gece boyunca LB/-NaCl besi ortamında geliştirilen aktif kültürler son konsantrasyonu $OD_{595}$= 0,2 ABS olacak şekilde dilüe edilmiş, dilüe edilen örneklerden 30 µl alınarak 100 µl LB/-NaCl besi ortamıyla karıştırılmış ve ardından biyofilm oluşumu için 20 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Üretilen eDNA ve biyofilm miktarlarının belirlenmesi amacı ile 4, 12 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çalışılan 96 kuyulu plate düzeni oluşturulurken her zaman dilimi ve her örnek için 3 tekrar olacak şekilde ayarlanmış ve biyofilm ölçümleri için en az 5, eDNA ölçümleri için ise en az 3 kuyu ayrılmıştır.

Hem biyofilm üretim düzeylerinin hem de üretilen eDNA miktarının hesaplanması amacı ile gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, öncelikle kuyularda bulunan süpernatant uzaklaştırılmış, biyofilm yapısı PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile yıkanmış ve plateler 1 saat süreyle oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra ortamda bulunan eDNA miktarının hesaplanması amacı ile her bir kuyuya 100 µl TE tampon ve

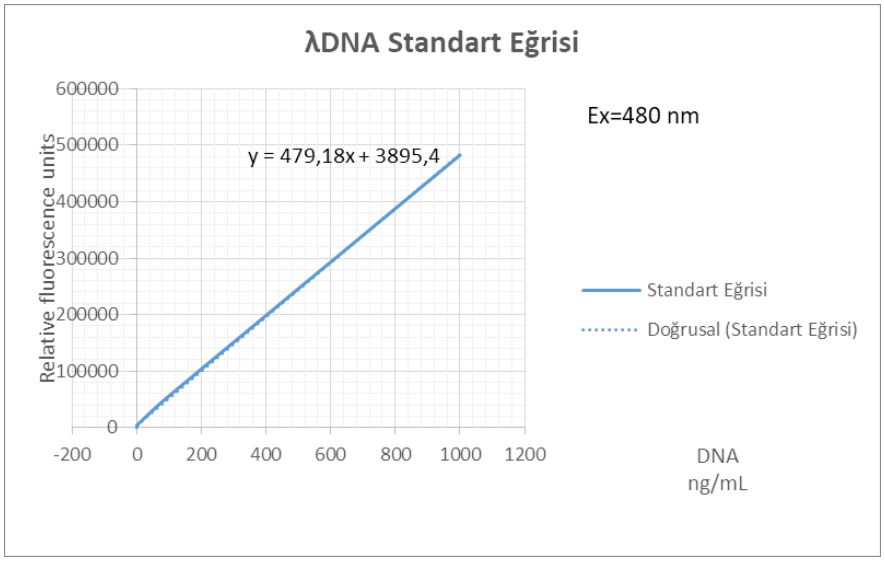
100 µl taze hazırlanmış PicoGreen® solüsyonu aktarılarak karıştırılmıştır. PicoGreen® ile muamele edilen kuyular oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2-4 dakika inkübe edildikten sonra floresan ışıma ile (Wallace Victor 3, 1420 Multicolor, PerkinElmer) okumaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada referans alınan standart eğri grafiğini oluşturmak amacı ile Lambda (λ) DNA dilüsyonları kullanılmıştır. Standart eğri grafiği oluşturmak amacıyla kit ürünü olan 100 µg/ml λDNA, yine kit ürünü olan TE tampon ile 2 µg/ml'ye seyreltilmiş ve standart eğri oluşturmak için çizelge 3.13'de belirtilen konsantrasyonlara dilüe edilmiştir.

Çizelge 3.13 Standart eğri grafiği oluşturmak amacıyla kullanılan λDNA dilüsyonları

| **Kullanılan λ DNA Miktarı** | **Kullanılan TE Miktarı** | **Hedef Konsantrasyon** |
|---|---|---|
| 1000 µl | 0 | 1 µg/ml |
| 100 µl | 900 µl | 100 ng/ml |
| 10 µl | 990 µl | 10 ng/ml |
| 1 µl | 999 µl | 1 ng/ml |
| 0 | 1000 µl | Blank |

Her bir konsantrasyondaki λDNA 1:1 oranında PicoGreen® solüsyonu ile muamele edilerek PerkinElmer cihazı ile spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiş, ölçümler sonunda elde edilen RFU değerleri ile standart eğri grafiği oluşturulmuştur. İzole edilen eDNA konsantrasyonları aşağıdaki standart eğri grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.1).




Şekil 3.1 İzole edilen eDNA konsantrasyonlarının belirlenmesinde referans alınan λDNA standart eğri grafiği

Biyofilm miktarının ölçülmesi çalışmalarında ise, kuyularda bulunan süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından, zayıf tutunan veya tutunmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile her kuyu iki kez 200 µl PBS ile yıkanmış ve daha sonra kuyularda bulunan biyofilm yapılarının fikse edilmesi amacı ile kuyulara 130 µl % 95'lik metanol ilave edilerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Fiksasyon aşamasının ardından kuyulara 130 µl kristal viyole çözeltisi eklenerek 30 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde kuyular 3 defa 200 µl steril su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurutulmuş, kuyularda tutunan kristal viyole boyası 130 µl % 33'lük glasiyal asetik asit ile çözülmüş ve $OD_{595}$ nm'de optik yoğunluk düzeyleri ölçülmüştür (O'Toole ve Kolter 1998). *Salmonella* suşlarının biyofilm üretim düzeylerinin belirlenmesi amacıyla ''cut off''değerleri kullanılmıştır. Bu hesaplamanın detayları 4.3.1. başlığında detaylı bir biçimde anlatılmaktadır.

### 3.2.4 Biyofilm yapıları üzerine antibiyotiklerin, Benzonase®'ın ve DNaz I enziminin etkisinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan *S.* Typhimurium suşlarının oluşturduğu biyofilm yapılarına antibiyotiklerin, enzimlerin ve antibiyotik+enzim kombinasyonlarının etkilerinin

belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen bu çalışmada, *Salmonella* suşlarının biyofilm üretimi 96 kuyulu polistiren plateler kullanılarak gerçekleştirilmiş ve çalışmamızda kullanılan antibiyotik ve enzimler LB/-NaCl besi ortamı kullanılarak uygun konsantrasyona ayarlandıktan sonra 4, 12 ve 24 saat süreyle geliştirilmiş biyofilm içeren kuyulara eklenmiştir. Negatif kontrol kuyuları ise yalnızca steril besiyeri ile muamele edilmiştir. Enzim ve antibiyotik denemeleri için öncelikle *S.* Typhimurium örnekleri optimum biyofilm üretim sıcaklıkları olan 20 °C'de 4, 12 ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde kuyulardaki süpernatant dikkatli bir biçimde uzaklaştırılmıştır. Tutunmayan veya zayıf tutunan bakterilerin uzaklaştırılması amacı ile her kuyunun steril LB/-NaCl besiyeri ile yıkanmasının ardından, kuyulara belirtilen konsantrasyonlardaki 200 µl antibiyotik, DNaz I, Benzonase®, antibiyotik+DNaz I ve antibiyotik+Benzonase® solüsyonları ilave edilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde, kuyularda bulunan antibiyotik, enzim ve kombinasyon solüsyonları mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve kuyu içeriği 200 µl PBS içerisinde çözüldükten sonra yine PBS ile seri dilüsyonları yapılarak LB agar ortamlarına 10'ar µl damlatılmıştır. 37 °C'de 18 saat süreyle gerçekleştirilen inkübasyonun ardından oluşan koloniler sayılmış ve CFU (koloni oluşturma birimi= kob) hesaplamaları yapılmıştır. Her bir deneme en az 3 tekrar ve 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak değerlendirme yapılmıştır. Hiçbir enzim ya da antibiyotik ile muamele edilmemiş kuyularda oluşan biyofilm yapısından gerçekleştirilen CFU hesaplamaları ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan hesaplama yönteminde ardışık iki seyreltiden gerçekleştirilen ekim sonuçları ve ağırlıklı aritmetik ortalamaları dikkate alınarak örneklerin koloni sayısı hesaplanmıştır. Bu hesaplamada kullandığımız formül;

$N = C / [V (n_1 + 0{,}1 \times n_2) \times d]$ şeklindedir ve bu yöntemde 15-300 aralığındaki koloni sayımları dikkate alınmaktadır.

Formüldeki öğeler;

N: Damlatılan örnekte bulunan mikroorganizma sayısı

C: Sayımı gerçekleştirilen tüm agar besi ortamlarındaki toplam koloni sayısı

V = Sayımı gerçekleştirilen agar besi ortamları üzerine damlatılan örneğin hacmi

$n_1$= İlk seyreltiden gerçekleştirilen sayımlarda sayım yapılan agar adedi

$n_2$= İkinci seyreltiden gerçekleştirilen sayımlarda sayım yapılan agar adedi

d = Sayımın yapıldığı ardışık iki seyreltinin daha konsantre olanının seyreltme oranı olarak gösterilmiştir (Halkman ve Ayhan 2000).

### 3.2.5 Biyofilm yapısından eDNA'nın izolasyonu

*S.* Typhimurium tarafından üretilen biyofilm yapısından eDNA'nın izole edilmesi ve izole edilen eDNA'nın miktarının hesaplanması amacı ile, *S.* Typhimurium biyofilm üretimleri 35-mm çaplı petri plaklarında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bakteri örnekleri LB/-NaCl besi ortamında ve 37 °C inkübasyon sıcaklığında bir gece geliştirilmesinin ardından, 35-mm petri plaklarına 4 ml LB/-NaCl sıvı besiyeri ve 1,2 ml hacminde 1 x $10^8$ CFU/ml bakteri inoküle edilmiş ve 20 °C'de 4, 12 ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda süpernatant ortamdan uzaklaştırılmış, petri çeperlerinde oluşan biyofilm yapısı 3 kez steril PBS ile dikkatlice yıkanmıştır. Petri plağı çeperlerinde oluşan biyofilm yapısı 500 µl PBS içerisinde kazınarak çözüldükten sonra içerisinde üç adet steril cam boncuk bulunan cam tüplere aktarılmış ve vorteks uygulaması ile matriks yapısı parçalanarak eDNA'ların ortama salınımı sağlanmıştır. Elde edilen süpernatant bakteri hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla 45 µm por çaplı membran filtreden geçirildikten sonra, fenol:kloroform çöktürmesi ile eDNA izolasyonu "Planktonik hücrelerden eDNA izolasyonu" kısmında açıklandığı biçimde gerçekleştirilmiştir. İzole edilen eDNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile agaroz jelde görüntülenmiş ve eDNA izolasyonunun başarısı PicoGreen® ölçümü ile de doğrulanmıştır.

### 3.2.6 İzole edilen nükleik asitlerin DNaz I, Benzonase®, Proteinaz K ve RNaz A ile muamelesi

Fenol:kloroform yöntemi ile çöktürülen nükleik asitler (eDNA ve gDNA); DNaz I (son konsantrasyonu 2 U/µl), Benzonase® (son konsantrasyonu 2 U/µl), proteinaz K (son konsantrasyonu 20 µg/ml), RNaz A (son konsantrasyonu 20 µg/ml) enzimleri ile

muamele edilmiştir. Tez önerimizde de belirttiğimiz gibi Benzonase® enzimi ilk kez deneneceği için enzimin son konsantrasyonu ön denemeler sonucunda belirlenmiştir. Bu amaçla çalışmada kullanılan nükleik asitler son konsantrasyonu 1 U/µl ve 2 U/µl olan Benzonase® enzimi ile muamele edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 2 U/µl konsantrasyonunda uygulanan enzimin 1 U/µl konsantrasyonundaki enzim uygulamasına göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda 2 U/µl konsantrasyonunda Benzonase® kullanılmıştır. Enzimler ile muamele edilen nükleik asitlerin, hiçbir enzim uygulanmamış nükleik asitler ile karşılaştırılması amacıyla % 0.7 oranında agaroz içeren jeller kullanılmıştır. Literatür incelendiğinde birçok araştırmacının nükleik asit miktar tayinini PicoGreen® ölçümü ile gerçekleştirdiği belirlenmiş ( Tang vd. 2013, Jeffery vd. 2017, Oostendorp vd. 2017, Welsh vd. 2017) ve bu nedenle gerçekleştirdiğimiz enzim muamelelerinin nükleik asitlere etkisi PicoGreen® ölçümleri ile de teyit edilmiştir.

### 3.2.7 Enzim muamelesine tabi tutulan nükleik asitlerin biyofilm yapısına etkisinin belirlenmesi

Bir gece boyunca LB/-NaCl besi ortamında geliştirilen ve son konsantrasyonu $OD_{595}$=0.2 ABS olacak biçimde ayarlanan 30 µl hacmindeki aktif *S.* Typhimurium kültürleri, 100 µl LB/-NaCl besi ortamı ile karıştırılmıştır. Ardından bir önceki çalışmada 20, 50 ve 100 µg/mL başlangıç konsantrasyonlarındaki enzimler ile (DNaz I, Benzonase®, Proteinaz K ve RNaz A) muamele edilmiş nükleik asitler 10 µL hacminde eklenmiş ve *S.* Typhimurium örnekleri, enzim uygulanmış nükleik asitler varlığında biyofilm oluşumu için 20 °C'de 24 saat ve 48 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tutunmayan bakterilerin yıkama ile uzaklaştırılmasının ardından, kristal viyole boyası ile kuyular boyanmış ve $OD_{595}$ nm'de spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilerek enzim uygulamasıyla parçalanan nükleik asitlerin biyofilm oluşumu üzerine etkileri belirlenmiştir (Tetz vd. 2009).

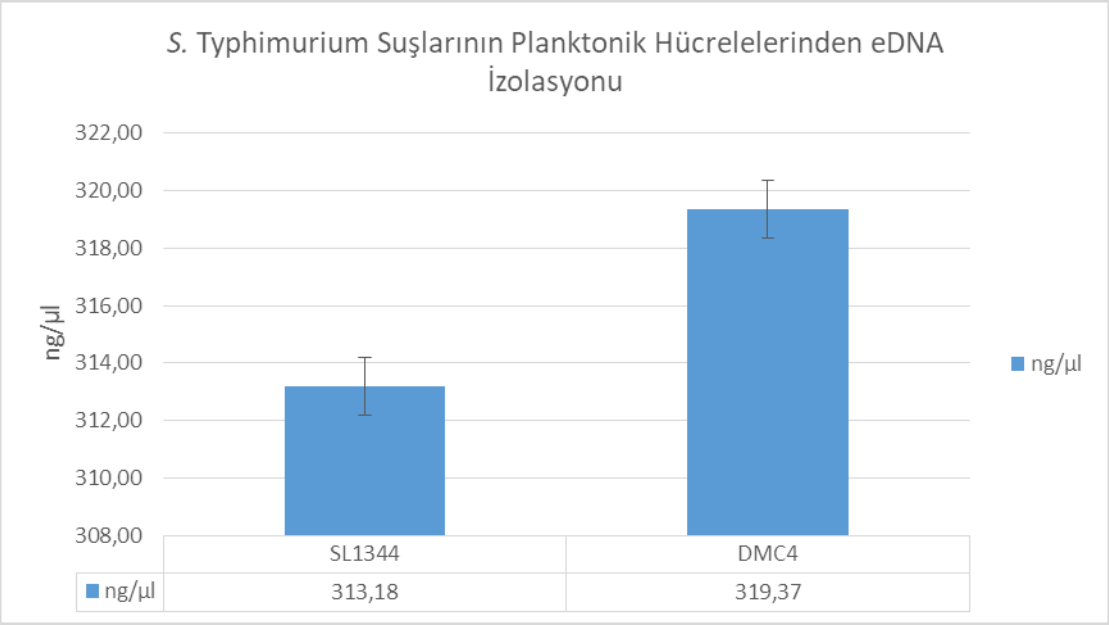
### 3.2.8 İstatistiki analizler

Çalışmalarımızın istatistiksel analizinin gerçekleştirilmesi için tez önerimizde SPSS 22.0 (IBM, USA) paket yazılımının gerçekleştirileceğini belirtmiştik. Ancak çalışmamızda yer alan bağımsız değişkenlerin çok sayıda grup içermesi ve gerçekleştirilen analizlerde farklı grupların birbirleriyle olan karşılaştırmalarının uygun bir biçimde modellenebilmesi amacı ile istatistik analizlerimizde R istatistik yazılımı kullanılmıştır. Deneylerimiz sonucunda elde ettiğimiz verilerin doğruluğu Varyans analizi (ANOVA) testi ile belirlenmiştir. Varyans analizi sonucu hesaplanan F değerine göre incelenen veriler "anlamlı" ya da "anlamsız" olarak değerlendirilmiştir. Anlamlı bulunan gruplar arasındaki değerlendirmeler ise Tukey'in Doğruluk Testi uyarınca gerçekleştirilmiştir (Neupane vd. 2014).

# 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

## 4.1 Planktonik Hücrelerin eDNA Üretiminin Belirlenmesi

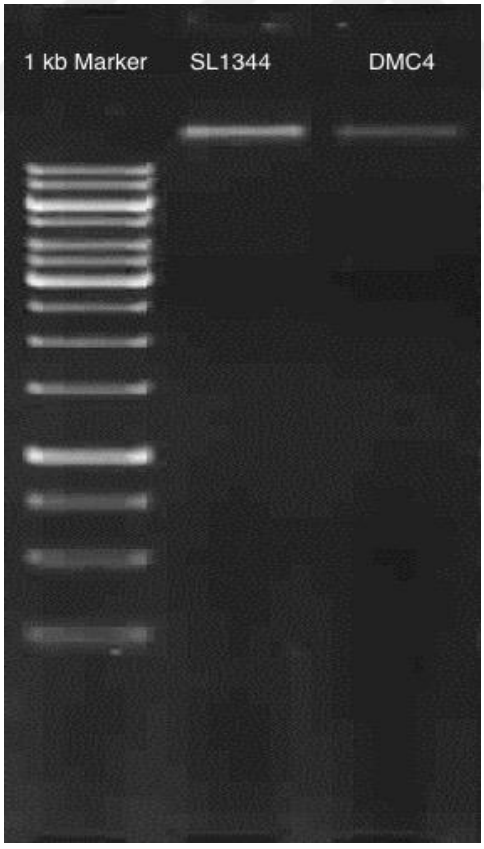
Bu çalışmada biyofilm yapısına katılmayan planktonik hücrelerin ortama bıraktığı hücre dışı DNA'ların (eDNA) miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Planktonik kültürü oluşturan hücrelerin santrifüj uygulamasıyla uzaklaştırılmasının ardından süpernatanttan fenol:kloroform yöntemi kullanılarak izole edilen eDNA miktarının hesaplanmasında daha önce belirtildiği gibi Lambda DNA dilüsyonları ile standart eğri grafikleri oluşturulmuş ve PicoGreen® işaretlemesiyle elde edilen RFU değerlerinden eDNA miktarlarının hesaplanmasında bu grafikten faydalanılmıştır. *S.* Typhimurium örneklerinde DMC4 kodlu suşun SL1344 kodlu suşa kıyasla daha fazla miktarda eDNA ürettiği, yapılan ölçümler sonucunda belirlenmiştir (Şekil 4.1).




Şekil 4.1 *S.* Typhimurium suşlarının planktonik formlarının ürettiği eDNA miktarları

### 4.2 Planktonik Hücrelerden Genomik DNA İzolasyonu

Saflaştırılan nükleik asitlerin kontrolü, TAE (Tris – Asetik Asit – EDTA ) tamponu ile hazırlanan % 1'lik agaroz jelde, 100 V sabit elektrik akımında 1 saat süreyle örneklerin elektroforez işlemine tabi tutulması sureti ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonrasında DNA bantları, 0.2 µg/mL etidyum bromid (Sigma Chem. Co. USA) içeren tampon içerisinde 30 dakika boyanmıştır. Boyama işlemi bitiminde jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole (UV) ışıkta incelenmiş ve Syngene GeneGenius Gel Imaging System kullanılarak fotoğrafları alınmıştır. Moleküler büyüklük tespiti, 1 kb moleküler DNA standartı (Solis BioDyne, Estonia) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2). *S.* Typhimurium suşlarından başarılı bir şekilde genomik DNA izolasyonu gerçekleştiği, agaroz jellerin görüntülenmesi sonucu belirlenmiştir (Şekil 4.2).




Şekil 4.2 *S.* Typhimurium suşlarının genomik DNA'larının (gDNA) agaroz jel görüntüsü

## 4.3 Biyofilm Üretiminin ve Biyofilm Yapısında Bulunan eDNA Miktarının Belirlenmesi

### 4.3.1 Biyofilm üretim miktarının belirlenmesi

Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda; test edilen *Salmonella* suşları için "cut off" (sınır) değerlerinin hesaplanması suretiyle, suşlar biyofilm üretimleri açısından "üretici olmayan", "zayıf", "orta" ve "güçlü" olmak üzere gruplandırılmıştır (Extremina vd. 2011). Sınır değerleri, mikrotitre plak ölçüm esasına dayalı yöntemlerde negatif test gruplarından gelen ölçüm sonuçlarının istatistiki sapma değerlerini ifade eden bir değerdir. Söz konusu yöntemde negatif kontrol (bakteri içermeyen besiyeri) üzerinden cut-off OD (ODc) değeri hesaplandıktan sonra çizelge 4.1'de belirtilen aralıklar esas alınarak biyofilm üretim düzeyleri belirlenmiştir. Cut-off OD (ODc) değeri, negatif kontrolün ortalaması x, standart hata ise SD ile gösterildiğinde ODc = x + 3SD formülü ile elde edilmektedir (Lunn vd. 2012). Biyofilm üreticisi suşların biyofilm üretim kapasiteleri aşağıda ifade edilen sınır değerlerin dönüşümleriyle ifade edilmektedir.

Bu çalışmada *S.* Typhimurium DMC4 suşu ve *S*. Typhimurium SL1344 kontrol suşunun biyofilm üretim kapasiteleri araştırılmıştır. *Salmonella* biyofilmlerinin araştırıldığı denemelerimiz *Salmonella* biyofilmleri için optimum olduğu bilinen koşullarda (tuzsuz LB besi ortamında, 20 °C inkübasyon sıcaklığında) 96 kuyulu polistiren plakalar kullanılarak yürütülmüştür. İnkübasyon süreleri sonunda oluşturulan biyofilmler kristal viyole boyaması ile boyanmış ve spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1 *S*. Typhimurium suşlarının biyofilm üretim düzeylerinin hesaplanması

| OD Değeri | Biyofilm üretim düzeyi |
|---|---|
| OD ≤ ODc | Üretici değil |
| ODc < OD ≤ 2xODc | Zayıf üretici |
| 2xODc < OD ≤4xODc | Orta düzey üretici |
| 4xODc < OD | Güçlü üretici |

*S.* Typhimurium SL1344 kontrol suşu, 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda $OD_{595}$= 0,10 düzeyinde biyofilm ürettiği için zayıf biyofilm üreticisi olarak değerlendirilmiş ancak inkübasyon süresi 12 saate çıkarıldığında $OD_{595}$ = 0,590; 24 saate çıkarıldığında ise $OD_{595}$ = 1,263 düzeyinde biyofilm üretimi gerçekleştirdiği için güçlü biyofilm üreticisi olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 *Salmonella* Typhimurium SL1344 suşunun 4h, 12h ve 24h inkübasyon sonunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri

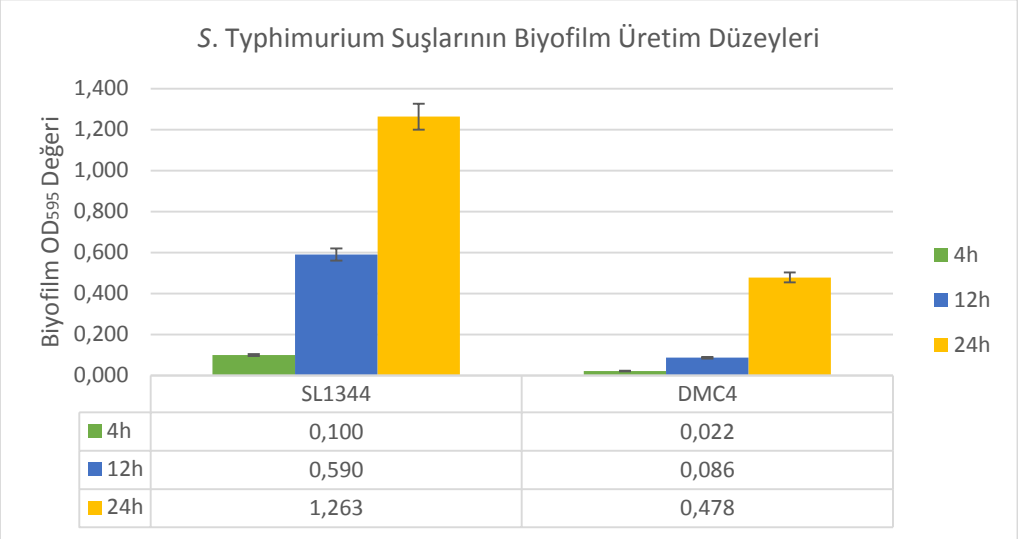
| **İnkübasyon Koşulları** | **Suş Adı** | **$OD_{595}$ Ölçüm Sonuçları** | **STD** | **"Cut off" (sınır) değeri** | **Biyofilm Üretim Düzeyleri** |
|---|---|---|---|---|---|
| **20˚C / 4h** | *S.* Typhimurium SL1344 | 0,100 | 0,004 | 0,076 | Zayıf Üretici |
| **20˚C / 12h** | *S.* Typhimurium SL1344 | 0,590 | 0,003 | 0,072 | Güçlü Üretici |
| **20˚C / 24h** | *S.* Typhimurium SL1344 | 1,263 | 0,002 | 0,069 | Güçlü Üretici |

*S.* Typhimurium DMC4 suşu ise 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda $OD_{595}$ nm=0,022 düzeyinde biyofilm ürettiği, inkübasyon süresi 12 saate çıkarıldığında zayıf biyofilm üretim özelliği gösterdiği, inkübasyon süresi 24 saate çıkarıldığında ise güçlü düzeyde biyofilm üretim özelliği gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 *Salmonella* Typhimurium DMC4 suşunun 4h, 12h ve 24h inkübasyon sonunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri

| **İnkübasyon Koşulları** | **Suş Adı** | **$OD_{595}$ Ölçüm Sonuçları** | **STD** | **"Cut off" (sınır) değeri** | **Biyofilm Üretim Düzeyleri** |
|---|---|---|---|---|---|
| **20˚C / 4h** | *S.* Typhimurium DMC4 | 0,022 | 0,004 | 0,076 | Üretici Değil |
| **20˚C / 12h** | *S.* Typhimurium DMC4 | 0,086 | 0,003 | 0,072 | Zayıf Üretici |
| **20˚C / 24h** | *S.* Typhimurium DMC4 | 0,478 | 0,002 | 0,069 | Güçlü Üretici |

Sonuç olarak çalışmada kullanılan *Salmonella* suşlarının zamana bağlı biyofilm üretim düzeyleri incelendiğinde *S.* Typhimurium SL1344 suşunun biyofilm oluşum düzeylerinin inkübasyon süresiyle doğru orantılı biçimde arttığı ve maksimum biyofilm oluşum düzeyine ($OD_{595}$ = 1,263) 24 saatlik inkübasyon sonunda ulaştığı belirlenmiştir. *S.* Typhimurium DMC4 suşunda ise ilk 12 saat boyunca biyofilm oluşumu neredeyse aynı düzeyde gerçekleşirken, inkübasyon süresi 24 saate çıkarıldığında biyofilm üretim düzeyi maksimuma ($OD_{595}$ = 0,478) ulaşmaktadır (Şekil 4.3).



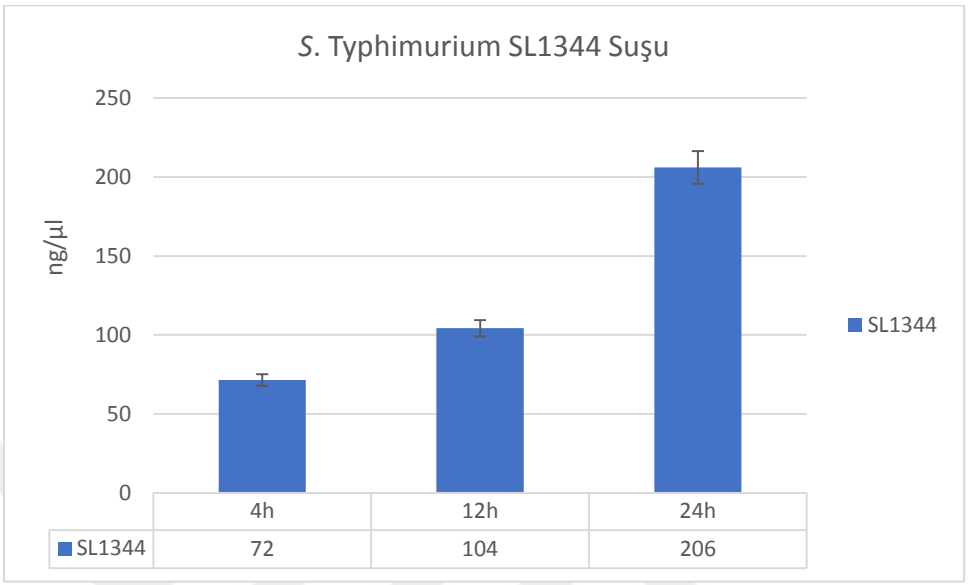

Şekil 4.3 *S.* Typhimurium suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde oluşturdukları biyofilm miktarlarının spektrofotometrik ölçüm sonuçları

### 4.3.2 Biyofilmde Bulunan eDNA Miktarının Belirlenmesi

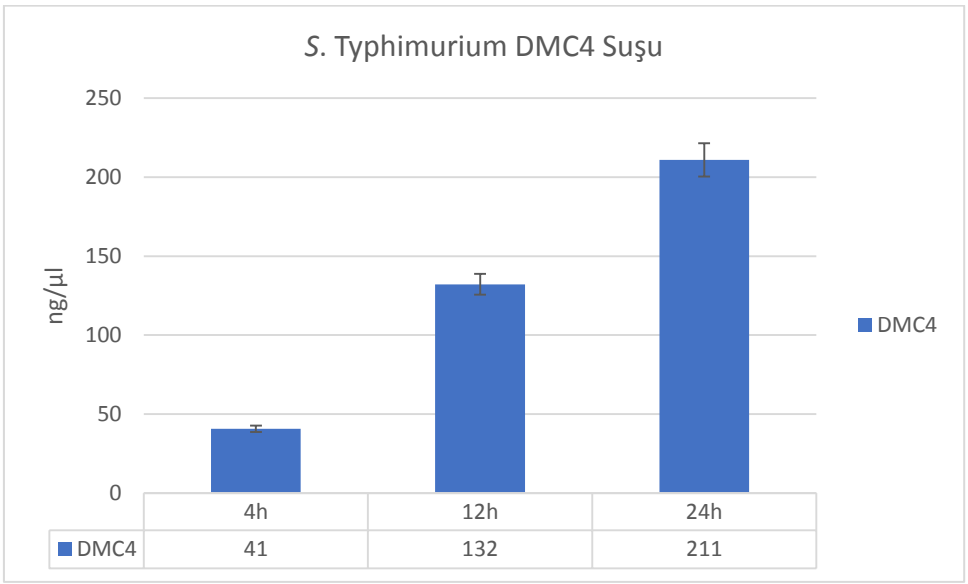
Bu çalışmada farklı inkübasyon sürelerinde 96 kuyulu polistiren plakalarda geliştirilen biyofilm yapısında bulunan eDNA miktarının belirlenmesi için 4, 12 ve 24 saat inkübasyon sonucu oluşan biyofilmler, PicoGreen® floresan işaretleme yöntemiyle boyanarak eDNA miktarları ölçülmüştür.

PicoGreen® floresan işaretlemesi sonucunda elde ettiğimiz ölçümler değerlendirildiğinde, incelenen *S.* Typhimurium örneklerinin farklı inkübasyon süreleri sonunda oluşturdukları biyofilm yapılarında bulunan eDNA miktarının hem *S.*

Typhimurium SL1344 hem de *S.* Typhimurium DMC4 suşunda en yüksek düzeye 24 saat sonunda ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.4 - 4.5).




Şekil 4.4 *S.* Typhimurium SL1344 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA miktarı



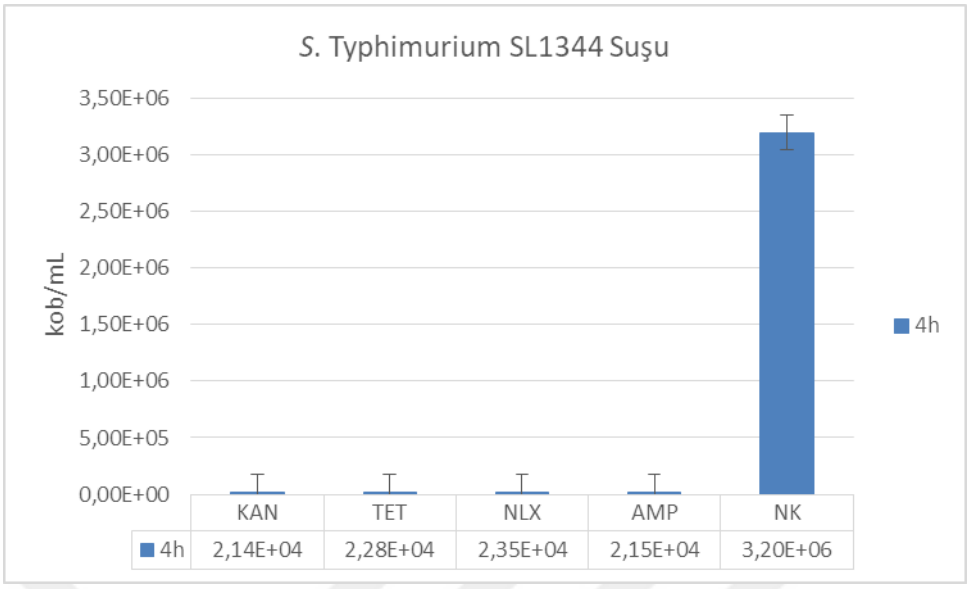

Şekil 4.5 *S.* Typhimurium DMC4 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA miktarı

## 4.4 Biyofilm Yapıları Üzerine Antibiyotiklerin, Benzonase®'ın ve DNaz I Enziminin Etkisinin Belirlenmesi

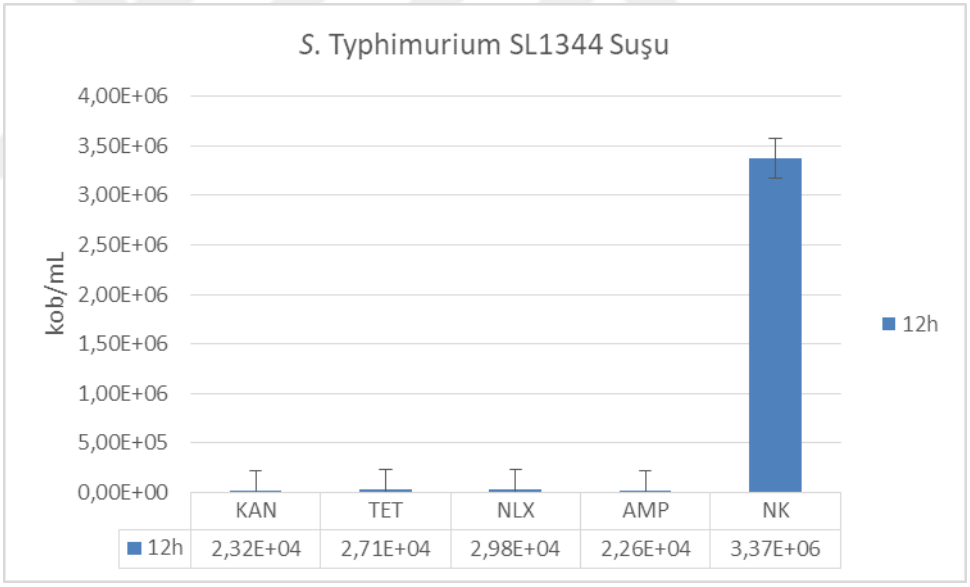
### 4.4.1 Biyofilm yapıları üzerine antibiyotiklerin etkisinin belirlenmesi

Bu çalışmada, *S.* Typhimurium suşlarının (DMC4 kodlu suş ve SL1344 kodlu kontrol suşu) 4, 12 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda oluşturdukları biyofilm yapıları üzerinde konvansiyonel antibiyotiklerin (kanamisin, tetrasiklin, nalidiksik asit ve ampisilin) uygulanması sonucunda biyofilm yapılarında meydana gelen değişimler araştırılmıştır. 4, 12 ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda oluşan biyofilm yapılarına antibiyotiklerin her biri ayrı ayrı muamele edilmiş ve 24 saatlik inkübasyonun ardından, biyofilm miktarlarındaki değişimler, hiç antibiyotik uygulaması yapılmamış kontrol kuyularıyla kıyaslanmak suretiyle belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan çeşitli antibiyotiklerin biyofilm yapısına olan etkisini hesaplamak amacıyla koloni sayım yöntemi (CFU hesaplaması) kullanılmıştır.

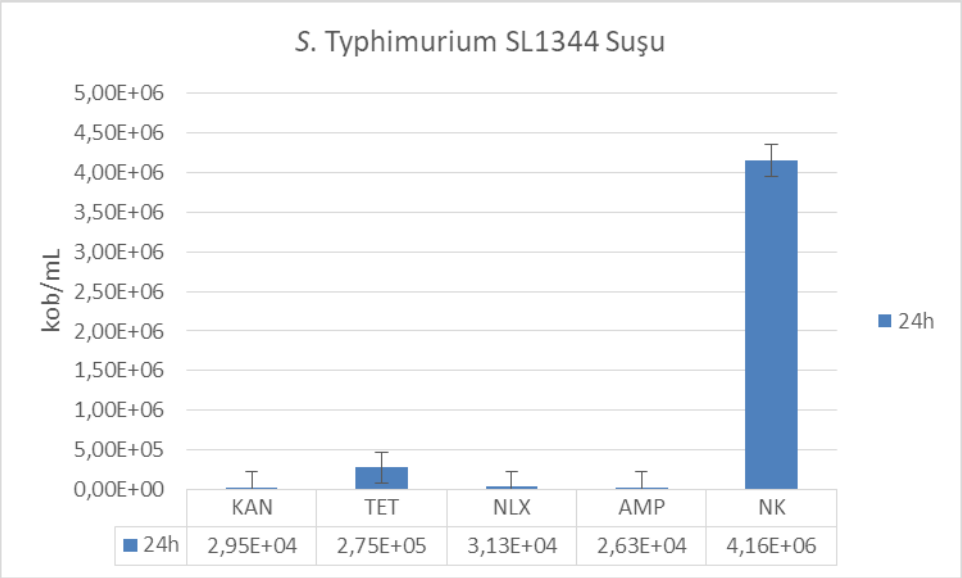
SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşunun 4 saatlik biyofilminde, 24 saat süresince uygulanan antibiyotiklerin eradikasyon etkileri incelendiğinde, her bir antibiyotiğin biyofilmi neredeyse aynı derecede ve büyük oranda eradike ettiği görülmüştür. *S.* Typhimurium SL1344 suşunun 12 saatlik biyofilmine uygulanan dört antibiyotikten ampisilinin test edilen diğer antibiyotiklere göre daha etkili olduğu, nalidiksik asitin ise biyofilme nispeten daha az etki ettiği belirlenmiştir. *S.* Typhimurium SL1344 suşunun 24 saatlik biyofilmine antibiyotik uygulaması sonucunda ise aynı şekilde ampisilinin daha etkili olduğu ve tetrasiklinin test edilen diğer antibiyotiklere göre daha az etkili olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6 - 4.8).




Şekil 4.6 *S.* Typhimurium SL1344 suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri

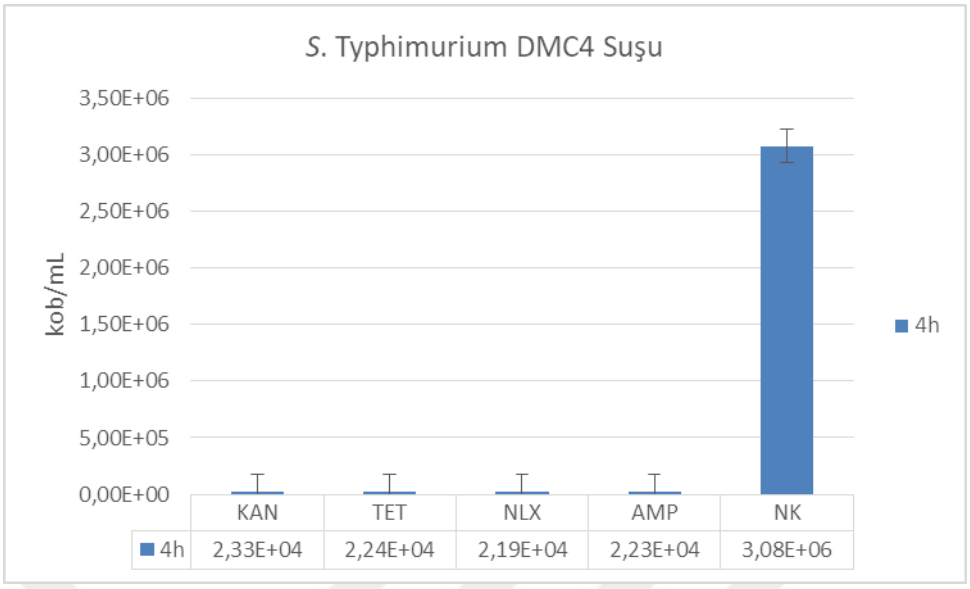



Şekil 4.7 *S.* Typhimurium SL1344 suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri

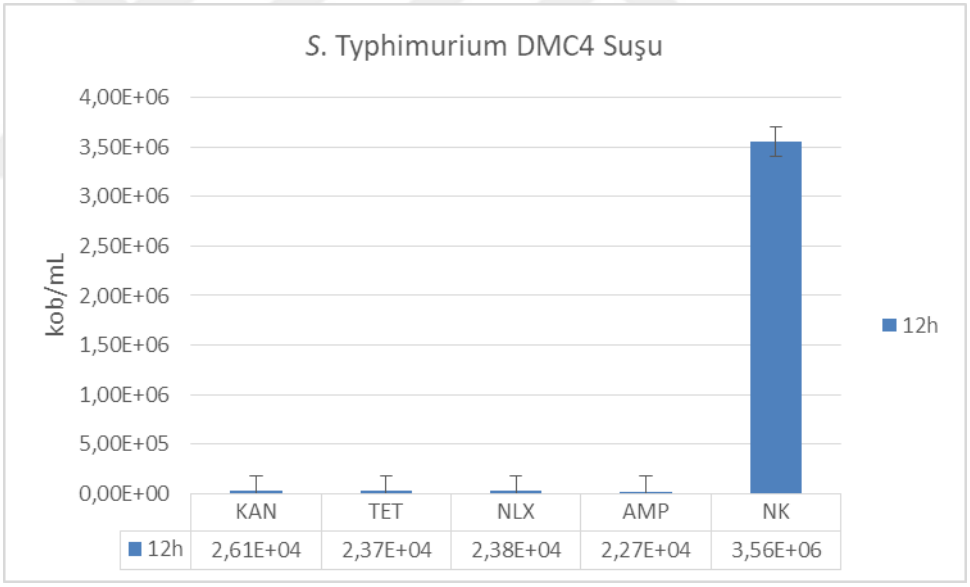



Şekil 4.8 *S.* Typhimurium SL1344 suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri

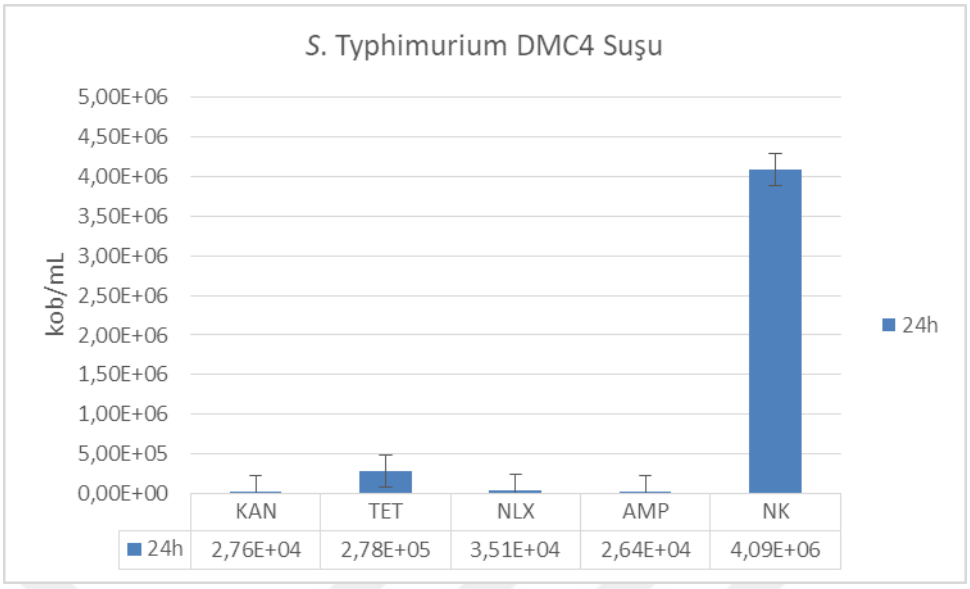
DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşunun 4 saatlik biyofilmi üzerine uygulanan antibiyotiklerin eradikasyon etkileri incelendiğinde, biyofilmler içerisindeki canlı hücre miktarlarının birbirlerine yakın olduğu görülmüştür. DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşunun 12 saatlik biyofilmlerine antibiyotik uygulandığında yine en etkili antibiyotiğin ampisilin olduğu ve kanamisinin biyofilmi oluşturan bakteriler üzerine diğer antibiyotiklere nazaran daha az etki ettiği saptanmıştır. DMC4 suşu tarafından 24 saatlik inkübasyon sonucu üretilen biyofilm yapısına antibiyotik muamelesi yapıldığında ise en etkili antibiyotiğin ampisilin olduğu ve tetrasiklinin ilk 12 saatten sonra etkisinin azalmasıyla canlı kalan bakterilerin çoğalarak biyofilmi güçlendirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9 - 4.11).




Şekil 4.9 *S.* Typhimurium DMC4 suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri




Şekil 4.10 *S.* Typhimurium DMC4 suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri



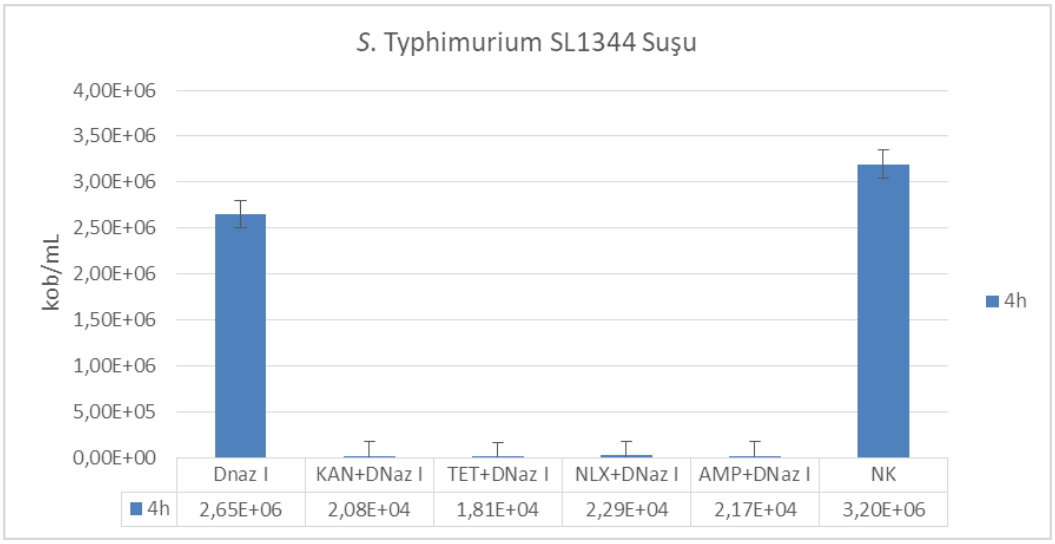

Şekil 4.11 *S.* Typhimurium DMC4 suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesi üzerine çeşitli antibiyotiklerin etkileri

### 4.4.2 Biyofilm yapıları üzerine DNaz I ve Benzonase® enziminin etkisinin belirlenmesi

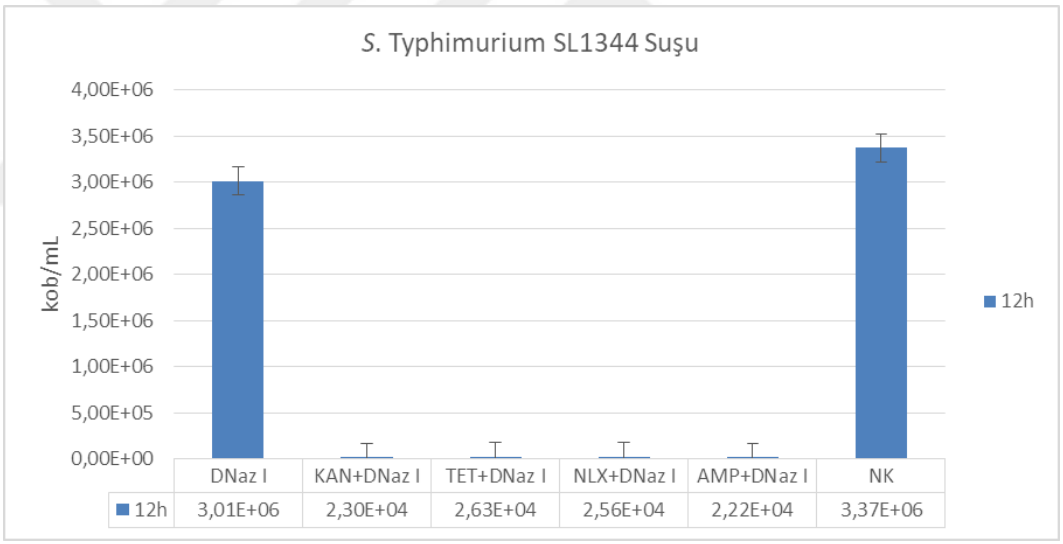
Bu çalışmada, *S.* Typhimurium suşlarının (DMC4 kodlu suş ve SL1344 kodlu kontrol suşu) 4, 12 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda oluşturdukları biyofilm yapıları üzerine DNaz I ve Benzonase® enzimleri ile beraber konvansiyonel antibiyotiklerin (kanamisin, tetrasiklin, nalidiksik asit ve ampisilin) kombinasyonunun uygulanmasının biyofilm yapılarında bulunan canlı hücrelere etkisi araştırılmıştır. 4, 12 ve 24 saat inkübasyon sonunda *S.* Typhimurium suşlarının oluşturdukları biyofilm yapılarına çalışmada kullanılanılan dört antibiyotik ve iki enzimin kombinasyonları (antibiyotik+DNaz I, antibiyotik+Benzonase®) ayrı ayrı uygulanmış ve 24h boyunca inkübasyona tabi tutulduktan sonra, biyofilm biyokütlesindeki değişmeler, hiç antibiyotik ve enzim uygulaması yapılmamış kontrol kuyularıyla kıyaslanmak suretiyle belirlenmiştir. Antibiyotik, enzim ve antibiyotik+enzim kombinasyonlarında elde edilen eradikasyon etkileri canlı hücre sayımları gerçekleştirilerek incelendiğinde, inkübasyon süresi, kullanılan antibiyotik, enzim ve kombinasyonlar bakımından her iki suştan elde edilen veriler One Way ANOVA testine tabi tutulmuştur. Anlamlı bulunan sonuçlara "Tukey Doğruluk Önem Testi" analizi gerçekleştirilmiş ve inkübasyon

süresi+bakteri+antibiyotik kombinasyonu interaksiyonuna göre bu etkileşimin % 0,1 ($p<0.001$) oranında anlamlı olduğu belirlenmiştir.

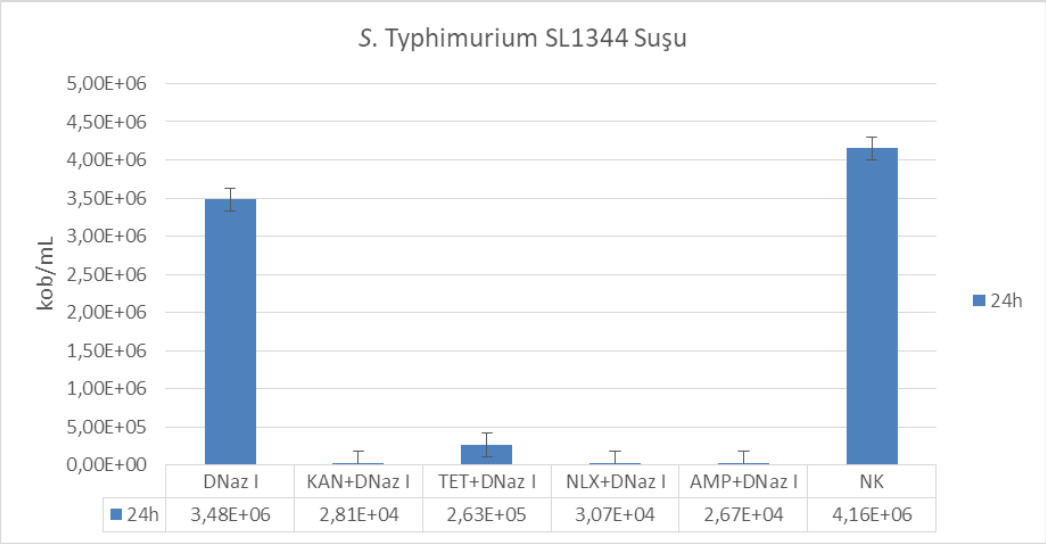
SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşunun biyofilmleri üzerine uygulanan enzim ve kombinasyonların etkisi incelendiğinde, 4 saatlik biyofilmlerde DNaz I enziminin tek başına biyofilm içerisindeki canlı hücrelere az miktarda etki ettiği, antibiyotiklerle kombine edildiğinde ise antibiyotiklerin varolan etkisinin yanında DNaz I enziminin çok fazla etkin olmadığı görülmektedir. *S.* Typhimurium SL1344 suşunun 12 saatlik biyofilmlerinde DNaz I enzimi tek başına yine çok düşük düzeyde etki gösterirken antibiyotiklerle kombine edildiğinde biyofilm yapısındaki canlı hücre sayısını önemli oranda azalttığı belirlenmiştir. Bu kombinasyonlar sonucunda gözlenen etki önemli oranda antibiyotiklerden ileri gelmektedir. Çünkü önceki sonuçlarımız incelendiğinde, *Salmonella* biyofilmleri üzerine antibiyotikler tek başlarına da oldukça etkili bulunmuşlardır. DNaz I enzimi ile kombine edildiklerinde elde edilen kob/mL değerleri karşılaştırıldığında etkide az da olsa bir artış gerçekleşmiştir. *S.* Typhimurium SL1344 suşunun 24 saatlik biyofilmlerine uygulanan DNaz I enziminin etkisi incelendiğinde ise yine DNaz I enziminin tek başına etkisinin az olduğu; bununla birlikte, DNaz I enziminin ampisilin antibiyotiğiyle kombine edildiğinde enzimin daha etkin hale geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.12 - 4.14). Tetrasiklin antibiyotiğinin *S.* Typhimurium SL1344 suşunun 24 saatlik biyofilm yapısına etkisi (Şekil 4.8) ile DNaz I ile kombine halde kullanılması sonucunda elde ettiğimiz veriler (Şekil 4.14) kıyaslandığında, kombinasyon uygulamasının az da olsa daha etkin olduğu belirlenmiştir.




Şekil 4.12 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

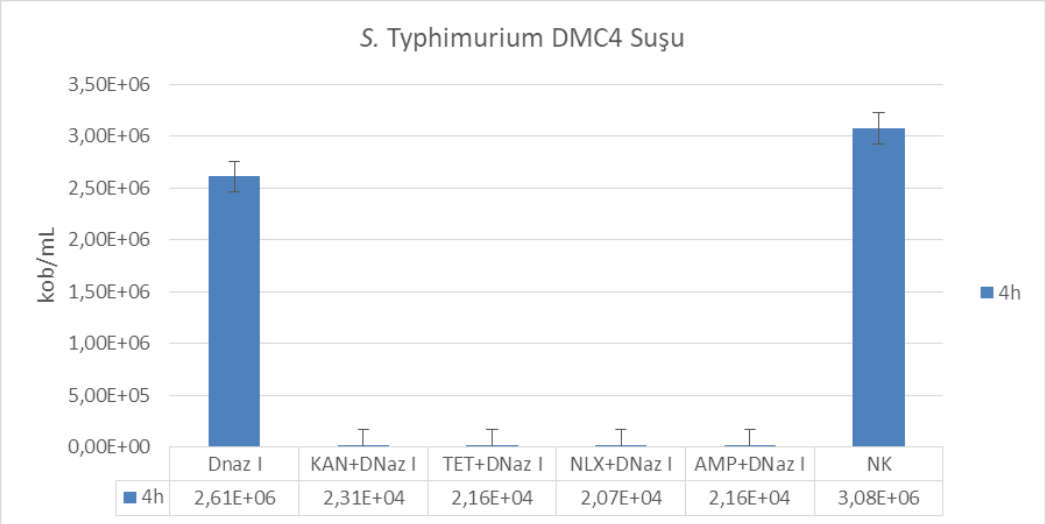



Şekil 4.13 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

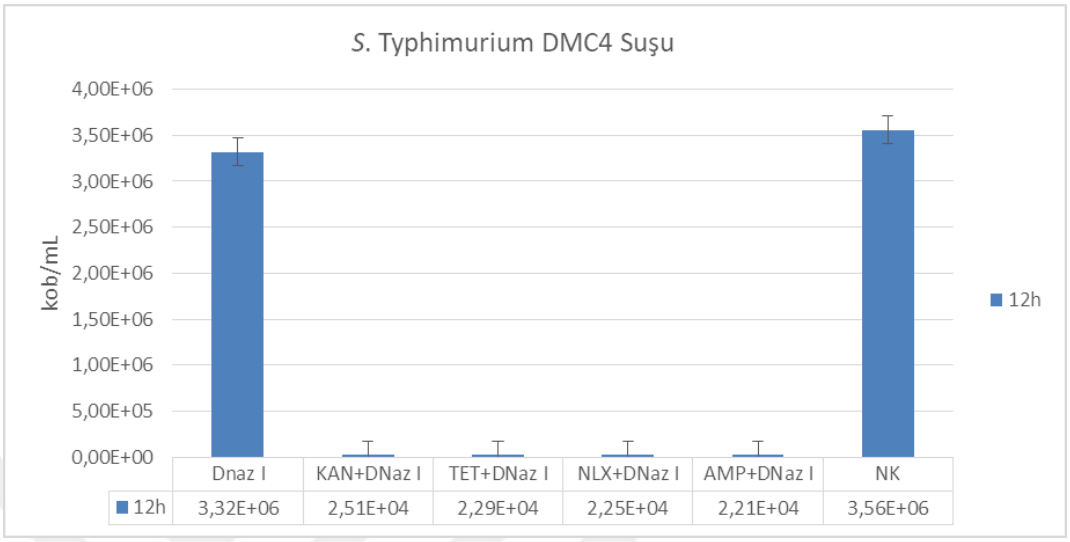



Şekil 4.14 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

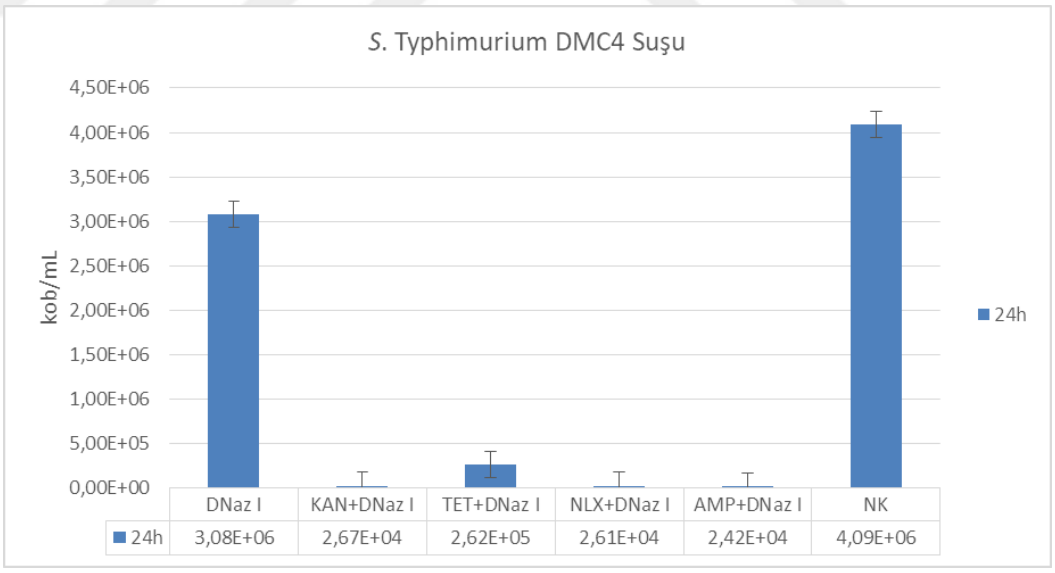
DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşunun 4 saatlik biyofilmlerinde DNaz I enziminin biyofilm içerisindeki canlı hücrelere tek başına iken düşük düzeyde etki ettiği, antibiyotiklerle kombine edildiğinde ise DNaz I enziminin antibiyotiklerin tek başına etkisine göz ardı edilecek düzeyde olumlu etki sağladığı gözlenmiştir. Bu durum DMC4 kodlu suş için test edilen tüm inkübasyon sürelerinde yine test edilen tüm ajanlar için aynı düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.15 – 4.17).



Şekil 4.15 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

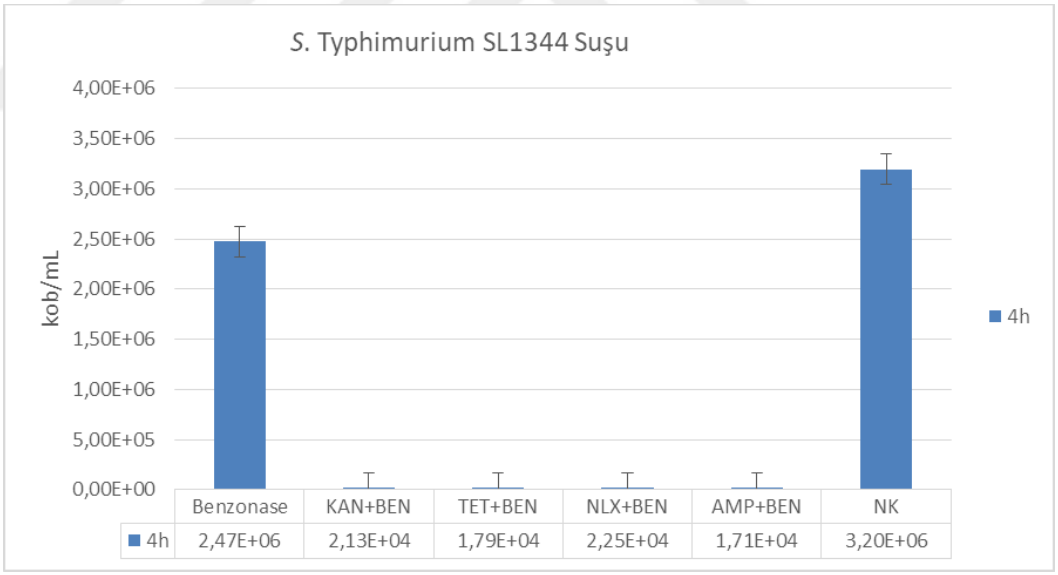



Şekil 4.16 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

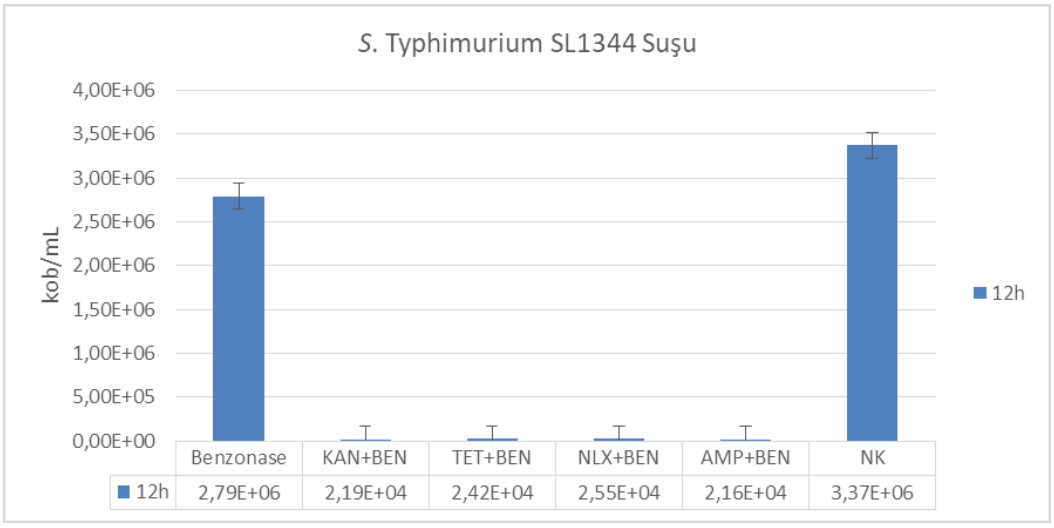



Şekil 4.17 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine DNaz I ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

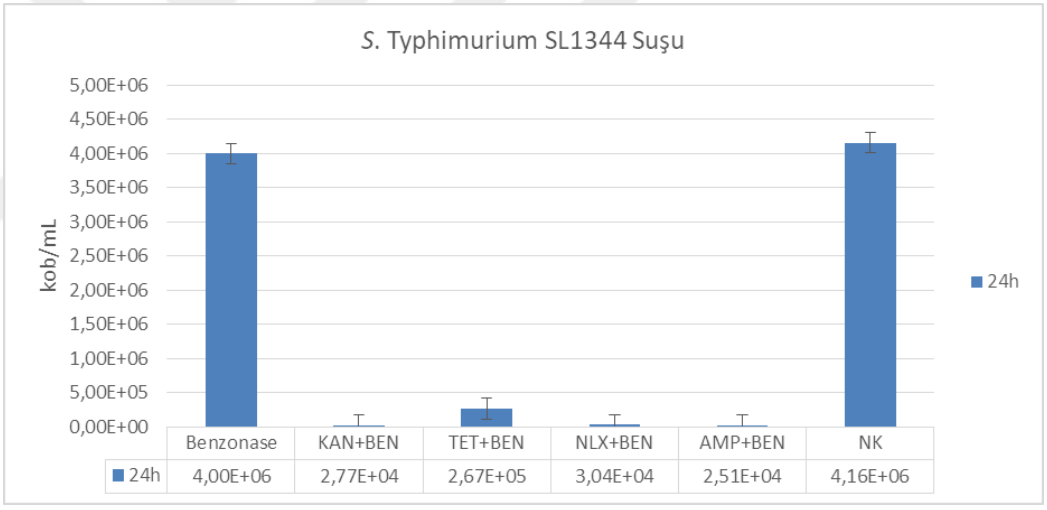
Çalışmamızın bir sonraki aşamasında ise deosiribonükleaz özellikteki Benzonase® enzimi ve bu enzimin antibiyotiklerle kombinasyonlarının biyofilm üzerine etkileri araştırılmıştır. SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşunun 4 saatlik biyofilmlerinde Benzonase® enziminin tek başına biyofilm içerisindeki canlı hücrelere düşük düzeyde etki ettiği, antibiyotiklerle kombine edildiğinde ise antibiyotiklerin varolan etkisine Benzonase® enziminin düşük de olsa olumlu yönde katkı sağladığı tespit edilmiştir. *S.* Typhimurium SL1344 kontrol suşunun 12 saatlik biyofilmlerinde bulunan canlı hücreler üzerine Benzonase® enzimi tek başına az miktarda etki gösterirken, antibiyotiklerle kombine edildiğinde biyofilm yapısında bulunan canlı hücrelerin sayısındaki azalmanın arttığı görülmektedir. SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşunun 24 saatlik biyofilmlerinde ise Benzonase® enziminin biyofilm içerisindeki canlı hücreler üzerine yine tek başına etkisinin zayıf olduğunu, antibiyotiklerle kombine edildiğinde ise, antibiyotiklerin eradikasyon etkisine olumlu katkı sağladığını söylemek mümkündür (Şekil 4.18 – 4.20).




Şekil 4.18 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

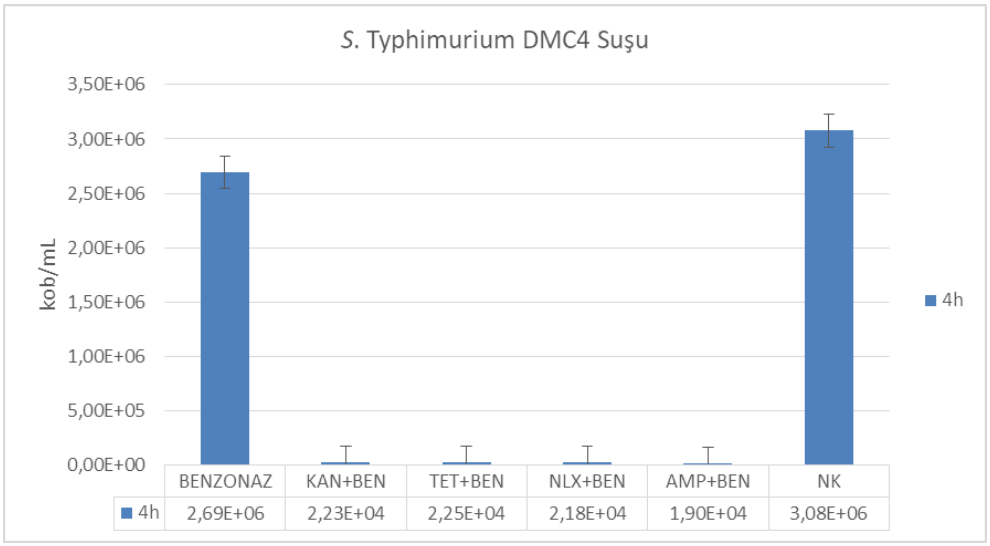



Şekil 4.19 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

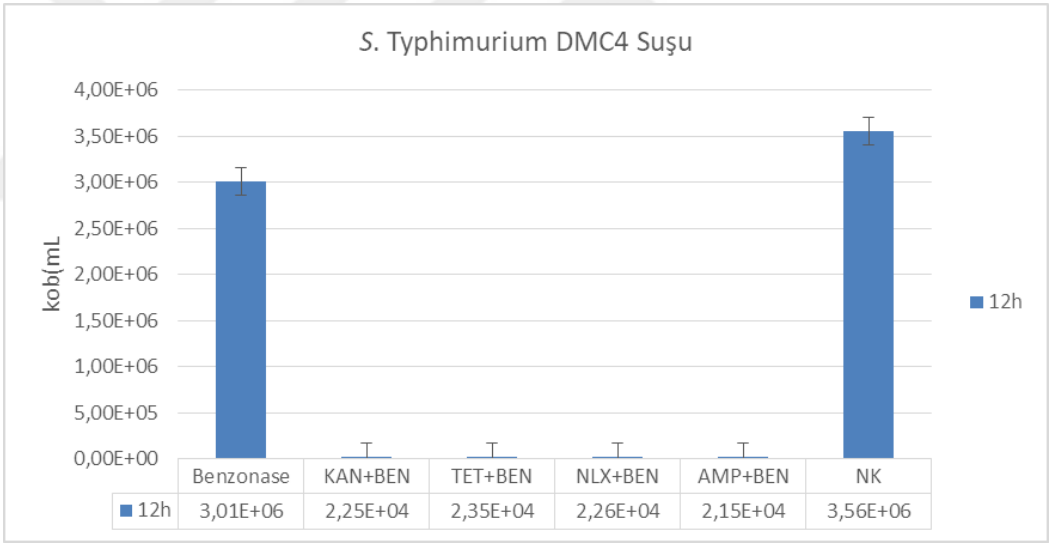



Şekil 4.20 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

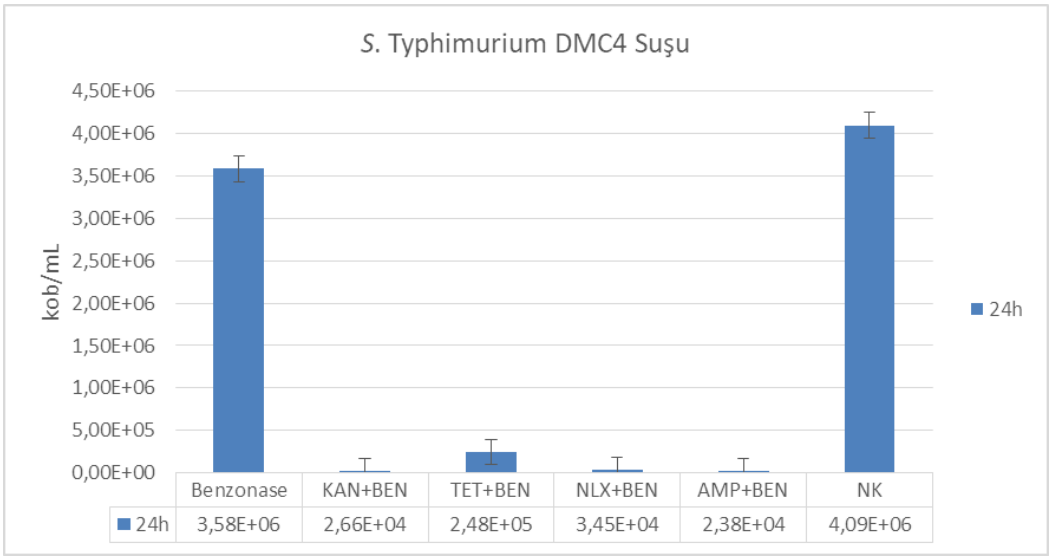
DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşunun 4 saatlik biyofilmlerinde Benzonase® enziminin biyofilm içerisindeki canlı hücrelere tek başına düşük düzeyde etki ettiği, antibiyotiklerle kombine edildiğinde ise test edilen her inkübasyon dilimi için de antibiyotiklerin tek başlarına sergiledikleri eradikasyon etkisine düşük düzeyde de olsa katkı sağladıkları belirlenmiştir (Şekil 4.21- 4.23).




Şekil 4.21 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 4h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi




Şekil 4.22 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 12h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi



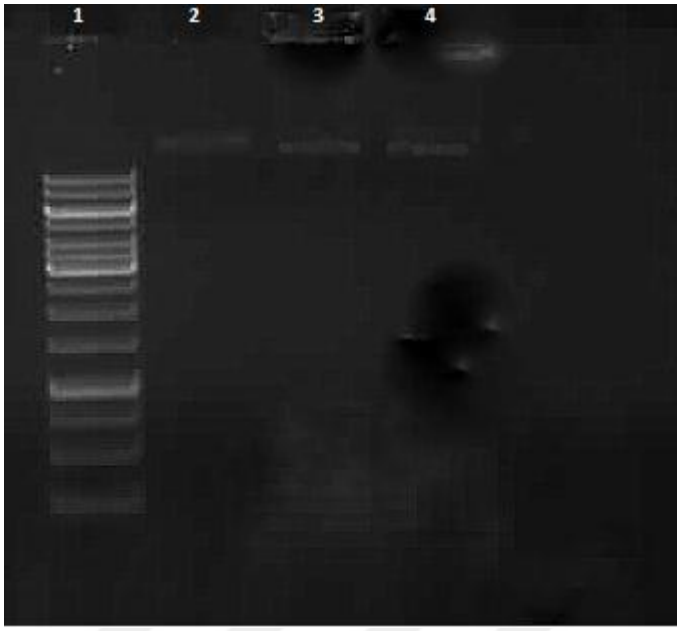

Şekil 4.23 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşu tarafından 24h inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm biyokütlesine Benzonase® ve antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

Sonuç olarak hem SL1344 hem de DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşları tarafından oluşturulan biyofilmlere aynı mekanizma ile etki gösteren DNaz I ve Benzonase® enzimlerinin tek başına çok az etki gösterdiği; kombinasyonlarda ise biyofilm içerisindeki hücrelere asıl etki eden ajanların enzimlerden ziyade antibiyotikler olduğu, yalnızca antibiyotiklerin etkisi ile kıyaslandığında kullandığımız enzim-antibiyotik kombinasyonlarının biyofilm içerisindeki canlı hücrelere etkisinin, az da olsa, daha fazla olduğu belirlenmiştir.

## 4.5 Biyofilm Yapısından eDNA'nın İzolasyonu

### 4.5.1 Biyofilm yapısından izole edilen eDNA'nın agaroz jelde görüntülenmesi

*Salmonella* suşlarından izole edilen genetik materyallerin jel elektroforezinde görüntüleri alınabilmiştir. Bant büyüklükleri incelendiğinde eDNA'nın gDNA bantından daha aşağıda, 28 kb'lık moleküler ağırlıkta olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24).



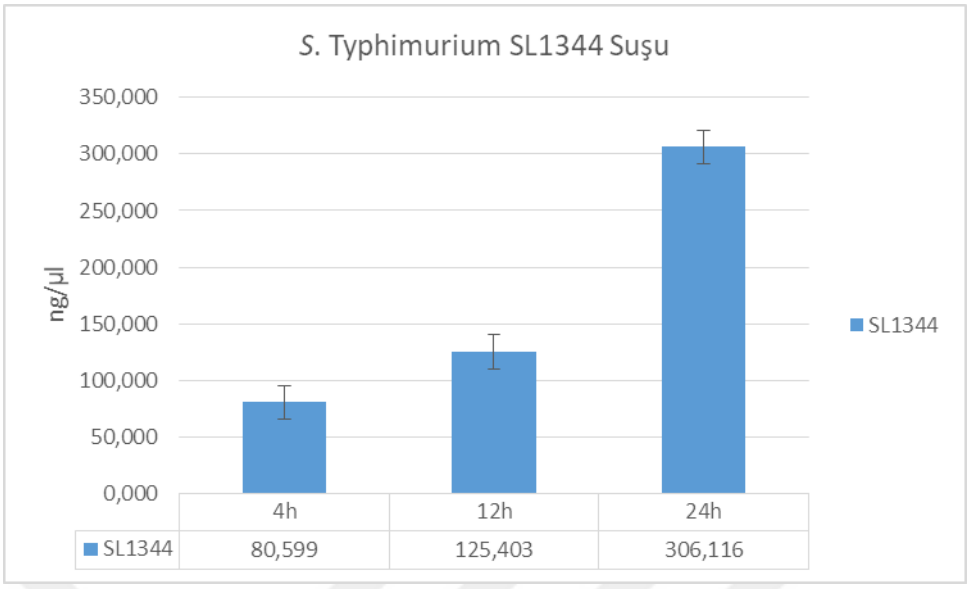

Şekil 4.24 SL1344 ve DMC4 kodlu *Salmonella* suşlarından izole edilen DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

(1. kuyu; Marker, 2. kuyu; genomik DNA, 3. kuyu; SL1344 hücre dışı DNA, 4. kuyu; DMC4 hücre dışı DNA)

### 4.5.2 Farklı inkübasyona sürelerindeki biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'nın miktarının belirlenmesi

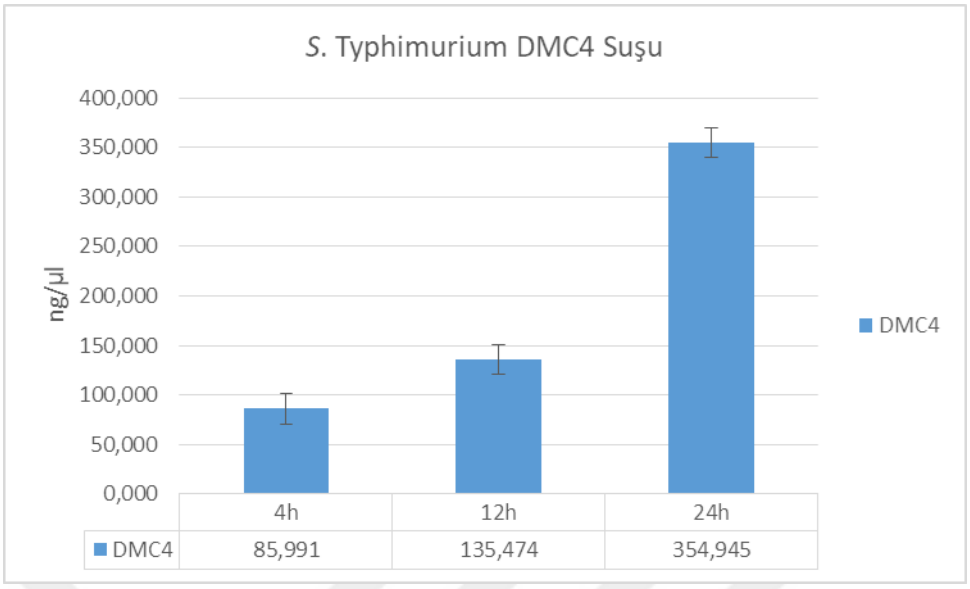
Bu çalışmada, *S.* Typhimurium suşları (DMC4 kodlu suş ve SL1344 kodlu kontrol suşu) tarafından 4, 12 ve 24 saat süreyle 35 mm'lik petri plaklarında geliştirilen biyofilmlerinden fenol:kloroform yöntemiyle izole edilen eDNA örnekleri PicoGreen® ile işaretlenerek ölçülmüş ve elde edilen RFU değerleri ile standart eğri grafiği kullanılarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşunun 4, 12 ve 24 saat süresince 35 μm'lik petri tabaklarında oluşturdukları biyofilmden fenol:kloroform yöntemiyle izole edilen eDNA'ların konsantrasyonları incelendiğinde eDNA konsantrasyonunun inkübasyon süresine paralel bir biçimde arttığı ve en yüksek eDNA konsantrasyonunun 24 saatlik biyofilmlerden elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.25).




Şekil 4.25 SL1344 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları

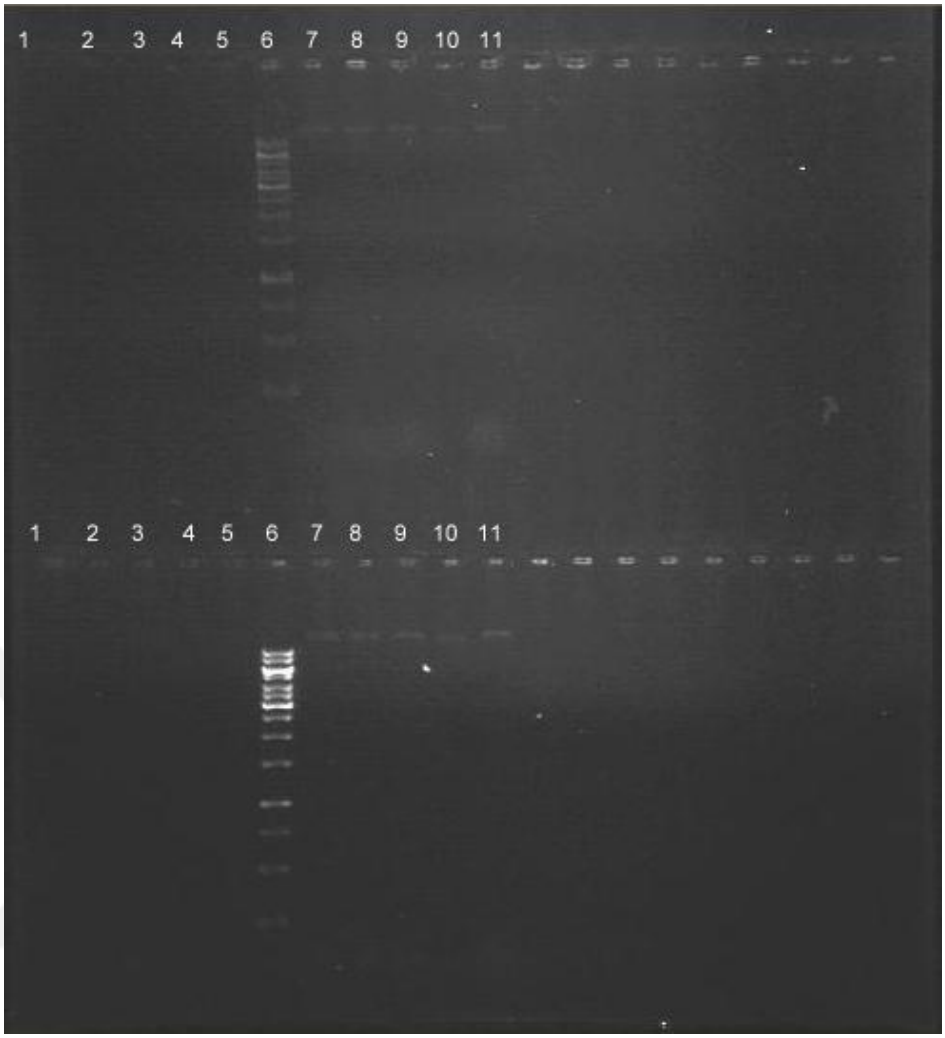
DMC4 kodlu *S.* Typhimurium kontrol suşunun 4, 12 ve 24 saat süresince 35 µm'lik petri tabaklarında oluşturdukları biyofilmden fenol:kloroform yöntemiyle izole edilen eDNA'ların konsantrasyonları incelendiğinde ise, yine aynı biçimde inkübasyon süresi arttıkça eDNA konsantrasyonunun da arttığı, en yüksek eDNA konsantrasyonuna ise 24 saatte ulaşıldığı belirlenmiştir. DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşunun biyofilm yapısında SL1344 kodlu *S.* Typhimurium suşunun biyofilm yapısına kıyasla daha fazla eDNA ihtiva ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.26).




Şekil 4.26 DMC4 kodlu *S.* Typhimurium suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları

## 4.6 İzole Edilen Nükleik Asitlerin DNaz I, Benzonase®, Proteinaz K ve RNaz A ile Muamelesi

Bu çalışmada *S.* Typhimurium suşlarından (DMC4 kodlu suş ve SL1344 kodlu kontrol suşu) fenol:kloroform yöntemiyle izole edilen nükleik asitler (eDNA ve gDNA) enzim uygulanmadan önce 20, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarına dilüe edilmiştir. Nükleik asitler belirtilen enzimlerle belirtilen konsantrasyonlarda (2 U/µl DNaz I, 2 U/µl Benzonase® ve 20 µg/ml Proteinaz K ve 20 µg/ml RNaz A) muamele edilmiş ve enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübason süresi bitiminde enzim ile muamele edilmiş ve hiçbir enzim uygulaması yapılmamış örnekler % 0,7 oranında agaroz içeren jellere yüklenerek EtBr boyamasının ardından jeller UV ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 4.27).




Şekil 4.27 Enzim muamelesine tabi tutulan 100 µg/mL başlangıç konsantrasyonundaki *S.* Typhimurium nükleik asitlerinin agaroz jel görüntüsü

(1-5. kuyular: sırasıyla DNaz I, Benzonase®, Proteinaz K, RNaz A uygulanmış ve hiçbir enzim uygulanmamış eDNA örnekleri; 6. kuyu: 1kb marker; 7-11. Kuyular: sırasıyla DNaz I, Benzonase®, Proteinaz K, RNaz A uygulanmış ve hiçbir enzim uygulanmamış gDNA örnekleri)

*Salmonella* eDNA ve gDNA örneklerinin jel görüntüsü incelendiğinde enzim uygulanmış ve enzim uygulanmamış eDNA örnekleri için jel görüntüsü alınamadığından bir karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır (Şekil 4.28).

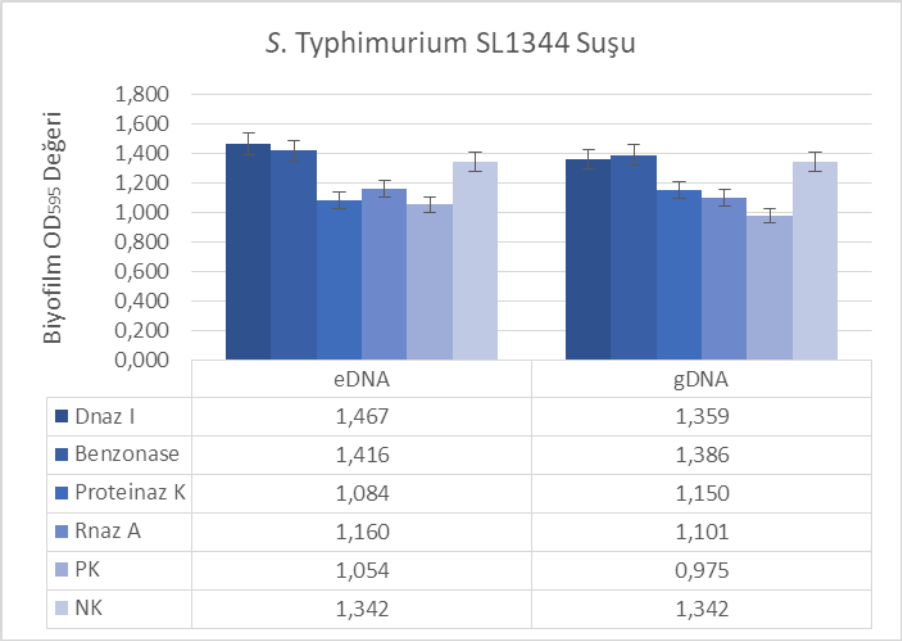
## 4.7 Enzim Muamelesine Tabi Tutulan Nükleik Asitlerin Biyofilm Yapısına Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlardaki DNA örneklerinin biyofilm oluşumuna etkileri belirlenmiştir. Her bakteri örneği için optimum koşullarda, 96 kuyulu polisitren

plaklar kullanılarak biyofilm oluşturulmuştur. Deneyin amacı gereği biyofilm oluşumuna $t_0$ anında, her bakteri için bir gece boyunca uygun besi ortamlarında geliştirilen aktif kültürler (*S.* Typhimurium örnekleri LB/-NaCl ortamında son konsantrasyonu $OD_{595}$= 0,2 ABS) olacak şekilde 100 µL besi ortamı ile karıştırılmıştır. Daha sonra bir önceki çalışmada 20, 50 ve 100 µg/mL başlangıç konsantrasyonlarındaki çeşitli enzimler uygulanmış nükleik asitler ise yapılan ön denemeler sonucunda belirlenmiş olan 10 µL hacminde eklenmiştir. *S.* Typhimurium örneklerinin biyofilm oluşturması için uygun sıcaklık olan 20 °C'de 24 saat ve 48 saat süresince inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresi bitiminde daha önce belirtildiği şekilde tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra, kristal viyole boyaması yapılarak $OD_{595}$ dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

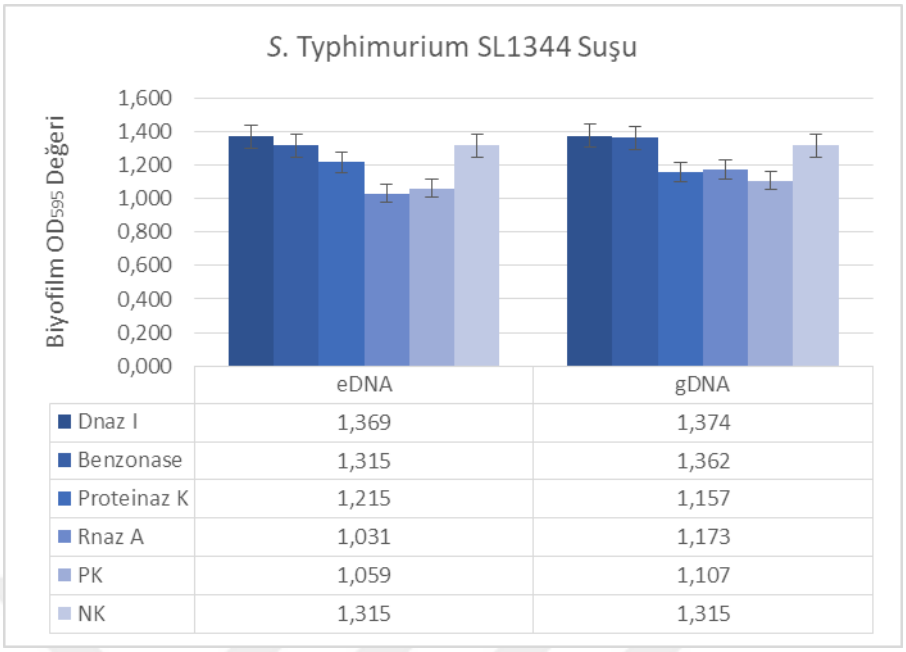
Enzim ile muamele edilmiş nükleik asitlerin biyofilm oluşumuna etkisinin belirlenmesi amacı ile iki farklı kontrol grubu oluşturulmuş ve bu gruplardan alınan spektrofotometrik ölçümler ile karşılaştırmalar yapılmıştır. İlk kontrol grubumuz enzim uygulanmamış nükleik asitlerin varlığında oluşan biyofilm yapısını ifade eden Pozitif Kontrol (PK) grubudur. Diğer kontrol grubumuz ise dışarıdan nükleik asit ilavesi yapılmaksızın oluşan biyofilm yapılarını ifade eden Negatif Kontrol (NK) grubudur. *S.* Typhimurium suşlarının enzim uygulanmış nükleik asitler varlığında geliştirilen biyofilm yapılarının incelenmesi sonucu elde edilen veriler doğrultusunda yapılan istatistik değerlendirmeler bu verilerin ($p<0.01$) oranında anlamlı olduğunu ifade etmektedir.

SL1344 kodlu *S.* Typhimurum kontrol suşu tarafından 20 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I ve Benzonase® enzimi uygulanmış eDNA ve gDNA örneklerinin biyofilme eklenmesi biyofilm miktarını değişen oranlarda arttırırken, Proteinaz K, RNaz A ve pozitif kontrol örneklerinin eklenmesi biyofilm yoğunluğunda ~0,2 birim azalmaya sebep olmuştur (Şekil 4.28).



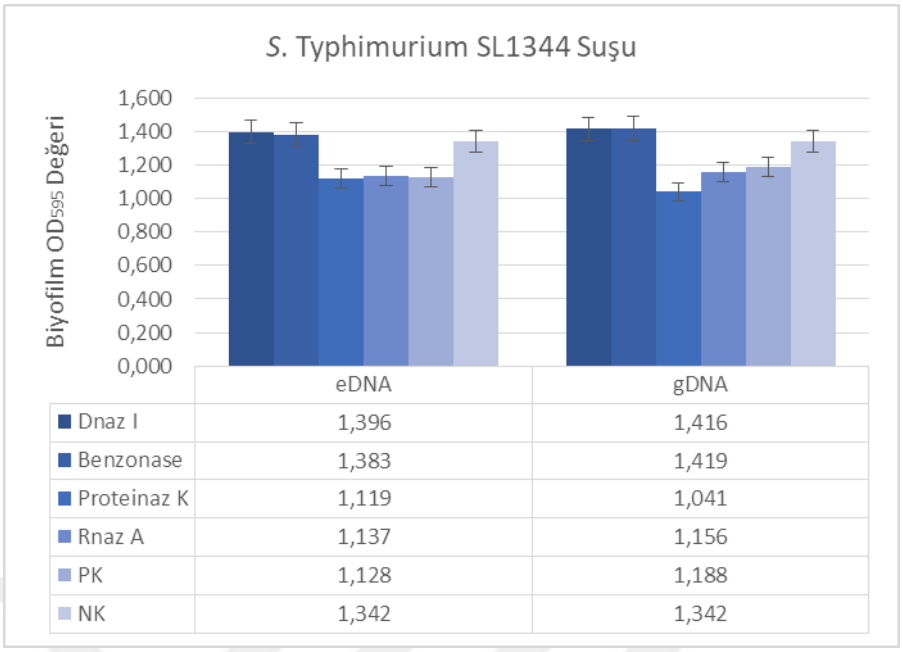

Şekil 4.28 20 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

SL1344 kodlu *S.* Typhimurum kontrol suşu tarafından 50 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I ve Benzonase® enzimi uygulanmış nükleik asitlerin biyofilm yoğunluğunu düşük oranlarda artırdığı, Proteinaz K, RNaz A ve pozitif kontrol örneklerinin eklenmesi sonucunda ise biyofilm kütlesinde ~0,2 birim düzeyinde azalma gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.29).



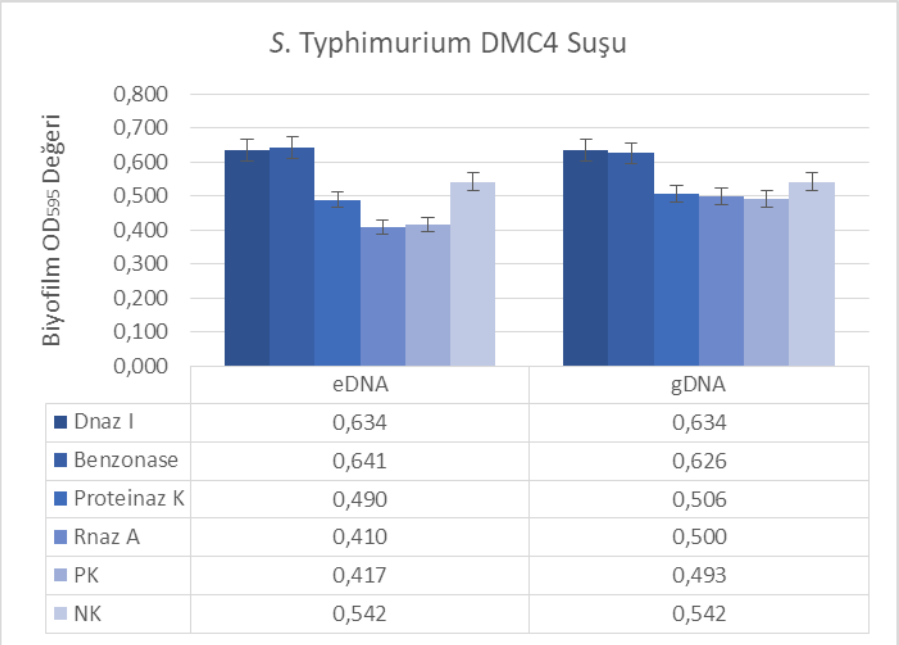

Şekil 4.29 50 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

SL1344 kodlu *S.* Typhimurum kontrol suşu tarafından 100 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I ve Benzonase® enzimiyle muamele edilen nükleik asitlerin biyofilm yoğunluğunu ~<0,1 birim artırdığı; Proteinaz K, RNaz A ve PK örneklerinin eklenmesi sonucunda ise ~>0,1 birim azalttığı görülmektedir (Şekil 4.30).




Şekil 4.30 100 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

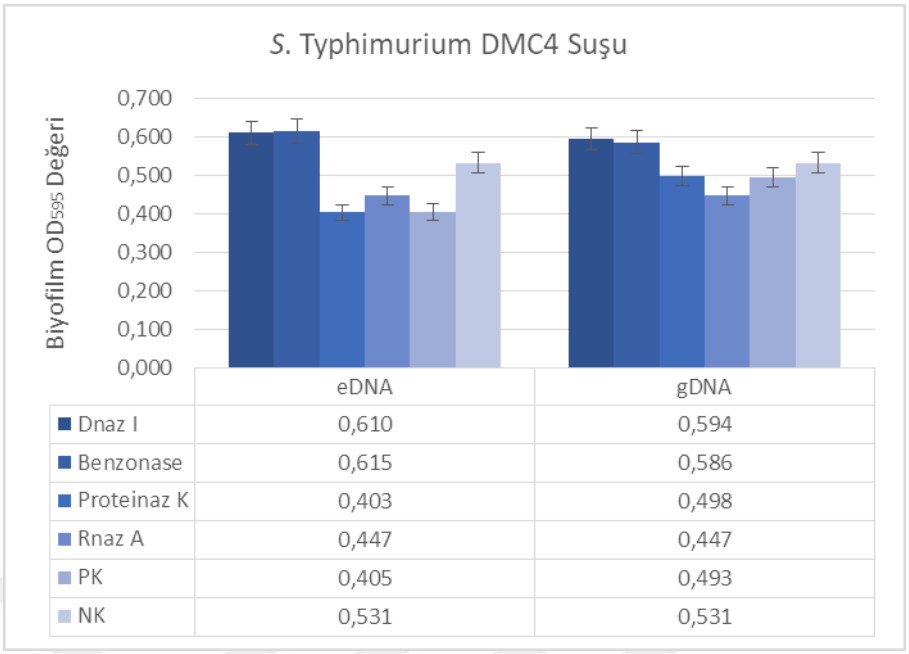
DMC4 kodlu *S.* Typhimurum suşu tarafından 20 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I ve Benzonase® enzimiyle muamele edilen nükleik asitlerin biyofilm yoğunluğunda ~>0,1 birim artışa; Proteinaz K, RNaz A ve PK örneklerinin eklenmesi sonucunda ise ~<0,1 birim azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.31).




| | eDNA | gDNA |
|---|---|---|
| Dnaz I | 0,634 | 0,634 |
| Benzonase | 0,641 | 0,626 |
| Proteinaz K | 0,490 | 0,506 |
| Rnaz A | 0,410 | 0,500 |
| PK | 0,417 | 0,493 |
| NK | 0,542 | 0,542 |

Şekil 4.31 20 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

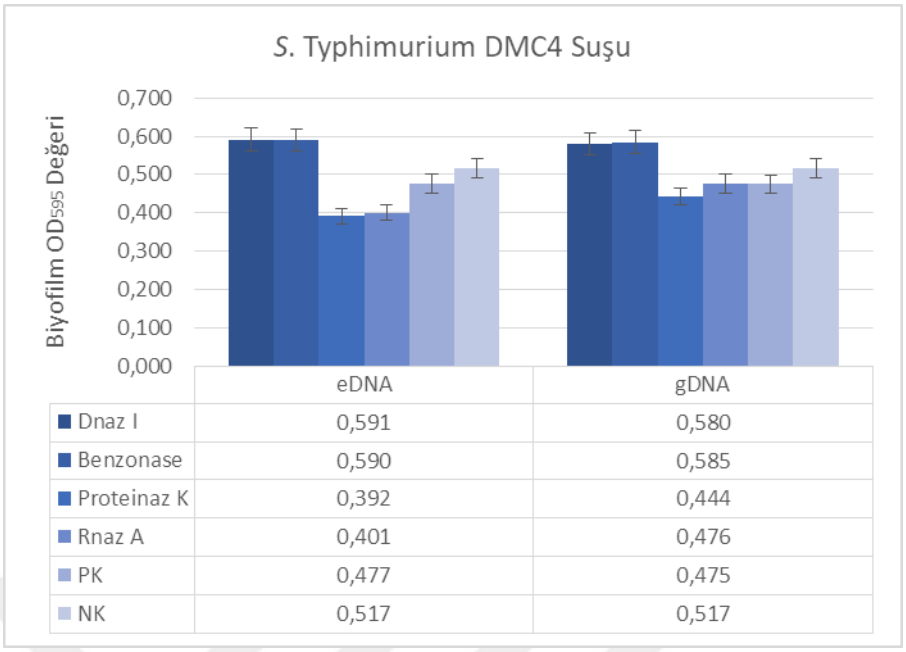
DMC4 kodlu *S.* Typhimurum suşu tarafından 50 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I ve Benzonase® enzimiyle muamele edilen nükleik asitlerin biyofilm kütlesinde düşük oranda artışa, Proteinaz K ve RNaz A ile muamele edilen örnekler ile PK örneklerinin eklenmesi sonucunda ise ~<0,1 birim azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.32).




| | eDNA | gDNA |
|---|---|---|
| Dnaz I | 0,610 | 0,594 |
| Benzonase | 0,615 | 0,586 |
| Proteinaz K | 0,403 | 0,498 |
| Rnaz A | 0,447 | 0,447 |
| PK | 0,405 | 0,493 |
| NK | 0,531 | 0,531 |

Şekil 4.32 50 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

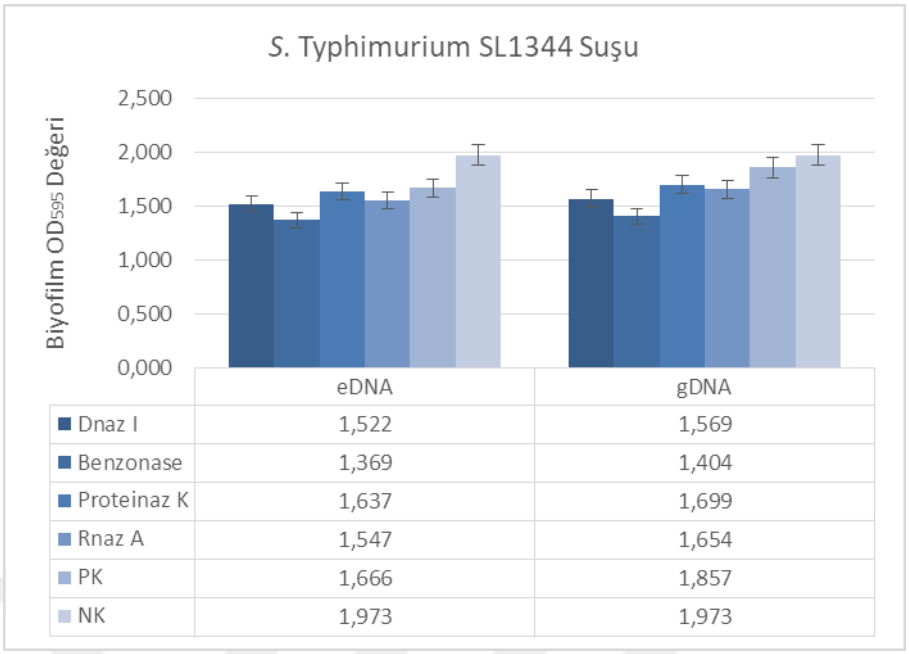
DMC4 kodlu *S.* Typhimurum suşu tarafından 100 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I ve Benzonase® enzimiyle muamele edilen nükleik asitlerin biyofilm yoğunluğunu ~<0,1 oranında artırdığı, Proteinaz K, RNaz A ve PK örneklerinin eklenmesinin ise biyofilm yoğunluğunu düşük oranlarda azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.33).




| | eDNA | gDNA |
|---|---|---|
| Dnaz I | 0,591 | 0,580 |
| Benzonase | 0,590 | 0,585 |
| Proteinaz K | 0,392 | 0,444 |
| Rnaz A | 0,401 | 0,476 |
| PK | 0,477 | 0,475 |
| NK | 0,517 | 0,517 |

Şekil 4.33 100 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

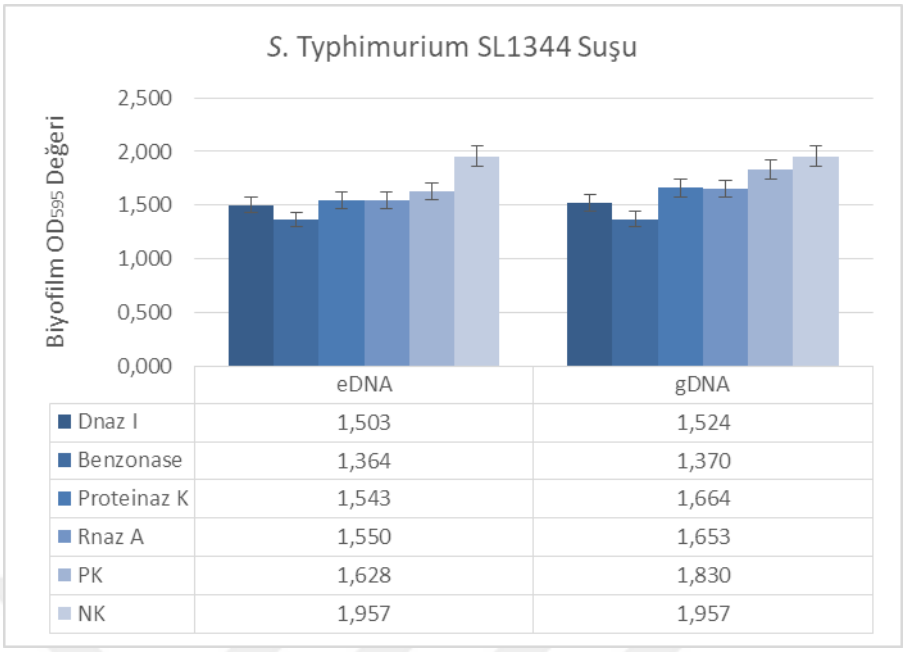
SL1344 kodlu *S.* Typhimurum kontrol suşu tarafından 20 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I ve Benzonase® enzimiyle muamele edilen nükleik asitlerin ~>0,3 birim azalmaya sebep olduğu; Proteinaz K, RNaz A ve PK örneklerinin eklenmesi sonucunda ise azalma düzeyinin ~0,1-0,3 birim arasında olduğu görülmektedir (Şekil 4.34).




| | eDNA | gDNA |
|---|---|---|
| Dnaz I | 1,522 | 1,569 |
| Benzonase | 1,369 | 1,404 |
| Proteinaz K | 1,637 | 1,699 |
| Rnaz A | 1,547 | 1,654 |
| PK | 1,666 | 1,857 |
| NK | 1,973 | 1,973 |

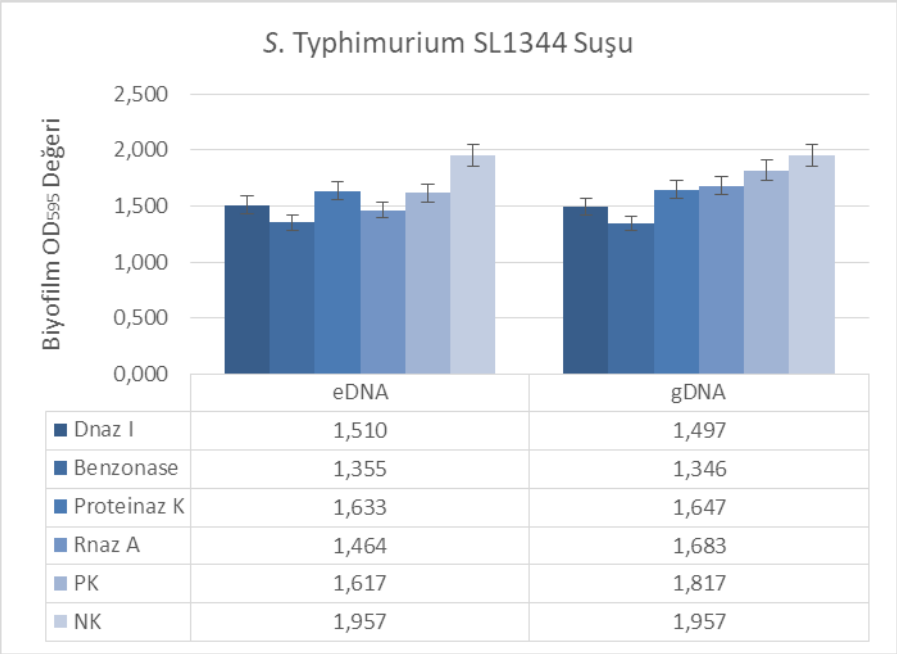
Şekil 4.34 20 µg/mL nükleik asit varlığında *S*. Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 48h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

SL1344 kodlu *S*. Typhimurum kontrol suşu tarafından 50 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I enzimi uygulanmış nükleik asitler biyofilm yoğunluğunu ~0,4 birim; Benzonase® enzimi uygulanmış nükleik asitler ~0,6 birim; Proteinaz K, RNaz A ve PK örneklerinin eklenmesi ise ~>0,2 birim azaltmıştır (Şekil 4.35).




Şekil 4.35 50 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 48h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

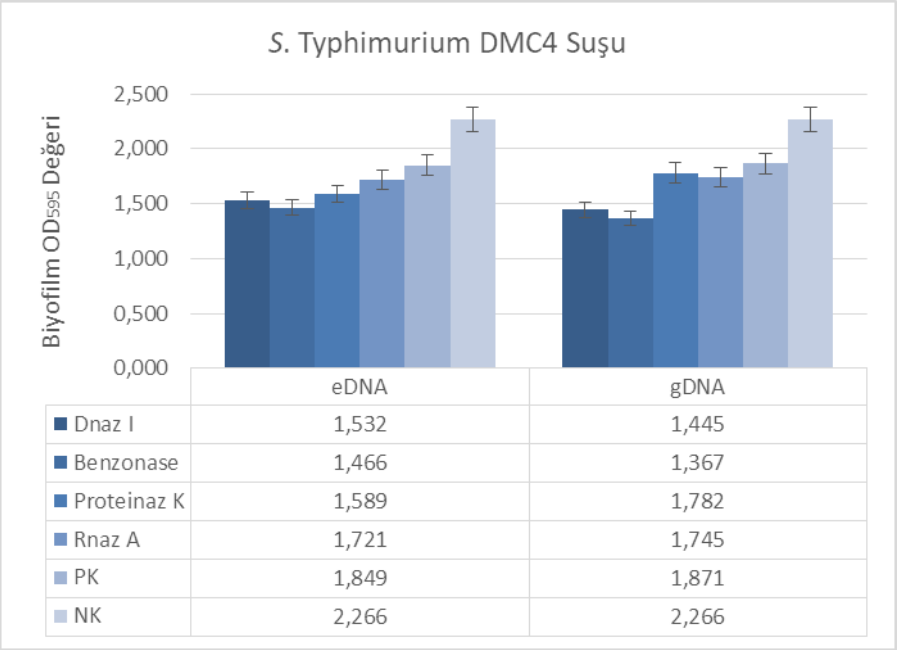
SL1344 kodlu *S.* Typhimurum kontrol suşu tarafından 100 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I enzimi uygulanmış nükleik asitlerin biyofilm yoğunluğunda ~0,4 birim; Benzonase® enzimi uygulanmış nükleik asitlerin ~0,5 birim; Proteinaz K, RNaz A ve PK örneklerinin eklenmesinin ise ~0,3 birim azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.36).




| | eDNA | gDNA |
|---|---|---|
| Dnaz I | 1,510 | 1,497 |
| Benzonase | 1,355 | 1,346 |
| Proteinaz K | 1,633 | 1,647 |
| Rnaz A | 1,464 | 1,683 |
| PK | 1,617 | 1,817 |
| NK | 1,957 | 1,957 |

Şekil 4.36 100 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium SL1344 kodlu kontrol suşu tarafından oluşturulan 48h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

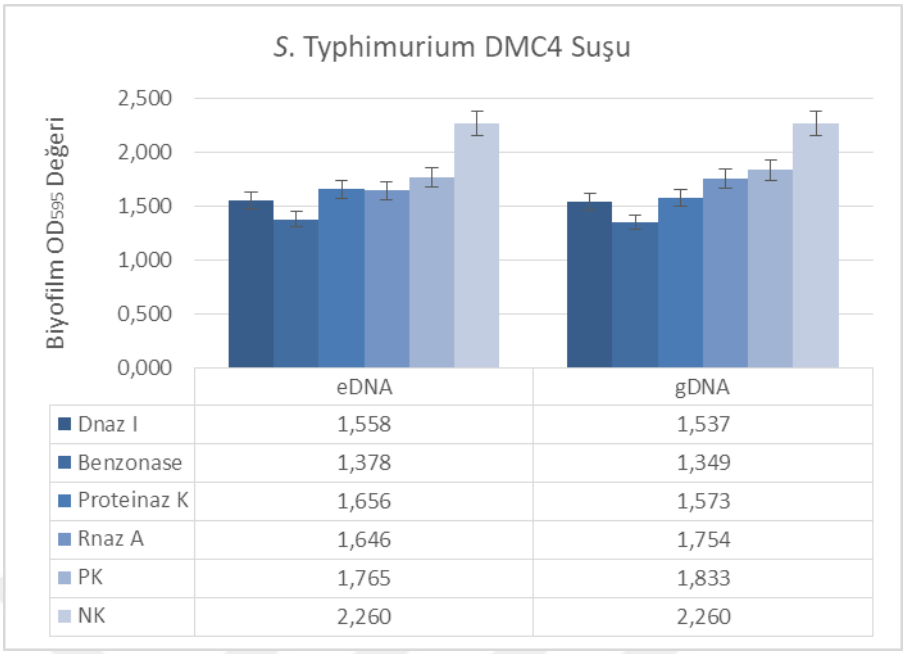
DMC4 kodlu *S.* Typhimurum suşu tarafından 20 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I ve Benzonase® enzimiyle muamele edilen nükleik asitlerin biyofilm yoğunluğunu ~<0,7 oranında azalttığı; Proteinaz K, RNaz A ve PK örneklerinin eklenmesi sonucunda da biyofilm yoğunluğunun değişik oranlarda azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.37).




| | eDNA | gDNA |
|---|---|---|
| Dnaz I | 1,532 | 1,445 |
| Benzonase | 1,466 | 1,367 |
| Proteinaz K | 1,589 | 1,782 |
| Rnaz A | 1,721 | 1,745 |
| PK | 1,849 | 1,871 |
| NK | 2,266 | 2,266 |

Şekil 4.37 20 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 48h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

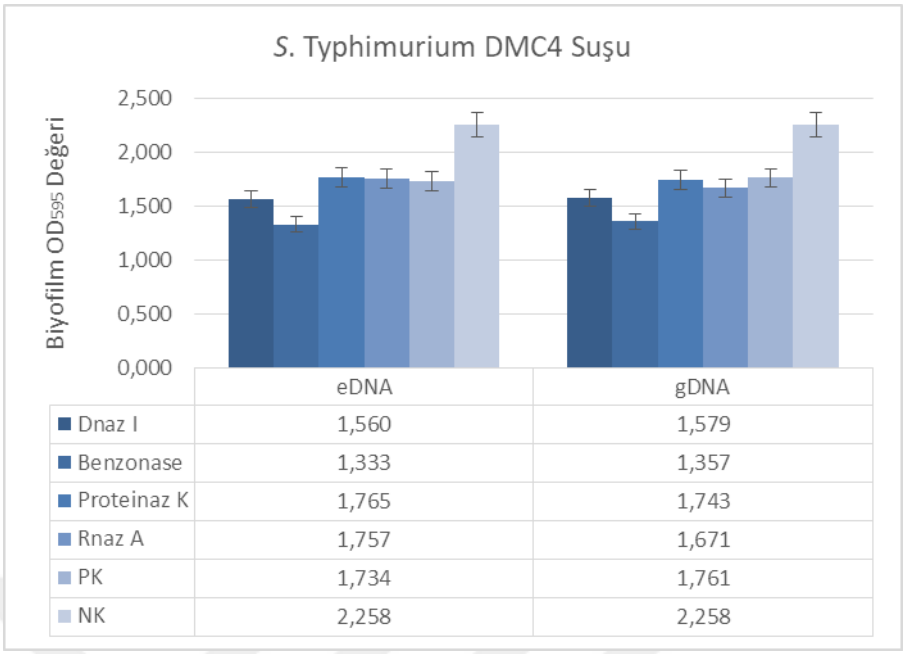
DMC4 kodlu *S.* Typhimurum suşu tarafından 50 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I, Benzonase®, Proteinaz K, RNaz A enzimleri uygulanan örneklerin ve PK örneklerinin eklenmesi biyofilm yoğunluğunu ~0.6-0,9 birim azaltmıştır (Şekil 4.38).




| | eDNA | gDNA |
|---|---|---|
| Dnaz I | 1,558 | 1,537 |
| Benzonase | 1,378 | 1,349 |
| Proteinaz K | 1,656 | 1,573 |
| Rnaz A | 1,646 | 1,754 |
| PK | 1,765 | 1,833 |
| NK | 2,260 | 2,260 |

Şekil 4.38 50 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 48h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

DMC4 kodlu *S.* Typhimurum suşu tarafından 100 µg/mL nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I ve Benzonase® enzimleriyle muamele edilen nükleik asitlerin eklenmesiyle biyofilm yoğunluğunda ~0,6-0,9 birim azalma, Proteinaz K, RNaz A ve PK örneklerinin eklenmesi sonucunda ise ~0,5 birim azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.39).




| | eDNA | gDNA |
|---|---|---|
| Dnaz I | 1,560 | 1,579 |
| Benzonase | 1,333 | 1,357 |
| Proteinaz K | 1,765 | 1,743 |
| Rnaz A | 1,757 | 1,671 |
| PK | 1,734 | 1,761 |
| NK | 2,258 | 2,258 |

Şekil 4.39 100 µg/mL nükleik asit varlığında *S.* Typhimurium DMC4 kodlu suşu tarafından oluşturulan 24h'lik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

# 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırmada gıda kökenli hastalık etmeni mikroorganizmalardan tüm dünyada en yaygın rastlanılan Gram negatif bakteri cinslerinden biri olan *Salmonella* cinsine ait (Hendriksen vd. 2011) bir serovaryetenin iki suşunda (*S.* Typhimurium SL1344 ve DMC4) biyofilm oluşumu üzerine eDNA'nın (hücre dışı DNA) rolünün belirlenmesi ve bu yolla söz konusu hastalık etmenlerinin kalıcılığının kontrolünde etkin stratejilerin geliştirilmesine esas teşkil edecek bilgi birikiminin sağlanması amaçlanmıştır (Arias ve Murray 2012). Ayrıca antibiyotik ve DNA parçalayıcı enzimlerin tek tek ve kombine kullanımlarının bu patojenlerin oluşturduğu biyofilmler üzerine etkinlikleri tanımlanarak, özellikle abiyotik yüzeylerdeki kontaminasyonlardan korunmada kullanım potansiyeli taşıyan ajanların belirlenmesi hedeflenmiştir.

*S.* Typhimurium suşlarında (SL1344 ve DMC4) planktonik formların sıvı besiyerinde ürettiği (ortama saldığı) eDNA, izole edilerek genomik DNA örnekleri ile karşılaştırılmak suretiyle doğrulanmış ve yapılan PicoGreen® ölçümleri sonucunda her iki cinse ait türlerin planktonik formlarının kültür ortamlarında eDNA salınımının gerçekleştiği belirlenmiştir. *Salmonella* planktonik formlarında eDNA salınımına ait ilk verileri teşkil eden bulgularımızda eDNA miktarının çok yüksek oluşu, eDNA nın kesikli kültürlerde genetik regülasyon üzerinde önemli bir rolü olduğuna işaret etmektedir. Nitekim *P. aureginosa* laslrll planktonik kültürleri ile yürütülen bir çalışmada (Allesen-Holm vd. 2006) eDNA salınımının geç logaritmik fazda başladığı ve durma fazında maksimuma ulaştığı belirlenmiştir. Araştırıcılar daha sonra, bu suşun yeter sayı algılama regülasyon sistemleri (quorum-sensing) bozulmuş bir mutantında eDNA salınımının gerçekleşmediğini saptamıştır. Bu bulgudan hareketle araştırıcılar, eDNA'nın planktonik kültürlerde popülasyon sinyallerine bağlı olarak fonksiyonel olduğu yorumunu yapmıştır. Bu durum *Rhodovulum, Streptococcus, Reinheimera* türlerinde de örneklenmiştir (Petersen vd. 2005, Suzuki vd. 2009, Dominiak vd. 2011). Ayrıca planktonik bakteri formları ile yürütülen bir diğer çalışmada ise (Tang vd. 2013) bir önceki çalışmadan farklı olarak, *Pseudomonas* ile birlikte *Reinheimera, Microbacterium* ve *Serratia* türlerinin planktonik kültürlerinde eDNA salınımının erken ekponansiyel üreme fazında başladığı ve geç logaritmik üreme fazında maksimuma

ulaştığı belirlenmiştir. Tüm bu veriler, çalışmamızda planktonik formlarla yürütülen eDNA salınımı bulguları ile paralellik göstermekte ve eDNA'nın biyofilm oluşumu yanında planktonik kültürlerdeki rolünün belirlenmesinin de hücre fizyolojisinin anlaşılması açısından önem taşıdığına işaret etmektedir.

Çalışmamızın temel amacı eDNA'nın *Salmonella* biyofilmlerinin üretimindeki rolünü belirlemek olduğundan, bu aşamadan sonra, çalışılan suşlarda biyofilm üretim düzeylerinin ve eDNA salınımının, optimum biyofilm üretim sıcaklığında (20°C), zamana bağlı (4, 12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde) değişimi incelenmiştir. Bu denemeler sonucunda *S.* Typhimurium suşlarında en yüksek biyofilm üretimi 24 saatte, eDNA'nın yüksek düzeyde salınımı da maksimum biyofilm üretim zamanı ile aynı bulunmuştur. Değişik çalışmalarda eDNA salınımının, biyofilm oluşumunun ilk aşamasından itibaren arttığı ve eDNA'nın biyofilm matriksinde birkiminin adezyonda, bakteriyel agregasyonun stabilitesinde, dış etkilere karşı korunmada, hareketliliğin regülasyonunda, besinsel gereksinimlerin karşılanmasında ve genetik aktarımda rol oynadığı belirlenmiştir (Whitchurch vd. 2002, Mulcahy vd. 2008, Vilain vd. 2009, Bakkali 2013, Sena-Vélez vd. 2016, Zhao vd. 2017). Biyofilm oluşumunda eDNA salınımı dikkate alındığında *Salmonella* suşları için elde ettiğimiz veriler bu literatür verileri ile paralellik göstermektedir. Ancak denemelerde kullanılan iki suşta da, planktonik formlarından salınan eDNA miktarı, aynı bakterilerin aynı inkübasyon zamanında biyofilm yapılarından salınan eDNA miktarından daha fazladır. Bu bulgular, eDNA'nın söz konusu bakterilerde sadece biyofilm oluşumunda değil, planktonik hücrelerin kesikli kültürlerinde değişik üreme fazları arasındaki adaptasyonda da rol aldığının işaretleridir. Özellikle, kesikli bakteri kültürlerinde yer alan planktonik hücreler üzerindeki fiber yapılarında eDNA'nın belirlenmiş oluşu bu öngörüyü desteklemektedir (Sena-Vélez vd. 2016).

*Salmonella* suşlarının ürettiği biyofilm yapılarında, tespit edilen eDNA'nın, bu yapılarda nasıl bir rol oynadığının belirlenmesine yönelik yürütülen çalışmaların ilk aşamasında, *Salmonella* biyofilmlerinin üzerinde farklı antibiyotiklerin ve antibiyotiklerle birlikte DNA parçalayıcı enzimlerin (DNaz I ve Benzonase®) kombine etkileri incelenmiştir. Biyofilm yapıları üzerinde antibiyotiklerin tek tek etkilerinin

incelendiği çalışmalarda; *Salmonella* suşlarında denenen tüm antibiyotikler, tüm deneme sürelerinde yüksek düzeyde etkinlik göstermişlerdir. Bu veriler de *Salmonella* biyofilmleri üzerine yürütülen antibiyotik etkinlik çalışmalarındaki veriler ile yüksek oranda uyum göstermektedir. Değişik araştırmalarda *Salmonella* biyofilmlerinin diğer tek suştan oluşan biyofilmlere oranla antibiyotiklere karşı daha hassas olduğu, başta sülfanamidler, tetrasiklinler, kinolonlar, penisilinler ve amiloglikozitler olmak üzere çok sayıda antibiyotiğe farklı düzeylerde hassasiyet gösterdiği saptanmıştır (Dallal vd. 2010, Ziech vd. 2017).

DNaz I ve Benzonase® enzimlerinin *Salmonella* biyofilmleri üzerine genel olarak çok düşük düzeyde etki gösterdiği, ancak bu etkinin canlı hücre sayımlarımlarında $10^1$ kob/mL seviyesinde dahi farklanmaya yol açmadığı belirlenmiştir. *Salmonella* suşlarının biyofilm yapılarına karşı DNaz I ve Benzonase® enzimlerinin tek tek kullanımındaki inhibisyon etkinlikleri çok düşük bulunmuştur. Özellikle *Salmonella* suşlarında eDNA'nın biyofilm üzerine etkinliği oldukça tartışmalı bir durum arz etmektedir. Bazı araştırıcılar eDNA'nın *Salmonella* biyofilmlerinin oluşumunda özellikle biyofilm oluşumunun ilk aşamalarında önemli bir katkı sağladığını, bazı araştırıcılar ise tam aksine eDNA'nın *Salmonella* biyofilmlerinin oluşumunu olumsuz yönde etkilediğini ileri sürmektedir (Karaca vd. 2013, Wang vd. 2014, Vorkapic vd. 2016, Di Domenico vd. 2017). Sonuç olarak antibiyotiklerin tek başına kullanımı ile *Salmonella* biyofilmlerinin eradikasyonunun mümkün olabileceği, oldukça düşük antibiyofilm etkinliği gösteren DNaz I ve Benzonase® enzimlerinin tek başına ya da antibiyotiklerle kombine kullanımının *Salmonella* biyofilmleri ile mücadelede bir yarar sağlayamayacağını söylemek mümkündür.

Çalışmamızın son aşamasında araştırmada kullanılan bakterilerin biyofilm üretim özellikleri üzerine eDNA'nın rolünün tanımlanması gerçekleştirilmiştir. *Salmonella*'nın her iki suşunun biyofilm oluşumu süresince eDNA'nın üretildiğinin belirlenmesinin ardından, fenol-kloroform yöntemi ile izole edilen eDNA örneklerinin biyofilm yapılarında zamana bağlı miktarsal tayinleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler tüm suşlarda en yüksek düzeyde eDNA üretiminin, 24 saat sonunda gerçekleştiğini göstermiştir. Bu aşamadan sonra 20, 50 ve 100 ng/µl eDNA ve g (genomik) DNA ilave

edilmiş ortamlarda 24 ve 48 saat süresince geliştirilen biyofilmlerin miktarsal tayinleri yapılarak her iki tip DNA'nın etkinliği ve bunun yanında söz konusu DNA'ların ilave edildiği ortamlara proteinaz K, RNaz A, DNaz I ve Benzonase® ilave edilerek kombine etkiler tanımlanmıştır. Çalışma sonuçlarında, eDNA'nın ve gDNA'nın biyofilm üretiminin engellenmesi yönünde net bir etkinlik gösterdiği 24 ve 48 saat inkübasyon periyotlarının her ikisi için de açık bir şekilde belirlenmiştir. Burada ortaya çıkan ilginç bir diğer bulgu, planktonik ve biyofilm oluşturan hücrelerin ürettiği ve ortama salınımını gerçekleştirdiği eDNA yanında hücre lizisi ile ortama geçen genomik DNA'nın biyofilm inhibisyon etkinliklerinin belirgin bir farklılık göstermemesidir. eDNA ve gDNA'nın denenen *Salmonella* suşlarında biyofilm oluşumunu inhibe ettiğinin bir diğer kanıtı ise 24 saat uygulamalarında DNaz I ve Benzonase® enzimi uygulamalarının biyofilm üretimini artırmasıdır. Bu sonuçlar biyofilm içerisindeki hücre dışı DNA'nın, kökeni ne olursa olsun, yıkımının biyofilm üzerindeki inhinisyon etkilerini ortadan kaldırdığını kanıtlamaktadır. Diğer enzimler (RNaz A ve Proteinaz K) ise 24 saatte, genelde biyofilm üretim etkinliğini artırma yönünde etki göstermiştir. Bu sonuçlar *Salmonella* biyofilmlerinin erken olgunlaşma aşamalarında hücre dışı DNA'nın rolünün diğer matriks bileşenleri (proteinler ve RNA) tarafından kısmen inhibe edildiğine işaret etmektedir. Diğer yandan 48 saatte Benzonase® ve DNaz I uygulamaları biyofilm etkinliğini artırmamış, tam aksine hücre dışı DNA'nın etkisi gibi ve hatta daha yüksek düzeyde bir inhibisyona neden olmuştur. Bu durum 24 saat örnekleri ile bir tezat teşkil ediyor gibi görünse de, literatür verileri ile tam bir uyum göstermektedir. Zira *Salmonella* biyofilmleri ve dolayısı ile ektraselüler matriks yapısı olgunlaştıkça enzimlerin ya da antimikrobiyallerin biyofilm yapılarına penetrasyonu nerede ise olanaksız hale gelirken, programlanmış hücre ölümü ve kardeş hücre katli (fratrisidal etki) ve eDNA salınımının teşviki gibi etmenlerle hücre dışı DNA miktarı daha fazla artmakta ve inhibisyon etkinliği yükselmektedir (Jakubovics vd. 2013, Wang vd. 2014, Aldecoa vd. 2017). Bu bulgular, *Salmonella* planktonik hücrelerinin de eDNA ürettiğine dair verilerimiz ile birleştirilerek değerlendirildiğinde, planktonik hücrelerde zaten var olan eDNA'nın bazı yayınlarda öne sürülen, adhezin gibi davranarak biyofilm oluşumunun çok erken aşamasında yüzeyde tutunmayı gerçekleştirebileceği görüşünü desteklemektedir. Ancak biyofilm gelişiminin diğer aşamalarında artan eDNA salınımı, biyofilm yapısının inhibisyonuna yol açmaktadır. Dolayısı ile eDNA'nın *Salmonella*'da

biyofilm yapıları içerisinde aktif salınımının biyofilm yapılarının güçlendirilmesi amacı ile gerçekleştiği genellemesinin, bizim bulgularımız ışığında, yapılamayacağı ortaya çıkmaktadır.

Elde edilen bulgular ışığında *Salmonella* biyofilmlerinin eradikasyonunda antibiyotikler çok güçlü ajanlar olarak öne çıkarken, hücre dışı DNA'nın da biyofilm inhibisyonunda rol aldığının belirlenmesi, özellikle gıda endüstrisinde *Salmonella* biyofilmlerinin eradikasyonunda alternatif bir yol olarak, fermente gıdalarda kullanılan starter kültür suşlarının lizisi sonucu ortama yayılan DNA'nın kullanılabilirliğine işaret etmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR


Aldecoa, A.L.I. De, Zafra, O. and González-pastor, J.E. 2017. Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities, *8*(July), 1–19.

Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S. and Tolker-Nielsen, T. 2006. A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, *59*(4), 1114–1128.

Anonymous. FDA. 2011. Bacterial Pathogen Growth and Inactivation. *Fish and Fishery Products, Hazards and Controls Guidance*. Retrieved from http://www. fda. gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM252447.pdf

Anonymous. WHO. 2014. Antimicrobial resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, *61*(3), 383–94.

Anonymous. 2017a. Newsroom Image Library - Disease Agents | CDC Online Newsroom | CDC. Retrieved August 31, 2017, from https://www.cdc.gov/ media/subtopic/library/diseases.htm

Anonymous. 2017b. Kanamycin disulfate salt from Streptomyces kanamyceticus aminoglycoside antibiotic | Sigma-Aldrich. Retrieved December 6, 2017, from https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/k1876?lang=en&region=TR

Anonymous. 2017c. Ampicillin sodium salt powder - multiple sizes available | Sigma-Aldrich. Retrieved December 6, 2017, from https://www.sigmaaldrich. com/catalog/product/sial/a9518?lang=en&region=TR

Anonymous. 2017d. Tetracycline ≥98.0% (NT) | Sigma-Aldrich. Retrieved December 6, 2017. https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ sigma/87128? lang = en&region=TR

Anonymous. 2017e. Nalidixic acid ≥98% | Sigma-Aldrich. Retrieved December 6, 2017, https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/ n8878?lang= en & region=TR

Arias, C. A. and Murray, B. E. 2012. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(4), 266–278.

Bakkali, M. 2013. Could DNA uptake be a side effect of bacterial adhesion and twitching motility? *Archives of Microbiology*, *195*(4), 279–289.

Bakker, E.M. and Tiddens, H.A.W.M. 2007. Pharmacology, clinical efficacy and safety of recombinant human DNase in cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med, 1: 317–32*.

Barak, J.D. and Liang, A.S. 2008. Role of soil, crop debris, and a plant pathogen in

Salmonella enterica contamination of tomato plants. *PLoS ONE*, *3*(2).

Barnhart, M.M. and Chapman, M.R. 2006. Curli Biogenesis and Function. *Annu Rev Microbiol*, 131–147.

Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martínez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M. and Hardt, W.D. 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infection and Immunity*, *71*(5), 2839–2858.

Bennett, J., Dolin, R. and Blaser, M.J. 2004. *Principles and Practice of Infectious diseases*.

Berger, C. N., Shaw, R. K., Brown, D. J., Mather, H., Clare, S., Dougan, G. and Frankel, G. 2009. Interaction of Salmonella enterica with basil and other salad leaves. *ISME*

Bloomberg, G. 1991. Designing Protein as Emulsifier. , *Lebensmit- Teltecnologie*, *Vol. 24*, *1*.

Boddicker, J.D., Ledeboer, N.A., Jagnow, J., Jones, B.D. and Clegg, S. 2002. Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by Salmonella enterica serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the fimH gene of the fim gene cluster. *Molecular Microbiology*, *45*(5), 1255–1265.

Boyd, A. and Chakrabarty, A.M. 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of Pseudomonas aeruginosa. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(7), 2355–2359.

Böckelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, T.R., Wecke, J., Lawrence, J.R. and Szewzyk, U. 2006. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiology Letters*, *262*(1), 31–38.

Castelijn, G. A. A., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R. and Abee, T. 2012. Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of Salmonella Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling*, *28*(1), 51–63.

Chandra, M., Thakur, S., Narang, D., Kaur, G. and Sharma, N. 2017. Evaluation of Salmonella Typhimurium biofilm against some antibiotics. *Indian Journal of Experimental Biology*, *55*, 562–567.

Chrzanowski, Ł., Owsianiak, M., Szulc, A., Marecik, R., Piotrowska-Cyplik, A., Olejnik-Schmidt, A. K. and Heipieper, H.J. 2011. Interactions between rhamnolipid biosurfactants and toxic chlorinated phenols enhance biodegradation of a model hydrocarbon-rich effluent. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *65*(4), 605–611.

Chrzanowski, L., Wick, L.Y., Meulenkamp, R., Kaestner, M. and Heipieper, H. J. 2009. Rhamnolipid biosurfactants decrease the toxicity of chlorinated phenols to

Pseudomonas putida DOT-T1E. *Letters in Applied Microbiology*, *48*(6), 756–762.

Corning, P. A. 2002. The re-emergence of emergence: A venerable concept in search of a theory. *Complexity*, *7*(6), 18–30.

Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. and Marrie, T. J. 1987. Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology*, *41*(1), 435–464.

Costerton, W. 1995. Microbial Biofilms. J. Indus Microbiol. 15: 137-40

Crawford, R.W., Reeve, K. E. and Gunn, J. S. 2010. Flagellated but not hyperfimbriated Salmonella enterica serovar typhimurium attaches to and forms biofilms on cholesterol-coated surfaces. *Journal of Bacteriology*, *192*(12), 2981–2990.

Cucarella, C., Solano, C. and Valle, J. 2001. Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Microbiology*, *183*(9), 2888–2896.

D'Aoust, J.Y. and Maurer, J. 2007. Salmonella Species. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition. ASM Press, Washington. p. 187-236

Dallal, M. M. S., Doyle, M. P., Rezadehbashi, M., Dabiri, H., Sanaei, M., Modarresi, S., and Sharifi-Yazdi, M. K. 2010. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of Salmonella serotypes, Campylobacter and Yersinia spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food Control*, *21*(4), 388–392.

Danese, P.N., Pratt, L.A. and Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, *182*(12), 3593–6.

Darby, C., Hsu, J.W., Ghori, N. and Falkow, S. 2002. Caenorhabditis elegans: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature*, *417*(6886), 243–244.

Das, T., Sehar, S. and Manefield, M. 2013. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, *5*(6), 778–786.

Davey, M. E. and O'toole, G. A. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*(4), 847–867.

DePas, W.H., Syed, A.K., Sifuentes, M., Lee, J.S., Warshaw, D., Saggar, V. and Chapman, M. R. 2014. Biofilm formation protects Escherichia coli against killing by Caenorhabditis elegans and Myxococcus xanthus. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(22), 7079–7087.

Di Domenico, E. G., Cavallo, I., Pontone, M., Toma, L. and Ensoli, F. 2017. Biofilm Producing Salmonella Typhi: Chronic Colonization and Development of Gallbladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9).

Dominiak, D. M., Nielsen, J. L. and Nielsen, P. H. 2011. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. *Environmental Microbiology*, *13*(3), 710–721.

Donlan, R. M. and Costerton, J. W. 2002. Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology*, *15*(2), 167–193.

Evans, L. R. and Linker, A. 1973. Production and characterization of the slime polysaccharide of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, *116*(2), 915–924.

Extremina, C.I., Costa, L., Aguiar, A.I., Peixe, L. and Fonseca, A.P. 2011. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *Journal of Microbiological Methods*, *84*(2), 167–173.

Flemming, H.C. 2016. EPS—Then and Now, 1–18. Microorganisms 4:E41.

Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. and Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(9), 563–575.

Fluckiger, U., Ulrich, M., Steinhuber, A., Döring, G., Mack, D., Landmann, R. and Wolz, C. 2005. Biofilm formation, icaADBC transcription and polysaccharide intercellular adhesin synthesis by staphylococci in a device-related infection model. *Infection and Immunity*, *73*(3), 1811–1819.

Fong, J.C.N., Karplus, K., Schoolnik, G.K. and Yildiz, F.H. 2006. Identi cation and Characterization of RbmA, a Novel Protein Required for the Development of Rugose Colony Morphology and Bio lm Structure in. *Society*, *188*(3), 1049–1059.

Fong, J.C.N. and Yildiz, F.H. 2007. The rbmBCDEF gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in Vibrio cholerae. *Journal of Bacteriology*, *189*(6), 2319–2330.

Friedman, L. and Kolter, R. 2004a. Genes involved in matrix formation in Pseudomonas aeruginosa PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, *51*(3), 675–690.

Friedman, L. and Kolter, R. 2004b. Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components of the Pseudomonas aeruginosa Biofilm Matrix. *J Bacteriol*, *186*(14), 4457–4465.

Gacesa, P. 1998. Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. *Microbiology*, *144: 1133*-.

Galán, J.E. 1996. Molecular genetic bases of Salmonella entry into host cells. *Molecular Microbiology*, *20*(2), 263–271.

Garrett, T.R., Bhakoo, M. and Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, *18*(9), 1049–1056.

Gautam, K.K. and Tyagi, V.K. 2006. Microbial Surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science*, *55*(4), 155–166.

Gerstel, U., Park, C. and Römling, U. 2003. Complex regulation of csgD promoter activity by global regulatory proteins. *Molecular Microbiology*, *49*(3), 639–654.

Ghigo, J. M. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, *412*(6845), 442–445.

Ginocchio, C.C., Olmsted, S.B., Wells, C. L. and Galán, J.E. 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on Salmonella typhimurium. *Cell*, *76*(4), 717–724.

Girard, V. and Mourez, M. 2006. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: Structural and functional features. *Research in Microbiology*.

Govan, J.R. and Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia. *Microbiological Reviews*, *60*(3), 539–574.

Gualdi, L., Tagliabue, L., Bertagnoli, S., Ieranò, T., De Castro, C. and Landini, P. 2008. Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in Escherichia coli. *Microbiology*, *154*(7), 2017–2024.

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. and Tribedi, P. 2016. Biofilm, pathogenesis and prevention a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, *198*(1), 1–15.

Halkman, A.K. ve Ayhan, K. 2000. *Mikroorganizma Sayımı*. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*. Ankara University.

Hall-Stoodley, L., Nistico, L., Sambanthamoorthy, K., Dice, B., Nguyen, D., Mershon, W.J. and Post, J.C. 2008. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in Streptococcus pneumoniae clinical isolates. *BMC Microbiology*, *8*, 173.

Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsén, A. and Normark, S. 1995. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in Escherichia coli K-12. *Molecular Microbiology*, *18*(4), 661–670.

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. and Götz, F. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. *Molecular Microbiology*, *20*(5), 1083–1091.

Hendriksen, R.S., Vieira, A.R., Karlsmose, S., Lo Fo Wong, D.M.A., Jensen, A.B., Wegener, H.C. and Aarestrup, F.M. 2011. Global Monitoring of *Salmonella* Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories

from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, *8*(8), 887–900.

Henrici, A. 1932. Studies of Freshwater Bacteria: A Direct Microscopic Technique. *J. Bacteriol*, 277–287.

Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. and Parsek, M.R. 2001. Alginate overproduction affects pseudomonas aeruginosa biofilm structure and function. *Journal of Bacteriology*, *183*(18), 5395–5401.

Hinnebusch, B.J. and Erickson, D.L. 2008. Yersinia pestis biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. *Current Topics in Microbiology and Immunology*.

Hurley, D., McCusker, M.P., Fanning, S. and Martins, M. 2014. Salmonella-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Frontiers in Immunology*, *5*(OCT), 1–11.

Huseby, M.J., Kruse, A.C., Digre, J., Kohler, P.L., Vocke, J.A., Mann, E.E. and Earhart, C.A. 2010. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(32), 14407–12.

Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., De Pinna, E., Nair, S., and Weill, F.X. 2014. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, *165*(7), 526–530.

Itoh, Y., Rice, J.D., Goller, C., Pannuri, A., Taylor, J., Meisner, J. and Romeo, T. 2008. Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification and export of the Escherichia coli biofilm adhesin poly-??-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *Journal of Bacteriology*, *190*(10), 3670–3680.

Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B. and Kaplan, J.B. 2008. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(2), 470–476.

Izano, E.A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Mulks, M.H., Velliyagounder, K., Ragunath, C. and Kaplan, J.B. 2007. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in Actinobacillus pleuropneumoniae. *Microbial Pathogenesis*, *43*(1), 1–9.

Jackson, K.D., Starkey, M., Kremer, S., Parsek, M.R. and Wozniak, D.J. 2004. Identification of psl, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for Pseudomonas aeruginosa PAO1 biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, *186*(14), 4466–4475.

Jakubovics, N.S., Shields, R.C., Rajarajan, N. and Burgess, J.G. 2013. Life after death: The critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, *57*(6), 467–475.

Jeffery, U., Ruterbories, L., Hanel, R. and LeVine, D.N. 2017. Cell-Free DNA and DNase Activity in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *31*(5), 1441–1450.

Johnson, L., Horsman, S.R., Charron-Mazenod, L., Turnbull, A.L., Mulcahy, H., Surette, M.G. and Lewenza, S. 2013. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *BMC Microbiology*, *13*(1), 115.

Jones, C.G., Lawton, J.H.and Shachak, M. 1994. Organisms as ecosystem Organisms engineers. *Oikos*, *69*(3), 373–386.

Kaplan, J. 2009. Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *Int J Artif Organs*, *32*, *545–55*.

Karaca, B., Akcelik, N.and Akcelik, M. 2013. Biofilm-producing abilities of Salmonella strains isolated from Turkey. *Biologia*, *68*(1), 1–10.

Karatan, E.and Watnick, P. 2009. Signals, regulatory networks and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*, *73*(2), 310–347.

Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E. and Håvarstein, L.S. 2005. Choline-binding protein D (CbpD) in Streptococcus pneumoniae is essential for competence-induced cell lysis. *Journal of Bacteriology*, *187*(13), 4338–4345.

Klemm, P., Vejborg, R.M. and Sherlock, O. 2006. Self-associating autotransporters, SAATs: Functional and structural similarities. *International Journal of Medical Microbiology*.

Kolodziejek, A.M. and Miller, S.I. 2015. Salmonella modulation of the phagosome membrane, role of SseJ. *Cellular Microbiology*, *17*(3), 333–341.

Kumar, C.G. and Anand, S. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, *42*(1), 9–27.

Lasa, I. and Penadés, J.R. 2006. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, *157*(2), 99–107.

Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Penadés, J.R. and Lasa, I. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, *58*(5), 1322–1339.

Le Quéré, B. and Ghigo, J.M. 2009. BcsQ is an essential component of the Escherichia coli cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. *Molecular Microbiology*, *72*(3), 724–740.

Ledeboer, N.A., Frye, J.G., McClelland, M. and Jones, B.D. 2006. Salmonella enterica

serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef and tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infection and Immunity*, *74*(6), 3156–3169.

Ledeboer, N.A. and Jones, B.D. 2005. Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on HEp-2 Cells and chicken intestinal epithelium exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella enterica* Serovar Typh. *Journal of Bacteriology*, *187*(9), 3214–3226.

Lembre, P., Lorentz, C. and Martino, P.Di. 2012. Exopolysaccharides of the biofilm matrix: A complex biophysical world. *Intech*, 371–392.

LeMinor, L. and Popoff, M.Y. 1987. Designation of Salmonella enterica sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus Salmonella. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *37*(4), 465–468.

Li, H., Xu, L., Wang, J., Wen, Y., Vuong, C., Otto, M. and Gao, Q. 2005. Conversion of Staphylococcus epidermidis strains from commensal to invasive by expression of the ica locus encoding production of biofilm exopolysaccharide. *Infection and Immunity*, *73*(5), 3188–3191.

Lunn, J. A., Lee, R., Smaller, J., MacKay, B. M., King, T., Hunt, G. B. and Malik, R. 2012. Twenty two cases of canine neural angiostronglyosis in eastern Australia (2002-2005) and a review of the literature. *Parasites & Vectors*, *5*(1), 70.

Ma, L., Jackson, K.D., Landry, R.M., Parsek, M.R. and Wozniak, D.J. 2006. Analysis of Pseudomonas aeruginosa conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of Bacteriology*, *188*(23), 8213–8221.

Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J. and Hoekstra, R.M. 2010. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(6), 882–889.

Marecik, R., Wojtera-Kwiczor, J., Ławniczak, Ł., Cyplik, P., Szulc, A., Piotrowska-Cyplik, A. and Chrzanowski, Ł. 2012. Rhamnolipids increase the phytotoxicity of diesel oil towards four common plant species in a terrestrial environment. *Water, Air and Soil Pollution*, *223*(7), 4275–4282.

Marić, S. and Vraneš, J. 2007. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum Biologorum*, *109*(2), 115–121.

Martin, A. 2016. A Microbial Paradise | scienceandfooducla. Retrieved November 13, 2017, from https://scienceandfooducla.wordpress.com/2016/04/26/gutopia-a-microbial-paradise/

Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P. ., Campbell, J.I.A., Jensen, P. and Kharazmi, A. 1999. Mucoid conversion of Pseudomonas aeruginosa by hydrogen peroxide: A mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis

lung. *Microbiology*, *145*(6), 1349–1357.

McClure, C.D. and Schiller, N. 1992. Effects of Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol.*, *51(2):97-1*.

Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P. and Arciola, C.R. 2011. Extracellular DNA in biofilms. *International Journal of Artificial Organs*, *34*(9), 824–831.

Morrey, C.B. 2013. *The Fundamentals of Bacteriology, by Charles Bradfield Morrey — A Project Gutenberg eBook.*

Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. and Lewenza, S. 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *PLoS Pathogens*, *4*(11).

Nadell, C.D., Bassler, B.L. and Levin, S.A. 2008. Observing bacteria through the lens of social evolution. *Journal of Biology*, *7*(7), 27.

Neupane, B., Richer, D., Bonner, A.J., Kibret, T. and Beyene, J. 2014. Network meta-analysis using R: A review of currently available automated packages. *PLoS ONE*, *9*(12), 1–17.

O'Toole, G.A. and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology*, *28*(3), 449–461.

Olbak, K., Baggesen, D.L., Aarestrup F. M., Munkebbesen, J., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner –Smıdt, P., Petersen, A., Munk, W. and Wegener, H.C. 1999. An Outbreak Of Multıdrug-Resıstant, Quınolone-Resıstant Salmonella Enterıca Serotype Typhımurıum Dt104. *The New England Journal of Medicine*.

Olvera, C., Goldberg, J.B., Sa¡nchez, R. and Soberan-Cha¡vez, G. 1999. The Pseudomonas aeruginosa algC gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, *179*(1), 85–90.

Oostendorp, C., Meyer, S., Sobrio, M., van Arendonk, J., Reichmann, E., Daamen, W.F. and van Kuppevelt, T.H. 2017. Evaluation of cultured human dermal- and dermo-epidermal substitutes focusing on extracellular matrix components: Comparison of protein and RNA analysis. *Burns*, *43*(3), 520–530.

Partridge, J.D. and Harshey, R.M. 2013. More than motility: Salmonella flagella contribute to overriding friction and facilitating colony hydration during swarming. *Journal of Bacteriology*, *195*(5), 919–929.

Patel, R. 2005. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (437), 41–47.

Pearson, J.P., Feldman, M., Iglewski, B.H. and Prince, A. 2000. Pseudomonas aeruginosa Cell-to-Cell Signaling Is Required for Virulence in a Model of Acute

Pulmonary Infection. *Infect. Immun.*, *68*(7), 4331–4334.

Petersen, F.C., Tao, L. and Scheie, A.A. 2005. DNA binding-uptake system: A link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, *187*(13), 4392–4400.

Ping, L. 2010. The asymmetric flagellar distribution and motility of Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology*, *397*(4), 906–916. h

Price-Whelan, A., Dietrich, L.E.P. and Newman, D.K. 2006. Rethinking "secondary" metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat Chem Biol*, *2: 71–78*.

Pui, C. F., Wong, W.C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, M.N. and Son, R. 2011. Salmonella: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, *18*(2), 465–473.

Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S. and Qu, D. 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. *Microbiology*, *153*(7), 2083–2092.

Re, S. Da and Ghigo, J. 2006. A CsgD-Independent Pathway for Cellulose Production and Biofilm Formation in Escherichia coli A CsgD-Independent Pathway for Cellulose Production and Biofilm Formation in Escherichia coli †, *188*(8), 3073–3087.

Reisner, A., Haagensen, J.A.J., Schembri, M.A., Zechner, E.L. and Molin, S. 2003. Development and maturation of Escherichia coli K-12 biofilms. *Molecular Microbiology*, *48*(4), 933–46.

Rivera-Chávez, F. and Bäumler, A.J. 2014. The Pyromaniac Inside You: *Salmonella* Metabolism in the Host Gut. *Annual Review of Microbiology*, *69*(1), 150522223126008.

Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D. and Normark, S. 1998. Curli Fibers Are Highly Conserved between Salmonella typhimurium and Escherichia coli with Respect to Operon Structure and Regulation Curli Fibers Are Highly Conserved between Salmonella typhimurium and Escherichia coli with Respect to Operon Structure an. *Journal of Bacteriology*, *180*(3), 722–731.

Ryu, W., Turner, L. and Berg, H. 2003. Real-Time Imaging of Fluorescent Flagellar Filaments. *APS Meeting Abstracts*, *1*(10), 16001.

Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A. and Sarubbo, L.A. 2016. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(3), 1–31.

Sauer, K., Sauer, K., Camper, A.K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Ehrlich, G.D. and Davies, D.G. 2002. Pseudomonas aeruginosa Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Society*, *184*(4), 1140–1154.

Schuhmacher, J.S., Thormann, K.M. and Bange, G. 2015. How bacteria maintain location and number of flagella? *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(6), 812–822.

Sena-Vélez, M., Redondo, C., Graham, J.H. and Cubero, J. 2016. Presence of extracellular DNA during biofilm formation by Xanthomonas citri subsp. citri strains with different host range. *PLoS ONE*, *11*(6), e0156695.

Sherlock, O., Vejborg, R.M. and Klemm, P. 2005. The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic Escherichia coli is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infection and Immunity*, *73*(4), 1954–1963.

Sinde, E. and Carballo, J. 2000. Attachment of Salmonella spp. and Listeria monocytogenes to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, *17*(4), 439–447.

Singer, S.W., Erickson, B.K., VerBerkmoes, N.C., Hwang, M., Shah, M.B., Hettich, R.L. and Thelen, M.P. 2010. Posttranslational modification and sequence variation of redox-active proteins correlate with biofilm life cycle in natural microbial communities. *The ISME Journal*, *4*(11), 1398–1409.

Smith T. 1894. The hog-cholera group of bacteria. *U.S. Bur Anim Ind Bull 1894;6:6-40.*

Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C. and Lasa, I. 2002. Genetic analysis of Salmonella enteritidis biofilm formation: Critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, *43*(3), 793–808.

Spoering, A.L. and Gilmore, M.S. 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, *9*(2), 133–7.

Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L. and Švabić-Vlahović, M. 2004. Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, *38*(5), 428–432.

Stokke, BT., Draget, KI., Smidsrod, O., Yuguchi, Y., Urakawa, H. and Kajiwara, K. 2000. Small- Angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. *Macromolecules, 33: 1853-1*.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, *56*(1), 187–209.

Su, L.H. and Chiu, C.H. 2006. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*, *30*(3), 210–219.

Suzuki, H., Daimon, M., Awano, T., Umekage, S., Tanaka, T. and Kikuchi, Y. 2009. Characterization of extracellular DNA production and flocculation of the marine photosynthetic bacterium Rhodovulum sulfidophilum. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*(2), 349–356.

Sykes, R. 2010. The 2009 Garrod Lecture: The evolution of antimicrobial resistance: A

Darwinian perspective. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *65*(9), 1842–1852.

Tang, L., Schramm, A., Neu, T.R., Revsbech, N.P. and Meyer, R.L. 2013. Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: A quantitative study. *FEMS Microbiology Ecology*, *86*(3), 394–403.

Tetz, G.V., Artemenko, N.K. and Tetz, V.V. 2009. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(3), 1204–1209.

Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Jaeger, K. E. 2005. Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*, *151*(5), 1313–1323.

Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M. and Euzéby, J.P. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(1), 521–524.

Tsolis, R.M., Adams, L.G., Ficht, T.A. and Bäumler, A.J. 1999. Contribution of Salmonella typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infection and Immunity*, *67*(9), 4879–4885.

Ude, S., Arnold, D.L., Moon, C.D., Timms-Wilson, T. and Spiers, A.J. 2006. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental Pseudomonas isolates. *Environmental Microbiology*, *8*(11), 1997–2011.

Vilain, S., Pretorius, J.M., Theron, J. and Bruzel, V.S. 2009. DNA as an adhesin: Bacillus cereus requires extracellular DNA to form biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(9), 2861–2868.

Vorkapic, D., Pressler, K. and Schild, S. 2016. Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. *Current Genetics*.

Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R. and Otto, M. 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(52), 54881–54886.

Wang, H.H., Wang, H.H., Xing, T., Wu, N., Xu, X. and Zhou, G. 2016. Removal of Salmonella biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bio-enzyme. *LWT - Food Science and Technology*, *66*, 298–304.

Wang, H., Huang, Y., Wu, S., Li, Y., Ye, Y., Zheng, Y. and Huang, R. 2014. Extracellular DNA inhibits Salmonella enterica serovar typhimurium and S. enterica serovar typhi biofilm development on abiotic surfaces. *Current Microbiology*, *68*(2), 262–268.

Wang, X., Iii, J.F.P. and Romeo, T. 2004. The pgaABCD locus of Escherichia coli promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *Society*, *186*(9), 2724–2734.

Watnick, P. and Kolter, R. 2000. Biofilm , City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, *182*(10), 2675–2679.

Welsh, S., Peakman, T., Sheard, S. and Almond, R. 2017. Comparison of DNA quantification methodology used in the DNA extraction protocol for the UK Biobank cohort. *BMC Genomics*, *18*(1), 26.

Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. and Mattick, J.S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science (New York, N.Y.)*, *295*(5559), 1487.

Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S. and Greenberg, E.P. 2001. Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Nature*, *413*(6858), 860–864.

Wilking, J.N., Zaburdaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M.P. and Weitz, D. 2013. Liquid transport facilitated by channels in Bacillus subtilis biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(3), 848–52.

Wilson, K. 2000. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology Edited by Frederick M Ausubel et Al*, *Chapter 2*(1994), 1–7.

Xu, M., Majta, V. and Majta, J. 2008. In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium isolated in Slovakia, *104*, 1294–1301.

Zhang, A., Mu, H., Zhang, W., Cui, G., Zhu, J. and Duan, J. 2013. Chitosan coupling makes microbial biofilms susceptible to antibiotics. *Scientific Reports*, *3*, 1–7.

Zhao, X., Zhao, F., Wang, J. and Zhong, N. 2017. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv.*, *7*(58), 36670–36683.

Ziech, R.E., Sereno, M.J., Druziani, J.T., Pereira, J.G. and Bersot, L.S. 2017. Antimicrobial Susceptibility and Biofilm Production by Salmonella sp Strains Isolated from Frozen Poultry Carcasses. *Brazılıan Journal Of Poultry Scıence*, *19*(1), 103–107.

Zobell, C.E. 1943. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology*, *46*(1), 39–56.

Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M. and Römling, U. 2003. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, *71*(7), 4151–8.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. and Römling, U. 2001. The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, *39*(6), 1452–1463.

# ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Çiğdem Elif ÇELİK
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 17.04.1990
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

**Eğitim Durumu**

Lise : Mustafa Kemal Lisesi (2007)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2014)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi – Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2018)

**Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler**

**Çiğdem Elif ÇELİK**, Burak GÜNEŞ, Pınar ŞANLIBABA, Başar UYMAZ, Nefise AKÇELİK, Mustafa AKÇELİK*. New Strategies in The Control of Biofilm Composition. ICAFOF 17-Cappadocia

Burak GÜNEŞ, **Çiğdem Elif ÇELİK**, Pınar ŞANLIBABA, Başar UYMAZ, Mustafa AKÇELİK, Nefise AKÇELİK*. The Role of Extracellular Dna in Biofilm Formation. ICAFOF 17-Cappadocia

**Uluslararası Kongrelerde Sunulan Poster Bildirileri**

Neslihan Taskale KARATUG*, Fatma Neslihan YUKSEL, Caner OZDEMIR, Cansu GÜRCAN, **Çiğdem Elif ÇELIK**, Sinem UGUR, Mustafa AKÇELIK. Anti-biofilm potential effect of Lactococcus lactis CNM81 strain isolated from raw milk on *Salmonella* Typhimurium SL1344 biofilm. ECCMID 17-Vienna