T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SICAKLIK, pH ve DEMİRİN KLİNİK İNSAN PATOJENLERİ TARAFINDAN *in vitro* BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Büşra POLAT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2022

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SICAKLIK, pH ve DEMİRİN KLİNİK İNSAN PATOJENLERİ TARAFINDAN *in vitro* BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Büşra POLAT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
2.1. Patojenlerin Virülansları 4
2.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları 8
2.3. Biyofilm Matrisi 11
2.4. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler 14
2.5. Biyofilmlerin Moleküler Mekanizmaları 16
2.5.1. ‘‘Quorum sensing’’ (çoğunluk/çekirdek algılama) 16
2.5.2. İkinci haberci siklik-di-guanilat monofosfat (C-di-GMP) 18
3. MATERYAL ve YÖNTEM 19
3.1. Materyal 19
3.2. Yöntem 19
3.2.1. Patojenik türlerin elde edilişi 19
3.2.2. Patojenlerin moleküler tanımlanması 19
3.2.2.1. DNA izolasyonu 19
3.2.2.2. 16S rRNA bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu 20
3.2.2.3. Dizi analizi 21
3.2.2.4. Filogenetik ağaç oluşturma 21
3.2.3. Biyofilm Oluşumu 22
3.2.4. Büyüme hızı 23
3.2.5. İstatistik analizler 23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 25
4.1. Patojenlerin Moleküler Tanımlanması 25
4.2. Çevresel Etkenlerin Patojenlerin Büyümeleri Üzerine Etkisi 26
4.2.1. Sıcaklığın büyüme üzerine etkisi 26
4.2.2. pH’ın büyüme üzerine etkisi 27
4.2.3. Demirin büyüme üzerine etkisi 27
4.3. Çevresel Etkenlerin Patojenlerin Biyofilm Oluşturma Yetenekleri Üzerine Etkisi 28
4.3.1. Sıcaklığın biyofilm üzerine etkisi 28
4.3.2. pH’ın etkisi 31
4.3.3. Demirin etkisi 33
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 38
5.1. Sonuçlar 38
5.2. Öneriler 39
KAYNAKLAR 41

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SICAKLIK, pH ve DEMİRİN KLİNİK İNSAN PATOJENLERİ TARAFINDAN *in vitro* BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Büşra POLAT

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Sedat ÇAM
Yıl:2022, Sayfa:48

Son yıllarda yapılan birçok çalışmalar, biyofilm üretimi patojenik bakterilerin virülanslarında artış meydana getirdiğini vurgulamaktadır. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar, antibiyotiklere, konak immün sistemine karşı daha dayanıklı olmaktadır. Farklı patojenlerin (hatta aynı türün farklı suşları arasında bile) farklı koşullar altında biyofilm oluşturma yetenekleri değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle, patojenlerin hangi koşullar da biofilmler oluşturduklarının bilinmesi, hastalıklarla mücadele de önem arz etmektedir. Bu çalışmada, Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nden elde edilen 8 patojenik klinik izolatların, biyofilm oluşumu ve büyüme hızları farklı sıcaklıklarda (24 ve 37°C), farklı pH aralıklarında (pH 5.5, 7.5 ve 8.5) ve farklı demir (0, 5, 10, 30, 50 ve 100 μM FeCl3) konsantrasyonlarında Nutrient Broth besiyerinde tespit edilmiştir. Maximum likelihood ve bayesian filogenetik analizler sonucunda, suşların ikisi *Escherichia coli* SB1/SB2, biri *Klebsiella aerogenes* SB1, biri *Klebsiella pneumoniae* SB1, ikisi *Pseudomonas aeruginosa* SB1/SB2, biri *Enterococcus faecalis* SB1 ve biri *Staphylococcus aureus* SB1 olarak tanımlanmıştır. Bütün suşlar 37°C'ye kıyasla 24°C'de daha fazla biyofilm oluşturmuştur. *K. pneumoniae* SB1 ve *P. aeruginosa* SB1 suşları hariç, diğer tüm suşların 24°C'de biyofilm oluşturması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 37°C'de gerçekleştirilen pH ve demir deneylerinde, suşların biyofilm üretimleri arasında önemli farklar gözlenmiştir. pH deneyin de, *E. coli* SB1/SB2, *S. aureus* SB1 suşları pH 5.5'de istatiksel olarak anlamlı daha fazla biyofilm oluşturmuştur. Bu suşlar gastrointestinal sistemde midenin asidik ortamında biyofilm oluşturarak konak organizma da hastalık yapabilme yeteneklerini artırabilirler. *K. aerogenes* SB1 ve *E. faecalis* SB1 suşlarında ise hafif asidik pH'a kıyasla pH.7.5 ve 8.5'de daha fazla biyofilm üretimi gözlenmiştir. *K. pneumoniae* SB1 ve *P. aeruginosa* SB1/SB2 suşları ise pH 8.5'de fazla miktarda biyofilm oluşturmuştur. Alkali ortamda biyofilm oluşturabilen bu suşlar ise, gastrointestinal sistemde incebağırsağın alkali ortamlarda biyofilm oluşturarak hayatta kalma becerilerini artırarak patojenitelerini artabilirler. Farklı demir konsantrasyonlarında biyofilm deneyinde, *E. coli* SB1/SB2, *K. aerogenes* SB1, *P. aeruginosa* SB1/SB2 suşlarında artan demir miktarı bu suşların biyofilm üretiminde azalmalar meydana getirmiştir. Bu suşlar, çevresel ortamlarda biyofilmler oluşturarak konak canlıya biyofilm modunda girebilirler. Vücutta gereğinden fazla demir biriken hastalar da, yüksek demir konsantrasyonlarıyla karşılaştıkların da biyofilm büyüme formundan, planktonik moda geçerek konak hücrelere saldırabilirler. Bu suşların aksine, *K. pneumoniae* SB1, *E. faecalis* SB1 ve *S. aureus* SB1 suşlarında ise biyofilm oluşumu artan demir konsantrasyonuna bağlı olarak biyofilm üretiminde artışlar meydana getirmiştir. Bu patojenler ise, kanda ki demir miktarı artırılmış hastalarda daha fazla biyofilm oluşturarak konak immün sisteminden kaçabilirler.

ANAHTAR KELİMELER: Patojen, sıcaklık, pH, demir, biyofilm

ABSTRACT

MSc Thesis

THE IMPACT OF TEMPERATURE, PH, AND IRON ON *in vitro* BIOFILM FORMATION BY CLINICAL HUMAN PATHOGENS

Büşra POLAT

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

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Sedat ÇAM
Year: 2022, Page:48

Many studies in recent years emphasize that biofilm production causes an increase in the virulence of pathogenic bacteria since biofilm-forming microorganisms are more resistant to antibiotics and host immune system. The ability of different pathogens (even among different strains of the same species) to form biofilms under different conditions varies. For this reason, in this study, biofilm formation and growth rates of 8 pathogenic clinical isolates obtained from Harran University Research and Application Hospital were determined at different temperatures (24 and 37°C), different pH levels (pH 5.5, 7.5 and 8.5) and different iron concentrations (0, 5, 10, 30, 50 and 100 μM $FeCl_3$) in nutrient broth medium. As a result of maximum likelihood and bayesian phylogenetic analysis, two of the strains were identified as *Escherichia coli* SB1/SB2, one as *Klebsiella aerogenes* SB1, one as *Klebsiella pneumoniae* SB1, two as *Pseudomonas aeruginosa* SB1/SB2, one as *Enterococcus faecalis* SB1 and one as *Staphylococcus aureus* SB1. All the strains formed more biofilms at 24°C compared to 37°C. With the exception of *K. pneumoniae* SB1 and *P. aeruginosa* SB1 strains, all the other strains formed statistically significant amount of biofilms at 24°C. Significant differences were also observed between the biofilm production of the strains in pH and iron experiments carried out at 37°C. In the pH experiment, *E. coli* SB1/SB2 and *S. aureus* SB1 formed significantly more biofilms at pH 5.5. These strains can increase their ability to cause disease in the host organism by forming biofilms in the acidic environment of the stomach. In *K. aerogenes* SB1 and *E. faecalis* SB1 strains, more biofilm production was observed at pH.7.5 and 8.5 compared to slightly acidic pH 5.5. *K. pneumoniae* SB1 and *P. aeruginosa* SB1/SB2 strains produced a large amount of biofilm at pH 8.5. These strains, which can form higher amount of biofilms in an alkaline environment, can increase their pathogenicity by increasing their survival ability by forming biofilms in alkaline environments of the gastrointestinal tract. In the biofilm experiment with different iron concentrations, increased iron content in *E. coli* SB1/SB2, *K. aerogenes* SB1, *P. aeruginosa* SB1/SB2 strains caused decreases in biofilm production. In patients with excessive iron accumulation in the body, these pathogens may attack host cells by switching from biofilm mode of growth to planktonic mode when they encounter the high iron concentrations. In contrast to these strains, biofilm formation in *K. pneumoniae* SB1, *E. faecalis* SB1 and *S. aureus* SB1 strains resulted in increases in biofilm production due to increased iron concentration. These pathogens, on the other hand, can escape from the host immune system by forming more biofilms in patients with increased iron content in the blood.

KEY WORDS: Pathogen, temperature, pH, iron, biofilm

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Sedat Çam'a, bana eğitim hayatım boyunca hep destek olan babam Mehmet Ali Arslan ve annem Reşide Aynur Arslan'a, ablalarım Öznur, Fatma, Gülnur, Leyla Özlem'e, bu süreçte hayatıma giren ve bana hep destek olan sevgili eşim Nazmi Polat'a teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Biyofilm gelişiminin beş aşaması 9
Şekil 2.2. Elektron mikroskobu ile görselleştirilmiş *Vibrio cholerae* tarafından biyofilm oluşumundaki adımların gösterimi 9
Şekil 2.3. Serbest yüzen planktonik *P. aeruginosa* hücrelerden multibakteriyel yaşama geçiş 10
Şekil 2.4. Ortamdaki otoindükleyicilerin konsantrasyonuna tepki veren bakteri davranışı. 17
Şekil 3.1. İnsan patojenlerinin amplifiye olmuş 16S rRNA gen bölgesinin jel görüntüsü…….21
Şekil 4.1. 16S rRNA gen bölgelerine bağlı maximum likelihood/bayesian filogenetik analizler……..25
Şekil 4.2. 16S rRNA gen bölgelerine bağlı maximum likelihood/bayesian filogenetik analizler……..26
Şekil 4.3. Sıcaklığın (°C) biyofilm üzerine etkisi…..……...29
Şekil 4.4. 37°C'de pH'ın biyofilm üzerine etkisi…..……32
Şekil 4.5. 37°C'de demirin ($FeCl_{3)}$ biyofilm üzerine etkisi…….……..……35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Sıcaklığın (°C) patojenlerin büyümesi üzerine etkisi. 27
Çizelge 4.2. pH'ın patojenlerin büyümesi üzerine etkisi. 27
Çizelge 4.3. Demirin patojenlerin büyümesi üzerine etkisi. 28

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIEC	Yapışık İnvasif *E. coli*
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
DAEC	Yaygın Olarak Yapışan *E. coli*
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EAEC	Enteroagregatif *E. coli*
eDNA	Hücre Dışı DNA
EHEC	Enterohemorajik *E. coli*
EIEC	Enteroinvaziv *E. coli*
EPEC	Enteropatojenik *E. coli*
EPS	Hücre Dışı Polimerik Madde
ETA	Endotrakeal Aspiratları
ETEC	Enterotoksijenik *E. coli*
ETT	Endotrakeal Tüp
ExPEC	Ekstraintestinal Patojenik *E. coli*
InPEC	Patojenik *E. coli*
MDR	Çoklu İlaca Dirençli
NIH	Ulusal Sağlık Enstitüsü
NMEC	Neonatal Menenjit *E. Coli*
NTEC	Nekrotoksik *E. coli*
PGG	Güçlü Demir Şelatör
QS	Çekirdek Algılama Yolu
SEPEC	Sepsis İle İlişkili *E.* Coli
UPEC	Üropatojenik *E. coli*
VAP	Ventilatörle İlişkili Pnömoni

1. GİRİŞ

Biyofilmler, kendi ürettiği polimerik bir matriks içine alınmış ve canlı veya cansız bir yüzeye yapışmış mikroorganizma hücreleri topluluğudur. Biyofilmler tek veya çok katmanlı olabilir. Biyofilmler, biyofilmin bileşen popülasyonu tarafından salgılanan hücre dışı polimerik maddelerden oluşan matriste kalan homojen veya heterojen bakteri popülasyonlarını içermektedir (Satpathy ve ark., 2016). Biyofilm oluşumu doğada şaşırtıcı derecede yaygındır ve fosil kayıtların göre çok erken dönemde ortaya çıktığı görülmüştür. Biyofilm oluşumu fosil kayıtlarının başlarında (yaklaşık 3,25 milyar yıl önce) ortaya çıkmıştır ve hem arke hem de bakteri soylarında, filogenetik ağacın en derinden bölünen dallarındaki 'yaşayan fosiller' de dâhil olmak üzere, çeşitli organizmalarda yaygın olarak görüldüğü iddia edilmiştir (Hall-Stoodley ve ark., 2004). Biyofilm oluşumu, birçok mikroorganizmanın yaşam döngülerinin eski ve temel bir parçası gibi görünüyor ve çeşitli ortamlarda hayatta kalmak için önemli bir yaşam stratejisi olarak kabul edilmektedir (Jefferson, 2004; Flemming ve ark., 2010).

Mikrobiyologların gerçek ekosistemlerde büyüyen mikroorganizmaların doğal popülasyonlarını incelemek için doğrudan farklı yöntemler kullanmışlardır. 150 yıldan fazla bir süredir, bakterilerin tercihen yüzeylerde ürediği fikri düzenli aralıklarla ön plana çıktığı ortaya atıldığı görülmektedir (Costerton, 1999). Bugün günümüz de ise; Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) raporlarına göre, bakteriyel patojenlerin yaklaşık %65'i biyofilm oluşturur ve Ulusal Sağlık Enstitüleri'ne (NIH) göre ise bu oran %80'dir.

Biyofilmler, çeşitli zorlu ortamlarda biyofilm oluşturan mikroorganizmalara çeşitli faydalar sağlamaktadır. Biyofilm oluşumu; oksijen radikallerinden, ultraviyole radyasyondan, dezenfektanlardan, pH değişikliklerden, yüklü biyositlerden, metalik katyonlardan, besin yetersizliğinden, konak immün sistemden ve antibiyotiklerden korunmak için mikrobiyal toplulukların seçici bir hayatta kalma stratejisi olarak kabul edilmektedir (Jefferson, 2004; Flemming ve ark., 2010). Biyofilm oluşumu, hücrelerin yalnızca düşmanca ortamlarda hayatta kalmasına değil, aynı zamanda mikrobiyal kümelerden mikroorganizmaların dağılmasıyla yeni nişleri kolonize etmesine izin

veren korumalı bir büyüme modunu temsil etmektedir. Son gelişmeler, biyofilmlerin hem ilkel çok hücreli organizmaların hem de çok yönlü ekosistemlerin özelliklerine sahip yapısal olarak karmaşık, dinamik sistemler olduğunu göstermektedir (Hall-Stoodley ve ark., 2004). *P. aeruginosa*, biyofilm gelişimi sırasında farklı fizyolojik özelliklere (yapısal ve metabolik değişiklikler) sahip çoklu fenotipler gösterebileceği öne sürülmüştür (Sauer ve ark., 2002). Ayrıca, biyofilmler; mikroorganizmalar arasında yatay gen transferini, çözünmüş organik maddelerin dış sindirim sistemi üreterek biyofilme tutulmasını ve bu besinlerin enerji kaynağı olarak kullanılmasını sağlayan uygun bir ortam sağlamaktadır (Flemming ve ark., 2010). Bakteriler arasındaki gen transferi, virülent suşların sayısında artışa neden olabilir (Lewis, 2001; Satpathy ve ark., 2016).

Biyofilmler hakkındaki ilk raporun üzerinden 70 yıldan fazla bir süre geçmesine rağmen, gıda, çevre ve biyomedikal alanlar gibi çok çeşitli alanlarda hala alarm durumundadır (Satpathy ve ark., 2016). Biyofilm oluşturan bakterilerin çoğu kronik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Tüm bakteriyel enfeksiyonların yaklaşık %65'in ve kronik enfeksiyonlarında %80'in biyofilmlerle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Lewis, 2001; Jamal ve ark., 2018). Biyofilmde bulunan bakteriler hem bağışıklık sistemine, hem antibiyotiklere hem de diğer tedavilere karşı dirençli olabileceğinden, biyofilm enfeksiyonları tipik olarak doğada kroniktir (Vestby ve ark., 2020). Biyofilm araştırmaları, sağlık ve hastalık belirtileri üzerindeki aşılmaz etkileri nedeniyle son zamanlarda büyük önem kazanmıştır (Saxena ve ark., 2019). Biyofilmler hastane enfeksiyonlarının %65'i ile ilişkilidir ve bu biyofilm bazlı enfeksiyonların tedavisinin maliyeti yıllık 1 milyar dolardan fazladır (Satpathy ve ark., 2016). Biyofilmler genellikle kontakt lensler, santral venöz kateterler, mekanik kalp kapakçıkları, periton diyaliz kateterleri, protez eklemler, kalp pilleri, idrar sondaları ve ses protezleri gibi kalıcı tıbbi cihazların üzerinde veya içinde oluşur (Donlan, 2001; Percival ve ark., 2007; Satpathy ve ark., 2016; Jamal ve ark., 2018). Ayrıca, cihazla ilgili olmayan insan sağlığı komplikasyonlarında da etkileri vardır. Kistik fibroz ile ilişkili *Pseudomonas aeruginosa*, alt solunum yolu ve cerrahi alanlar ile ilişkili *Staphylococcus aureus*, pnömoniya neden olan *Haemophilus influenza*, endodontik *Streptococcus mutans* biyofilm oluşumu yoluyla enfeksiyona aracılık eden bir kaç patojendir (Saxena ve ark., 2019). *Staphylococcus epidermidis* ve *P. aeruginosa*,

tehlikede olan konaklarda kronik enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Costerton ve ark., 1995).

Biyofilm oluşum süreci, mikro-koloni oluşumuna yol açacak canlı veya cansız bir yüzeye tutunma ile başlayan, üç boyutlu mimari yapılar oluşturan ve olgunlaşmadan sonra ayrılma ile biten birçok aşamadan oluşmaktadır. Biyofilm oluşumunun ilk önemli aşaması mikroorganizmaların bir yüzeye geri dönüşümsüz tutunabilmeleridir. Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların bir yüzeye tutunma özellikleri, biyofilm gelişimi sırasındaki sıcaklık ve pH değişimlerinden etkilenir (Velmourougane ve ark., 2017). Bu nedenle, sıcaklık ve pH biyofilm oluşumunun başlayabilmesi için ilk temel faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, demir, çoğu mikroorganizma için önemli bir büyüme faktörüdür ve patojenitede ve biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Jones ve ark., 2009; Çam ve ark, 2020b). Biyofilm oluşumunun sıcaklığa, pH'a ve demire bağlı düzenlenmesi bakteri türlerine göre değişebilir ve oldukça karmaşık olabilmektedir (Çam ve ark., 2020b). Çok sayıda ki mikrobiyal enfeksiyonlar, biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilmiştir ve tedavi süreçlerinde büyük sıkıntılara yol açmaktadır (Saxena ve ark., 2019). Biyofilm hakkında hem teşhis hem de tedavi stratejilerinin acilen yeniden düşünülmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Satpathy ve ark., 2016). Biyofilm enfeksiyonu için çare aramak, antibakteriyel ilaç geliştirmedeki en zor ve zorlu görevlerden biridir, çünkü biyofilm oluşturmak için farklı bakteriler kimyasal olarak çeşitli moleküller kullanmaktadır (Satpathy ve ark., 2016). Bakteriyel biyofilmin anlaşılması, biyofilmle ilgili hastalıkları yönetmek ve/veya ortadan kaldırmak için önemlidir. Bu nedenle, bu mevcut çalışmada çeşitli insan patojenlerinin biyofilm oluşturma yetenekleri farklı sıcaklık, pH ve demir konsantrasyonlarında test edilmiştir.

1. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Patojenlerin Virülansları

E.coli fakültetif anaerob olan gram negatif bir bakteridir. Laboratuvar koşullarında kolay ve ucuz bir şekilde üretilebilen çubuk şeklinde sporsuz bir bakteridir. *E. coli* yaygın olarak sıcakkanlı hayvanların, özellikle memelilerin ve aynı zamanda kuşların bağırsaklarında yaşarken, bu bakteri türünün balıklardan, kurbağalardan veya timsahlar, kaplumbağalar veya yılanlar gibi sürüngenlerden de izole edilebilir. *E.coli* suşlarının çoğu konakçının bağırsağında bulunur. Çoğu *E. coli* suşu zararsız kommensal organizmalardır, ancak herhangi bir *E. coli*, bağırsak mukozasına nüfuz ederse ve kan dolaşımına girerse hastalığa neden olabilir. *E. coli* kana ulaştığında ve parçalandığında, ateşe ve hatta ölüme neden olan bir endotoksin salgılar. Endotoksin, bakteri hücre duvarının normal bir parçasıdır. *E. coli*'nin bazı suşları, kolera toksinine benzeyen bir enterotoksin üretir ve bu protein, bakteriler bağırsak epitelini asla geçmese bile akut ishale neden olur. Bazı *E. coli* bağırsak mukozasına sıkıca yapışabilir. *E. coli*, intimin olarak bilinen bir protein aracılığıyla bağırsak mukozasına sıkıca bağlanır (Reisner ve ark., 2006).

Biyofilmle ilişkili enfeksiyonlar için önerilen kriterlerin çoğunu veya tamamını karşılayan ishalli hastalıklara ve çeşitli bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olan genetik olarak çeşitli bir türdür. *E.coli* üretral ve intravasküler kateterler, protez, protez eklemler gibi bazı yerlerde biyofilm yapıları oluşturarak morbidite ve mortaliteden sorumlu olmuştur. Bu biyofilm yapılarını yok etmek zordur. Çünkü bakteriler hayatta kalma etkinliğini arttırmak için EPS adı verilen çeşitli koruyucu maddeler salgılar ve çekirdek algılama (QS) yolu ile birbirleri ile iletişim kurarlar. Bazı *E. coli* türleri, çok çeşitli insan ekstraintestinal ve intestinal enfeksiyonlara neden olmalarını sağlayan bazı virülans faktörlerine sahiptir. Bir tarafta ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) esas olarak üropatojenik *E. coli* (UPEC), neonatal menenjit *E. coli* (NMEC), nekrotoksik *E. coli* (NTEC) ve sepsis ile ilişkili *E.* coli'yi (SEPEC) içerir. Diğer tarafta ve Crohn hastalığıyla ilişkili yapışık invasif *E. coli'ye* (AIEC) ek

olarak, bağırsak patojenik *E. coli* (InPEC) esasen altı ishalli patotipi kapsar (Ageorges ve ark., 2020).

Omurgalılarda kalın bağırsağın patojenik olmayan bir üyesi olarak *E.coli,* alttaki epitelyumu kolonize etmeden mukus tabakası içinde yer alıyor gibi görünmektedir. Buna karşılık, diyarejenik *E. coli* suşları, mukus tabakasına nüfuz etme ve mukozayı verimli bir şekilde kolonize etme yetenekleri ile tanımlanır ve karakterize edilir. Bakterilerin epitelyal HEp-2 hücrelerine in vitro yapışma modelleri, hayvan modellerinde mukozal yüzeylerde bulunanlarla iyi bir uyum içindedir ve yaygın olarak yapışan *E.coli,* enteropatojenik *E.coli* (EPEC) ve enteroagregatif *E.coli* gibi farklı patotipleri ayırt eder. Üropatojenik *E. coli* suşları, antibiyotik tedavisine ve kesme kuvvetlerine direndikleri kateterlerin lümeninde oluşan biyofilmlerden sıklıkla izole edilir. *E.coli*'nin bazı suşları bu şekilde sıralanabilir; (i) enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), (ii) enteroagregatif *E. coli* (EAEC), (iii) enteropatojenik *E. coli* (EPEC), (iv) enterohemorajik *E. coli* (EHEC), (v) enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve (vi) yaygın olarak yapışan *E. coli* (DAEC). Sürekli kültür çalışmaları, *E. coli*'nin, fermentasyon asitleri mevcut olsa bile hafif asidik pH'da büyüyebileceğini ve bu koşullar altında hücre içi pH'ın düştüğünü göstermiştir. Streptokoklar ve laktobasiller, hücre içi pH 5,5'in altında olduğunda büyüyebilir ve bu bakteriler, *E. coli*'den daha düşük bir dış pH'da büyüyebilirler. Laktik asit bakterileri, hafif asidik pH'ta oldukça iyi büyür, ancak hayatta kalamazlar. Doğal olarak oluşan *E. coli* düşük pH değerlerinde de gelişmez, ancak düşük pH'da hayatta kalabilir ve pH tekrar uygunsa yeniden büyümeyi sürdürebilir (Russell ve ark., 2000).

Pseudomonas bakterisi gram negatif bir bakteridir. Toprak, tatlı su ve deniz gibi alanlarda yaygın olarak görülmektedir. Çoğalabilmek için çok az besine gereksinim duyar. Antiseptiklerin çoğuna *aynı zamanda bir dizi* kromozomal ve plazmit aracılı antibiyotik direnç faktörüne sahiptir, bu da antibiyotik tedavisini zorlaştırır ve potansiyel olarak başarısız olmasına neden olur. *Pseudomonas aeruginosa,* insan hastalıklarına sebep olan patojen bir bakteridir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında elde edilen bakterilerin yaklaşık olarak beşte birini oluşturmaktadır. Bu bakterinin çoğu suşu bakteriyosin sentezler (Köse ve ark., 2014). Bu bakteri daha çok ameliyat ve ya diğer nedenlerden kaynaklanan yanık ve yaralarla, kateter gibi cihazlarla ve hava akımını sağlayan solunum makineleri gibi cihazlarla insan

vücudunu enfekte edip sağlığı tehdit etmektedir. Nemli ortamlarda yaşadıklarından kateter gibi boru içleri, klima, solunum cihazları, ağzı açık bırakılan dezenfektanlar, nemli temizlik bezleri, temizlik fırçaları, lavabolar, banyolar ve duş başlıkları gibi yerlere kolayca yerleşebilir ve orada üreyebilirler (Berktaş ve ark., 2011). Bu nedenle *Pseudomonas* özellikle toplu kullanım alanlarında ve hastanelerde risk oluşturmaktadır. ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri ile Ulusal Hastane Enfeksiyonu Sürveyans Sisteminden alınan verilere göre *Pseudomonas* bakterisi hastane kaynaklı zatürrenin ikinci en sık nedeni, idrar yolu enfeksiyonunun üçüncü en yaygın sebebi, cerrahi enfeksiyonların dördüncü en yaygın sebebidir. Ayrıca bu bakteri kandan en sık elde edilen yedinci patojendir. En önemlisi ise hastanelerde zatürreye sebep olan en yaygın çoklu ilaca dirençli (MDR) gram negatif bakteri olmasıdır (El Solh ve ark., 2009).

Perotin ve ark. (2012), yaptığı bir çalışmada ventilasyon uygulanan hastaların endotrakeal tüplerindeki (ETT) biyofilmin ventilatörle ilişkili pnömoni (VAP) gelişiminde nasıl rol aldığı konusunda araştırmalar ve deneyler yapılmıştır. Tıbbi yoğun bakım ünitesinde yapılan çalışmada mekanik ventilatör uygulanan hastalar göz önünde bulunduruldu. Haftada iki kez sürveyans endotrakeal aspiratları (ETA) alınan ve ekstübasyonda ETT'ler mikrobiyolojik değerlendirme ve taramalı elektron mikroskobu ile incelenen örnekler sonucunda ETT'lerin %95'inde biyofilm bulundu. Vakaların %56'sında ETA ve biyofilmde aynı mikroorganizma ürediği gözlemlendi. Her iki örnekte de en sık izole edilen bakteriler *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* olduğu belirlendi (Perotin ve ark., 2012).

Klebsiella pneumoniae ağız, deri ve bağırsağın normal florasında bulunan gram negatif, kapsüllü, fakültatif anaerobik bir bakteridir. *K. pneumonia* içme suyu dağıtım sistemi dâhil olmak üzere toprak, bitki örtüsü ve su gibi çeşitli çevresel nişlerde sıklıkla bulunur (Sahly ve ark., 2000). Patojen bir bakteri olan *K. pneumoniae*'nin en yaygın bulaşma nedeni hastane kaynaklıdır. Fırsatçı bir patojen olan bu bakteri daha çok ciddi hastalıklarla mücadele eden ve bu nedenle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalara saldırır. Bazı verilere göre *Klebsiella* bakterisinin bağışıklık sistemi zayıf kişilere bulaşması durumunda antimikrobiyal tedavi uygulansa dahi yaklaşık %50 ölüme sebep olduğu görülmüştür (Lee ve ark., 2015).

Uygun antibiyotik kullanımlarına rağmen varlığını sürdüren bakteri büyük risk oluşturmaktadır. Hastane dışında sebep olduğu en yaygın enfeksiyon bronkopnömoni ve bronşit şeklinde görülen pnömonidir. Bu bakteri bunun yanı sıra en çok kronik alkolikleri etkileyen ve tedavi edilmediği müddetçe yüksek ölüm oranına sahip olan pnömoniye sebep olan bakteri olarak da bilinmektedir. Kanlı, katı balgam üretebilen bakteri iltihaplanma ve kanama ile akciğerde ağır hasarlara sebep olabilmektedir. *K. pneumoniae'nin* 1980'lerin sonundan beri biyofilm olarak *in vitro* üreyebildiği rapor edilmiştir. Ancak *in vivo* biyofilm 1992'de bir takım araştırmacının taramalı elektron mikroskobu ile yaptığı çalışma ile kanıtlanmıştır. Yapılan *in vitro* çalışmalar idrar, balgam, kan ve yara sürüntülerinden izole edilen *K. pneumoniae'*nin yaklaşık %40'ının biyofilm oluşturabildiğini göstermiştir. *Pseudomonas'da olduğu gibi K. pneumoniae'*de ventilatör ilişkili pnömoniden (VAP) etkilenen hastaların endotrakeal tüplerinden (ETT) izole edilen yüksek oranda *K. pneumoniae suşlarının da in vitro* biyofilm oluşturabildiği belirlenmiştir (Vuotto ve ark., 2014). Seifi ve ark. (2016), yaptığı bir çalışmada balgam ve cerrahi yara sürüntülerinden elde edilen *K. pneumoniae* izolatlarının çok büyük bir bölümünün tam olarak yerleşik biyofilmler ürettiğini gösterdi. Buna karşılık, kandan izole edilen *K. pneumoniae* suşları, büyük biyofilmler oluşturmak için daha zayıf eğilimler sergilemektedir (Seifi ve ark., 2016).

Enterococcus deniz suları, toprak gibi çevresel kaynaklarda, bitkilerde, hayvansal kaynaklarda, fermente gıda ürünlerinde, hem omurgalı hem omurgasızların mikrobiyotalarında ve genellikle insan sindirim sisteminde yaşayan gram pozitif, spor oluşturmayan, fakültatif anaerobik bakteridir. Bunlar, idrar yolunu, kan dolaşımını, karın içi ve pelvik bölgeleri, cerrahi bölgeleri ve merkezi sinir sistemini enfekte ederler (Fisher ve ark., 2009). Aşırı sıcaklık (5-65), geniş pH aralığında yaşayan (4.5-10) ve yüksek NaCI konsantrasyonu gibi stres durumlarında bile hayatta kalan bir bakteridir. Büyüme ise 10 ile 45°C arasında gerçekleşir ve çoğu tür için optimal büyüme 35 ile 37°C arasında gerçekleşir. *Klebsiella pneumoniae* bakterisinde olduğu gibi bu bakteriler de antibiyotiğe karşı direnç sağlarlar. Bu dirence katkı sağlayan etmenlerden biri oluşturdukları biyofilm yapıları olabilmektedir (Garcia-Solache ve ark., 2019).

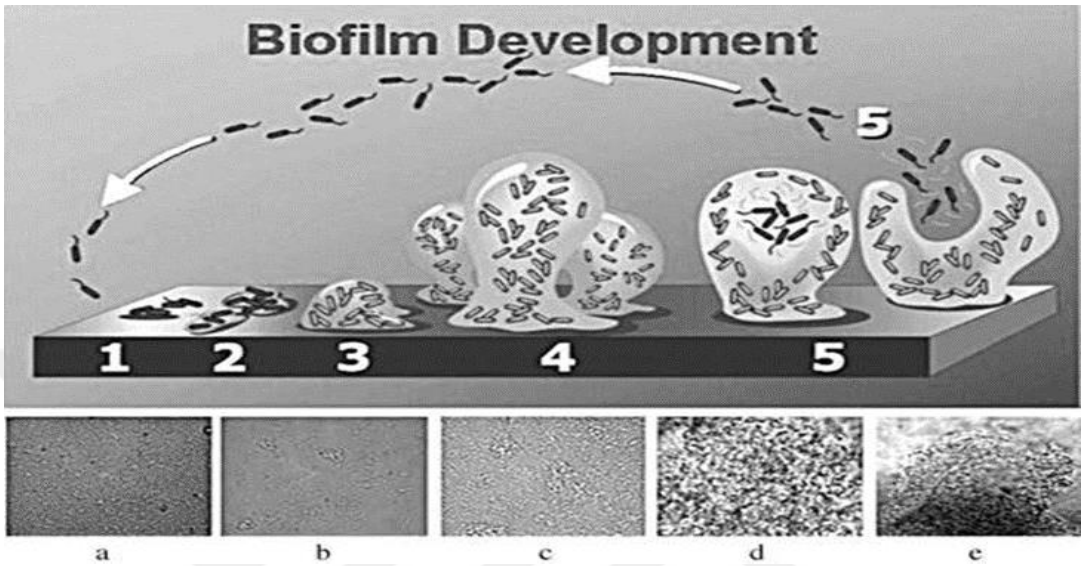
Staphylococcaceae ailesi içerisinde yer alan *Staphylococcus* cinsi gram pozitif ve fakültatif aerobik olan bakteriler ciddi bir enfeksiyon sebebidir. Yüksek tuz konsantrasyonları ve geniş sıcaklık aralığında (18°C-40°C) yaşayabilen bakteri

kolayca üreyebilmektedir. Hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz olarak bilinen bu bakterinin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda kapsül oluşturabilen suşları da vardır. Bu bakteri mastitis, botryomycosis, kuzuların enzootik piyemisi, kanatlılarda stafilokok enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, metritis, enteritis, gıda zehirlenmeleri gibi hastalıklara sebep olmaktadır (Yüksekdağ ve ark., 2013). Biyofilm üreten patojen *Staphylococcus aureus* , implante edilmiş yapay kalp kapakçıkları, kateterler ve eklem protezleri de dahil olmak üzere kalıcı tıbbi cihazlarda biyofilmler oluşturarak terapötik tedaviye direnme yeteneği nedeniyle kronik enfeksiyonlara neden olur. Birkaç biyofilm çalışması, *S. aureus* biyofilmlerinin kalın hücre katmanları halinde çoğaldığını ve yayıldığını göstermiştir (Yüksekdağ ve ark., 2013). *S. aureus* bakterisinde yüzeye yapışıp biyofilm yapısı oluşturmak için icaADBC operonu polisakkarit tutunma matriksini oluşturur. Daha sonra yüzeyde yapışma yine bununla sağlanır (Moormeier ve ark., 2017).

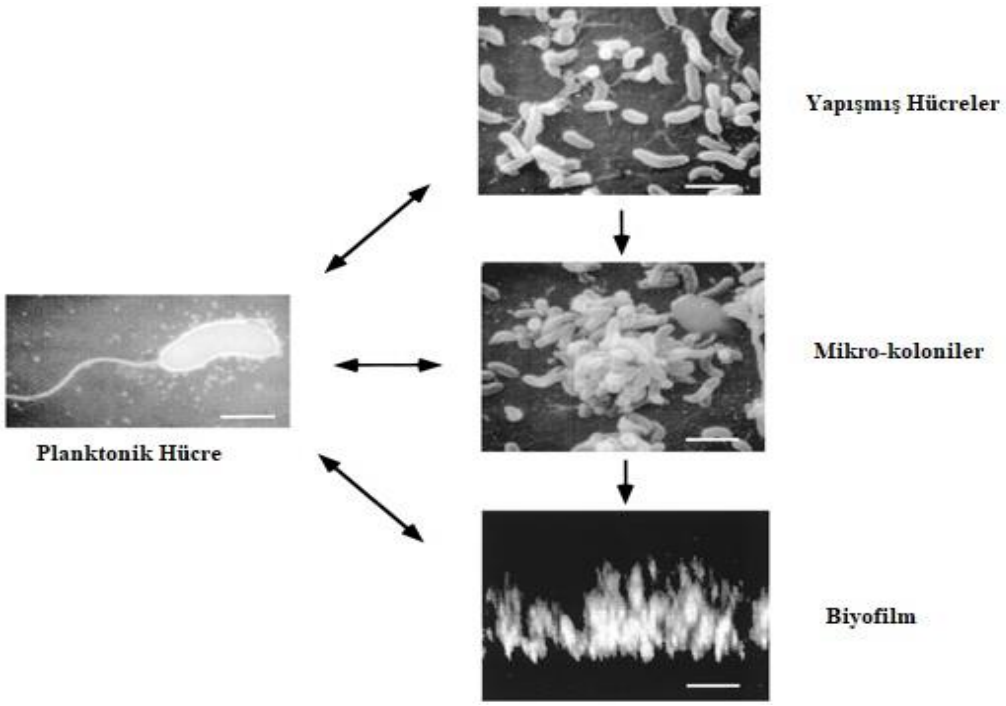
2.2. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm gelişimi beş farklı aşamaya ayrılabilir. Bunlar; (1) geri döndürülebilir bağlanma, (2) geri döndürülemez bağlanma, (3 ve 4) olgunlaşma ve (5) dağılmadır (Şekil 1). Biyofilm aşamasında, planktonik hücreler uygun bir ortam bulduklarında, bir araya gelerek topluluk oluşturur ve mikro-koloniler oluştururlar. Daha sonra bu mikro-koloniler büyüyerek biyofilm mimarisini oluştururlar (Watnick ve ark., 2000). Oluşum şekillerinin elektron mikroskop görüntüsü Şekil 2'de gösterilmiştir.

Biyofilm oluşturmanın ilk adımı, bakterinin canlı veya cansız yüzeylere geri döndürülebilir tutunma sürecidir. Yüzeylere yapışma genellikle elektrostatik, hidrofobik gibi spesifik olmayan etkileşimler ile lektin ve diğer ligandlar gibi spesifik moleküller tarafından belirlenmektedir (Carpentier ve ark., 1993). Biyofilmlerin yapısı, seğirme motilitesi, büyüme hızı, hücre sinyali ve EPS üretimi gibi bir dizi biyolojik faktörden açıkça etkilenirken, fiziksel büyüme ortamı da biyofilm yapısının belirlenmesinde önemli bir rol oynayabilir (P. Stoodley ve ark., 2002). Bu nedenle, biyofilm oluşumunun başlayabilmesi için, bir yüzeye tutunabilmesi büyük önem arz etmektedir.

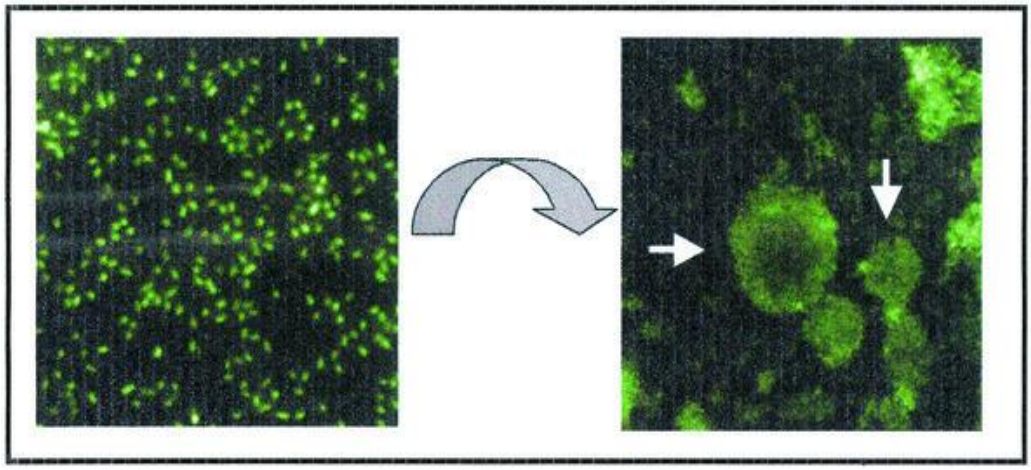


Şekil 2.1. Biyofilm gelişiminin beş aşaması (P. Stoodley ve ark., 2002). 1. adım geri döndürülebilir bağlanma; 2. adım geri döndürülemez bağlanma; 3. ve 4. adım olgunlaşma süreci ve 5. adım dağılma aşaması



Şekil 2.2. Elektron mikroskobu ile görselleştirilmiş *Vibrio cholerae* tarafından biyofilm oluşumundaki adımların gösterimi (Watnick ve ark., 2000)

Mikroorganizmalar, yüzeylere gevşek bir şekilde bağlanmak için ya rastgele su akışı ya da kemotaksis yoluyla yakındaki uygun bir yüzeye ulaşmak zorundadır, daha sonra ekzopolisakkarit üretimi ile yüzeyler ve bağlı mikrobiyal hücreler arasında geri döndürülemez bağlanma gerçekleşir. Bir yüzeye tutunma tersinir bağlanmadan etkilendiğinde, bakterilerin alt tabaka ile teması sürdürmesi ve olgun bir biyofilm geliştirmek için büyümesi gerekir. Geri dönüşümlü bağlanmadan geri dönüşümsüz bağlanmaya geçişi, sıklıkla hücre dışı polimerlerin mevcudiyetinin aracılık ettiği belirtilmiştir (P. Stoodley ve ark., 2002). Bu aşama da serbest yüzen planktonik hücrelerden multibakteriyel bir toplulukta yaşama geçiş süreci başlamıştır (Şekil 3). Tip IV pili, flagella aracılı hareketlilik ve ekzopolisakkarit üretimi geri dönüşümsüz bağlanmada büyük roller oynamaktadır (Watnick ve ark., 2000; P. Stoodley ve ark., 2002). Bakterileri bir alt tabakaya basitçe bağlı olan bakterilerden ayıran bakteriyel biyofilmlerin ayırt edici özelliği, biyofilmlerin yerleşik bakterileri çevreleyen hücre dışı polimerik madde (EPS) içermesidir (P. Stoodley ve ark., 2002). Mikrobiyal EPS, kimyasal bileşimde oldukça çeşitli olabilen ve çeşitli polisakaritler, proteinler, nükleik asitler ve fosfolipitler içerebilen biyosentetik polimerlerdir (Flemming ve ark., 2010).



Şekil 2.3. Serbest yüzen planktonik *P. aeruginosa* hücrelerden multibakteriyel yaşama geçiş (O'Toole, 2003)

Biyofilm gelişiminin bir sonraki aşaması olan olgunlaşma, mevcut besinlerden yararlanmak için en uygun şekilde yapılandırılmış olan bağlı mikrobiyal hücreleri saran hücre dışı dinamik polimerik matrisin çoğalması ve üretilmesiyle olgunlaşır ve böylece üç boyutlu biyofilm mimarisi oluşturulur (Sutherland, 2001; Joo ve ark., 2012). Olgunlaşma aşamasında karmaşık mimarinin, kanalların, gözeneklerin oluşması ve bakterilerin alt tabakadan yeniden dağılımı ile sonuçlanır (Davies ve ark., 1998). Bu olgunlaşma aşamasında, mikroorganizmaların gen ekspresyonların da büyük değişimler olabilmektedir. *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilmlerin olgunlaşması aşamasında planktonik büyüyen gruplara kıyasla, 800'den fazla proteinin ekspresyon seviyesinde altı kattan daha fazla değişikliğe neden olduğu gösterilmiştir (proteomun %50'sinden fazlası) (Sauer ve ark., 2002). Hatta biyofilm oluşumunun farklı aşamalarında farklı koşullar da genler farklı şekiller de ifade edilebilmektedir. *Vibrio vulnificus* ile yapılan bir çalışma da, kapsül polisakkarit genin ekspresyonu, biyofilmin olgunlaşma aşamasında 24°C'de bir artış gözlenmemişken 37 °C'de önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir (Çam ve ark., 2020a).

Biyofilm oluşumunun son aşaması olan ayrılma aşamasında, biyofilm içinde oluşturulan planktonik mikroorganizmaların biyofilmden ayrıldığı ve yeni biyofilm yapıların kurulması için besin açısından zengin yeni ortamlara dağıldığı biyofilm hücrelerinin ayrıldığı aşamadır (Dunne, 2002). Açlığın, bakterilerin besin açısından zengin habitatları aramasına izin veren bilinmeyen bir mekanizma tarafından ayrılmaya yol açabileceği ortaya atılmıştır (O'Toole ve ark., 2000). Şaşırtıcı şekilde, biyofilm mimarisinden ayrılan *P. aeruginosa* hücreleri, olgun biyofilm hücrelerinden çok planktonik hücrelere benzemektedir (Sauer ve ark., 2002). Bu bulgu, dağılan biyofilm hücrelerinin planktonik büyüme moduna geri döndüğünü göstermiştir. Böylece, biyofilm gelişimsel yaşam döngüsü tam bir döngüye girmektedir (Sauer ve ark., 2002).

2.3. Biyofilm Matrisi

"Çoğu biyofilmde mikroorganizmalar kuru kütlenin %10'undan azını oluştururken, matris %90'dan fazlasını oluşturabilir" (Flemming ve ark., 2010).

Matris, biyofilm hücrelerinin gömülü olduğu, çoğunlukla organizma tarafından üretilen hücre dışı etken maddedir. Biyofilmin üç boyutlu yapı iskelesini oluşturan ve yüzeylere yapışmadan ve biyofilmdeki kohezyondan sorumlu olan hücre dışı polimerik maddeler (EPS) olarak bilinen farklı biyopolimer türlerinin bir araya gelmesinden oluşmaktadır (Flemming ve ark., 2010). EPS, biyofilm oluşumu için önemlidir ve planktonik yaşam tarzından tamamen farklı bir yaşam sunmaktadır. Biyofilm mimarisinin mekanik stabilitesi ve oluşumu çoğunlukla EPS üretimi ile sağlanır (Flemming ve ark., 2010), bu nedenle biyofilmin ana yapısal bileşeni olarak kabul edilmektedir. EPS, biyofilm oluşturan hücreler için dinamik bir heterojen mikro ortam oluşturur. Yapılandırılmış çok hücreli mikrobiyal toplulukların oluşumu ve bakımı büyük ölçüde EPS üretimine ve miktarına bağlıdır (Sutherland, 2001). EPS'nin bireysel bileşenlerinin konsantrasyonu, kohezyonu, yükü, sorpsiyon kapasitesi, özgüllüğü ve doğası ile matrisin üç boyutlu mimarisi, belirli bir biyofilmdeki yaşam modunu belirlemektedir (Flemming ve ark., 2010).

Biyofilm matrisi, biyofilm yaşam tarzı için çok çeşitli avantajlar sağlamaktadır. En önemli avantajlarından biri; EPS, biyofilm hücrelerini stabil hale getirir ve onları birbirine yakın tutar, böylece hücrelerarası iletişimlere ve etkileşimlere olanak sağlamaktadır (Flemming ve ark., 2010). Matris mikroorganizmaları çeşitli dış etkenlerden (antibiyotikler, ultraviyole radyasyon, biyositler, immün sistem vb.) korumaktadır (Flemming ve ark., 2010). Hücre dışı enzimlerin salgılanmasıyla, organizmalara çok yönlü bir dış sindirim sistemi sunmaktadır ve böylece çözünmüş ve partiküllü besinleri su fazından ayırarak ve besin ve enerji kaynakları olarak kullanılmalarına izin vermektedir (Flemming ve ark., 2010). Parçalanan hücrelerin bileşenlerini bünyesinde bulunduran matris, bu bileşenlerin daha sonra kullanılmasına imkan sunan bir depo görevi görür. Böylece, yatay gen transferinde adeta bir gen deposu görevi gören DNA'yı içermektedir (Flemming ve ark., 2010).

EPS temel olarak polisakkaritlerden, proteinlerden, nükleik asitlerden, lipitlerden ve sudan oluşmaktadır. Ekzopolisakkaritler, EPS matrisinin önemli bir bölümünü oluşturur (Frolund ve ark., 1996; Wingender ve ark., 2001). Ekzopolisakkaritlerin içeriği farklı canlı gruplarına bağı olarak farklılık göstermektedir. Genel olarak bazı ekzopolisakkaritler sükrozdan türetilen glukanlar, fruktanlar ve selüloz dahil olmak üzere çeşitli homopolisakkaritlerden oluşurken; çoğu

ekzopolisakkarit, nötr ve yüklü şeker kalıntılarının bir karışımından oluşan heteropolisakkaritlerdir (Flemming ve ark., 2010). Ekzopolisakkaritler, tek bir türün suşları arasında bile farklılık gösterebilmektedir. *P. aeruginosa* suşları aljinat, Pel ve Psl gibi üç farklı ekzopolisakkarit üretir ve bu ekzopolisakkaritler biyofilm oluşumundan ve biyofilmin mekanik stabilitesinden sorumludur (Colvin ve ark., 2012). Çok sayıda ki bakteriler için ekzopolisakkaritler vazgeçilmez bir bileşendir. Ekzopolisakkarit üretiminden sorumlu olan genlerde meydana getirilen mutasyonlar; mutant organizmaların bir yüzeye yapışıp sınırlı bir ölçüde mikro-koloniler oluşturmuş olsa bile iyi gelişmiş olgun bir biyofilm yapısı oluşturamadıklarını göstermiştir (Watnick ve ark., 1999; Danese ve ark., 2000; Ma ve ark., 2009).

Biyofilm matrisi, kütle bazında ekzopolisakkarit miktarından daha fazla miktarlarda protein içerebilir (Frølund ve ark., 1996; Conrad ve ark., 2003). Biyofilm de yapısal ve enzimatik proteinler farklı görevleri üstlenmiştir. Yapısal proteinler, biyofilm içindeki yapısal bütünlük ve stabiliteden sorumludur (Sutherland, 2001). Biyofilmdeki protein miktarı, farklı mikroorganizmaların oluşturdukları biyofilmler arasında önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Tipik olarak yapısal proteinler çoğu biyofilm matrisinin %1-2'sini oluştururken (Sutherland, 2001), *Pseudomonas putita* biyofilmlerin de bu oran %75 olarak gözlenmiştir (Jahn ve ark., 1999). Hücre yüzeyi ile ilişkili ve hücre dışı karbonhidrat bağlayıcı proteinler gibi matristeki enzimatik olmayan proteinler, polisakkarit matris ağının oluşumunda ve stabilizasyonunda yer alır ve bakteri yüzeyi ile hücre dışı EPS arasında bir bağlantı oluşturabilirler (Flemming ve ark., 2010). Enzimlerin varlığı ise; matrisi, biyopolimerleri düşük moleküler kütleli ürünlere parçalayan bir sindirim sistemi oluşturarak, elde edilen ürünleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmasını sağlar (Flemming ve ark., 2010). İlaveten, bazı enzimler organizmaların biyofilmden ayrılmasını kolaylaştırmak için, EPS'nin yapısının bozulmasında görev alırken; bazı enzimler ise, tıbbi biyofilmler de virülans faktörleri olarak görev almaktadır (Flemming ve ark., 2010).

Hücre dışı DNA (eDNA), *P. aeruginosa* biyofilmlerinde önemli bir matris bileşenidir ve biyofilm oluşturan hücreler arası bir bağlayıcı olarak işlev görür (Yang ve ark., 2007) . Hücre dışı DNA başlangıçta parçalanmış hücrelerden kalan materyal olarak görülse de, aslında matrisin ve biyofilm yaşam tarzının ayrılmaz bir parçası olduğu giderek daha açık hale gelmiştir (Molin ve ark., 2003; Flemming ve ark., 2010).

eDNA miktarı farklı organizma gruplarında farklı oranlar da olmaktadır. Örneğin, hücre dışı DNA *S. aureus*'un biyofilm matrisinde önemli bir yapısal bileşen iken, *S. epidermidis* tarafından oluşturulan biyofilmlerin yalnızca küçük bir oranını teşkil etmektedir (Izano ve ark., 2008). eDNA'nın lokalizasyonu biyofilmler arasında büyük farklılıklar gösterebilir. *P. aeruginosa* biyofilmlerinde eDNA ızgara benzeri bir yapı oluştururken, suda yaşayan bakteri gruplarında ise eDNA ipliksi bir ağ oluşturabilmektedir (Allesen-Holm ve ark., 2006; Bockelmann ve ark., 2006)

Matrisin diğer iki önemli molekülleri lipitler ve sudur. Lipopolisakkaritler, *Thiobacillus ferrooxidans*'ın yüzeylere yapışmasında çok önemlidir (Sand ve ark., 2006) ve *Serratia marcescens*, yüzey aktif özelliklere sahip hücre dışı lipitler üretmektedir (Matsuyama ve ark., 1996). Matrisin en büyük bileşeni ise, sudur (Zhang ve ark., 1998). Matris, biyofilm üreten organizmalara çevresinden daha yavaş kuruyan yüksek oranda hidratlı bir ortam sağlar ve böylece su potansiyelinde ki dalgalanmalara karşı biyofilm oluşturan mikroorganizmaları korumaktadır (Flemming ve ark., 2010).

2.4. Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Biyofilm oluşumu çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlere bağlıdır. Sıcaklık, pH, demir, besin mevcudiyeti, tuzluluk, oksijen, büyüme besiyeri, dinamik koşullar ve genetik faktörler biyofilm oluşumunu belirleyen parametrelerdir (Di Bonaventura ve ark., 2007; Yang ve ark., 2007; Hoštacká ve ark., 2010; Sanchez ve ark., 2013; Townsley ve ark., 2015; Çam ve ark., 2020b).

Optimum sıcaklık normal enzim aktivitelerini ve mikroorganizma metabolizmasını artırdığı için daha fazla biyofilm oluşumu beklenebilir (Stepanović ve ark., 2003); ama çok sayıda ki önce ki çalışmalar da, sıcaklık biyofilm üzerinde farklı etkiler gösterdiği ortaya atılmıştır. Farklı türler arasında farklılık gösterdiği gibi aynı türün farklı suşları arasında da farklılıklar göstermektedir. Bir çalışma da, test edilen *P. aeruginosa, K pneumoniae, V. cholerae* non-O1 ve *V. cholerae* O1 suşlarının bazıları 37°C'ye kıyasla 30°C'de %46,4-98,4 oranında daha fazla biyofilm üretimi gözlenmiştir. Bu türlerin diğer suşları ise 37°C'de %103–143 oranında daha fazla biyofilm oluşturmuştur (Hoštacká ve ark.,2010). Önemli bir insan patojeni olan *Vibrio*

vulnificus biyofilmleri üzerine yapılan bir çalışma da, test edilen tüm suşlar 30 ve 37°C'ye kıyasla 24°C'de önemli derecede daha fazla biyofilm oluşturmuştur (Çam ve ark., 2020b). *V. vulnificus*'un klinik suşları tarafından 24 °C'de biyofilm üretimi, çevresel suştan istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmuştur. 51 *Stenotrophomonas maltophilia* suşları üzerinde yapılan bir çalışma da ise, test edilen suşlar 37 veya 18 °C'ye kıyasla 32 °C'de daha fazla biyofilm üretimi gözlenmiştir (Di Bonaventura ve ark., 2007). Bu çalışma da, çevresel faktörlerden bağımsız olarak, genetik faktörlerin *S. maltophilia*'nın biyofilmleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır. Düşük sıcaklıkta daha fazla biyofilm üretimi, farklı mikroorganizmalar üzerinde farklı çalışmada da gösterilmiştir (White-Ziegler ve ark., 2008; Townsley ve ark., 2015; Kim ve ark., 2020).

Sıcaklık faktörü gibi, pH'ta mikroorganizmaların biyofilm oluşturmasında farklı türler arasında hatta aynı türün farklı bireyleri arasında bile farklılıklar göstermiştir. Hostacka ve diğerlerinin farklı mikroorganizmaların biyofilm oluşumu üzerine yaptığı bir çalışma da, test edilen *P. aeruginosa, K pneumoniae, V. cholerae* non-O1 ve *V. cholerae* O1 türlerinin tüm suşları yüksek pH değerlerinde daha fazla biyofilm üretmiştir (Hoštacká ve ark., 2010). *P. aeruginosa*'da pH 5.5'e kıyasla pH 8.5'te biyofilm üretimi % 139–244 oranında; *K. pneumoniae*'de %151-319; *V. cholerae* non-O1 ve O1'de ise % 204-329 daha fazla biyofilm oluşturmuştur (Hoštacká ve ark., 2010). Benzer etki *S. maltophilia* suşları arasında da gözlenmiştir. *S. maltophilia* suşlarının pH 8,5 ve 7,5'teki biyofilm miktarı farklılık göstermezken, pH 5.5'e kıyasla önemli ölçüde daha fazla biyofilm üretmiştir (Di Bonaventura ve ark., 2007). Diğer taraftan, *V. vulnificus* suşları arasında yapılan çalışma da, pH suşlar arasında biyofilm oluşumu üzerinde farklı etkiler göstermiştir. 37°C'de test edilen farklı pH aralıklarında tutarlı bir sonuç bulunamazken, en yüksek biyofilm üretimi 24°C'de pH 5.5'te gözlenmiştir (Çam ve ark., 2020b). *Staphylococcus aureus* biyofilm oluşturma yeteneği çeşitli pH seviyelerinde (3, 5, 7, 9 ve 12) test edilmiştir. *S. aureus* suşlarının bazıları düşük pH'ta daha fazla biyofilm oluştururken, diğerleri alkalin ortamlarda önemli ölçüde biyofilm oluşturmuştur. En düşük seviye de biyofilm üretimi ise yüksek asidik (pH 3) ve alkali (pH 12) seviyelerinde bulunmuştur (Zmantar ve ark., 2010). Farklı pH aralıklarında *E. coli* K12 suşunun biyofilm üretiminde de farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. 25°C'de pH 7.4'te güçlü bir biyofilm oluşturmuşken, 37°C'de

biyofilm oluşumu çok düşük bulunmuştur. Aksine en iyi biyofilm oluşumu 37°C'de pH 5.5'te gözlenmiştir (Mathlouthi ve ark., 2018).

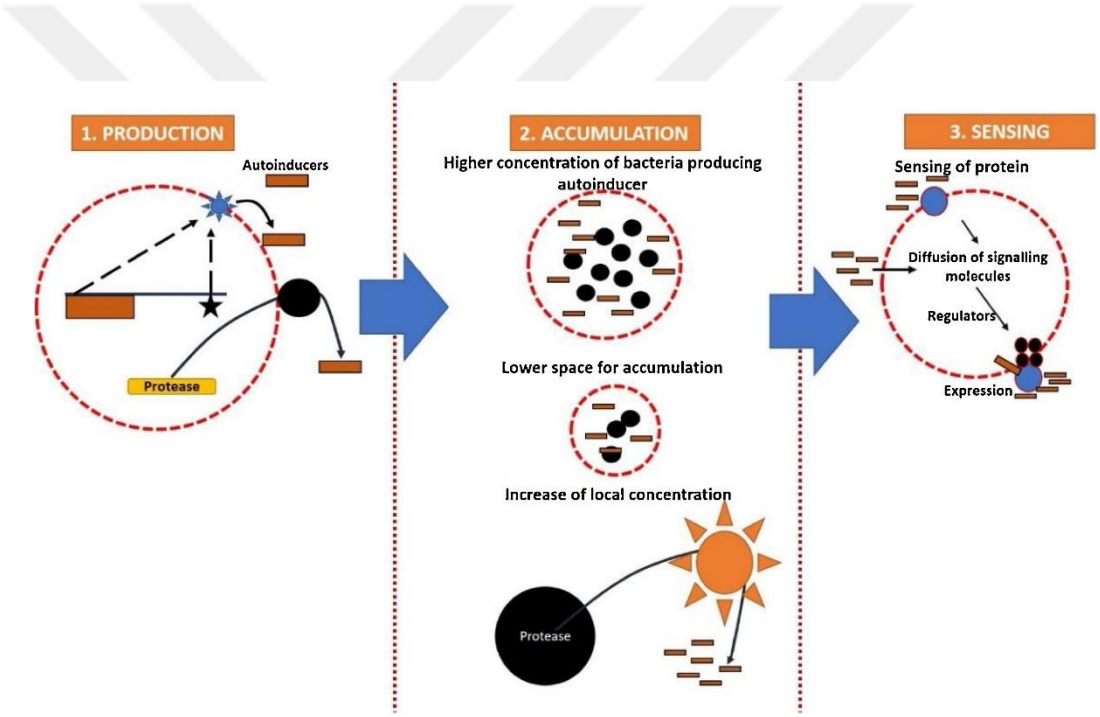
Farklı konsantrasyonlarda demir biyofilm üretiminde önemli bir rol oynamaktadır ve farklı türler arasında farklı etkiler oluşturmaktadır. Yüksek demir konsantrasyonları, *P. aeruginosa*'da biyofilm üretimi için gerekli olan belirli genlerin ekspresyonunu baskıladığı ve önceden var olan mevcut biyofilmleri de bozduğu rapor edilmiştir (Musk ve ark., 2005). Başka bir çalışma da, 5 μM $FeCl_3$ içeren ortamın *P. aeruginosa*'nın biyofilm üretimini artırdığını ve ancak yüksek demir koşulları altında (100 μM) ise biyofilm üretiminin baskılandığı öne sürülmüştür (Yang ve ark., 2007). *Legionella pneumophila* suşlarının biyofilm oluşumu, demir açısından zengin koşullarda engellenmiştir (Hindré ve ark., 2008). *Streptococcus mutans* yapılan bir çalışma da ise, demirden yoksun tükürükte (Fe^{3+}<0.1 μM) bu türün biyofilm üretimi artarken, Fe^{3+}>1 μM ortamda biyofilm oluşumunun baskılandığı gözlenmiştir (Berlutti *et al.*, 2004). Artan demirin biyofilm üzerinde negatif etkisinin yanı sıra, birçok mikroorganizma da artan demir miktarı biyofilm üretimini tetiklemiştir. Düşük demir koşulları altında *E. coli* biyofilm oluşumu bastırıldığı ortaya atılmıştır (Wu ve ark., 2009). *Staphylococcus aureus* SA113 suşunun güçlü demir şelatör (PGG) içeren büyüme ortamına 200 μM demir ilavesi biyofilm üretimini geri kazandırmıştır (Lin *et al.*, 2012). Son yıllarda yapılan bir çalışma da, test edilen tüm *V. vulnificus* suşlarının biyofilm üretimi ile büyüme ortamındaki demir konsantrasyonu arasında güçlü, doğrudan bir ilişki bulunmuştur (Çam ve ark., 2020b). *V. vulnificus* suşlarının en fazla biyofilm üretimi 200 μM $FeCl_3$ konsantrasyonlarında gözlenmiştir. 200 μM demir ilavesine kadar negatif bir etki gözlenmemiştir.

2.5. Biyofilmlerin Moleküler Mekanizmaları

2.5.1. ‘‘Quorum sensing’’ (çoğunluk/çekirdek algılama)

Bakteriler, biyofilm oluşumunu ve patojenite geliştirmelerine yardımcı olan çeşitli biyolojik yollarla kendi aralarında iletişim kurar (Brindhadevi ve ark., 2020). Böyle bir sistem, virülans faktörleri geliştirmeye yönelik sinyal mekanizması ve bir savunma mekanizması tarafından desteklenmektedir (Ng ve ark., 2009; Pereira ve ark., 2013). Bakteriler hücreden hücreye iletişim sağlamak için ‘‘quorum sensing’’

(çoğunluk/çekirdek algılama) adı verilen popülasyon yoğunluğuna bağlı bir sinyal haberleşme sistemi kullanmaktadır. Bakteriler, hücre yoğunluğundaki ve tür karmaşıklığındaki değişikliklere yanıt olarak gen ekspresyonunu çekirdek algılamayla eşzamanlı olarak kontrol eder (Ng ve ark., 2009). Asil homoserin laktonlar (AHL'ler), tür içi çekirdek algılama için Gram negatif proteobakteriler tarafından kullanılan ana otoindükleyici sinyal sınıfıdır (Ng ve ark., 2009). Gram pozitif bakteriler, çekirdek algılama sinyal molekülleri olarak spesifik peptitleri kullanır (Satpathy ve ark., 2016; Brindhadevi ve ark., 2020). Beslenme, pH ve sinyal akış hızları gibi çeşitli çevresel faktörler, biyofilmlerde çekirdek algılama aracılıyla işleyişi kontrol eder (da Silva ve ark., 2017).



Şekil 2.4. Ortamdaki otoindükleyicilerin konsantrasyonuna tepki veren bakteri davranışı (Brindhadevi ve ark., 2020)

Gram negatif bakteriler, hücre zarlarını geçen ve alıcı hücrelerdeki düzenleyici proteinlere bağlanan yayılabilir AHL'leri kullanır (Saxena ve ark., 2019). LuxI/LuxR, Gram negatif bakterilerde çekirdek algılama sisteminin bir prototipidir. LuxI, yüksek konsantrasyonlarda aynı kökenli LuxR reseptörüne bağlanan ve stabilize eden AHL üreten bir AHL sentazıdır. AHL-LuxR reseptör protein kompleksi, daha fazla AHL üretmek ve sinyal amplifikasyonuna neden olmak için ileri beslemeli bir reaksiyonda

LuxI ekspresyonunu otomatik olarak indüklerken birkaç genin ekspresyonunu tetikler (Saxena ve ark., 2019). Gram pozitif bakteriler ise zara bağlı reseptör histidin kinazları gerektiren peptit bazlı algılama mekanizmalarına dayanır (Saxena ve ark., 2019). Gram pozitif Bacillus subtilis ve S. aureus bakterileri biyofilm oluşumunun ökaryotik benzeri Ser/Thr kinaz aracılı düzenlemesini kullanır (Saxena ve ark., 2019). Çok sayıda patojenik bakteri, ökaryotik benzeri Ser/Thr kinazlar için genler barındırır ve bu enzim sistemlerinin sinyal moleküllerinin biyosentezini düzenlemede ve biyofilm yaşam modunu kontrol etmede evrimsel önemini ortaya koyduğu öne sürülmüştür (Saxena ve ark., 2019).

2.5.2. İkinci haberci siklik-di-guanilat monofosfat (C-di-GMP)

C-di-GMP ikinci haberci, birçok bakteri davranışını düzenleyen ve hareketli serbest yaşayan hücreler ile biyofilm oluşturucular arasında yaşam tarzı geçişini yönlendirmek için kilit öneme sahip bir hücre içi sinyal sistemidir (Valentini ve ark., 2016). Hücredeki yüksek c-di-GMP konsantrasyonu ile biyofilm oluşumu veya düşük c-di-GMP seviyeleri ve hareketlilik arasındaki ilişki, *E. coli*, *P.aeruginosa* ve *Salmonella enterica* serovar Typhimurium gibi çeşitli bakteri türlerinde gösterilmiştir (Simm ve ark., 2004; Valentini ve ark., 2016).

P. aeruginosa, kistik fibroz hastalarının kronik enfeksiyonunda baskındır, burada bakteri uzun yıllar devam eder ve yaşamı tehdit eden akciğer hasarı oluşturur (Valentini ve ark., 2016). Uzun süreli enfeksiyonlar boyunca, *P. aeruginosa* akciğer ortamına kapsamlı genetik ve fenotipik adaptasyona uğrar, bu da artan biyofilm üretimi ile daha az öldürücü bir duruma neden olur (Marvig ve ark., 2015). *P. aeruginosa* bakterisinde c-di-GMP, biyofilm oluşumu sırasında pozitif bir düzenleyicidir ve biyofilmle ilişkili genleri düzenlemektedir (Valentini ve ark., 2016; Brindhadevi ve ark., 2020). C-di-GMP seviyesindeki artış, bakterilerin kamçı aracılı hareketliliğini azaltarak ekzopolisakkaritleri ve adezinleri indükleyerek biyofilm bağlanmasını desteklerken, azalan c-di-GMP seviyesi hareketliliği arttırır ve serbest yüzen planktonik hücreler oluşturmaktadır (Valentini ve ark., 2016; Brindhadevi ve ark., 2020).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyali insan patojen bakterileri olan 2 suş *Escherichia coli,* 1 suş *Klebsiella aerogenes,* 1 suş *Klebsiella pneumoniae,* 2 suş *Pseudomonas aeruginosa,* 1 suş *Enterococcus faecalis ve* 1 suş *Staphylococcus aureus* bakterileri oluşturmaktadır. Çalışmanın diğer materyalleri ise petri kabı, falkon tüpleri, tüp standı, beher, erlenmayer, otomatik pipetler, PCR cihazı ve PCR için gerekli malzeme ve kimyasallar, agaroz jel elektroforezi için gerekli malzeme ve cihazlar, jel görüntüleyici, pH metre, spektrofotometre, terazi, otoklav, çeşitli hacimlerde cam tüpler, inkübatör, etüv, santrifüj cihazı gerekmektedir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Patojenik türlerin elde edilişi

Harran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Mikrobiyoloji Laboratuvarından insan patojenik bakteriler (2 *Escherichia coli,* 1 *Klebsiella aerogenes,* 1 *Klebsiella pneumoniae,* 2 *Pseudomonas aeruginosa,* 1 *Enterococcus faecalis ve* 1 *Staphylococcus aureus)* katı kültürde petri kaplarında tekli koloni oluşturmuş şekilde alınmıştır. Türler her ekim öncesi petri kaplarında tutulmuştur ve ara ara yeni petri kaplarına ekim yapılarak canlı tutulmaya çalışılmıştır. Türlerin morfolojik ve biyokimyasal analizleri Araştırma Hastanesi tarafından yapılmıştır.

3.2.2. Patojenlerin moleküler tanımlanması

3.2.2.1. DNA izolasyonu

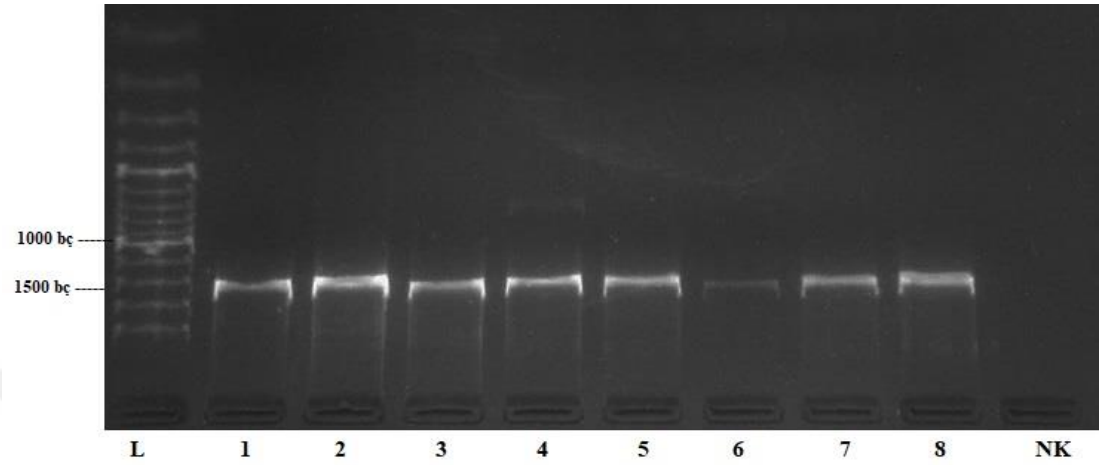
Bakterilerden DNA izolasyonu için Çam ve diğerlerinin kullandığı protokol takip edildi (Çam ve ark., 2019). Petrilerden sıvı nutrient besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de bir gün inkübe edilen tüpler hazırlandı. Gece boyunca büyütülen kültür

4°C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant dökülmüştür. Pelet üzerine 500 µL %2'lik CTAB solüsyonu eklendi ve vortekslendi. Dijital ısı bloğunda tüpler 60°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi ve her 10 dakikada bir vortekslendi. Ardından 500 µL kloroform- izoamil alkol (24:1) tüplere eklendi ve vortekslendi. Tüpler 10 dakika boyunca 10000 rpm'de 4°C'de santrifüj edildi. En üstte DNA içeren sulu faz yeni bir ependorf tüpüne alındı. Sulu çözeltinin 2/3'ü kadar soğuk isopropanol eklendi ve tüpler birkaç kez nazikçe çevrildi. 1 gün boyunca -20°C'de saklandı. Bir günün sonunda 4°C'de 10000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice boşaltıldı. Tüpler kurutma kâğıdı üzerine ağzı açık ve ters bir şekilde konuldu. 3-4 saat kuruması beklendi. Ardından dondurucudan çıkarılan soğuk etanolden 200 µL eklendi. Birkaç kez etrafında çevrilerek döküldü. Tüpler ağzı açık ters bir şekilde hava ortamında 2-3 saat kurumaya bırakılmıştır. Etanolden uzaklaştırılmış pelet 200 µL Tris-EDTA tampon çözeltisin de yeniden süspanse edildi. Gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi ve ertesi gün -20°C'ye alındı. DNA kalitesi Spektrofotometre (Inpoler)'de 260/280 oranına göre belirlenmiştir.

3.2.2.2. 16S rRNA bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu

16S ribozomal gen bölgesinin çoğaltılması için fD1 ve rD1 primerleri kullanılmıştır (Weisburg *et al.*, 1991). fD1 ve rD1 primerlerinin gen sekansları sırasıyla ''CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG'' ve ''CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC''dir. Polimeraz zincir reaksiyon (PZR) için Taq polimeraz enzim protolü takip edilmiştir (ThermoScientific, #EP0402). Totalde 50 µL olan polimeraz zincir reaksiyon içeriği; 10 mM dNTPs (1 µL), 25mM $MgCl_2$ (5 µl), 10X Taq buffer $(NH_4)_2SO_4$ (5µL), 1.25 U Taq DNA polimeraz, fD1/rD1 primer çifti (her biri 1 µL) ve yaklaşık 50 ng/µL DNA'dan oluşmuştur. Hacim, ultra saf deiyonize H_2O ile 50 µL'e tamamlanmıştır. 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu Thermal Cycler (BIO-RAD T100™) cihazında gerçekleştirilmiştir. Başlangıç denatürasyon aşaması 95ºC'de 4 dakikada yapılmıştır. Amplifiye olacak bölgenin çoğaltılması için, denatürasyon aşaması 95ºC'de 30 saniye de, primerin hedef gen bölgesine bağlanması 58ºC'de 30 saniye de ve hedef bölgenin uzama aşaması 72ºC'de 90 saniye de yapılmıştır. Daha sonra 72ºC'de 10 dakikada bekletilerek, tüpler cihazdan alınmıştır. ~1500 baz çifti uzunluğunda ki hedef bölge,

%1.5 agaroz jelde 110 volt akımda 1XTAE bufferda yürütülmüş ve UVItec cihazında ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 5)



Şekil 3.1. İnsan patojenlerinin amplifiye olmuş 16S rRNA gen bölgesinin jel görüntüsü (L: ladder, 1: *E.coli* SB1, 2: *E. coli* SB2, 3: *K. aerogenes* SB1, 4: *K. pneumoniae* SB1, 5: *P. aeruginosa* SB1, 6: *P. aeruginosa* SB2, 7: *E. faecalis* SB1, 8: *S. aureus* SB1, NK: negatif kontrol, bç: baz çifti)

3.2.2.3. Dizi analizi

fD1/rD1 primer çiftiyle çoğaltılmış gen bölgesinin sekans analizi MEDSANTEK/İSTANBUL şirketine yaptırılmıştır. Saflaştırılması yapılan örneklerin dizi analizi 3500XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)'da çift yönlü olarak yapılmıştır. Dizi analizi yapılan sekansların incelenmesi ve temizlenmesi FinchTV versiyon 1.4.0 programında yapılmıştır. Sekansların hizalanması ve düzeltilmesi için BioEdit sürüm 7.0.5.3 programında gerçekleştirilmiştir. Clustal Omega programı 1.2.4 sürümü kullanarak, çoklu hizalama yapılmıştır ve filogenetik analizler için sekanslar FASTA formatında kopyalanmıştır.

3.2.2.4. Filogenetik ağaç oluşturma

Patojenlerin tanımlanmasında NCBI-BLAST, maximum likelihood ve bayesian analizlerden yararlanılmıştır. Filogenetik ağaç oluşturmak için referans suşların gen

dizileri NCBI Blast'tan elde edilmiştir. Elde edilen referans suşların gen erişim numaraları Şekil 6 ve 7'de verilmiştir.

Maximum likelihood analizi MEGA X programında 10.1.8 sürümü kullanılarak yapılmıştır (Kumar ve ark., 2018). Filogenetik ağaç maksimum olabilirlik yöntemi ve Tamura-Nei (TrN) modeli kullanılarak oluşturuldu. En uygun nükleotid yer değiştirilme modeli olarak Tamura-Nei (Tamura ve ark., 2013) seçilmiştir. Tamura-Nei modeli kullanılarak tahmin edilen ikili mesafelerin bir matrisine Neighbor-Join ve BioNJ algoritmaları uygulanarak ve daha sonra üstün log olabilirlik değerine sahip topoloji seçilerek otomatik olarak elde edilmiştir.

Bayesian analizleri MrBayes programı 3.2.6 sürümü kullanılarak yapılmıştır (Ronquist ve ark., 2003). Markov Zinciri Monte Carlo (MCMC) yöntemi aracılığıyla, bu model parametrelerinin posterior dağılımının tahmini yapılmıştır. ''4by4'', yer değiştirme modeli olarak tercih edilmişken; ''invariable+gamma''da bölgeler arası oran varyasyonu için seçilmiştir. Bu analiz, 4 zincirli 100000 jenerasyon üzerinden yapılmıştır. Örnekleme her 100 jenerasyon da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ilk 1000 ağaç ''burn-in'' olarak kabul edilip değerlendirilmemiştir. MrBayes programı kullanılarak elde edilen bayesian analiz sonuçları, newick formatında elde edilmiştir. Daha sonra MEGA X programı 10.1.8 sürümünde filogenetik ağaç meydana getirilmiştir (Kumar ve ark., 2018).

3.2.3. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu farklı sıcaklıklarda (24 ve 37°C), farklı pH aralıklarında (pH 5.5, 7.5 ve 8.5) ve farklı demir (0, 5, 10, 30, 50 ve 100 µM $FeCl_3$) konsantrasyonlarında gerçekleştirildi. pH ve demir deneyleri 37°C'de yapıldı. Biyofilm deneyi farklı besiyerleri (Ashby-Sucrose, Nutrient ve Lysogeny Broth) kullanılarak test edildi ve en fazla biyofilm oluşumu Nutrient Broth'da gözlemlendiği için, biyofilm oluşumu aşamaları için Nutrient Broth tercih edilmiştir. Biyofilm oluşturulacak borosilikat cam tüplere 500 µL Nutrient Broth aktarıldı ve gece boyunca oda sıcaklığında bekletilerek kontaminasyon olup olmadığı gözlemlendi. Bir gece boyunca Nutrient Broth içeren falkon tüplerde büyütülen bakterilerden ~20 µL (~1 × 10^6 CFU/ml), 500 µL Nutrient

Broth içeren borosilikat tüplere eklenerek, istenilen koşullar uygulanarak sabit şekilde 24 saat bekletilerek biyofilm oluşturması beklenildi. Borosilikat cam tüplerin etrafında halka şeklinde oluşturulmuş biyofilmin miktarı, modifiye edilmiş kristal viyole boyama yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. (Çam ve ark., 2020b). İlkin biyofilm oluşturan tüplerin içeriği, biyofilme zarar vermeden boşaltıldı ve her tüp %2'lik NaCI ile 3 kere yıkandı. Bunu yaparken cam tüpe yapışan biyofilm tabakalarına zarar vermemek için çözeltinin direkt tüpe aktarılmasından kaçınıldı ve kenarlarından nazikçe eklendi. Yıkama işleminin ardından her tüpe 600µL %0.1'lik kristal viyole boya eklendi ve 40 dakika bekletildi. Tüplerin içerisinde boya dökülerek her tüp yine 3 kere %2'lik NaCI ile yıkandı. Ardından %98'lik etanolden 600 µL tüplere eklendi ve 10 dakika bekletildi. Etanolde çözünen boyadan gerekli miktarda alınarak (gerektiğinde seyrelterek) 96 oyuklu plakalara aktarıldı ve UV spectrophotometer (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader) cihazında 570 nm'de ölçüm yapıldı. Biyofilm deneyi 4-5 replike ve 3 tekrarlı yapılmıştır ve ortalamaları alınarak analizleri yapılmıştır.

3.2.4. Büyüme hızı

Biyofilm oluşum koşulları altında büyütülen kültürden, aynı zamanda 100 µL alikotlardan alınarak 96 oyuklu plakalar da UV spektrofotometre'de 600nm'de büyüme yoğunlukları ölçülmüştür. Spektrofotometreden elde edilen optik değerleri hücre sayısına dönüştürmek için, farklı zamanlarda büyüyen kültürden alınarak mikroorganizmalar farklı optik yoğunluklarında elde edilen değerler mikroskopla sayılmıştır. Büyüme hızlarını belirleyebilmek için, $g=(\log_{10} N_t - \log_{10} N_0)\ (\log_{10}^2)^{-1}$ formülü kullanılmıştır. ''N_0'', başlangıç hücre sayımı ve ''N_t'', son hücre sayımıdır. ''g'', ortalama jenerasyon zamanıdır. Suşların büyüme hızları, 2 replikeden oluşan 2 farklı deney sonucunun ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

3.2.5. İstatistik analizler

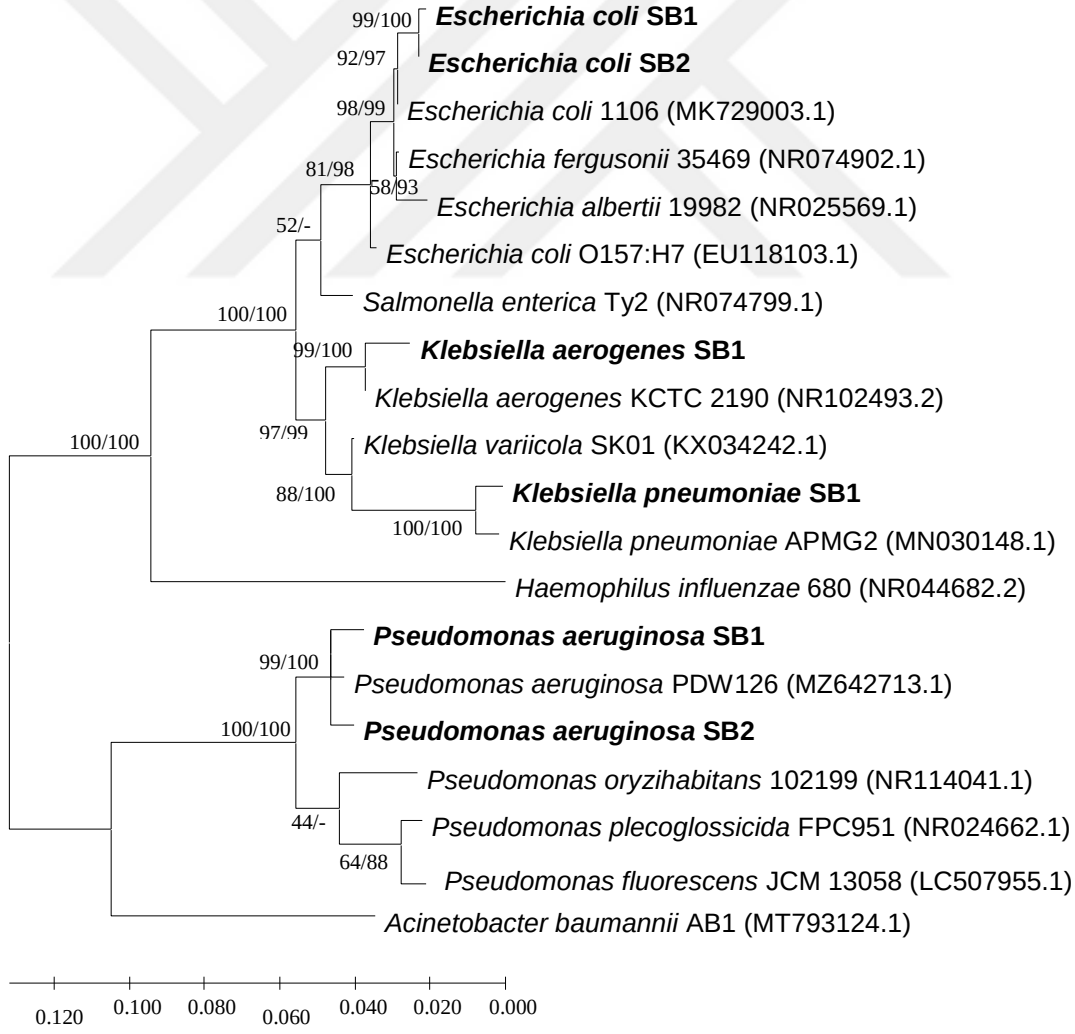
İstatistik analizler SPSS programı 24.0 sürümde yapılmıştır. Tek yönlü ANOVA öncesi Bartlett test kullanılmıştır. İki grup arasında ki farklar için Tek Örneklem T-test; ikiden fazla gruplar arasında ki farklılıklar için Bonferroni *post hoc* test kullanıldı.

Doğrusal regresyon analizi de parametreler arasında ki ilişkiyi bulmak için uygulanmıştır. Bütün testler de $P<0.05$ olarak belirlenmiştir.

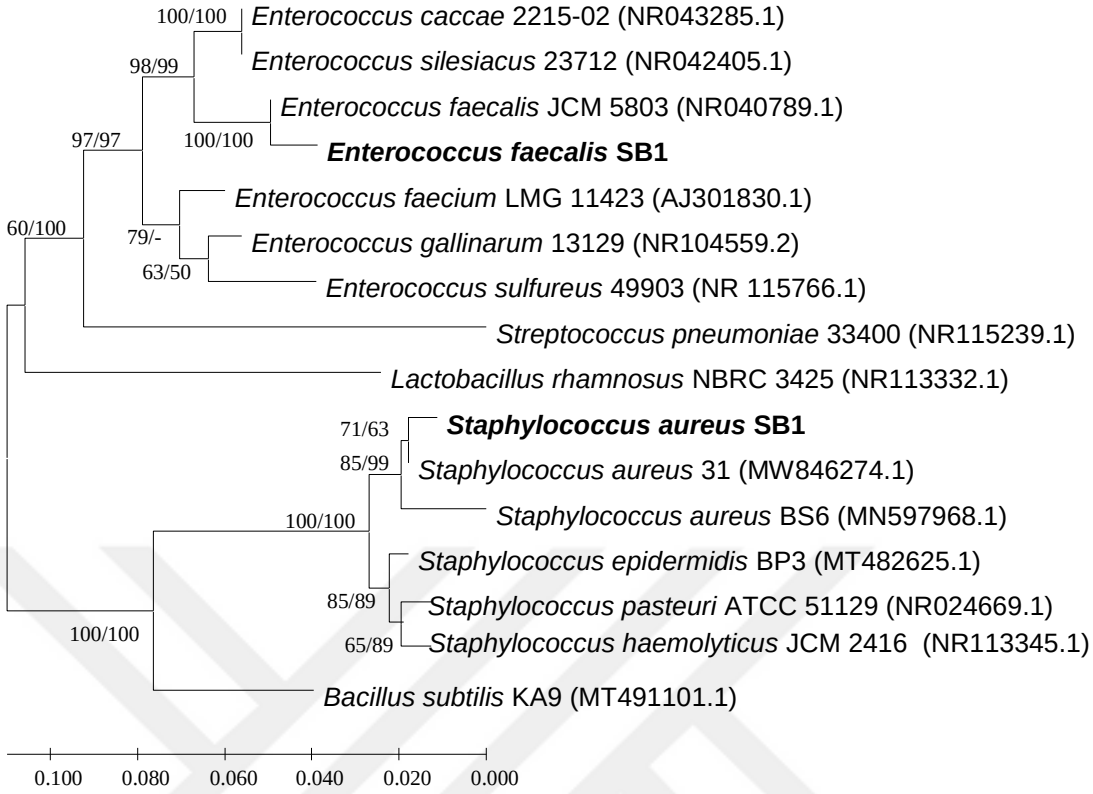
3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Patojenlerin Moleküler Tanımlanması

Maximum likelihood ve bayesian filogenetik analizler sonucunda, suşların ikisi *Escherichia coli* SB1/SB2, biri *Klebsiella aerogenes* SB1, biri *Klebsiella pneumoniae* SB1, ikisi *Pseudomonas aeruginosa* SB1/SB2 (Şekil 4.1.), biri *Enterococcus faecalis* SB1 ve biri *Staphylococcus aureus* SB1 (Şekil 4.2.) olarak tanımlanmıştır. Suşların FASTA dizileri NCBI'a girilmiştir ve erişim numaraları Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. 16S rRNA gen bölgelerine bağlı maximum likelihood/bayesian filogenetik analizler



Şekil 4.2. 16S rRNA gen bölgelerine bağlı maximum likelihood/bayesian filogenetik analizler

4.2. Çevresel Etkenlerin Patojenlerin Büyümeleri Üzerine Etkisi

4.2.1. Sıcaklığın büyüme üzerine etkisi

24 ve 37°C'de suşların büyüme hızları belirlenmiştir. Bütün suşların büyüme hızları 37°C'de daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.1.) ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır (Tek Örneklem T-test; $P<0.05$). Patojenlerin büyüme hızlarının 37°C'de daha yüksek çıkması, kinetik enerjilerinin artması sonucunda meydana gelmiştir. Çok sayıda ki mikroorganizma yüksek sıcaklıklarda daha hızlı büyümektedir.

Çizelge 4.1. Sıcaklığın (°C) patojenlerin büyümesi üzerine etkisi; Tek Örneklem T-test; ortalama ± standart sapma; P<0.05. * İstatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir.

Suşlar	Gen Erişim Numaraları	24°C	37°C	P
E. coli SB1	OL831124	0.335±0.34	0.434±0.02*	<0.05
E. coli SB2	OL831123	0.343±0.02	0.445±0.02*	<0.05
K. aerogenes SB1	OL831120	0.297±0.01	0.425±0.01*	<0.05
K. pneumoniae SB1	OL831121	0.371±0.02	0.465±0.02*	<0.05
P. aeruginosa SB1	OL831122	0.353±0.02	0.461±0.04*	<0.05
P. aeruginosa SB2	OL831125	0.335±0.02	0.466±0.02*	<0.05
E. faecalis SB1	OL831127	0.397±0.01	0.507±0.05*	<0.05
S. aureus SB1	OL831126	0.361±0.03	0.472±0.02*	<0.05

4.2.2. pH'ın büyüme üzerine etkisi

Bütün suşların en yüksek büyüme hızları pH 7.5'te gözlenmiştir (Çizelge 4.2.). *E. coli* SB1, *K. pneumoniae* SB1 ve *P. aeruginosa* SB1/SB2 suşlarında istatistiksel olarak anlamlı farklar pH 7.5'te görülmüştür (Bonferroni *post hoc* test; P<0.05).

Çizelge 4.2. pH'ın patojenlerin büyümesi üzerine etkisi; Bonferroni *post hoc* test; ortalama ± standart sapma; P<0.05. * İstatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir.

Suşlar	pH 5.5	pH 7.5	pH 8.5
E. coli SB1	0.466±0.03	0.545±0.04*	0.391±0.02
E. coli SB2	0.409±0.02	0.501±0.06	0.377±0.03
K. aerogenes SB1	0.374±0.04	0.487±0.04	0.385±0.04
K. pneumoniae SB1	0.359±0.03	0.501±0.01*	0.383±0.02
P. aeruginosa SB1	0.368±0.03	0.517±0.03*	0.381±0.03
P. aeruginosa SB2	0.328±0.04	0.479±0.02*	0.370±0.04
E. faecalis SB1	0.394±0.03	0.499±0.02	0.421±0.03
S. aureus SB1	0.450±0.04	0.484±0.03	0.423±0.03

4.2.3. Demirin büyüme üzerine etkisi

Test edilen bütün suşlar, artan demir miktarına bağlı şekilde büyüme hızlarında artış gözlenmiştir. Sadece *E. coli* SB1 100 µM ve *E. coli* SB2 0 µM konsantrasyonlarda istatiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Bonferroni *post hoc* test; P<0.05). Doğrusal

regresyon analizi *E. coli* SB2 suşu hariç diğer bütün suşların, artan demir miktarı ile büyüme hızları arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir (Doğrusal regresyon analizi, $P<0.05$). R^2 değerleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

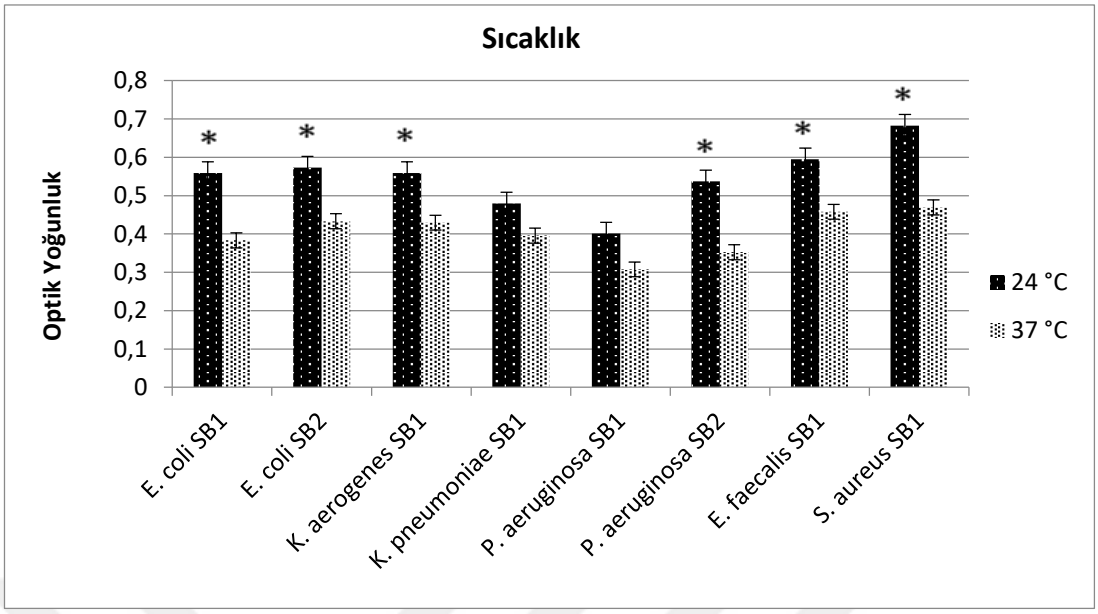
Çizelge 4.3. Demirin patojenlerin büyümesi üzerine etkisi; Bonferroni *post hoc* test; ortalama ± standart sapma; $P<0.05$. * İstatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir.

Suşlar	0 µM	5 µM	10 µM	30 µM	50 µM	100 µM	R^2
E. coli SB1	0.45±0.02	0.57±0.03	0.58±0.02	0.67±0.02	0.73±0.01	0.86±0.01*	0.87
E. coli SB2	0.39±0.02*	0.57±0.02	0.63±0.02	0.65±0.05	0.73±0.04	0.77±0.03	0.57
K. aerogenes SB1	0.37±0.02	0.45±0.03	0.43±0.05	0.54±0.02	0.61±0.02	0.69±0.02	0.91
K. pneumoniae SB1	0.33±0.03	0.38±0.03	0.46±0.03	0.53±0.04	0.58±0.02	0.72±0.04	0.90
P. aeruginosa SB1	0.30±0.03	0.35±0.02	0.37±0.03	0.46±0.06	0.50±0.01	0.56±0.01	0.81
P. aeruginosa SB2	0.33±0.02	0.40±0.03	0.42±0.04	0.48±0.02	0.52±0.04	0.62±0.05	0.91
E. faecalis SB1	0.35±0.03	0.42±0.05	0.43±0.02	0.41±0.05	0.49±0.07	0.60±0.05	0.88
S. aureus SB1	0.33±0.05	0.39±0.01	0.42±0.05	0.50±0.03	0.57±0.02	0.67±0.03	0.90

4.3. Çevresel Etkenlerin Patojenlerin Biyofilm Oluşturma Yetenekleri Üzerine Etkisi

4.3.1. Sıcaklığın biyofilm üzerine etkisi

Patojenlerin biyofilm oluşturma yetenekleri 24 ve 37°C'de test edilmiştir. Bütün suşlar 37°C'ye kıyasla 24°C'de daha fazla biyofilm oluşturmuştur (Şekil 4.3.). *K. pneumoniae* SB1 ve *P. aeruginosa* SB1 suşları hariç, diğer tüm suşların 24°C'de biyofilm oluşturması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tek Örneklem T-test; $P<0.05$).



Şekil 4.3. Sıcaklığın (°C) biyofilm üzerine etkisi; Tek Örneklem T-test; ortalama ± standart hata; P<0.05. * İstatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir.

E. coli bakterisi ile yapılan daha önceki bir çalışmada da mevcut çalışma sonuçlarına benzer şekilde, düşük sıcaklıklarda (23°C) daha fazla biyofilm üretimi gözlenmiştir (White-Ziegler ve ark., 2008). Bu çalışma da biyofilmle ilişkili çok sayıda ki genin ekspresyonu düşük sıcaklıkta daha fazla bulunmuştur. Düşük sıcaklıkta artan biyofilm üretimi, yüksek sıcaklıkta artan büyümeye rağmen, düşük sıcaklıktan kaynaklanan biyofilmle ilişkili genlerin ekspresyonunda ki artışa atfedilmiştir. Bizim çalışmamızda da *E. coli* patojeni düşük sıcaklıkta büyüme hızları düşük olmasına rağmen (Çizelge 1) istatistiksel olarak biyofilm üretiminde önemli bir artış göstermiştir. Bu mikroorganizma, düşük sıcaklıkta soğuk şoku tepkiye bağlı olarak, soğuğa karşı biyofilm üretimini artırarak adaptasyon sağlamış olabilir. Çünkü düşük sıcaklıkta ifade edilen bazı genler, soğuk şok tepkisiyle ilişkili genlerle örtüşür, bu da sıcaklıktaki ani değişimlere uyum sağlamak için kullanılan stratejilerin olabileceği fikri öne sürülmüştür (White-Ziegler ve ark., 2008).

Mevcut çalışmaya benzer şekilde farklı çalışmalarda da *P. aeruginosa* patojeni yüksek sıcaklıklara kıyasla düşük sıcaklıklarda daha fazla biyofilm oluşturmuştur (Hoštacká ve ark., 2010; Kim ve ark., 2020). Kim ve diğerlerinin yaptığı bir çalışma da, *P. aeruginosa* 20°C'de biyofilm oluşumu büyük ölçüde artmıştır ve göze çarpan

mantar benzeri biyofilm yapısının en sağlam formuna ulaşmıştır. Ancak, sıcaklık 37°C'ye yükseldiğinde biyofilm oluşumu önemli bir oranla hızla azaldığı gözlenmiştir. 25°C, biyofilm oluşumunun en düşük noktası olarak belirlenmiştir (Kim ve ark., 2020). Hücre içi 3',5'-siklik diguanilat (c-di-GMP) seviyeleri de sıcaklık 20°C'den 25°C'ye yükseldiğinde hızla azalmıştır. Yani, biyofilm oluşumu ve hücre içi c-di-GMP seviyesi benzer bir patern izlemiştir. C-di-GMP, biyofilm oluşumu için gerekli faktörlerin üretimine aracılık etmektedir. Biyofilm oluşumunun sıcaklık regülasyonu esas olarak c-di-GMP'nin aracılık etmesine atfedilmiştir (Kim ve ark., 2020). İlaveten, düşük sıcaklıklarda daha fazla ve daha iyi yapılandırılmış biyofilmlerin oluşumu, düşük sıcaklıklarda artan aljinat üretimine bağlanmıştır (Kim ve ark., 2020). Aljinat bir polisakkarit olup, biyofilm üç boyutlu yapısını oluşturmakta rol oynayan önemli bir karbonhidrattır (Ghafoor ve ark., 2011).

K. aerogenes, K. pneumoniae, E. faecalis ve *S. aureus* patojenleri de çalışmamızda düşük sıcaklıkta daha fazla biyofilm oluşturmuştur. Fakat literatürde bu patojenler üzerinde sıcaklığın biyofilm oluşumu üzerinde pek bir çalışma bulunmamaktadır. Farklı mikroorganizmalar üzerine yapılan biyofilmle ilgili çalışmalar da, biyofilm üretimi düşük sıcaklıklarda artış göstermiştir (Di Bonaventura ve ark., 2007; Hoštacká ve ark., 2010; Loni ve ark., 2015; Çam ve ark., 2020b). Önemli bir insan patojeni olan *Vibrio vulnificus* üzerine yapılan çalışmalar da, yeni bir fenotipik varyant tanımlanmıştır. Bu yeni varyant *V. vulnificus'un* sürekli olarak daha düşük sıcaklıklara maruz bırakıldığında oluşturulmaktadır. Bu varyantın düşük sıcaklıklarda bol miktarda biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir (Grau ve ark., 2005; Çam ve ark., 2020b). Mevcut çalışmamızda ki patojenlerin de düşük sıcaklıklarda biyofilm üretiminde önemli artışlar göstermesinin altında, patojenlerin farklı bir varyant dönüşmesinden kaynaklanabilir. Ya da biyofilm oluşumunun çok önemli bir bileşeni olan ekzopolisakkaritlerin viskozitesinden kaynaklanmış olabilir. Mikrobiyal exopolisakkaritler düşük sıcaklıkta stabildir ve böylece düşük sıcaklıkta biyofilm üretimini daha fazla desteklemektedir (Nisbet ve ark., 1984).

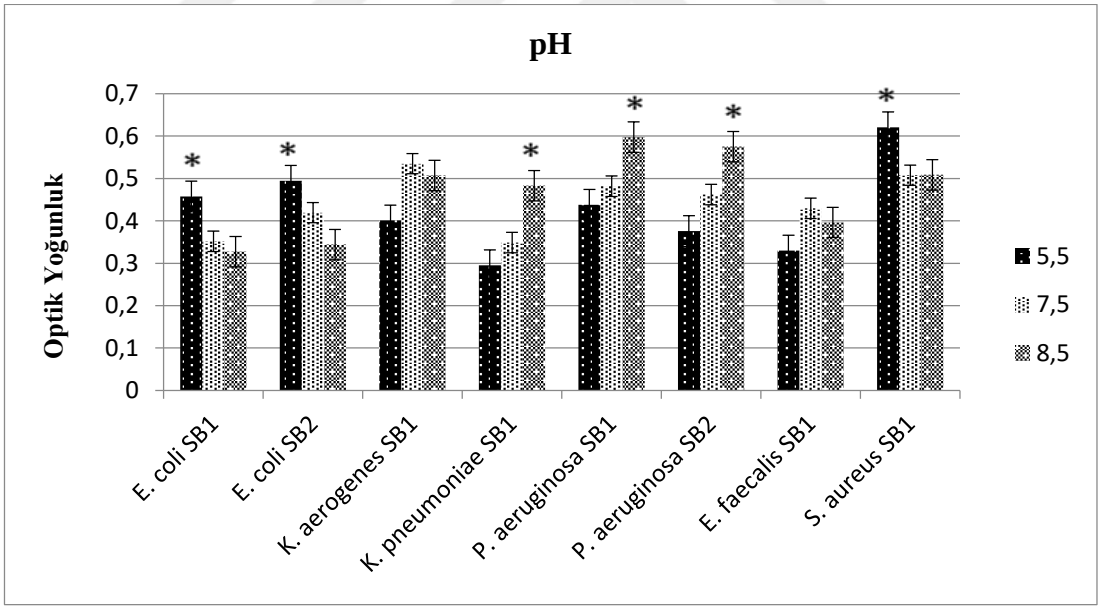
4.3.2. pH'ın etkisi

Çalışmamızda kullanılan *E. coli* suşları, yüksek pH değerlerine kıyasla düşük pH'da istatistiksel olarak önemli miktarda biyofilm oluşturmuştur (Şekil 4.4). Bir başka çalışmada da bizim sonuçlarımıza benzer sonuç bulunmuştur. Bir *E. coli* suşu ve izogenik türevleri pH 5.5'de 37°C'de Luria-Bertani besiyerinde pH 7.4'e kıyasla çok daha fazla biyofilm oluşturmuştur (Mathlouthi ve ark., 2018). Mevcut çalışmamızda *S. aureus* patojeni de düşük pH'da istatistiksel olarak fazla miktarda biyofilm oluşturmuştur (Şekil 4.4). *S. aureus* patojeninin biyofilm oluşturma özelliği üzerine yapılan bir çalışma da, farklı pH aralıklarında *S. aureus* suşları farklı derecelerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur. Çalışma da bazı suşlar nötr/yüksek pH'da yüksek derecede biyofilm oluştururken bazı suşlar düşük pH aralığında fazla miktarda biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir (Zmantar ve ark., 2010).

E. coli SB1/SB2 ve *S. aureus* SB1 suşlarının düşük pH'da fazla miktarda biyofilm oluşturmasının altında farklı sebepler yatabilir. *S. aureus*'ın farklı pH aralığında farklı seviyelerde biyofilm oluşturması, pH'ın bakteriyel enzim aktivitesi üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmasına atfedilmiştir. (Zmantar ve ark., 2010). Her enzim aktivitesi optimum bir pH'a sahiptir ve bu nedenle asidik ortamda biyofilm oluşturan genlerin ifadesinde artış söz konusu olabilir. Farklı pH koşullarında dış zar porin proteinlerinin gen regülasyonu farklı şekillerde olabilmektedir. *E. coli*'de asidik pH bazı porin proteinlerde artış meydana getirirken bazılarında düşüşe neden olabilmektedir (Heyde ve ark., 1987). Biyofilm matrisini oluşturan polisakkaritlerin bu porin proteinlerin miktarına bağlı şekilde farklı miktarlarda sekresyonuna neden olmuş olabilir. İlaveten, pH stresinin neden olduğu koşullar altında büyütüldüğünde, *Staphylococcus epidermidis*'in biyofilm oluşumunun indüklendiği gösterilmiştir (Fitzpatrick ve ark., 2002). Düşük pH'da artan biyofilm üretimi *Vibrio cholerae* ve *V. vulnificus* patojenlerinde de gözlenmiştir. *V. vulnificus* suşları pH 5.5'de pH 7.5/8.5'e oranla yaklaşık %33 daha fazla biyofilm oluşturmuştur (Çam and Brinkmeyer, 2020b). Safra asitleri *V. cholerae*'de biyofilm oluşumunu uyarmaktadır (T. ve ark., 2006). Çalışmamızda kullandığımız suşların farklı pH koşullarında büyüme hızlarına baktığımızda, en yüksek büyüme hızı pH 7.5'da olduğu görülmektedir (Çizelge 2). Düşük pH'da artan biyofilm üretimi *E. coli* ve *S. aureus* suşlarının pH stresine karşı

oluşturdukları koruyucu bir tepki olabilir ve bu nedenle pH'a bağlı stres koşullar suşları biyofilm oluşturmaya yönlendirmiş olacağı fikrini doğurmaktadır.

Farklı pH koşulları aynı zamanda mikroorganizmaların bir yüzeye bağlanma yeteneklerini de etkilemektedir. *V. cholerae*'nin zooplanktona bağlanma oranları farklı pH aralıklarında incelenmiş ve optimum tutunma daha düşük bir pH ölçeğinde gözlenirken pH'ın artması bağlanma oranını düşürdüğü gözlenmiştir (M.A ve ark., 1997). *S. aureus* ile yapılan bir başka çalışmada da, cam yüzeye yapışan hücrelerin sayısı pH 4-6 aralığında güçlü bir şekildeyken, yüksek asidik ve alkali pH'da zayıf bir şekilde yapıştığını göstermiştir (Hamadi ve ark., 2005). İnert veya canlı yüzeylere tutunma ve yapışma, biyofilm oluşumunun ilk adımlarıdır. *E. coli* ve *S. aureus* patojenlerinin hafif asidik (pH 5.5) ve 37°C'de biyofilm üretiminde ki artış, gastrointestinal sistemde mikroorganizmaların biyofilm üretimlerini kolaylaştırabilir ve böylece virülanslarında artış meydana getirebilir.



Şekil 4.4. 37°C'de pH'ın biyofilm üzerine etkisi; Bonferroni *post hoc* test; ortalama ± standart hata; P<0.05. * İstatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir.

K. pneumoniae SB1 ile *P. aeruginosa* SB1/SB2 suşlarının pH 7.5'de büyüme hızları daha yüksek olmasına rağmen, yüksek pH'da (pH 8.5) daha fazla biyofilm oluşturmuştur (Şekil 4.4). Bu iki türün yüksek pH'da daha fazla biyofilm oluşturması

bir başka çalışmada da ortaya çıkarılmıştır (Hoštacká ve ark., 2010). *P. aeruginosa* patojeninin yüksek pH'da artan biyofilm miktarı aljinat üretimine atfedilmiştir. Aljinat, *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturmasında önemli bir etkiye sahip polisakkarittir (Ghafoor ve ark., 2011). Biyofilmin 3 boyutlu mimarisinin oluşumunda polisakkaritler önemli roller oynamaktadır (Ryder ve ark., 2007). Yüksek pH'da bakteri hücre duvarının dış zarındaki gözeneklerin genişlemesi karbon birikimine ve dolayısıyla daha fazla miktarda aljinat sentezine katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (Hoštacká ve ark., 2010). Benzer etki *K. pneumoniae* patojeninde de görülebilir. *E. coli* K12'de dış zar porin proteinlerinin pH ile düzenlenmesi üzerinde yapılan bir çalışmada, temel dış zar porin proteinlerinin regülasyonu farklı pH değerlerinde farklı şekillerde olduğu ortaya çıkarılmıştır (Heyde ve ark., 1987).

K. aerogenes SB1 ve *E. faecalis* SB1 patojenleri pH 7.5'de daha fazla miktarda biyofilm oluşturmuştur (Şekil 4.4). Bu farklılık istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu iki patojenin büyüme hızları da pH 7.5'de fazla bulunmuştur (Çizelge 4.2). Bu bakterilerin pH 7.5'de ki artan biyofilm miktarı artan büyüme hızlarına dayandırılabilir. Mikroorganizmalar nötr pH'da daha hızlı büyümektedirler ve böylece bu türler daha fazla biyofilm üretimi göstermişlerdir. Farklı bazı bakteri gruplarında en büyük biyofilm kütlesi pH 7-7.5'de bulunmuştur (Schultze ve ark., 2021).

4.3.3. Demirin etkisi

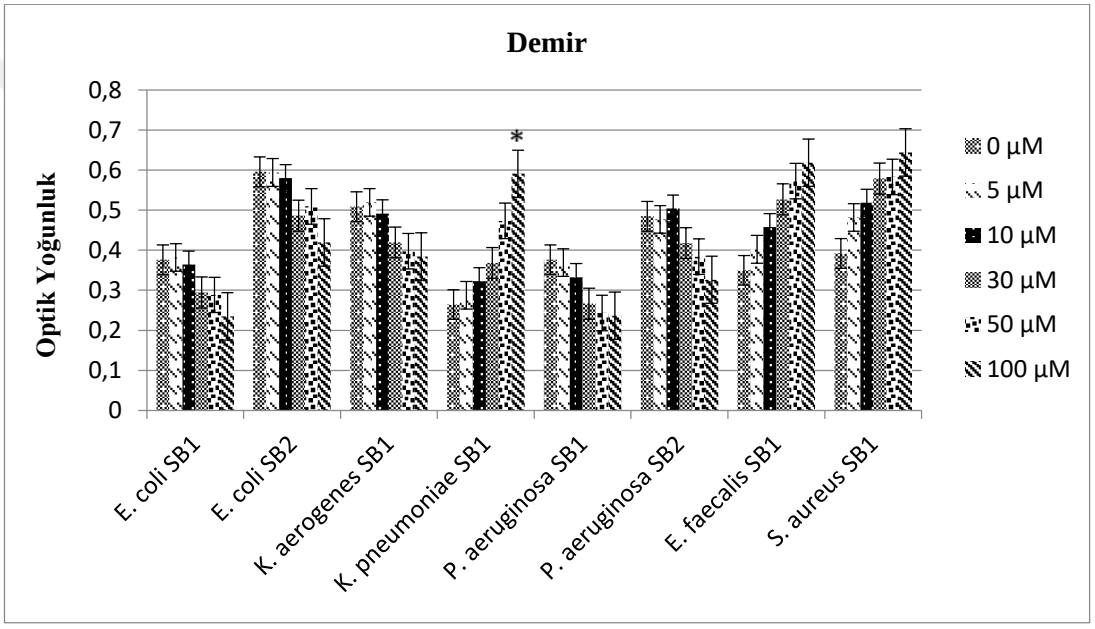
Biyofilm oluşumu, birçok faktör tarafından düzenlenen karmaşık bir gelişim sürecidir. Biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde çevresel sinyaller ve metal iyonları rol oynamaktadır (Lin ve ark., 2012). Biyofilm oluşumunun demire bağlı düzenlenmesi bakteri türlerine göre değişebilir ve oldukça karmaşık olabilir. Çalışmamız da *E. coli* SB1/2, *K. aerogenes* SB1 ve *P. aeruginosa* SB1/2 suşlarında artan demir konsantrasyonlarında biyofilm üretiminin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.5). Demir sınırlamasının bazı bakteri türlerinde biyofilm oluşumunun indüklediği gözlenmişken, bazılarında biyofilm oluşumu düşük demir koşulları altında baskılanmıştır (Wu a ve ark., 2009; Çam ve ark., 2020b). 30 μM demir ilavesinden sonra biyofilm üretiminin azalması ise, patojenik *E. coli* suşlarının selüloz üretiminin

azalmasıyla ilişkili olabilir. *E. coli*'de selüloz, hem biyotik hem de abiyotik yüzeylere bağlanma ile ilişkilidir (Rowe ve ark., 2010). *E. coli*'nin demir açlığı biyofilm oluşum aşamasında bağlanmaya yardımcı olacak özelliklerle selüloz matrisinin sentezini indüklemektedir (Rowe ve ark., 2010). Bir başka deyişle, yüksek demir konsantrasyonlarında selüloz üretimi azaltmakta ve dolayısıyla biyofilmler dağılmaya başlamaktadır.

Çalışmamız da *P. aeruginosa* SB1/2 suşlarında da yüksek demir konsantrasyonlarında biyofilm oluşumu azalmıştır. Önceki çalışmalar da birbirine tezat farklı bulgular elde edilmiştir. Demirin kısıtlı olduğu bir ortamda *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma yeteneğinin önemli ölçüde azaldığı ve biyofilm üretiminin demir ilavesinden sonra önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir, bu da demirin *P. aeruginosa* biyofilmlerin oluşumunda önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir (Wiens ve ark., 2014). Diğer taraftan, mevcut çalışmamıza benzer şekilde bir başka çalışma da ise; yüksek demir konsantrasyonlarının biyofilm oluşum sürecini güçlü bir şekilde azalttığı, önceden oluşturulmuş biyofilmlerin bozduğu ve 250 μM demir konsantrasyonda 48 saatte biyofilmler neredeyse tamamen yok edildiği gözlenmiştir (Musk ve ark., 2005). Musk ve arkadaşları, yüksek demir konsantrasyonlarının *P. aeruginosa*'da biyofilm üretimi baskılamasını; konak hücreden demir alınımını ve quorum algılama için gerekli olan belirli genlerin ekspresyonunu baskıladığı düşüncesine varmışlardır. İlaveten, düşük demir konsantrasyonlu (5μM $FeCl_3$) ortamlarda biyofilmlerin önemli bir yapısal bileşeni olan ölü *P. aeruginosa* hücrelerinden DNA salınımını artarken, yüksek konsantrasyonda demir ilavesi, DNA salınımını baskılayarak biyofilm oluşumunu engellemektedir (Yang ve ark., 2007). Çalışmamız da, yüksek demir konsantrasyonunda *P. aeruginosa*'nın büyüme hızını artırmasına rağmen (Çizelge 4.3), biyofilm üretiminde azalmalar meydana gelmesi önce ki çalışmaları destekler niteliktedir. Bu mikroorganizma da biyofilm üretiminin artması ya da azalması büyüme miktarından ziyade başka faktörlere bağlı olarak düzenlenmektedir.

Demir, çeşitli bakteri türleri için gerekli olan temel bir metaldir (Chandrangsu ve ark., 2017). Konak hücrelerden demir alınması, enfeksiyonun önemli bir parçasıdır ve bu nedenle patojenik bakteriler yüksek afiniteli demir edinme mekanizmaları geliştirmiştir (Fischbach ve ark., 2006). Demir, bakteriyel büyüme için temel bir

besindir ve bakteriyel enerji üretimi, nükleotid sentezi ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi için çok önemlidir (Lin ve ark., 2012). Düşük demir konsantrasyonlu ortamlarda biyofilm oluşturan patojenik *E. coli* suşları, konak hücreden demir sağlayacak mekanizmalar geliştirerek, enfeksiyon başlangıcında biyofilm büyüme modundan planktonik moda geçerek konak canlı hücrelere bağlanarak virülanslarını artırabileceğini düşünmekteyiz. Biyofilmler, insan vücudundaki çoğu bakteriyel enfeksiyonda önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle, *Pseudomonas aeruginosa*, kistik fibrozis hastalarında immün savunmalardan kaçınmak ve patogenezini uygulamak için biyofilmler kullanmaktadır (Musk ve ark., 2005).



Şekil 4.5. 37°C'de demirin ($FeCl_3$) biyofilm üzerine etkisi; Bonferroni *post hoc* test; ortalama ± standart hata; P<0.05. * İstatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir.

K. pneumoniae SB1, *E. faecalis* SB1 ve *S. aureus* SB1 suşlarının biyofilm üretimi ile demir konsantrasyonu arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur. R^2 değerleri sırasıyla 0.97, 0,78 ve 0.68'dir (Doğrusal regresyon analizi, P<0.05). Artan demir miktarı bu üç suşta biyofilm üretimini artırmıştır (Şekil 4.5). *K. pneumoniae* SB1'de 100 µM'da ki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Bonferroni *post hoc* test; P<0.05). Bu suşların büyüme hızları da artan demir miktarına bağlı olarak artışlar göstermiştir. (Çizelge 4.3). Biyofilm üretimi ile büyüme hızları arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur. *K. pneumoniae* SB1, *E. faecalis* ve *S. aureus* SB1 SB1'nın R^2 değerleri sırasıyla 0.95, 0.74 ve 0.89'dur (Doğrusal regresyon analizi, P<0.05). Biyofilm

oluşumunda ki artış, artan büyüme oranlarına bağlı olabilir. Benzer sonuçlar başka çalışmalarda da gözlenmiştir. Bir çalışma da, yüksek demir konsantrasyonlarında test edilen tüm *K. pneumoniae* klinik izolatlarının büyümelerinin ve biyofilm oluşumunun teşvik edildiği gözlenmiştir ve biyofilm oluşumunun *K. pneumoniae*'nin virülansını artırabileceği öne sürülmüştür (Chen ve ark., 2020).

S. aureus biyofilmlerin de ise; artan/azalan demir miktarlarında önceki çalışmalarda farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. *S. aureus* tarafından biyofilm oluşumu, farklı büyüme koşullarından etkilendiğini ve çeşitli faktörleri içerebileceği gösterilmiştir (Thompson ve ark., 2010). Bir çalışma da, *S. aureus* biyofilm üretimi, demir kısıtlı koşullarda indüklenirken ve ortama demir ilavesiyle üretim baskılanmıştır (Johnson ve ark., 2005). Diğer bir taraftan, çalışmamıza benzer şekilde, *S. aureus* patojeninde artan demir miktarı biyofilm üretimini artırdığı gözlenmiştir (Lin ve ark., 2012). Lin ve arkadaşları biyofilm oluşumunda gerekli olan bağlanma ve hücreler arası adezinde görev alan polisakkarit üretiminde demirin gerekli olduğunu göstermiştir. Demir, hücrelerin katı bir yüzeye kalıcı olarak bağlanmasına katıldığını desteklemektedir. Demirin biyofilm üretimini artırdığı ve arasında güçlü bir ilişki olduğu önemli bir insan patojeni olan *V. vulnificus* üzerine yapılan bir başka çalışmada açıkça gösterilmiştir (Çam a ve ark., 2020b). Bu çalışmada da, *V. vulnificus*'un biyofilm gelişiminin ilk basamaklarında bağlanma için gerekli olan yüzey uzantılarının ve ekzopolisakkarit miktar artışının demir tarafından kontrol edilebileceği öne sürülmüştür. Benzer yorumlar *P. aeruginosa*'nın artan demir miktarına bağlı olarak artan biyofilm üretiminde de yapılmıştır. Demirin yüzey hareketliliğini düzenler ve polisakkarit matrisini stabilize ederek *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu desteklediği rapor edilmiştir (Singh, 2004; Berlutti ve ark., 2005). *K. pneumoniae* SB1 ve *S. aureus* SB1 suşlarının artan demir miktarlarına bağlı biyofilm üretiminin artması, muhtemelen biyofilm oluşumunun en önemli aşaması olan bir yüzeye bağlanma da görev alan, yüzey uzantılarının ve ekzopolisakkarit miktarının demir iyonu tarafından artırmış olabileceğine atfedilebilir.

Çalışmamızda kullanılan *E. faecalis* SB1 suşu da artan demir miktarına bağlı olarak biyofilm üretiminde artışlar göstermiştir. Latorre ve arkadaşları da yüksek demir konsantrasyonlarda *E. faecalis* patojeninin fazla miktarda biyofilm oluşturduğunu rapor etmişlerdir (Latorre ve ark., 2018). Demir fazlalığı durumu

öncelikle bazal metabolizma ile ilgili genleri ve düzenleyicileri aktive eder ve böylece büyüme hızlarını artırmaktadır. Artan metabolizma hızı sonucunda, hızlı büyüyen mikroorganizmalar daha fazla biyofilm oluşturmuş olabilir. Ayrıca, *E. faecalis* patojeninin de demir metabolizması Fur (demir alım regülatörü) regulonu tarafından kontrol edilmektedir. Bu bakteri de Fur regulonunun karakterizasyonu, Fur proteinin, demir alım sistemlerinde yer alan genlerin ekspresyonunu düzenlediğini ve demir miktarının az olması durumunda yanıt vermek için yüksek düzeyde verimlilik ve özgüllük kazandırdığını göstermiştir (Latorre ve ark., 2018). Bu transkripsiyonel faktör, hücre içi demir konsantrasyonu eşik seviyelerini aştığında hedef genlerini baskılar (Fuangthong ve ark., 2003). Bu regulon aynı zamanda biyofilm miktarını da düzenlemektedir (Latorre ve ark., 2018).

4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nden elde edilen 8 patojenik klinik izolatlar maximum likelihood ve bayesian filogenetik analizler sonucunda, iki *Escherichia coli* SB1/SB2, bir *Klebsiella aerogenes* SB1, bir *Klebsiella pneumoniae* SB1, iki *Pseudomonas aeruginosa* SB1/SB2, bir *Enterococcus faecalis* SB1 ve bir *Staphylococcus aureus* SB1 olarak tanımlanmıştır.

İzolatların büyüme hızları 24 ve 37°C'de, farklı pH aralıklarında ve farklı demir (0, 5, 10, 30, 50 ve 100 μM $FeCl_3$) konsantrasyonlarında test edilmiştir. Bütün suşlar 37°C'de daha hızlı büyüme göstermişlerdir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Test edilen tüm izolatların büyüme hızları en fazla pH 7.5'te gözlenmiştir. Sadece *E. coli* SB1, *K. pneumoniae* SB1 ve *P. aeruginosa* SB1/SB2 suşlarında istatiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır. Çalışmamız da kullanılan bütün suşların büyüme hızları artan demir miktarına bağlı olarak artışlar göstermiştir. Doğrusal regresyon analizi sonucunda, *E. coli* SB2 suşunda orta düzeyde bir ilişki bulunurken, diğer bütün suşların büyüme hızları ile artan demir konsantrasyonu arasında istatiksel olarak anlamlı güçlü bir ilişki bulunmuştur.

Çalışmamızda kullandığımız 8 klinik izolatların, farklı iki sıcaklıkta (24 ve 37°C), farklı pH aralıklarında (pH 5.5, 7.5 ve 8.5) ve farklı demir (0, 5, 10, 30, 50 ve 100 μM $FeCl_3$) konsantrasyonlarında biyofilm oluşturma yetenekleri test edilmiştir. Büyüme hızları 37°C'de daha fazla olmasına rağmen, bütün suşlar 37°C'ye kıyasla 24°C'de daha fazla biyofilm oluşturmuştur. Tek Örneklem T-test analizi sonucunda, *K. pneumoniae* SB1 ve *P. aeruginosa* SB1 suşları hariç, diğer tüm suşların 24°C'de biyofilm oluşturması istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır.

37°C'de farklı pH değerlerinde biyofilm oluşumu test edilmesi sonucunda, *E. coli* SB1/SB2, *S. aureus* SB1 suşları büyüme hızları pH 7.5'e göre daha fazla olmasına rağmen, pH 5.5'de istatiksel olarak anlamlı daha fazla biyofilm üretmiştir. *K. aerogenes* SB1 ve *E. faecalis* SB1 suşlarında ise hafif asidik pH'a (pH 5.5) kıyasla

pH.7.5 ve 8.5'de daha fazla biyofilm üretimi gözlenmiştir. Fakat bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. pH 8.5'de en yüksek miktarda biyofilm üretimi *K. pneumoniae* SB1 ve *P. aeruginosa* SB1/SB2 suşlarında gözlenmiştir. Bu suşlarda da en yüksek büyüme pH 7.5'de gözlenmiştir. pH 8.5'de ki bu fark istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

37°C'de farklı demir konsantrasyonlarında biyofilm deneyi sonucunda, *E. coli* SB1/SB2, *K. aerogenes* SB1, *P. aeruginosa* SB1/SB2 suşlarında artan demir miktarına bağlı olarak biyofilm üretiminin azaldığı gözlenmiştir. 10 μM demir konsantrasyonuna kadar biyofilm üretimleri arasında kayda değer bir fark görülmemişken, 30 μM ve daha fazla demir III klorürün eklenmesi sonucunda biyofilm üretiminde büyük azalmalar meydana gelmiştir. Bu beş suşun aksine, doğrusal regresyon analizi 3 suşta (*K. pneumoniae* SB1, *E. faecalis* SB1 ve *S. aureus* SB1) biyofilm oluşumu ile demir miktarı arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. R^2 değerleri sırasıyla 0.97, 0,78 ve 0.68'dir. Bonferroni *post hoc* test, sadece *K. pneumoniae* SB1'de 100 μM'da ki biyofilm üretiminde ki artış istatistiksel olarak anlamlı göstermiştir. Bu üç suşta biyofilm üretimi ile büyüme hızları arasında da güçlü bir ilişki bulunmuştur. Sırasıyla R2 değerleri 0.95, 0.74 ve 0.89'dur.

5.2. Öneriler

Son yıllarda yapılan birçok çalışma da biyofilm üretimi patojenik bakterilerin virülanslarında artış meydana getirdiğini vurgulamaktadır. Çünkü biyofilm oluşturan mikroorganizmalar uygun olmayan koşullarda, antibiyotiklere, deterjanlara, konak immün sistemine karşı daha dayanıklı olmaktadır. Her mikroorganizmanın farklı koşullar altında biyofilm oluşturma yetenekleri değişkenlik göstermektedir. Hattan aynı türün farklı suşlarında bile farklılıklar gözlenmiştir. Bu nedenle hangi bakterinin hangi koşullar altında biyofilm oluşturmaya meyilli olduğunu araştırmak ve konak canlı da biyofilm oluşturmaması için alınacak önlemlere katkıda sağlamak için önem arz etmektedir. Çalışmamızda test edilen tüm suşlar düşük sıcaklıkta daha fazla biyofilm oluşturmuş olsa bile, insan vücut sıcaklığında da önemli derecede biyofilm oluşturmuştur. Bu nedenle pH ve demir deneyleri insan vücut koşullarını sağlayabilmek için 37°C'de gerçekleştirilmiştir. *E. coli* SB1/SB2 ve *S. aureus* SB1

suşları asidik ortamda daha fazla biyofilm oluşturma eğilimindedir. Bu nedenle bu türler gastrointestinal sistemde midenin asidik ortamında biyofilm oluşturarak konak organizma da hastalık yapabilme yeteneklerini artırabilirler. Biyofilm içinde ki mikroorganizmalar konak immün sisteme ve midenin asidik ortamından rahatça korunabilirler. *K. pneumoniae* SB1 ve *P. aeruginosa* SB1/SB2 suşları ise daha alkali ortamda biyofilm üretebilme yetenekleri artmıştır. Bu nedenle, gastrointestinal sistemde incebağırsağın alkali ortamlarına yerleşip, biyofilm oluşturarak hayatta kalma becerilerini artırarak patojenitelerini artabilirler. Benzer etkiler ürogenital sistemde ya da insan vücudunun diğer bölgelerinde de gözlemlenebilir. *P. aeruginosa* bakterisi kistik fibrozis hastalarında akciğerlerde kronik rahatsızlıklara yol açabilmektedir. Bu nedenle, bu test edilen patojenik bakterilerle mücadele edebilmek için biyofilm oluşturma aşamaları göz önünde bulundurulmalı ve buna göre hastalıklarla mücadele edilmelidir.

Sağlıklı bir insan kanında demir konsantrasyonu çok küçük miktarlardadır. Fakat hemokromatozis gibi hastalıklarda kanda ki demir miktarı artmakta ve bu da patojenlerin büyüme kinetiklerini ve virülanslarını artırmaktadır. Çalışmamız da kullandığımız *K. pneumoniae* SB1, *E. faecalis* SB1 ve *S. aureus* SB1 suşları demir konsantrasyonu artıkça biyofilm oluşturma yetenekleri artmıştır. Bu patojenler, kanda ki demir miktarı artırılmış hastalarda daha fazla biyofilm oluşturarak konak immün sisteminden kaçabilme olasılıkları yüksektir. *E. coli* SB1/SB2, *K. aerogenes* SB1, *P. aeruginosa* SB1/SB2 suşlarında artan demir miktarına bağlı olarak biyofilm üretiminin azaldığı gözlenmiştir. Bu suşlar ise, çevresel ortamlarda biyofilmler oluşturarak konak canlıya biyofilm modunda geçebilirler. Vücutta gereğinden fazla demir biriken hastalar da, yüksek demir konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında biyofilm büyüme formundan, planktonik moda geçerek konak hücrelere saldırabilirler. Konak canlı da biyofilmin sağlam güçlü ekzopolisakkariti sayesinde, olumsuz koşullarda hayatta kalarak ve sayıca belirli bir seviyeye ulaştıklarında virülansları artmış olacaktır. Bilim insanları mikroorganizmaların canlı organizmalarda da biyofilmler oluşturduklarını saptamışlardır. Bizim deneyimiz de bu bakterilerin cansız yüzeylerde biyofilm oluşturdukları test edildi. Canlı organizmalarda da test edilip daha doğru sonuçlara ulaşılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

AGEORGES, V., MONTEIRO, R., LEROY, S., BURGESS, C.M., PIZZA, M., CHAUCHEYRAS-DURAND, F., and DESVAUX, M, 2020. Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic Escherichia coli (DEC): from bacterial adhesion to biofilm formation. Fems Microbiology Reviews *44*, 314-350.

ALLESEN-HOLM, M., BARKEN, K.B., YANG, L., KLAUSEN, M., Webb, J.S., KJELLEBERG, S., MOLIN, S., GIVSKOV, M., and TOLKER-NIELSEN, T, 2006. A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. Molecular Microbiology *59*, 1114-1128.

BERKTAŞ, M., ÇIKMAN, A., PARLAK, M., YAMAN, G., and GÜDÜCÜOĞLU, H, 2011. Nozokomiyal Kökenli Pseudomonas Aeruginosa İzolatlarında Antibiyotiklere Direnç, vol. 18: Van Tıp Dergisi, 192-196.

BERLUTTI, F., AJELLO, M., BOSSO, P., MOREA, C., PETRUCCA, A., ANTONINI, G., and VALENTI, P, 2004. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in Streptococcus mutans.

BERLUTTI, F., MOREA, C., BATTISTONI, A., SARLI, S., CIPRIANI, P., SUPERTI, F., AMMENDOLIA, M.G., and VALENTI, P, 2005. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cenocepacia. International Journal of Immunopathology and Pharmacology *18*, 661-670.

BOCKELMANN, 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*, 31-38.

BRINDHADEVI, K., LEWISOSCAR, F., MYLONAKIS, E., SHANMUGAM, S., VERMA, T.N., and PUGAZHENDHI, A, 2020. Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in Pseudomonas aeruginosa. Process Biochemistry *96*, 49-57.

CARPENTIER, B., and CERF, O, 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. Journal of Applied Bacteriology *75*, 499-511.

CHANDRANGSU, P., RENSING, C., and HELMANN, J.D, 2017. Metal homeostasis and resistance in bacteria. Nature Reviews Microbiology *15*, 338-350.

CHEN, T., DONG, G.F., ZHANG, S.Q., ZHANG, X.C., ZHAO, Y.J., CAO, J.M., ZHOU, T.L., and WU, Q, 2020. Effects of iron on the growth, biofilm formation and virulence of Klebsiella pneumoniae causing liver abscess. Bmc Microbiology *20*.

COLVIN, K.M., IRIE, Y., TART, C.S., URBANO, R., WHITNEY, J.C., RYDER, C., HOWELL, P.L., WOZNIAK, D.J., and PARSEK, M.R, 2012. The Pel and Psl polysaccharides provide Pseudomonas aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix. Environmental Microbiology *14*, 1913-1928.

CONRAD, A., KONTRO, M., KEINANEN, M.M., CADORET, A., FAURE, P., MANSUY-HUAULT, L., and BLOCK, J.C, 2003. Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. Lipids *38*, 1093-1105.

Costerton, J.W, 1999. Introduction to biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents *11*, 217-221.

ÇAM, S., and BRINKMEYER, R, 2020a. Differential expression of vvhA and CPS operon allele 1 genes in Vibrio vulnificus under biofilm and planktonic conditions. Antonie van Leeuwenhoek *113*, 1437-1446.

ÇAM, S., and BRINKMEYER, R, 2020b. The effects of temperature, pH, and iron on biofilm formation by clinical versus environmental strains of Vibrio vulnificus. Folia Microbiologica *65*, 557-566.

ÇAM, S., BRINKMEYER, R., and SCHWARZ, J.R, 2019. Quantitative PCR enumeration of vcgC and 16S rRNA type A and B genes as virulence indicators for environmental and clinical strains of Vibrio vulnificus in Galveston Bay oysters. Canadian Journal of Microbiology *65*, 613-621.

DA SILVA, D.P., SCHOFIELD, M.C., PARSEK, M.R., and TSENG, B.S, 2017. An Update on the Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development. Pathogens *6*.

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*, 3593-3596.

DAVIES, D.G., PARSEK, M.R., PEARSON, J.P., IGLEWSKI, B.H., COSTERTON, J.W., and GREENBERG, E.P, 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science *280*, 295-298.

DI BONAVENTURA, G., STEPANOVIĆ, S., PICCIANI, C., POMPILIO, A., and PICCOLOMINI, R, 2007. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinicalStenotrophomonas maltophilia isolates. Folia Microbiologica *52*, 86.

DONLAN, R.M, 2001. Biofilms and device-associated infections. Emerging Infectious Diseases *7*, 277-281.

DUNNE, W.M, 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? Clinical Microbiology Reviews *15*, 155-166.

EL SOLH, A.A., and ALHAJHUSAIN, A, 2009. Update on the treatment of Pseudomonas aeruginosa pneumonia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy *64*, 229-238.

FISCHBACH, M.A., LIN, H.N., LIU, D.R., and WALSH, C.T, 2006. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. Nature Chemical Biology *2*, 132-138.

FISHER, K., and PHILLIPS, C, 2009. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology-Sgm *155*, 1749-1757.

FITZPATRICK, F., HUMPHREYS, H., SMYTH, E., KENNEDY, C.A., and O'GARA, J.P, 2002. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of Staphylococcus epidermidis. Journal of Hospital Infection *52*, 212-218.

FLEMMING, H.-C., and WINGENDER, J, 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology *8*, 623-633.

FROLUND, B., PALMGREN, R., KEIDING, K., and NIELSEN, P.H, 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. Water Research *30*, 1749-1758.

FRØLUND, B., PALMGREN, R., KEIDING, K., and NIELSEN, P.H, 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. Water Research *30*, 1749-1758.

FUANGTHONG, M., and HELMANN, J.D, 2003. Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in Bacillus subtilis. Journal of Bacteriology *185*, 6348-6357.

GARCIA-SOLACHE, M., and RICE, L.B, 2019. The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. Clinical Microbiology Reviews *32*.

GHAFOOR, A., HAY, I.D., and REHM, B.H.A, 2011. Role of Exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Architecture. Applied and Environmental Microbiology *77*, 5238-5246.

GIL-PEROTIN, S., RAMIREZ, P., MARTI, V., SAHUQUILLO, J.M., GONZALEZ, E., CALLEJA, I., MENENDEZ, R., and BONASTRE, J, 2012. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. Critical Care *16*.

GRAU, B.L., HENK, M.C., and PETTIS, G.S, 2005. High-Frequency Phase Variation of Vibrio vulnificus 1003: Isolation and Characterization of a Rugose Phenotypic Variant. Journal of Bacteriology *187*, 2519-2525.

HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J.W., and STOODLEY, P, 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology *2*, 95.

HAMADI, F., LATRACHE, H., MABRROUKI, M., ELGHMARI, A., OUTZOURHIT, A., ELLOUALI, M., and CHTAINI, A, 2005. Effect of pH on distribution and adhesion of Staphylococcus aureus to glass. Journal of Adhesion Science and Technology *19*, 73-85.

HEYDE, M., and PORTALIER, R, 1987. REGULATION OF MAJOR OUTER-MEMBRANE PORIN PROTEINS OF ESCHERICHIA-COLI K-12 BY PH. Molecular & General Genetics *208*, 511-517.

HINDRÉ, T., BRÜGGEMANN, H., BUCHRIESER, C., and HÉCHARD, Y, 2008. Transcriptional profiling of Legionella pneumophila biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation *154*, 30-41.

HOŠTACKÁ, A., ČIŽNÁR, I., and ŠTEFKOVIČOVÁ, M, 2010. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. Folia Microbiologica *55*, 75-78.

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*, 470-476.

J W Costerton, Z Lewandowski, D E Caldwell, D R Korber, a., and Lappin-Scott, H.M, 1995. Microbial Biofilms. Annual Review of Microbiology *49*, 711-745.

JAHN, A., GRIEBE, T., and NIELSEN, P.H, 1999. Composition of Pseudomonas putida biofilms: Accumulation of protein in the biofilm matrix. Biofouling *14*, 49-57.

JAMAL, M., AHMAD, W., ANDLEEB, S., JALIL, F., IMRAN, M., NAWAZ, M.A., HUSSAIN, T., ALI, M., RAFIQ, M., and KAMIL, M.A, 2018. Bacterial biofilm and associated infections. Journal of the Chinese Medical Association *81*, 7-11.

JEFFERSON, K.K, 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiology Letters *236*, 163-173.

JOHNSON, M., COCKAYNE, A., WILLIAMS, P.H., and MORRISSEY, J.A, 2005. Iron-responsive regulation of biofilm formation in Staphylococcus aureus involves fur-dependent and fur-independent mechanisms. Journal of Bacteriology *187*, 8211-8215.

JONES, M.K., and OLIVER, J.D, 2009. Vibrio vulnificus: Disease and Pathogenesis. Infection and Immunity *77*, 1723-1733.

JOO, H.-S., and OTTO, M, 2012. Molecular Basis of In Vivo Biofilm Formation by Bacterial Pathogens. Chemistry & Biology *19*, 1503-1513.

KIM, S., LI, X.H., HWANG, H.J., and LEE, J.H, 2020. Thermoregulation of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation. Applied and Environmental Microbiology *86*.

KUMAR, S., STECHER, G., Li, M., KNYAZ, C., and TAMURA, K, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol Biol Evol *35*, 1547-1549.

KÖSE, Ş., ATALAY, S., ÖDEMİŞ, İ., ve ADAR, P, 2014. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas Aeruginosa* Suşlarinin Antibiyotik Duyarliliklari, Vol. 28: Ankem Derg, 100-104.

LATORRE, M., QUENTI, D., TRAVISANY, D., SINGH, K.V., MURRAY, B.E., MAASS, A., and CAMBIAZO, V, 2018. The Role of Fur in the Transcriptional and Iron Homeostatic Response of Enterococcus faecalis. Frontiers in Microbiology *9*.

LEE, W.H., CHOI, H.I., HONG, S.W., KIM, K.S., GHO, Y.S., and JEON, S.G, 2015. Vaccination with Klebsiella pneumoniae-derived extracellular vesicles protects against bacteria-induced lethality via both humoral and cellular immunity. Experimental and Molecular Medicine *47*.

LEWIS, K, 2001. Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy *45*, 999-1007.

LIN, M.-H., SHU, J.-C., HUANG, H.-Y., and CHENG, Y.C, 2012. Involvement of Iron in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. PLOS ONE *7*, e34388.

LONI, T., and H., Y.F, 2015. Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in Vibrio cholerae. Environmental Microbiology *17*, 4290-4305.

M.A, H., and P.A, W, 1997. Attachment of Vibrio cholerae under various environmental conditions and to selected substrates. FEMS Microbiology Ecology *22*, 215-223.

MA, L.M., CONOVER, M., LU, H.P., PARSEK, M.R., BAYLES, K., and WOZNIAK, D.J, 2009. Assembly and Development of the Pseudomonas aeruginosa Biofilm Matrix. Plos Pathogens *5*.

MARVIG, R.L., SOMMER, L.M., MOLIN, S., and JOHANSEN, H.K, 2015. Convergent evolution and adaptation of Pseudomonas aeruginosa within patients with cystic fibrosis. Nature Genetics *47*, 57-+.

MATHLOUTHI, A., PENNACCHIETTI, E., and DE BIASE, D, 2018. Effect of Temperature, pH and Plasmids on In Vitro Biofilm Formation in Escherichia coli. , vol. 10(4): *Acta naturae*, 129–132.

MATSUYAMA, T., and NAKAGAWA, Y, 1996. Surface-active exolipids: Analysis of absolute chemical structures and biological functions. Journal of Microbiological Methods *25*, 165-175.

MOLIN, S., and TOLKER-NIELSEN, T, 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Current Opinion in Biotechnology *14*, 255-261.

MOORMEIER, D.E., and BAYLES, K.W, 2017. Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. Molecular Microbiology *104*, 365-376.

MUSK, D.J., BANKO, D.A., and HERGENROTHER, P.J, 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of Pseudomonas aeruginosa. Chemistry & Biology *12*, 789-796.

NG, W.L., and BASSLER, B.L, 2009. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. Annual Review of Genetics *43*, 197-222.

NISBET, B.A., SUTHERLAND, I.W., BRADSHAW, I.J., KERR, M., MORRIS, E.R., and SHEPPERSON, W.A, 1984. XM-6 - A NEW GEL-FORMING BACTERIAL POLYSACCHARIDE. Carbohydrate Polymers *4*, 377-394.

O'TOOLE, G., KAPLAN, H.B., and KOLTER, R, 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual Review of Microbiology *54*, 49-79.

O'TOOLE, G.A. (2003). To build a biofilm. Journal of Bacteriology *185*, 2687-2689.

STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D.G, and COSTERTON, J.W, 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. Annual Review of Microbiology *56*, 187-209.

PERCIVAL, S.L., and KITE, P, 2007. Intravascular catheters and biofilm control. Journal of Vascular Access *8*, 69-80.

PEREIRA, C.S., THOMPSON, J.A., and XAVIER, K.B, 2013. AI-2-mediated signalling in bacteria. Fems Microbiology Reviews *37*, 156-181.

REISNER, A., KROGFELT, K.A., KLEIN, B.M., ZECHNER, E.L., and MOLIN, S, 2006. In vitro Biofilm formation of commensal and pathogenic Escherichia coli strains: Impact of environmental and genetic factors. Journal of Bacteriology *188*, 3572-3581.

RONQUIST, F., and HUELSENBECK, J.P, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics *19*, 1572-1574.

ROWE, M.C., WITHERS, H.L., and SWIFT, S, 2010. Uropathogenic Escherichia coli forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. Fems Microbiology Letters *307*, 102-109.

RUSSELL, J.B., DIEZ-GONZALEZ, F., and JARVIS, G.N, 2000. Invited review: Effects of diet shifts on Escherichia coli in cattle. Journal of Dairy Science *83*, 863-873.

RYDER, C., BYRD, M., and WOZNIAK, D.J, 2007. Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Current Opinion in Microbiology *10*, 644-648.

SAHLY, H., PODSCHUN, R., and ULLMANN, U, 2000. Klebsiella infections in the immunocompromised host. Biology and Pathology of Innate Immunity Mechanisms *479*, 237-249.

SANCHEZ, C.J., MENDE, K., BECKIUS, M.L., AKERS, K.S., ROMANO, D.R., WENKE, J.C., and MURRAY, C.K, 2013. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infectious Diseases *13*, 47.

SAND, W., and GEHRKE, T, 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. Research in Microbiology *157*, 49-56.

SATPATHY, S., SEN, S.K., PATTANAIK, S., and RAUT, S, 2016. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology *7*, 56-66.

SAUER, K., CAMPER, A.K., EHRLICH, G.D., COSTERTON, J.W., and DAVIES, D.G, 2002. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. Journal of Bacteriology *184*, 1140-1154.

SAXENA, P., JOSHI, Y., RAWAT, K., and BISHT, R, 2019. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. Indian Journal of Microbiology *59*, 3-12.

SCHULTZE, L.B., MALDONADO, A., LUSSI, A., SCULEAN, A., and EICK, S, 2021. The Impact of the pH Value on Biofilm Formation, vol. 29: Monogr Oral Sci. Basel, Karger,, 19-29.

SEIFI, K., KAZEMIAN, H., HEIDARI, H., REZAGHOLIZADEH, F., SAEE, Y., SHIRVANI, F., and HOURI, H, 2016. Evaluation of Biofilm Formation Among Klebsiella pneumoniae Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. Jundishapur Journal of Microbiology *9*.

SIMM, R., MORR, M., KADER, A., NIMTZ, M., and ROMLING, U, 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. Molecular Microbiology *53*, 1123-1134.

SINGH, P.K, 2004. Iron sequestration by human lactoferrin stimulates P-aeruginosa surface motility and blocks biofilm formation. Biometals *17*, 267-270.

STEPANOVIĆ, S., ĆIRKOVIĆ, I., MIJAČ, V., and ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M, 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by Salmonella spp. Food Microbiology *20*, 339-343.

SUTHERLAND, I.W, 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in Microbiology *9*, 222-227.

T., H.D., JUN, Z., DEREK, S., and J., M.J, 2006. Bile acids stimulate biofilm formation in Vibrio cholerae. Molecular Microbiology *59*, 193-201.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., and KUMAR, S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution *30*, 2725-2729.

THOMPSON, K.M., ABRAHAM, N., and JEFFERSON, K.K, 2010. Staphylococcus aureus extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. Fems Microbiology Letters *305*, 143-147.

TOWNSLEY, L., and YILDIZ, F.H, 2015. Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in Vibrio cholerae. Environmental microbiology *17*, 4290-4305.

VALENTINI, M., and FILLOUX, A, 2016. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from Pseudomonas aeruginosa and Other Bacteria. J Biol Chem *291*, 12547-12555.

VELMOUROUGANE, K., PRASANNA, R., and SAXENA, A.K, 2017. Agriculturally important microbial biofilms: Present status and future prospects. J Basic Microbiol *57*, 548-573.

VESTBY, L.K., GRONSETH, T., SIMM, R., and NESSE, L.L, 2020. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. Antibiotics-Basel *9*.

VUOTTO, C., LONGO, F., BALICE, M.P., DONELLI, G., and VARALDO, P.E, 2014. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens *3*, 743-758.

WATNICK, P., and KOLTER, R, 2000. Biofilm, city of microbes. Journal of Bacteriology *182*, 2675-2679.

WATNICK, P.I., and KOLTER, R, 1999. Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm. Molecular Microbiology *34*, 586-595.

WEISBURG, W.G., BARNS, S.M., PELLETIER, D.A., and LANE, D.J, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology *173*, 697-703.

WHITE-ZIEGLER, C.A., UM, S., PREZ, N.M., BERNS, A.L., MALHOWSKI, A.J., and YOUNG, S, 2008. Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in Escherichia coli K-12. Microbiology-Sgm *154*, 148-166.

WIENS, J.R., VASIL, A.I., SCHURR, M.J., and VASIL, M.L, 2014. Iron-Regulated Expression of Alginate Production, Mucoid Phenotype, and Biofilm Formation by Pseudomonas aeruginosa. Mbio *5*.

WINGENDER, J., STRATHMANN, M., RODE, A., LEIS, A., and FLEMMING, H.C, 2001. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from Pseudomonas aeruginosa. Microbial Growth in Biofilms, Pt a: Developmental and Molecular Biological Aspects *336*, 302-314.

WU, Y., and OUTTEN, F.W, 2009. IscR Controls Iron-Dependent Biofilm Formation in Escherichia coli by Regulating Type I Fimbria Expression. Journal of Bacteriology *191*, 1248-1257.

YANG, L., BARKEN, K.B., SKINDERSOE, M.E., CHRISTENSEN, A.B., GIVSKOV, M., and TOLKER-NIELSEN, T, 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by Pseudomonas aeruginosa. Microbiology *153*, 1318-1328.

YÜKSEKDAĞ, Z.N., and BALTACI, N, 2013. *Staphylococcus aureus* Türlerinde Biyofilm ve Biyofilm Oluşumundan Sorumlu Genler, vol. 43: Türk Mikrobiyol Cem Derg, 77-83.

ZHANG, X.Q., BISHOP, P.L., and KUPFERLE, M.J, 1998. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. Water Science and Technology *37*, 345-348.

ZMANTAR, T., KOUIDHI, B., MILADI, H., MANDOUANI, K., and BAKHROUF, A, 2010. A Microtiter plate assay for Staphylococcus aureus biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. New Microbiologica *33*, 137-145.