

**T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BAKTERİYEL BALIK PATOJENLERİNDE BİYOFİLM
OLUŞUMUNA FARKLI MADDELERİN *İN VİTRO* ETKİSİNİN
TESPİTİ**

Fethi FİLİK

**Danışman
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2019**




© 2019 [Fethi FİLİK]

TEZ ONAYI

Fethi FİLİK tarafından hazırlanan "**Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerinde Biyofilm Oluşumuna Farklı Maddelerin In Vitro Etkisinin Tespiti**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

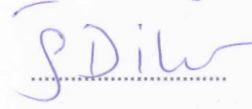
Danışman

Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



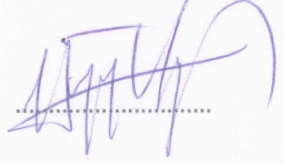
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Öznur DİLER
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hijran YAVUZCAN
Ankara Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yusuf UÇAR

.....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Fethi FİLİK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Biyofilm.....	5
2.2. Adezyon	10
2.2.1. Primer adezyon.....	11
2.2.2. Sekonder adezyon	11
2.3. Ekstraselüler Polimerik Substant (EPS)'in Genel Özellikleri	12
2.4. Biyofilmde Bakteriler Arası Haberleşme: "Quorum Sensing"	13
2.5. Biyofilmlerle İlgili Balık Enfeksiyonları	14
2.6. Biyofilm İnhibisyonu	15
2.6.1. Biyofilm inhibisyonunda kullanılan bazı maddeler.....	15
2.6.1.1. Lizozim.....	16
2.6.1.2. Malik asit	16
2.6.1.3. Sarımsak yağı.....	17
2.6.1.4. Kekik yağı.....	18
2.7. Farklı Yüzeylerde Biyofilm Oluşumu	20
2.8. Balık Patojenleri	22
2.8.1. <i>Staphylococcus warneri</i>	22
2.8.1.1. <i>S. warneri</i> 'de biyofilm üretimi.....	23
2.8.2. <i>Aeromonas sobria</i>	24
2.8.2.1. <i>A. sobria</i> 'da biyofilm üretimi.....	25
2.8.3. <i>Yersinia ruckeri</i>	25
2.8.3.1. <i>Y. ruckeri</i> 'de biyofilm üretimi	27
2.8.4. <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	27
2.8.4.1. <i>F. psychrophilum</i> 'da biyofilm üretimi.....	30

2.8.5. <i>Vibrio anguillarum</i> (<i>Listonella anguillarum</i>)	30
2.8.5.1. <i>V. anguillarum</i> 'da biyofilm üretimi	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM	33
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Bakteriyel suşlar (<i>S. warneri</i> , <i>A. sobria</i> , <i>Y. ruckeri</i> , <i>F. psychrophilum</i> , <i>V. anguillarum</i> suşlarının üretim ve depolanması)	33
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	33
3.1.3. Besiyeri ve çözeltiler.....	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Adezyon testi	34
3.2.2. Patojenlerin biyofilm testi	34
3.2.2.1. Tüp yöntemi	34
3.2.2.2. Mikroplak yöntemi	35
3.2.2.3. Kongo red agar yöntemi	35
3.2.3. Lizozim, malik asit, sarımsak yağı, kekik yağı maddeleriyle biyofilm inhibisyon testi	36
3.2.4. Balık patojenlerinin ahşap, çelik, fiberglas, cam üzerinde biyofilm oluşturması	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	38
4.1. Balık Patojenleri <i>S. warneri</i> , <i>A. sobria</i> , <i>Y. ruckeri</i> , <i>F. psychrophilum</i> , <i>V.</i> <i>anguillarum</i> 'un Koloni Morfolojileri	38
4.2. Adezyon Testi Bulguları	40
4.3. Biyofilm Testleri Bulguları	41
4.3.1. Tüp yöntemi bulguları	41
4.3.2. Mikroplak yöntemi bulguları.....	43
4.3.3. Kongo red agar yöntemi bulguları	45
4.4. Lizozim, Malik Asit, Sarımsak Yağı, Kekik Yağı Maddeleriyle Biyofilm İnhibisyon Testi Bulguları	49
4.5. Balık Patojenlerinin Ahşap, Çelik, Fiberglas, Cam Üzerinde Biyofilm Bulguları	51
5. TARIŞMA VE SONUÇ	57
6. KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ.....	86

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerinde Biyofilm Oluşumuna Farklı Maddelerin *In Vitro* Etkisinin Tespiti

Fethi FİLİK

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Bu çalışmada, bakteriyel balık patojenlerinden *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio anguillarum*'da adezyon oluşumu ve biyofilm oluşumu incelenmiştir. Ayrıca bu suşlar ile lizozim, malik asit, sarımsak yağı, kekik yağıyla biyofilm inhibisyon testleri ve ahşap, metal, fiberglas, cam gibi farklı materyallerde biyofilm oluşumları araştırılmıştır.

Adezyon testinde plaklarda oluşan bir saatlik tutunma incelendiğinde negatif kontrolde 0,036 iken *V. anguillarum*'da 0,044, *A. sobria*'da 0,056, *S. warneri*'de 0,040, *Y. ruckeri*'de 0,050, *F. psychrophilum*'da 0,059 absorbans değerleriyle adezyon oluşturduğu bulunmuştur. Adezyon gücü *F. psychrophilum*'da diğer patojenlere oranla çok daha güçlü olduğu saptanmıştır. Adezyon testinde absorbans değerlerine göre yüzeye yapışma gücü sırayla *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum*, *S. warneri* olarak belirlenmiştir.

Biyofilm tespiti için kullanılan tüp yönteminde *F. psychrophilum*'da (++), *A. sobria*'da (++), *S. warneri*'de (+), *Y. ruckeri*'de (-), *V. anguillarum*'da (-) olarak tespit edilmiştir. Tüp testinde tüpün iç yüzeyinde oluşan film tabakasının kalınlığına göre sırayla *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* olarak belirlenmiştir. En güçlü biyofilm oluşumu *F. psychrophilum* ve *A. sobria*'da görülmüştür. Mikroplaklarla yapılan biyofilm testinde plaklarda oluşan biyofilm negatif kontrolde 0,048, *S. warneri*'de 0,121, *A. sobria*'da 0,158, *Y. ruckeri*'de 0,071, *F. psychrophilum*'da 0,172, *V. anguillarum*'da 0,212 absorbans değeri tespit edilmiştir. Mikroplak testinde biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Mikroplak yönteminde en güçlü biyofilm oluşumu *V. anguillarum*'da bulunmuştur.

Kongo red agar testinde biyofilm (slime) oluşturan bakterilerin koloni morfolojisinin renk değiştirmesine göre biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Kongo red agarda kuru kristalize siyah koloni üreterek en güçlü biyofilm oluşumu *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*'de bulunmuştur. Pembe renkli koloni üreten *F. psychrophilum* ve *Y. ruckeri* bakterileri ise bu teste biyofilm oluşumu göstermemiştir.

Mikroplak testindeki biyofilm oluşumu pozitif kontrol olarak değerlendirildiğinde lizozim, malik asit, sarımsak yağı, kekik yağı maddelerinin *in vitro* antibiyofilm etkisi araştırıldığında bu maddelerin çok etkili bir biyofilm inhibisyon maddesi olduğu tespit edilmiştir.

Ahşap, metal, fiberglas, cam gibi malzemelerde biyofilm oluşumu ile yapılan testlerde patojenlerin tamamının yetiştiricilik tesislerinde birçok alanda kullanılan bu materyallerde biyofilm oluşturduğu kanıtlanmıştır. Genel olarak cam, fiberglas, elik ve ahşap yüzeylerde biyofilm oluşum gücü sırayla *S. warneri*, *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak; *S. warneri*, *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri*'nin farklı materyallerin yüzeylerinde biyofilm oluşturdukları ve lizozim, malik asit, sarımsak yağı, kekik yağı maddelerinin antibiyofilm maddesi oldukları tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio anguillarum*, adezyon, biyofilm, biyofilm inhibisyonu, farklı yüzeyler

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

Determination of *In Vitro* Effect of Different Substances to Biofilm Formation in Some Bacterial Fish Pathogens

Fethi FİLİK

Isparta University of Applied Sciences
Graduate Education Institute
Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

In this study, adhesion formation and biofilm formation in bacterial fish pathogens *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio anguillarum* were investigated. In addition to these strains, biofilm formation was investigated with lysozyme, malic acid, garlic oil, thyme oil on biofilm inhibition tests and different materials such as wood, metal, fiberglass and glass.

In the adhesion test, when the one-hour attachment was 0.036 in the negative control, 0.044 in the *V. anguillarum*, 0.056 in the *A. sobria*, 0.040 in the *S. warneri*, 0.050 in the *Y. ruckeri*, and 0.059 in the *F. psychrophilum* formed the adhesion with the absorbance values. Adhesion strength *F. psychrophilum* was found to be much stronger than other pathogens. Adhesion test according to the absorbance values on the surface strength of the adhesion *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum*, *S. warneri* was determined, respectively.

In the tube method used for biofilm formation detection as *F. psychrophilum* (++) , *A. sobria* (++) , *S. warneri* (+) , *Y. ruckeri* (-) , *V. anguillarum* (-). In the tube test, *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* were determined according to the thickness of the film layer formed on the inner surface of the tube. The most potent biofilm formation was observed in *F. psychrophilum* and *A. sobria*. In biofilm test with microplates, the biofilm absorbance values were determined as 0.048 in the negative control, 0,121 in *S. warneri*, 0,158 in *A. sobria*, 0,071 in *Y. ruckeri*, 0,172 in *F. psychrophilum* and 0,212 in *V. anguillarum*. Biofilm formation in the microplate test was determined as *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri*, respectively. The most powerful biofilm formation in microplate method was found in *V. anguillarum*.

The biofilm formation in Congo red agar test was determined as *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* according to the color change of colony morphology of bacteria produced biofilm. The most powerful biofilm (slime) formation was found in *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri* by producing dry crystalline black colony in Congo red agar. The pink colony-producing *F. psychrophilum* and *Y. ruckeri* bacteria did not show biofilm formation in this test.

When the biofilm formation in microplate test was evaluated as positive control, it was determined that lysozyme, malic acid, garlic oil, thyme oil were a very effective biofilm inhibition agents when the *in vitro* antibiofilm effect of these substances were investigated.

In the tests conducted with biofilm formation in materials such as wood, metal, fiberglass, glass of all the pathogens have been proven to form biofilm in these materials which are used in many areas in aquaculture facilities. Generally, the biofilm formation power on glass, fiberglass, metal and wood surfaces was determined as *S. warneri*, *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* respectively.

As a result; *S. warneri*, *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri*'s biofilms formation on the surface of different materials and lysozyme, malic acid, garlic oil, oregano oil substances were found to be the agent of antibiofilm.

Keywords: *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio anguillarum*, adhesion, biofilm, biofilm inhibition, different surfaces

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim esnasında bilimsel katkılarıyla bana destek olan, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, bilgilerine, öngörüsüne, yerinde tespitlerine, tecrübelerine, değerli görüşlerine her zaman saygı duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve özveriden dolayı Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez araştırma çalışmalarım sırasında ve öğrenimim süresince bilgi ve görüşleri ile beni aydınlatan, bana yol göstererek destek olan tüm Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi'nin değerli öğretim üyelerine ve idari personeline çok teşekkür ederim.

5092-YL1-17 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Hayatım boyunca ve eğitimimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan değerli eşime, dünyalar tatlısı kızıma ve aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Fethi FİLİK
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Biyofilm oluşumunun aşamaları	5
Şekil 2.2. Biyofilmin 3 boyutlu görünümü	10
Şekil 2.3. Bakterilerin bir yüzey üzerinde olduklarını algılamaları.....	11
Şekil 2.4. Ekstraselüler polimerik substant	13
Şekil 2.5. Malik asit	17
Şekil 2.6. Teflon üzerinde <i>Escherichia coli</i> biyofilminin taramalı elektron mikroskopuyla görüntülenmesi.....	22
Şekil 2.7. <i>S. warneri</i>	23
Şekil 2.8. <i>A. sobria</i>	24
Şekil 2.9. <i>Y. ruckeri</i>	27
Şekil 2.10. <i>F. psychrophilum</i>	30
Şekil 2.11. <i>V. anguillarum</i>	31
Şekil 4.1. <i>F. psychrophilum</i> OA ve OB'da koloni morfolojisi.....	38
Şekil 4.2. <i>S. warneri</i> koloni morfolojisi.....	39
Şekil 4.3. <i>A. sobria</i> koloni morfolojisi	39
Şekil 4.4. <i>Y. ruckeri</i> koloni morfolojisi.....	40
Şekil 4.5. <i>V. anguillarum</i> koloni morfolojisi	40
Şekil 4.6. <i>A. sobria</i> , <i>S. warneri</i> ve <i>Y. ruckeri</i> 'de adezyon oluşumu.....	41
Şekil 4.7. Tüp yöntemi ile <i>F. psychrophilum</i> (++) , <i>A. sobria</i> (++) , <i>S. warneri</i> (+) suşlarında film tabakası varlığıyla biyofilm oluşumu	42
Şekil 4.8. Tüp yönteminde <i>S. warneri</i> (+) , <i>A. sobria</i> (++) ve <i>F. Psychrophilum</i> (++) suşlarında biyofilm oluşumu.....	42
Şekil 4.9. Tüp yönteminde <i>Y. ruckeri</i> ve <i>V. anguillarum</i> suşlarında film tabakası yokluğuyla biyofilm oluşmaması.....	43
Şekil 4.10. <i>V. anguillarum</i> 'da biyofilm oluşumu.....	44
Şekil 4.11. <i>S. warneri</i> , <i>A. sobria</i> ve <i>Y. ruckeri</i> 'de biyofilm oluşumu	44
Şekil 4.12. <i>F. psychrophilum</i> 'da biyofilm oluşumu	44
Şekil 4.13. Bakteri koloni renkleri: doğal krem koloni – biyofilm oluşmamasıyla pembe koloni – biyofilm oluşmasıyla siyah koloni .	45
Şekil 4.14. CRA testinde pembe renk koloni morfolojisiyle negatif, siyah renk koloni morfolojisiyle pozitif sonuç	46
Şekil 4.15. Siyah pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturan <i>S. warneri</i> suşu	46

Şekil 4.16. Siyah pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturan <i>A. sobria</i> suşu	47
Şekil 4.17. Siyah pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturan <i>V. anguillarum</i> suşu.....	47
Şekil 4.18. Pembe pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturmeyan <i>Y. ruckeri</i> suşu.....	48
Şekil 4.19. Pembe pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturmeyan <i>F. psychrophilum</i> suşu.....	48
Şekil 4.20. <i>V. anguillarum</i> 'da biyofilm oluşumu (pozitif kontrol) ve <i>V. anguillarum</i> 'da malik asitle biyofilm inhibisyonu	51
Şekil 4.21. <i>S. warneri</i> , <i>A. sobria</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>F. psychrophilum</i> ve <i>Y. ruckeri</i> suşlarının cam, fiberglas, çelik ve tahta materyallerinde biyofilm oluşturmaları.....	53
Şekil 4.22. <i>S. warneri</i> 'nin cam, fiberglas, çelik, tahta gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturmaları.....	53
Şekil 4.23. Çeliğe en güçlü tutunmayla <i>S. warneri</i> 'de biyofilm oluşumu	54
Şekil 4.24. <i>A. sobria</i> 'nın cam, fiberglas, çelik, tahta gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturmaları	54
Şekil 4.25. <i>Y. ruckeri</i> 'nin cam, fiberglas, çelik, tahta gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturmaları	55
Şekil 4.26. <i>F. psychrophilum</i> araştırılmasında kristal viyole ile boyama öncesi farklı materyaller	55
Şekil 4.27. <i>F. psychrophilum</i> 'un kristal viyole ile boyama sonrası cam, fiberglas, çelik, tahta gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturmaları	55
Şekil 4.28. <i>V. anguillarum</i> 'un cam, fiberglas, çelik, tahta gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturmaları.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Biyofilmin kimyasal kompozisyonu.....	9
Çizelge 2.2. Seyreltilmemiş sarımsak yağının analizi	18
Çizelge 2.3. Kekik uçucu yağının kimyasal kompozisyonu	19
Çizelge 2.4. <i>T. vulgaris</i> 'teki seçilmiş kimyasal bileşenler listesi	20
Çizelge 4.1. Farklı metotlarda uygulanan biyofilm testine göre patojen bakterilerin biyofilm oluşturma güçleri	49
Çizelge 4.2. Bakterilerin farklı materyal yüzeylerinde biyofilm oluşturmalarının derecelendirilmesi	52



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
OA	: Ordal Agar
OB	: Ordal Broth
CRA	: Congo Red Agar
CRAS	: Congo Red Agar Salinity
CROA	: Congo Red Ordal Agar
BHI	: Brain Heart Infusion
PBS	: Phosphate Buffered Saline
QS	: Quorum Sensing
QQ	: Quorum Quenching
EPS	: Extraselüler Polimerik Substant (Extracellular Polymeric Substance)
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
C-di-GMP	: cyclic di-GMP

1. GİRİŞ

Biyofilm, bakteri hücrelerin birbirine ve buldukları yüzeye yapıştıkları bir mikroorganizma kümesi olup EPS, DNA, proteinler ve polisakkaritlerden oluşan polimerik bir yapıdır. Biyofilm, kalınlığı 0,2 mikron üstünde ise bakteri içerebileceği belirtilmiştir (Larson, 2011). Dünyadaki mikrobiyal kütleinin %80 kadarının biyofilm durumunda bulunduğu iddia edilmektedir (Davies, 2003; Richards ve Melveer, 2009). Mikrobiyal biyofilmlerin balık sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ulusal sağlık enstitüleri, enfeksiyonların %80'inden fazlasına biyofilmlerin neden olduğunu tahmin etmektedir (Donlan ve Costerton, 2002). Bu iddialar göz önüne alındığında savaşmamız gereken biyofilmlerin ne derece önem arz ettiği daha iyi anlaşılmaktadır.

Biyofilm kitlesi yerleştiği bölgeye göre değişir ve genellikle bakteri, mantar, alg ve protozoa ve fajları içeren birçok mikroorganizma türünden oluşur (Wu vd., 2015). İlk yapışma (adezyon) olduğunda biyofilmin uzaklaştırılması artık zordur (Bryers, 2008).

Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların yaşam alanları içindeki bir yüzeye teması ile başlar ve salgıladıkları çeşitli ekstrasellüler biyopolimerler sayesinde metal, plastik, medikal implant, hücre dokusu gibi çok farklı yüzeylere bağlanabilirler. Birçok konuda biyofilm oluşumunun verdiği hasarların maliyeti milyar dolarları bulmaktadır. Biyofilm sistemlerinin birçok negatif etkisi vardır. Mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan antibiyotikler biyofilm üzerinde yeterli etkinliğe sahip değildir. Bir çalışmada, antimikrobik etkinliği bilinen gümüş iyonları ile kateter manşetleri kaplanmış, fakat gümüş iyonlarının zamanla ortama difüze olması, kaplamanın antimikrobik etkinliğini kaybetmesine neden olmuştur. Kaplama malzemesi olarak antibiyotiklerin kullanılması ise mikroorganizmaların kullanılan antibiyotiğe karşı direnç kazanmasına ve uygulamanın etkinliğini kaybetmesine neden olmaktadır. Biyofilmi engellemek için geliştirilen yaklaşımlardan bir tanesi enzimlerin kullanılmasıdır. Enzimlerin çevreye zarar vermemesi biyofilmle mücadele de önemli bir üstünlüktür. Lizozim ve polietilen glikolün kovalent olarak yüzeye

bağlandıklarında yüzeyin antibakteriyel ve antiadhezif özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (Sert, 2014).

Patojenik bakterilerin neden olduğu akut enfeksiyonlar, kapsamlı olarak incelenmelidir. Bu enfeksiyonlar önceki dönemlerde ve günümüzde milyonlarca balığı öldürmüştür, ancak modern aşuların, antibiyotiklerin ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin geliştirilmesi ile etkili bir biçimde mücadele edilmektedir. Ancak enfeksiyonla mücadelede alternatif tedavi ve kontrol yaklaşımlarının geliştirilmesi önemli bir beklentidir. Bakteriyel patogeneze ilgili yapılan araştırmaların çoğu akut enfeksiyonlara odaklanmış ancak bu hastalıklar, şimdi biyofilm içinde yetişen bakterilerin neden olduğu yeni bir kategori olan kronik enfeksiyonlarla desteklenmektedir. Kronik yaralar, fibrinöz peritonitis enfeksiyonları gibi biyofilm enfeksiyonları, dünyadaki milyonlarca balığı her yıl etkilemekte ve birçok ölüm meydana getirmektedir. Genel olarak, bakteriler büyüme ve çoğalma sırasında iki yaşam şekline sahiptir. Tek bir formda, bakteriler tekli bağımsız hücreler olarak (planktonik) bulunurken, diğer formda bakteriler katı agregalar halinde yapışık olarak bulunurlar. İkinci form genellikle biyofilm büyüme fenotipi olarak adlandırılır. Bununla birlikte, bakterilerin konakçısı içerisinde bir biyofilm oluşturmayı başarabildikleri durumlarda, enfeksiyon genellikle tedavi edilemez olarak ortaya çıkar ve kronik bir duruma gelebilir. Kronik biyofilmin temeli enfeksiyonların önemli noktası antibiyotiklere karşı aşırı direnç ve konakçı savunmalarından kaçmaktır. Bakteriler her iki yaşam ortamında da benzer bir yaşam biçimine (biyofilm) sahiptir, ancak hayatta kalma ve üstünlük mücadelesi farklıdır (Bjarnsholt, 2013).

Mikrobiyal biyofilmler, biyofilimde yaşayan hücreler için koruyucu ortamlar sağlayan mikrobiyal hücrelerin kendiliğinden örgütlenmiş kompleksleri olup, meydan okumalara verimli bir şekilde cevap vermelerini sağlar. Biyofilm hücrelerinin artmış direnci ve değiştirilmiş metabolizması, biyofilmleri, farmasötiklerin ve biyoyakıtların üretimi de dahil olmak üzere kimyasal üretim süreçlerinde potansiyel olarak çok fayda sağlar (Schuster ve Marks, 2014).

Biyofilm; canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları veya doğal akuatik sistemlerde yer alabilir. Bakteriler bir

yüzeye yapıştıktan ve biyofilm oluşturduktan sonra o yüzeyden hafif durulama ile uzaklaştırılmazlar. Biyofilm matrikslerinin içerisinde hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir (Donlan, 2002).

Bu güçlü biyofilmler stveart antimikrobiyal tedaviyle elimine edilemezler, bu nedenle biyofilmlerin eliminasyonuna yönelik pek çok çalışma yürütülmektedir. Yeni tedavi yöntemleri biyofilmlerin hayat döngüsünde belirli aşamaların engellenmesine yöneliktir (Suh vd., 2010). Biyofilm oluşumunu engelleme yöntemleri biyofilm oluşabilecek yüzeylerin probiyotik kolonizasyonu ile korunması, biyofilm oluşumu için gereken tutunmayı ve sonrası oluşan genetik transkripsiyonu engellemek, mikroorganizmaların antimikrobiyallerle karşılaşmasını engelleyen koruyucu ekstrapolimer matriksin mekanik veya kimyasal yıkımı ve temizlenmesidir (Stephens, 2002). Biyofilm yapısının büyük kısmını oluşturan ekstraselüler matriks, biyofilmdeki mikroorganizmaların; antikorlar, fagositoz, antibiyotik penetrasyonu ve kompleman bağlanmasından korunmasını sağlar. Ayrıca bakterilerin besin ve oksijen ihtiyacını da azaltır. Biyofilmler immün sisteme ve antimikrobiyal ajanlara karşı öylesine dirençlidirler ki *in vitro* kültür çalışması sonucu uygulanan doğru antibiyotiker bile, *in vivo* matriks içinde yaşayan mikroorganizmaları etkileyememektedirler (Davies, 2003). Antibiyotik tedavisi biyofilmin periferindeki metabolik olarak aktif mikroorganizmaları etkileyebilir fakat biyofilmin daha derin kısımlarındaki baskın haldekiler etkilenmez ve antibiyotik baskısı kalktığında biyofilmin tekrar büyümesini sağlarlar. Bu yüzden biyofilmler, konak dolaşımına girerek sistemik hastalığa yol açabilen bakteriler için bir kaynaktır. Antibiyotik tedavisi ile dolaşımdaki bakteriler elimine edilebilir fakat hastalığın yeniden orataya çıkmasına neden olan biyofilmlere karşı etkili olunamamaktadır (Donlan ve Costerton, 2002; Suh vd., 2010; Davies, 2003; Richards ve Melveer, 2009; Şahin ve Midilli, 2013).

Söz konusu tehlikeli biyofilm su ürünleri yetiştiriciliğinde de balık pulları gibi balığın vücudunda ve yetiştiricilik tesislerinde kullanılan birçok materyalin yüzeyinde görülmektedir. Etkili bir virülens faktörü olan biyofilmin yetiştiricilik tesislerinden uzak tutulması bu nedenle oldukça önemlidir.

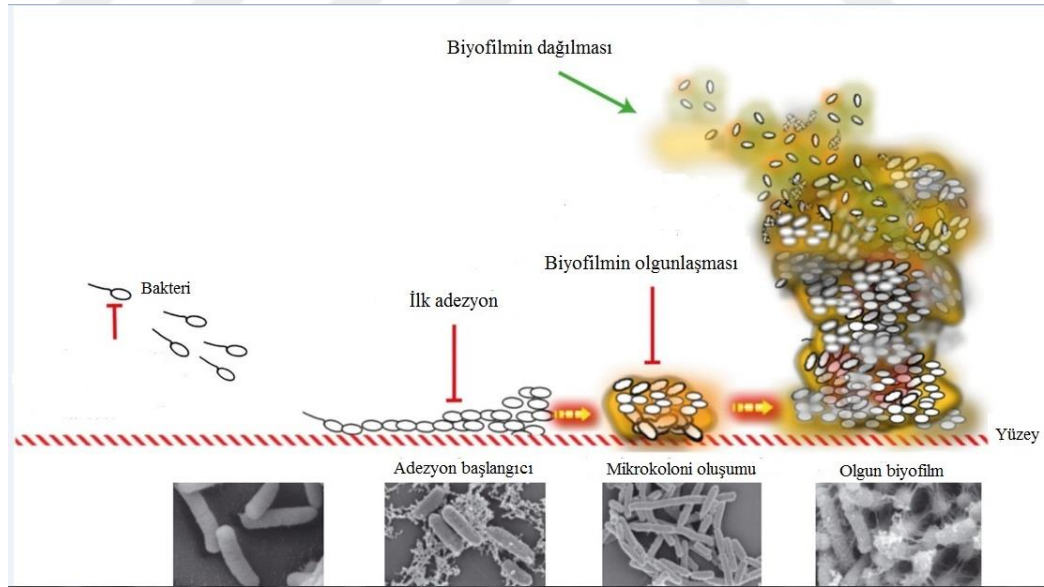
Bu çalışmanın amacı; balıklardan izole edilen *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Vibrio anguillarum* balık patojenlerinin adezyonu (ilk tutunma) ve biyofilm virülens gücü tüp, mikropalak, congo red agar yöntemleriyle araştırılmış, bu patojenlerin ahşap, metal, fiberglas, cam gibi farklı yüzeylerde biyofilm oluşumu incelenmiştir. Ayrıca biyofilm oluşumuna kekik yağı, sarımsak yağı, malik asit ve lizozim etkileri araştırılmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Biyofilm

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan, iletişim ve bilgi aktarımına izin veren, farklı gen transkripsiyonu ve büyüme oranlarına bağlı olarak farklı fenotipik özellik gösterebilen (Donlan ve Costerton, 2002), birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur. Bakteriler ekstraselüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarid, nükleik asit ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (Post vd., 2004). Bardouniotis vd. (2003) *Mycobacterium fortuitum* ve *Mycobacterium marinum*'un biyofilm büyümesini incelemişlerdir. Yaptıkları testle planktonik formdaki bakterilerle ve biyofilm içerisindeki bakterilerin biyositlere duyarlılığını karşılaştırmışlardır. Testin sonucunda biyofilm içerisindeki bakterilerin daha dirençli olduğunu görmüşlerdir.



Şekil 2.1. Biyofilm oluşumunun aşamaları (Monroe, 2007; Rendueles ve Ghigo, 2012)

Antibiofilm molekülleri, biyofilm oluşum sürecinin çeşitli aşamalarında etkindir. Biyofilm oluşumu genellikle bakterilerin abiotik veya biyotik bir yüzeye yapıştığı yüzey basamakları ve pili, fimbriyanın ve ekso polisakkaritlerin

üretilmesi yoluyla çok basamaklı bir süreç olarak tanımlanır. İlk ekleden sonra, üç boyutlu gelişme, farklı türlerin zaten etkileşime girdiği mikro koloni yapılarıyla başlar. Bir sonraki adım olan biyofilm olgunlaşması, olgun biyofilmlerin üç boyutlu yapısını ve bağlanmayı sağlayan matris üretimine bağlıdır (Flemming ve Wingender, 2010a). Her bir basamağı temsil eden taramalı elektron mikroskobu görüntüleri gösterilmektedir. Biyofilm oluşumunun son adımı, bakterilerin, diğer yüzeyleri kolonileştirmek için planktonik yaşam biçimine kavuştuğu hücre ayrılması veya dağılmasıdır. Mikrobiyal müdahaleler, biyofilm oluşumunu inhibe edebilir veya gelişmelerinin farklı aşamalarında farklı mekanizmalar ve stratejiler vasıtasıyla biyofilm dağılımını artırabilir (Rendueles ve Ghigo, 2012).

Biyofilm gelişmesinin beş aşaması (Şekil 2.1); 1: Planktonik bakterilerin biyomateryal yüzeyine yapışmaları, 2: Hücrelerin toplanıp mikro koloniler oluşturması, ekstraselüler polimerik substantlar (EPS) yani slimenin dışarı atılması ve bağlanmanın geri döndürülemez hale gelmesi, 3: Biyofilm oluşması, olgunlaşması ve hücrelerin çok katmanlı kümeler oluşturması, 4: Üç boyutlu büyüme ve konakçı savunma mekanizmalarına ve antibiyotiklere karşı koruma sağlayarak biyofilmin daha da olgunlaşması, 5: Biyofilmin, kritik bir kütleye ulaşması ve diğer yüzeylere kolonize olmaya hazır olması, planktonik bakterilerin dağılması şeklinde gelişmektedir (Monroe, 2007; Rendueles ve Ghigo, 2012).

Biyofilm oluşumunda yüzeye ilk tutunmada bakteri yüzey ile tam olarak temas etmemekte, ancak aralarında elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçleri gibi uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir, çünkü bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklüdür. Adezyonda hidrofobik etkileşimlerin rolü büyüktür. Devamında yüzeye kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri oluşmaktadır. Bakteri flagella, pili gibi organelleriyle yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanırlar. Yüzeye tutunan bakteri, membrana bağlı proteinlerden Ekstraselüler Polimerik Substant (EPS) üretir. Bağlanmayı yüzey kolonizasyonu takip eder. Tutunan bakteri ilk koloniyi oluşturur. Her

koloniyi bir sonraki koloni takip edecektir. Mikrokoloniler büyüdükçe biyofilmin mimarisi de gelişir (Gün ve Ekinci, 2009). Bu mimari de tam hidrat ve canlı biyofilm volümlerinin %15 hücre, % 85 matriks materyali tarafından oluşturulduğu ve hücrelerin matrikslerinin çevrelediği farklı yüksekliklerdeki 'kuleler' veya 'mantarlar' içerisinde buldukları bildirilmiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Çiftçi, 2005). Aynı zamanda biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan 'su kanallarına' sahip, çok tabakalı heterojen yapıdadırlar (Bothwell vd., 2003). Bakteri planktonik olarak son evrede biyofilmden kopararak ayrılır ve artık yeni yüzeyler için tehdit arz etmektedir. Artan akış kuvveti, iç enzimatik bozulma, EPS ya da yüzeye bağlayan proteinlerin açığa çıkması gibi hücre içinde görülen işlemler biyofilm hücrelerinin ayrılmasında önemli rol üstlenir (Akan ve Kınık, 2014).

Mikrobiyal biyofilmler konak savunma faktörlerine ve antimikrobiyal ajanlara dirençlidirler (Baillie ve Douglas, 1998). Biyofilmler polinükleer lökositlerin kemotaksisinin inhibisyonu ile opsonizasyon ve fagositoz üzerinde olumsuz etkinlik göstermektedirler (Potera, 1999; Jansen vd., 1989). İlk kez 1982'de Christensen tarafından *Staphylococcus epidermidis* için tanımlanan slime faktörü protein, hekzoaminler, nötral şekerler ve fosforlu bileşikler gibi birçok maddenin oluşturduğu karışık bir yapıdır (Cengiz vd.,2006). Bu faktör %40 karbonhidrat ve %27 protein içeren glikokaliks yapısında, hücre dışı bir maddedir. Slime faktörü mikroorganizmaların konak hücreye ve yapay yüzeylere adezyonundan sorumludur. Bu yüzeylerde fibrin ve fibronektin faktörü ile bir biyofilm tabakası oluşmakta ve bu biyofilmden oluşan mikroorganizma çoğu kez sepsise yol açmaktadır (Orhon vd., 1998; Karaca vd., 2001). Biyofilm "slime" olarak ta adlandırılmaktadır (Veenstra vd., 1996).

Bir mikrobik biyofilm kendi kendini organize edebilir (autopoiesis), çevresel düzensizliklere dirençlidir (homeostasis), birlikte olduklarında izole olduklarından daha etkilidir (sinerji), çevresel değişikliklere karşı tek tek bir bireyden ziyade birlikte karşılık verir (communality) (Caldwell vd., 1997; Şimşek ve Bulut, 2012). Biyofilm tabakası içerisinde yaşayan bakterilerin hayatta kalma şansları daha fazladır. Biyofilmin dış tabakaları hasarı absorbe

ederken, iç tabakalarda stres yanıtının başlaması için zaman kazanılmış olur (Costerton vd., 1999).

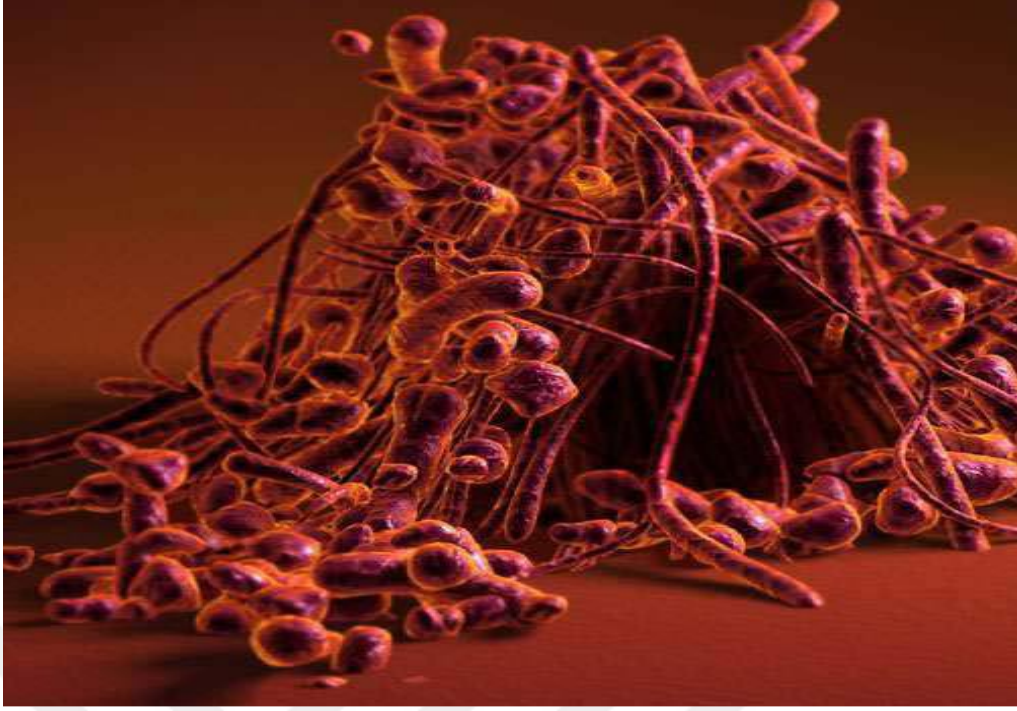
Biyofilm morfolojisi, çeşitli parametrelerle incelenmiştir: (i) biyofilmin bulunduğu alt tabakaya normal yönde substrattan maksimum uzaklığı tanımlayan ortalama kalınlık, böylece biyofilm içerisindeki tüm gözenekleri ve boşlukları hariç tutmak (ii) pürüzlülük, kalınlık dağılımından hesaplanan ve biyofilmin heterojenliğini tanımlayan bir miktar (iii) alt katman kapsamı, biyofilmin kapladığı yüzey alanı yüzdesi (iv) besin maddelerine maruz kalan biyofilm alanının fraksiyonunu yansıtan yüzey-hacim oranı ve (v) biyofilmin toplam biyokütlenin bir kestirimini sağlayan biyofilmin biyo hacmi veya toplam hacmi olarak ifade edilmiştir (Heydorn vd., 2000; Chang vd., 2015). Söz konusu biyofilm (Şekil 2.2) oluşumu bakteriyel patojenitede ve ısrarcı infeksiyonlarda önemli rol oynar (Costerton vd., 1999; Middleton vd., 2002). Güçlü bir virülens olan biyofilmin kimyasal kompozisyonu verilmiştir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Biyofilmin kimyasal kompozisyonu (Jamal vd., 2015)

Bileşen (Component)	Matriksteki yüzdesi (Percentage of matrix)
Mikrobiyal hücre	%2-5
DNA ve RNA	< %1-2
Polisakkaritler	%1-2
Proteinler	< %1-2
Su	%97

Biyofilmin planktonik bakteriden üstünlükleri dört madde altında toplanmıştır. Bunlar sırasıyla (Donlan, 2002):

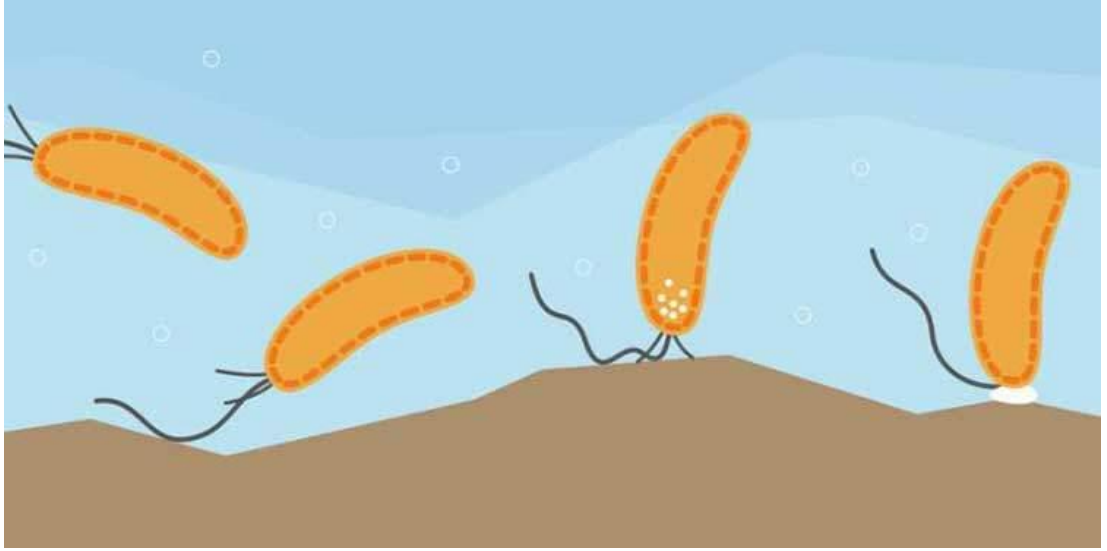
- EPS çevreden besin maddelerini (C-N-PO₄ gibi) konsantre ederek bakterilerin kullanımına sunar.
- Biyofilm oluşumunda bulunan bakteriler antimikrobiyel maddeler, yüzey gerilimi değiştiren ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı dirençlilik geliştirirler. Bu direnç, gelişimin durdurulup canlılığın korunmasından, genetik düzenleme ile yukarı ya da aşağıya doğru düzenleme ile modifikasyona kadar değişen reaksiyonlar halinde gözlemlenir.
- Tabakalı dizilim sonucu yüzeyde bulunan çeşitli bakteriler mekanik kalkan etkilerinin yanı sıra; katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılayarak antimikrobiyellere karşı iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar.
- Biyofilm parçaları koparak yeni yüzeylere yayılır. Planktonik bir hücrenin tutunmasından daha kolay bir tutunma gerçekleştirirler.



Şekil 2.2. Biyofilmin 3 boyutlu görünümü (Çizim: Bryan Christie) (Çiftçi, 2005)

2.2. Adezyon

İlk birkaç saniye yani dokunma anı, başarılı enfeksiyonlar için genellikle kritiktir. Balık vücutu ve dokuları, bilindiği gibi bakterilerin yaşaması için çekici bir ortam olup bakterinin bu bölgede biyofilm oluşturarak yaşaması için primer bir motivasyon oluşturmaktadır. Bakterinin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmesini sağlamak için bir takım stratejileri vardır. Bakteri yüzey proteinleri, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstraselüller matriks proteinlerine yapışırlar. Bu adhesin ve matriks proteinleri konakçı ile bakterinin adheransında anahtar rol oynarlar (Patti vd., 1994). Adherans sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar. İlginçtir ki biyofilm bakterinin adheransını arttırırken, biyofilm oluşumunun başlaması ile birlikte bakteri adhezyon ve motilite faktörlerinin ekspresyonunda da bir baskılama olmaktadır (Gilmore vd., 2003; Güvensen ve Ekmekçioğlu, 2016).



Şekil 2.3. Bakterilerin bir yüzey üzerinde olduklarını algulamaları (Anonim, 2018)

Bakteri adezyonu primer ve sekonder adezyon olmak üzere iki aşamadan oluşmaktadır (Öztürk vd., 2008):

2.2.1. Primer adezyon

Birçok fizikokimyasal değişkenin rol oynadığı bu bağlanma geri dönüşümlü ve gevşek bir bağlanmadır. Bakteri ve uygun inert yüzeyler arasında oluşmaktadır. Adezyonun oluşması için öncelikle bakteri, inert yüzeye yeteri kadar yaklaşabilmelidir (<1nm). Bundan sonra adezyonun oluşumu her iki yüzeyin çekim ve itme gücüne bağlı olarak gelişmektedir. Burada elektrostatik, hidrofobik ilişki, van der Waals gücü, ısı ve hidrodinamik güç önemlidir. Bakterilerin hemen tümü ve inert yüzeyler negatif şarja sahip olup birbirleri için aslında itme gücü oluşturmaktadır. Primer aderenza en önemli faktörün bakteri ve yüzeyler arası hidrofobik ilişki olduğu bilinmektedir (Öztürk vd., 2008).

2.2.2. Sekonder adezyon

Bakteri yüzeyindeki pili, fimbria veya fibriller gibi ligandların ökaryot hücrelerdeki spesifik ligandlara bağlanması ile oluşan özgül ve geri dönüşümsüz bağlanmadır (Şekil 2.3). Biyofilmin maturasyonu, bakterinin yüzeye geri dönüşümsüz olarak yapışmasından sonra başlamaktadır. Biyofilm geliştikçe

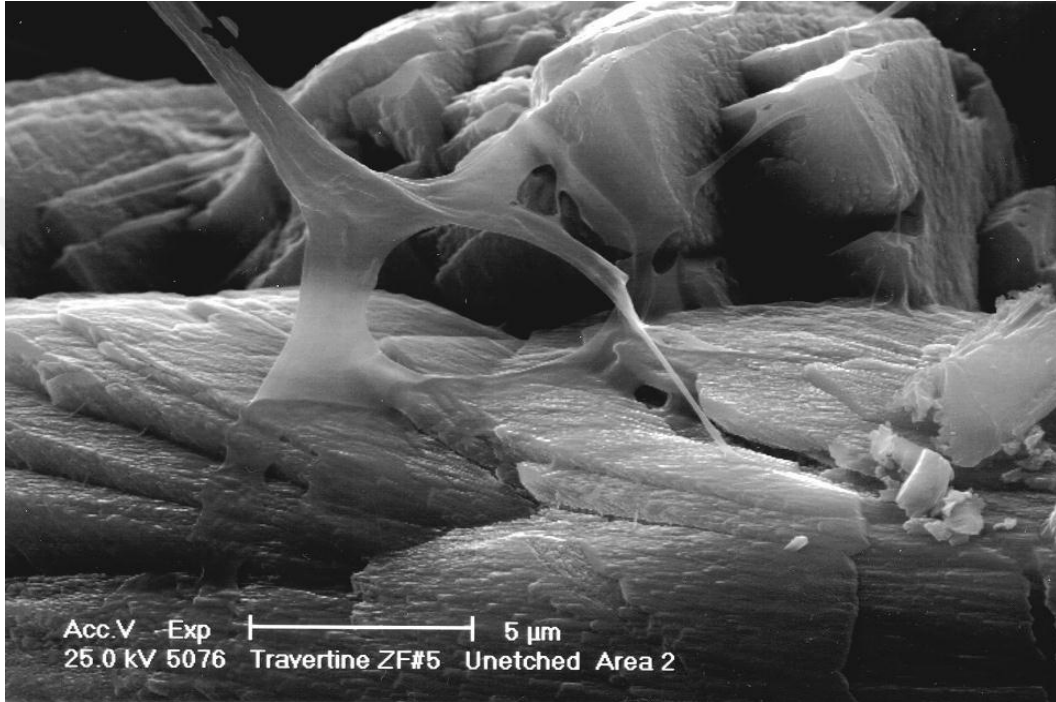
bakterinin aderans ve motilite faktörlerinin salınımında da baskılanma olmaktadır. Birçok türde, biyofilm anyonik yapıda olup esansiyel mineraller ve besinlerin etraftan yakalanarak yoğunlaştırılmasını sağlayan bir sistem oluşturmaktadır. Esasta, biyofilm 3 boyutlu çekim gücü oluşturup bulunduğu bakteriyi çevreleyerek bakterinin aderansını ve korunmasını sağlamaktadır (Öztürk vd., 2008).

Tek bir bakteri türü veya birden fazla bakteri türü içeren yüzeye bağlı mikroorganizma popülasyonlarına biyofilm denir. O'Toole ve Kolter (1998) *Pseudomonas fluorescens* WCS365 suşunda biyofilmi çalışmışlardır. *P. fluorescens*'in, bir dizi besin maddesi üzerinde ve abiyotik bir yüzey üzerinde biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir. Biyofilm oluşumunun erken başlaması için protein sentezinin gerekli olduğunu belirten O'Toole ve Kolter, bir veya daha fazla ekstrasitoplazmik proteinin abiyotik yüzey ile etkileşimde rol oynadığını ve ortamın ozmolaritesinin, bakterinin biyofilm oluşturabilme kabiliyetini etkilediğini de bildirmişlerdir.

2.3. Ekstraselüler Polimerik Substant (EPS)'in Genel Özellikleri

Ekstraselüler Polimerik Substant (EPS) (Şekil 2.4) formları hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüller veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır. Bakteriyel EPS'ler genellikle immunojeniktirler. *In vitro* çalışmalarda EPS'lerin varlığı katı besi ortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilmektedir. Bakterinin dış yüzeyini kaplayan EPS kapsül veya slim formda olabilir. Kapsüller EPS bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır. EPS'yi oluşturan homopolisakkaridlerin çoğunluğu nötr olmasına rağmen bir çok bakteriyel EPS negatif yük taşır ve yüksek kütleyle sahiptir. Ayrıca polisakkaridler hidrofilik özellik taşımakla birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir. EPS'deki yapısal ve düzenleyici genlerin üretimi kromozomal veya plasmid DNA kodlu olabilir. EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize

edilemediklerinden enerji kaynağı değildirler, buna karşılık mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı veya düşman bir ortamdan uzaklaştırırlar (Moriello vd., 2003, Ophir ve Gutnick, 1994). EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşıda fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır. Patojenlerinin ürettikleri EPS'lerin virülens faktörleri oldukları da bilinmektedir. Sonuç olarak yüksek moleküler yapıya sahip EPS bakterinin kararlılığını ortaya koymaktadır (Yılmaz ve Yuvalı Çelik, 2007).



Şekil 2.4. Ekstraselüler polimerik substant (EPS) (Sutherland, 2001)

2.4. Biyofilmde Bakteriler Arası Haberleşme: “Quorum Sensing”

Adezyon ve biyofilm oluşumunun, çevresel koşullara ve tek başına veya birbiriyle uyum içinde hareket eden birden çok bakterinin katılımını gerektiren karmaşık bir mekanizmadır (Willems ve Bonten, 2007). Bu denli karmaşık bir yapının oluşumu, hücreler arasında iletişimi gerekli kılmaktadır; bu iletişim, bakteriler tarafından, konsantrasyona bağımlı bir biçimde bakteriyel genlerin düzenlenmesinde değişikliğe yol açan küçük moleküllerin salınması ve bağlanması aracılığıyla gerçekleşir. Bu moleküller, DNA alışveriş sinyalleşmesi ve toksin yapımı gibi çeşitli işlevlere sahiptirler (Post vd., 2008). Biyofilm özelliklerinden bazıları; keratinositlere tutunma, çevreyi algılama genlerinin ekspresyonu ve *In vitro* biyofilm oluşturma sayılabilir (Wang vd., 2005).

Çevreyi Algılama Sistemi "Quorum Sensing (QS)" hayatına devam etmek için bakteriye güç katan bir sistemdir (Chu vd., 2015). Bakterilerin kendi aralarında 'Ben buradayım' mesajı veren bir iletişim mekanizması vardır. Bu mesajı da moleküller aracılığıyla gerçekleştirirler (Camara, 2007). Balıklarda hastalık yapabilmek için bakteriyel patojenler birbirlerine gönderdikleri bu sinyal molekülleri ile birbirlerini hissederek istedikleri çoğunluğa ulaştıklarını anladıkları anda virülens faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetikler ve konak üzerindeki etkisini gösterirler. QS; virülens, intrasellüler üreme ve biyofilm formasyonu ile ilişkili biyolojik öneme sahip bir fenomendir (Harraghy vd., 2007).

Hatta çevreyi algılamanın kontrolündeki en etkili virülens faktörü olan biyofilm; cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin salgıladıkları mukoz yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşan, "mikroplar şehri" (Watnick ve Kolter, 2000) olarak nitelenmiştir (Nurcan, 2010).

2.5. Biyofilmlerle İlgili Balık Enfeksiyonları

Listeria, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Bacillus* ve *Aeromonas* gibi biyofilm oluşturan patojenik türler akuatik ortamlarda hastalıklara neden olmaktadır (Mortensen, 2014).

Biyofilmler bakterilerin birbirleri arasında horizontal gen transferi yapması için elverişli ortamlardır. Horizontal gen transferi bakterilere, balık enfeksiyonlarıyla mücadele de antimikrobiyal direnci gibi adaptif mutasyonlar geliştirmeleri avantajını sağlamaktadır (Jurcisek ve Bakaletz, 2007).

Voung vd., 2004'de, polisakkarit Inter Sellüler Adhesin'i (PIA) yıkıcı mutasyon geçirmiş bakterilerde, polimorfonükleer lökositlerle fagositoz ve öldürmeyi arttırdığını bildirmiştir. Yasuda vd., 1994'de, biyofilm içerisinde gelişen *E.coli* hücrelerini fagositoza duyarlı biyofilm dışı bakteriler ile süspanse etmiş ve *In vitro* olarak polimorfonükleer lökositlerinin öldürücü aktivitesine karşı daha az duyarlı olduklarını saptamışlardır. Buna dayanarak fagositoza dirençteki artışın, biyofilm bakterilerinin polimorfonükleer lökositlerdeki oksijen ile öldürülemeyen, dirençli türler ortaya çıktığı hipotezini öne sürmüşlerdir. Buna

göre, enfeksiyonlardaki biyofilmlerden ayrılan bakterilerin immün sistemi aşarak enfeksiyon oluşturmaya daha hazır olduğunu ifade etmişlerdir.

Shiau ve Wu (1998) *S. epidermidis* tarafından üretilen ekstrasellüler slime faktörünün makrofaj fagositik aktivitesine engel olduğunu saptamıştır (Ataol, 2011).

2.6. Biyofilm İnhibisyonu

Biyofilm bakterilerinin konvensiyonel yöntemlerle (antibiyotikler, biyositler, dezenfektalar, antimikrobiyal ajanlar gibi) öldürülmesi etkili olamamaktadır. Antimikrobiyal ajanların bakteri hücrelerini inaktive edebilmesi için, matriks içerisinde yayılması gerekmektedir. Biyofilm matriksini oluşturan ekstrasellüler polimerik maddeler antimikrobiyal moleküllerin yayılım hızını yavaşlatmakta ve matriks ajanlarıyla ilişkisini kesmektedir (Patti vd., 1994). Antimikrobiyaller hem çevre üzerine tehlikelidir hemde klinik açıdan hasta balık üzerinde toksik etki de gösterilebilir. Antibiyotikler ise patojenik biyofilm enfeksiyonlarının inatçılıklarını arttırmaktadır. Biyofilmi tamamen yok etmenin klasik yöntemlerle mümkün olamayacağı bilinmektedir. Kontamine EPS ve biyofilm içerisindeki bakteriler genetik değişimlere de uğrayabilmektedirler. Bu nedenle biyofilmin engellenmesi şarttır. Biyofilme izin vermemek için biyositlerin biyodispersanlar, biyosümfaktanlar gibi çeşitli antibiyofilm maddeler uygulanabilir. Quorum Quenching (QQ) ile QS moleküllerinin üretiminin önlenmesi, parçalanması veya inhibisyonu, QS sinyalinin alınmasının önlenmesi stratejileri üzerinde çalışılmalıdır. Enzimatik yöntemlerle mücadele edilebilir. Slime tabakanın yapışkanımsı jel özelliğinin giderilmesinde enzimlerin şelatlayıcı maddelerle kombinasyonu değerlendirilebilir (Ceyhan, 2008).

2.6.1. Biyofilm inhibisyonunda kullanılan bazı maddeler

Günümüzde tüketicilerin sağlıklı ve doğal ürünlere olan ilgisinin artması nedeni ile yeni ve doğal antimikrobiyallere ihtiyaç giderek artmaktadır (Xu vd., 2014).

2.6.1.1. Lizozim

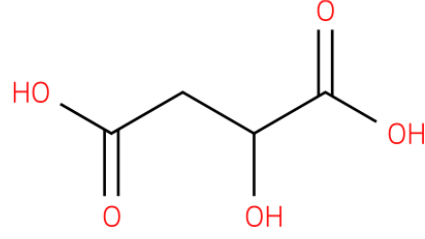
Lizozim, Alexveer Fleming tarafından 1922 yılında keşfedilmiş ve yumurta akı albümininden elde edilmiş antimikrobiyal maddedir. Dünya Sağlık Örgütü ve Gıda ve Tarım Organizasyonu 1993 yılında, lizozimin toksik olmadığını bildirmiştir. Bunun yanında lizozim, Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde nisin gibi 'GRAS' (Generally Recognised as Safe) statüsünde yer almaktadır (Üstünkol, 2006). Lizozim spesifik bir antikor olarak balığın mukusunda doğal olarak da bulunmaktadır (Balta, 2016).

2.6.1.2. Malik asit

Malik asit ilk kez Carl Wilhelm Scheele tarafından 1785 yılında elma suyundan izole edilmiştir (Carl Wilhelm Scheele, 1785). Malik asit, kayısı, böğürtlen, yaban mersini, kiraz, üzüm, mirabelles, şeftali, armut, erik ve ayva da dahil olmak üzere birçok meyvede ana asittir (Tabelle I of Fruchtsäuren, 2016). Yaşayan canlı hücrelerin mitokondrilerinde yer alan bir enerji döngüsü olan Krebs döngüsünün, önemli bir ara basamağıdır. Sahip olduğu eşsiz özellikleri sayesinde sağlığa çok sayıda faydaları vardır. Hoş ve kalıcı ekşimsi aromaya sahip olmak, yüksek çözünürlük, düşük erime noktası, düşük higroskopik özellikleri, metal iyonları ile şelat yeteneği, harmanlanabilir olması bu faydalardan bazılarıdır (Anonim, 2018).

Organik asitler arasında malik asit (Şekil 2.5) birçok gıdada bulunan bir organik asittir. Malik asit uygulamasının *Monocytogenes*, *Escherichia coli* gibi birçok patojen üzerinde antimikrobiyal etkili olduğu bulunmuştur (Raybaudi-Massilia, 2009). Yapılan çalışmalarda malik, sitrik, laktik ve tartarik asitlerin antibakteriyel etkileri olduğu belirlenmiştir (Eswaranveam vd., 2004; Lu vd., 2011).

Malik asit uygulaması %1 ve %2 konsantrasyonda 5 dakika süre ile tavuk etleri üzerinde *Monocytogenes* üzerinde denenmiş ve %2 malik asit uygulamasının inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir (González-Fveos ve Herera, 2013).



Şekil 2.5. Malik asit (Anonim, 2018)

2.6.1.3. Sarımsak yağı

Sarımsak (*Allium sativum L.*) çok eski yıllardan beri halk hekimliğinde tedavide kullanılmaktadır. Sarımsakta bulunan en önemli kimyasal bileşikler sülfür (Allisin, Ajoen ve Diallylsülfür) bileşikleridir. Bunlardan allisin; antibakteriyel, antifungal, antiparazitik ve antikarsinojenik özelliği kanıtlanmış bir maddedir (Özçelik vd., 2007).

Sarımsak Liliaceae familyasından soğanlı bir kültür bitkisidir. Vatanı ön ve Güney Asya'dır. Üretim şekilleri ve genetik özelliklerindeki farklılıklar nedeni ile bitkinin kimyasal bileşiminde de farklılıklar oluşabilir. Sarımsakta bulunan kimyasal maddelerin bilimsel olarak araştırılması 1892 yılında Alman kimyacılar Schemimler ve Weltheim ile başlamış ve daha sonra çok sayıda araştırmacı sarımsağın kimyası ile ilgilenmiştir (Amagase vd., 2001; Özçelik vd., 2007).

Sarımsak 200 den fazla kimyasal bileşik içermekte olup bunların en önemlilerinden bazıları kükürt ihtiva eden bileşiklerden (alisin ve ajoene) oluşan uçucu yağlar ve enzimler (alinaz, peroksidaz ve mirasinaz), karbonhidratlar (sakaroz, glikoz), mineraller, aminoasitler, A, B1, B2, Niasin ve C vitamindir. Keskin kokusunu veren allil sülfid, kükürtlü ve eterli yağlardan oluşmuştur (Baytop, 1999; Kütevin ve Türkeş, 1987). Sarımsağa özel koku ve lezzeti veren taşıdığı kükürtlü uçucu yağdır (Baytop, 1999; Ayaz ve Alpsoy, 2007).

Sarımsak yağı sarımsak tanelerinden buhar distilasyonu ile çıkarılan önemli bir yağ ürünüdür. Sarımsak yağı bileşikleri başlıca diallyl disulfide (DADS ya da 4,5-dithia-1,7-octadiene) (%60), diallyl trisulfide (DATS) (%20), allyl propyl disulfide (%16), az miktarda disulfide ve muhtemelen diallyl polysulfidedir

(Pranoto vd., 2005). Seyreltilmemiş sarımsak yağının daha detaylı analizi Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Seyreltilmemiş sarımsak yağının analizi (O'Gara vd., 2000)

Bileşenler	Konsantrasyon (mg/g)*
Diallyl monosulfide	106 ± 7 (10,6)
Diallyl disulfide	530 ± 7 (53,0)
Diallyl trisulfide	115 ± 4 (11,5)
Diallyl tetrasulfide	43 ± 2 (4,3)
Diallyl pentasulfide	10,5 ± 0,4 (1,1)
Diallyl hexasulfide	0,14 ± 0,01 (0,01)
Methyl allyl disulfide	44,1 ± 2 (4,4)
Methyl allyl trisulfide	69,9 ± 2,2 (7)
Methyl allyl tetrasulfide	24,6 ± 2,0 (2,5)
Methyl allyl pentasulfide	6,3 ± 0,6 (0,6)
Methyl allyl hexasulfide	1,5 ± 0,1 (0,2)
Dimethyl trisulfide	12,0 ± 1,3 (1,2)
Dimethyl tetrasulfide	4,3 ± 0,6 (0,2)
Dimethyl pentasulfide	2,0 ± 0,4 (0,2)

* Parantez içindeki değerler yüzdeleridir

2.6.1.4. Kekik yağı

Dünyada yaklaşık 100 tür içeren önemli bir aromatik bitki olan *Thymus vulgaris* L. (*T. vulgaris*) tıbbi amaçlı ve mutfak yemeklerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *Thymus* cinsi bitkiler önemli tıbbi bitkilerdir, bu bitkilerin esansiyel yağları çeşitli terapötik özelliklerinden dolayı önemle tavsiye edilir ve genellikle kekik yağı olarak bilinir (Dauqan ve Abdullah, 2017). Kekik uçucu yağının kimyasal kompozisyonu Çizelge 2.3.'de verilmiştir. *Thymus* türleri, farmakolojik ve biyolojik özelliklerinden dolayı şifalı bitkiler olarak düşünülür. Bu özellikleri ana bileşenleri monoterpen fenollerden olan timol ve karvakrola bağlıdır. Taze kekik, tüm otlar arasında en yüksek antioksidan düzeyine sahiptir (Dauqan ve Abdullah, 2017). Çizelge 2.4.'de *T. vulgaris*'teki seçilmiş kimyasal bileşenler listesi detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 2.3. Kekik uçucu yağının kimyasal kompozisyonu (Fatimah, 2014)

Bileşenler	Formül	Nispi konsantrasyon (%)
3-Hxenol	C ₆ H ₁₂ O	0,1
α-Tujene	C ₁₀ H ₁₆	1,52
α-Pinene	C ₁₀ H ₁₆	1,31
Camphene	C ₁₀ H ₁₆	0,75
Sabinene	C ₁₀ H ₁₆	0,84
3-Otenol	C ₈ H ₁₆ O	0,36
3-Otanone	C ₈ H ₁₆ O	0,2
β-Myrcene	C ₁₀ H ₁₆	0,67
3-Otanol	C ₈ H ₁₈ O	0,21
α-Pellverene	C ₁₀ H ₁₆	0,1
δ-3-Carene	C ₁₀ H ₁₆	0,11
α-Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	2,36
ρ-Cymene	C ₁₀ H ₁₄	7,61
Sylvestrene	C ₁₀ H ₁₆	0,34
1,8-Cineol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,57
cis-Oimene	C ₁₀ H ₁₆	0,22
β-Oimene	C ₁₀ H ₁₆	0,2
γ-Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	9,5
cis-Sabinene	C ₁₀ H ₈ O	0,1
3-Nonenol	C ₉ H ₂₀ O	0,12
3-Nonene	C ₉ H ₁₈	0,22
α-Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	3,27
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	0,93
Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	1,37
Carene	C ₁₀ H ₁₆	0,35
E-Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	0,54
3,4-Octadienal	C ₈ H ₁₄ O	0,23
Verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	0,12
endo-Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,1
4-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	1,44
α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	1,63
Dihydrocarvone	C ₁₀ H ₁₆ O	0,1
Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	0,12
9- ρ-Menthenol	C ₁₀ H ₁₆ O	0,23
2,6-Octadienal	C ₈ H ₁₂ O	0,14
Anisole	C ₇ H ₁₈ O	0,23
Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	0,1
Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	0,24
Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	54,26
Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	4,42
Octadienoic acid	C ₁₈ H ₁₂ O	0,1
Geranic acid	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	0,3

Çizelge 2.4. *T. vulgaris*'teki seçilmiş kimyasal bileşenler listesi (Hina vd., 2013)

Kimyasal Bileşen	Biyolojik Aktiviteleri
Timol	Antiseptik, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan özellikler
Karvakrol	Antimikrobiyal, antitrombotik, antiinflamatuvar (antiiltihap), asetil kolinesteraz önleyici özellikler
Linalol	Antiviral etki, antiinflamatuvar (antiiltihap), antioksidan, antinosiseptif ve analjezik etkinlik
Apigenin	Antikanserojenik, antiinflamatuvar (antiiltihap), antiprogresyon (hastalığın ilerlemesini durdurma), antiviral ve antioksidan özellikler
Öjenol	Nörokoruyucu, antikanser, antibakteriyel ve antianafilaktik faaliyetler
Rosmanirik Asit	Astringent (Kanamayı durduran), antialerjik, antimitojen, antioksidatif ve antiinflamatuvar (antiiltihap)

2.7. Farklı Yüzeylerde Biyofilm Oluşumu

Biyofilmler, yaygın olarak katı-bağlı yapılar olarak değerlendirilmesine rağmen, prensipte hava-sıvı, sıvı-sıvı, katı-sıvı veya hava-katı ara yüzleri de dahil olmak üzere herhangi bir arayüz ile ilişkilendirilebilir (Chang vd., 2015).

Adezyon ve biyofilm paslanmaz çelik, gıda yüzeyi, cam, kauçuk, ahşap ve polipropilen (protez cihazları, kateterler, implant, yapay organlar gibi) yüzeylere belirli koşullar altında yapışır ve yüzey ile etkileşime girerek hücre sel büyüme başlatır (Karaca, 2011; Di Ciccio vd., 2015).

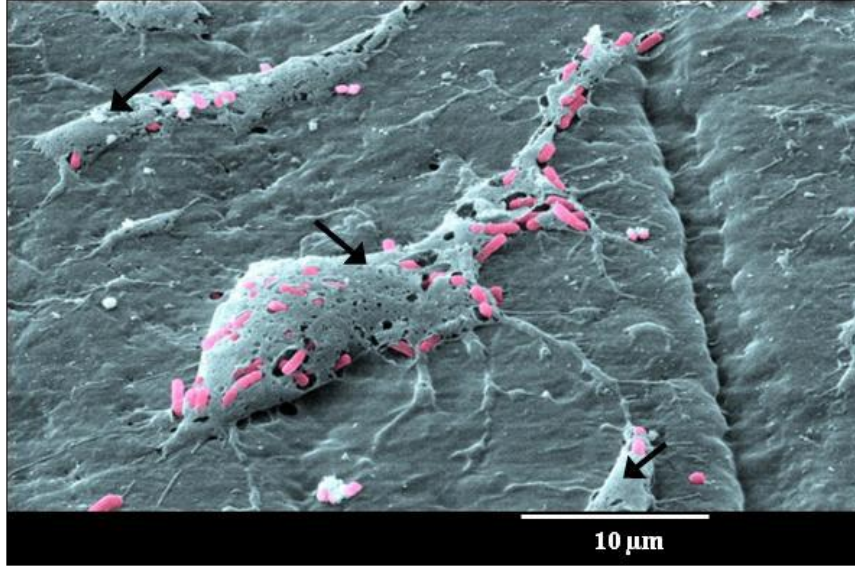
Bakteriyel biyofilmin farklı yüzeylere tutunmasının bir örneği Şekil 2.6'de teflon üzerine *E. coli* biyofilmiyle gösterilmiştir.

Metal yüzeylerdeki (bakır, çeşitli alaşımlar, paslanmaz, galvanizli ve karbon çelik) mikrobiyolojik korozyon, mikroorganizmalar ve onların metabolik ürünleri olan enzimler, hücre dışı polimerik maddeler, organik ve inorganik asitler, H₂S ve amonyak gibi uçucu bileşiklerle ilişkilidir. Mikroorganizmaların metal yüzeyi ile kurduğu ilişki ve etkileşimi sonucu ortaya çıkan elektrokimyasal reaksiyonlar metalin çözünerek korozyona uğramasına sebep olur (Beale vd., 2014). Mikroorganizmalar, sadece metal yüzeylerin korozyonundan değil beton, ahşap ve plastik gibi yapıların da aşınmasından sorumludur (Görs vd., 2007; Javaherdashti, 2009; Doğruöz, 2014).

Materyallere bağlı olarak bakterilerin tutunma oranları değerlendirildiğinde farklı ortam karakterlerinde tutunmanın da farklılıklar göstereceği yönündedir (Donlan, 2002; Davey ve O'toole, 2000).

Yüzey pürüzlülüğü ve serbest yüzey enerjisi (SYE) bakteri adezyonunun sadece materyalin yüzey yapısıyla ilgili değil aynı zamanda yüzey pürüzlülüğüyle de ilgili olduğu ve yüzey pürüzlülüğünün plak birikim miktarını belirlemede en önemli faktör olduğu bildirilmiştir (Auschill vd., 2002; Larson, 2011). Pürüzlü yüzeylerin SYE'nin fazla olması nedeniyle plak oluşumuna daha yatkın olduğu ve cilalanmış yüzeylerin genellikle düşük yüzey enerjisine sahip olduğu belirtilmiştir (Larson, 2011). *In vivo* ve *In vitro* koşullarda, pürüzlü yüzeydeki bakteri birikiminin iyi cilalanmış yüzeyden çok daha fazla olduğu; ancak yüzey pürüzlülüğünün genç biyofilm adezyonunu etkilediği ve biyofilm büyüme/olgunlaşma sonrası yüzey pürüzlülüğünün biyofilme olan etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Dezelic, 2009).

Yüzeyin düzensiz oluşu mikroorganizmanın tutunmasını ve kolonizasyonunu artırır. Bunun nedeni olarak düzensiz yüzeylerde suyun koparma kuvvetinin oldukça az olması ve bu noktalarda yüzey alanının artması öne sürülmektedir. Tutunulan yüzeyin kimyasal özellikleri de tutunma hız ve boyutuna katkı yapar. Mikroorganizmalar teflon ve bazı plastikler gibi hidrofobik nonpolar yüzeylere, cam ya da metal gibi hidrofilik yüzeylerden çok daha hızlı tutunabilmektedirler (Sutherland, 2001; Kojic ve Darouiche, 2004; Sapmaz Karabağ, 2010).



Şekil 2.6. Teflon üzerinde *Escherichia coli* biyofilminin taramalı elektron mikroskopuyla görüntülenmesi (Khelissa vd., 2017)

2.8. Balık Patojenleri

2.8.1. *Staphylococcus warneri*

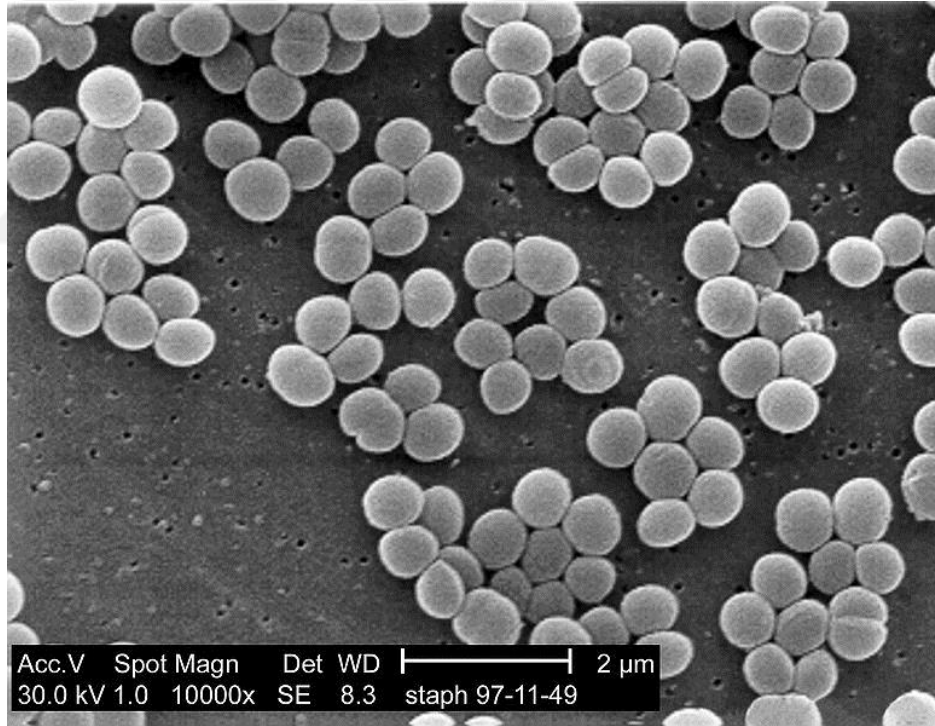
Micrococcaceae ailesinin üyesi olan stafilocoklar hareketsiz aerobik ortamı tercih eden fakat fakültatif anaerob gibi de davranabilen Gram pozitif koklardır. İnsanlarda ve hayvanlarda cilt florasının bir parçası olarak bulunan ortak bir komensal organizmadır. Deri bütünlüğünün bozulması durumunda deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, bakteremi, kardiyovasküler, kas ve iskelet, merkezi sinir sistem enfeksiyonları gibi birçok hastalığa sebep olurlar (Sharon, 2006; Khorshed ve Özbal, 2012). Stafilocokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış, 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881'de İskoçyalı cerrah Alexveer Ogston fare ve kobaylar için patojen olduğunu vurgulamıştır. Karakteristik kümelenmeler yaptıklarından dolayı Alexveer Ogston tarafından incelenmiştir (Waldvogel, 2000; Batı Kutlu, 2006).

Günümüze kadar *Staphylococcus* genusunda 33 tür ve 17 alt tür saptanmıştır. Stafilocok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre en az dört grup altında toplanabilirler. *S. epidermidis* grubunda; *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saccharolyticus* türleri, *S. saprophyticus* grubunda; *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* türleri, *S. simulans* grubunda; *S.*

simulans, *S. carnosus* türleri, *S. sciure* grubunda; *S. sciure*, *S. lentus* türleri yer almaktadır (Waldvogel, 2000; Batı Kutlu, 2006).

S. warneri balığın cilt altında lokalize olan, nadiren insanlarda enfeksiyon oluşturan oportunist bir balık patojenidir (Gil vd., 2000). *S. warneri* (Şekil 2.7) katalaz-pozitif, oksidaz-negatif ve koagülaz-negatiftir. Diğer koagülaz negatif stafilokoklarda olduğu gibi, bağışıklık sistemi bozulmuş hastalarda zaman zaman enfeksiyona neden olur. Kolonileri genellikle bej, bronz veya sarı, bazen portakal renklidir ve 35°C'de 48 saat inkübasyondan sonra yaklaşık 2-4 mm çapındadır. Optimum büyüme sıcaklığı 30-40°C'dir (Kloos ve Schleifer, 1975).

Ülkemiz yetiştiriciliği yapılan anaç gökkuşuğu alabalığından (*Oncorhynchus mykiss*) ve Atlantik salmonundan (*Salmo salar*) *S. warneri* patojeni izole edilmiştir (Metin vd., 2014).



Şekil 2.7. *S. warneri* (SEM) (Anonim, 2018)

2.8.1.1. *S. warneri*'de biyofilm üretimi

Stafilokokların, çeşitli yüzeylere yapışabilme ve biyofilm oluşturabilme özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Stafilokokların biyofilm oluşturmalarında *icaADBC* gen lokusu tarafından kodlanan polisakkarit intersellüler adhesin (PIA)

en önemli rolü üstlendiği gösterilmiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Arciola vd., 2015).

S. warneri de diğer Gram pozitif bakterilerde olduğu gibi biyofilm oluşturur (Molobela vd., 2010). Bu biyofilmler antimikrobiyal ajanların girişine karşı fiziksel bir bariyer oluşturur ve elde edilen hasta balıklar arasında kronik enfeksiyonların patognomik olduğu düşünülmektedir (Zineb vd., 2014).

2.8.2. *Aeromonas sobria*

Aeromonas türleri, gıda, içme suyu, kanalizasyon, çevresel su ve insan klinik örnekleri gibi birçok kaynaktan izole edilebilen Gram negatif, fakültatif anaerobik bakterilerdir. Bu organizmaların, sporadik diyare veya dizanterinin etken ajanları olduğu bilinmektedir, Ayrıca yaşamı tehdit eden ekstraintestinal enfeksiyona neden olurlar. Bazı fenotipler d-glikozu asit ve gazda fermente ederler ve hücre dışı hemolizin gösterirler (Shiina vd., 2004).

A. sobria Gram negatif, çubuk şekilli, spor oluşturmeyen, hareketli, fakültatif anaerobtur (Şekil 2.8). Bu bakteri yaygın olarak tüm dünyada toprakta ve çeşitli su sistemlerinde bulunur. *A. sobria* türünün çoğunluğu epitelyal dokuda değil Intra Luminal Sıvıda (ILF) bulunur (Kikuchi ve Graf, 2007).

A. sobria; Ülkemizde Atlantik salmonundan (*Salmo salar*) (Karatas, 1996), Gökkuşluğu alabalığından (*Oncorhynchus mykiss*) (Ozkok, 2005; Sağlam vd., 2006 Timur vd., 2008; Kayis vd., 2009; Ozer vd., 2009; Korun ve Toprak 2010), Sazandan (*Carassius auratus*) (Korun ve Toprak 2007b), Çipuradan (*Sparus aurata*) ve Levrekten (*Dicentrarchus labrax*) (Avsever vd., 2012) izole edilmiştir (Öztürk, ve Altınok, 2014).



Şekil 2.8. *A. sobria* (SEM) (Ding vd.,2017)

2.8.2.1. *A. sobria*'da biyofilm üretimi

Aeromonas türleri polar ve lateral flegella olmak üzere iki farklı flagellar sisteme sahiptir (Gavin vd., 2002; Rabaan vd., 2001). *Aeromonas*'larda her iki flagella (polar ve lateral) sisteminin tutunmada kritik rol oynamaktadır ve her iki flagella sistemi *Aeromonas*'ların biyofilm oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Polar flagella yüzme hareketinde ve başlangıç tutunmasında, lateral flagella ise hücrelerin kolonizasyonunda rol oynamaktadır (Kirov vd., 2003).

Rahman vd., 2007'de kalıcı *Aeromonas* klonlarının tüm izolatlarının güçlü biyofilm oluşum yeteneği sergilediğini göstermiştir. C-di-GMP (cyclic di-GMP) birçok bakteride biyofilm oluşumunu düzenler. C-di-GMP sinyalizasyonunun etkisini araştırmak için *Salmonella typhimurium*'dan bir *A. sobria* suşuna heterolog GGDEF ve EAL alan proteinleri tanıtmışlardır. GGDEF alan proteini AdrA'nın aşırı ekspresyonu, c-di-GMP konsantrasyonunu ve biyofilm oluşumunu arttırmıştır ve hareketliliği azaltmıştır. Duyarlı sinyal molekülü C4-homoserin lakton üretimi ve su bitkisi ve amoeba yüzeylerine yapışması arttığını belirtmişlerdir. Öte yandan, EAL alan protein YhjH'nin aşırı ekspresyonu, biyofilm oluşumunu ve hareketliliğini arttırmıştır. AdrA GGDEF etkin proteini *A. sobria* AEW43'teki c-di-GMP seviyesini değiştirerek çok hücreli davranış biçimi göstermiştir. Suda yaşayan yabancı otlara ve serbest yaşayan hayvan (amoeba) yüzeylerine yapışmayı ve biyofilm oluşumunu düzenlemiştir. Ayrıca, *A. sobria* AEW43'teki C4-HSL molekülünün seviyesini de etkilemiştir. C-di-GMP'nin hücre içi konsantrasyonu ve çekirdek derişiminin hücre dışı yoğunlaşması, biyofilm oluşumunda kritik bir rol oynadığından, biyofilm gelişiminin moleküler mekanizmalarını araştırmak için yeni bir odak olarak C-di-GMP sinyali ile quorum sensing moleküllerinin arasındaki bağlantıyı aydınlatmanın önemini vurgulamışlardır.

2.8.3. *Yersinia ruckeri*

Y. ruckeri, Enterobacteriaceae familyasına aittir. Yuvarlak uçlu Gram negatif çubuklardır. Aktif olarak büyüyen hücreler yaklaşık 0,75 µm çapında ve 1,0-3,0 µm uzunluğundadır. Spor yapmayan bu bakteri, kapsül içermez. Flagella her zaman mevcut olmadığından, *Y. ruckeri* suşları değişken motilite gösterir (Şekil

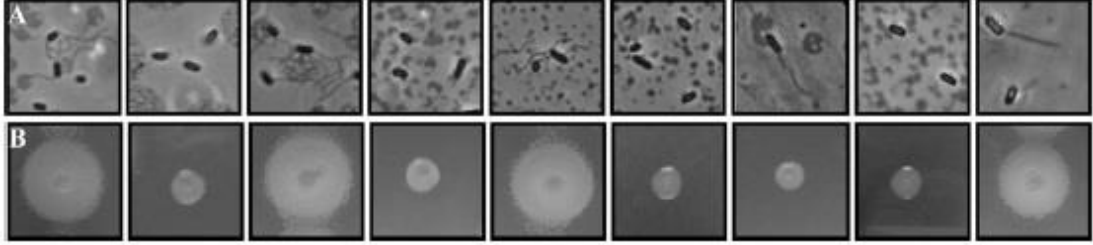
2.9) (Davies ve Frerichs 1989). Enterobacteriaceae ailesinin diğer üyelerinde olduğu gibi, *Y. ruckeri*, glikoz fermentatif, oksidaz-negatif ve nitrat indirgeyicidir (Ross vd., 1966). *Y. ruckeri* suşlarının fenotipik özellikleri yönünden homojen bir yapı sergilediği için diğer türlerden ayrımı biyokimyasal testler ile yapılabilir. *Y. ruckeri*'nin fenotipik özellikleri; B-galaktosidaz, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz (+) H₂S ve indol (-)'dir. *Y. ruckeri*, inositol, ramnoz, sukroz, melibiyoz ve arabinozdan farklı olarak glikoz ve manitol fermente eder (Frerichs, 1993).

Y. ruckeri, salmonid balıklarında önemli ekonomik kayıplara yol açan Yersiniosis veya Enterik Red Mouth (ERM) hastalığının etkenidir. Enfeksiyon, vücut yüzeyinde ve iç organlarda hemorajilerle birlikte septisemik bir duruma neden olabilir (Tobback vd., 2007). ERM, konjestif veya hemorajik zonların varlığı ile karakterizedir. Çeşitli doku ve organlarda, özellikle de ağız çevresinde ve bağırsaklarda bulunur. Patojenin dağılımı, taşıyıcı balıklar, su omurgasızları ve kuşlar gibi vektörlerle gerçekleşir (Coquet vd., 2002).

Gökkuşağı alabalıklarında Yersiniozis genellikle 10g'a kadar ağırlıkdaki balıklarda şiddetli enfeksiyonlara neden olmakta 50g ve daha büyük balıklarda ise kronik formda seyretmektedir. Enfeksiyonun şiddeti 15-18°C su sıcaklıklarında en yüksek düzeye ulaşırken ve 10°C'nin altındaki su sıcaklıklarında ise düşmektedir. Aşırı yağlı ya da aşırı zayıf balıkların salgınlara daha duyarlı oldukları belirtilmektedir (Rucker, 1966; Duman, 2017).

Hastalık, özellikle somon balığı üzerinde görülmesine rağmen, diğer balık türlerini de etkilemektedir (Horne ve Barnes, 1999). Hastalık şimdi yaygın olarak görülmektedir ve Kuzey Amerika, Avustralya, Güney Afrika ve Avrupa ülkelerinde bildirilmiştir (Tobback vd., 2007). *Y. ruckeri*, Türkiye'de ilk kez 1991 yılında Timur ve Timur tarafından Güney Anadolu'da bir gökkuşağı alabalık yetiştirme tesisinden izole edilmiştir (Timur ve Timur, 1991). *Y. ruckeri* suşları arasında serolojik farklılıklar bulunmakla birlikte, biyokimyasal özellikleri açısından çok benzer serotiplere sahip oldukları belirtilmektedir (Busch, 1982). Bununla birlikte, bazı suşlarda metil kırmızı (MR), voges proskauer (VP), lizin dekarboksilaz, arginin dihidrolaz ve laktoz fermentasyon testi sonuçlarında farklılıkların saptanabileceği bildirilmektedir (Stevenson vd., 1993). Sorbitol

fermantasyon yeteneğinin *Y. ruckeri* suşları arasında değişebileceği ve serotip 2 suşlarının, diğer suşlardan sorbitol fermentasyon yeteneği ile farklılaşabileceği belirtilmektedir (Altun vd., 2013).



Şekil 2.9. *Y. ruckeri* (SEM) (Welch vd., 2011)

2.8.3.1. *Y. ruckeri*'de biyofilm üretimi

Biyofilm balık çiftliği tanklarında potansiyel bir enfeksiyon kaynağıdır (Coquet vd., 2002). Quorum Sensing (QS) denilen sistemle bakterilerin ürettiği düşük molekül ağırlıklı moleküller, hücre dışı ortamda birikirler. Bu moleküllerin miktarı eşik değere ulaştığı zaman popülasyonun cevabı uyarılır (Ulusoy, 2007). Bu cevaplardan en etkili biyofilm oluşumudur (Sequences, 2008). *Yersinia* bakteri türleri QS adı verilen bu mekanizmayla ortamda kendi yoğunluklarını algılayabilir ve biyofilm oluşturabilir. *Y.ruckeri* QS sisteminin düzenlediği *N*-Açıl homoseri lakton molekülerinden biri olan 3oxo-C8-HSL molekülüyle virülens gücü biyofilmi üretmektedir (Delshad vd., 2018). *Y. ruckeri*'de flagellar proteininin aşırı salgılanması durumunda bu bakterinin karakteristik özelliği olan yapışkanlığı artmakta ve biyofilm oluşturabilme kabiliyeti kazanabilmektedir. Bu durum *Y. ruckeri*'nin sedimentte ve dışkıda uzun süreler canlı kalabilmesini sağlamaktadır (Coquet vd., 2002).

2.8.4. *Flavobacterium psychrophilum*

Bacteroidetes'e ait olan, psikrofilik, Gram negatif bakteriyel bir çubuktur (uzunluk olarak 3-5 µm). Bakteriyel soğuk su hastalığının (BCWD) etkenidir ve ilk olarak 1948'de izole edilmiştir (Starliper, 2011). 0.75-1.0 µm genişliğinde 3-5 µm uzunluğunda değişen gram-negatif bir bakteridir. 16°C'nin altındaki optimum büyüme sıcaklığına sahip soğuk, temiz sularda bulunur. Cytophaga Agar'da büyürken, *F. psychrophilum* çapı 3 mm'den büyük olmayan ince yayılan

kenarlara sahip parlak sarı koloniler üretir. Sarı pigmentasyonu nedeniyle, orijinal olarak bir mikrobakteri olarak kabul edilir. Motivasyon, kayma, pili veya flagella kullanımını içermeyen hareket ile elde edilir. Bakteri jelatin hidrolizi, albümin sindirimi, tributirin sindirimi, tributrin hidrolizi, *E. coli* hücre otolizi ve kazein hidrolizi için pozitifdir. Balık konakçıda, patojen, yumurtlayan yetişkinlerin deri/mukus, solungaç, beyin, assit, lezyon, mukus, böbrek, dalak ve üreme dışkıları gibi dış ve iç bölgeler üzerinde bulunabilir. Kolonizasyon, konakçadaki soluk beyaz alanlar tarafından belirgindir (Hesami vd., 2011). kesinlikle aerobik metabolizmaya sahiptir, fakat karbon ve enerji kaynağı olarak karbonhidratları kullanamaz. Bunun yerine, karbon ve enerji için peptidlere dayanır. Genomu, 2,432 protein kodlama genini içereceği tahmin edilen 2,861,988 bp'lik bir dairesel kromozomdan oluşur. Ailenin çevre üyeleri ile karşılaştırıldığında, muhtemelen sınırlı ekolojik niş ile ilgili küçük bir genom vardır. Genom, konakçının dokularının virülansına ve tahribatına katılan 13 varsayılan salgılanmış proteazı kodlar. Ayrıca, genom, doku yıkımı için proteazlar ve konak doku hasarından sorumlu olan proteinler tiyol ile aktive edilmiş sitolizler ile birlikte çalışan bakteri hemolizini kodlar (Duchaud vd., 2007).

F. psychrophilum salmonid balıklarda özellikle kuluçkahane sıcaklığının 10°C'nin altına düştüğü sıcaklıklarda görülerek alabalık larva ve yavrularında yüksek mortaliteye sebep olan bulaşıcı bir hastalıktır. *F. psychrophilum*'un sağlıklı balıkların vücut yüzeyinde, ovaryum, sperm, sindirim sistemi ve sağlıklı balıkların solungaç mikroflorası içinde bol miktarda mevcuttur. Ayrıca etkenin hasta anaç balıkların yumurtalarına buradan da yavru balıklara vertikal bulaşabildiği bildirilmektedir (Balta, 1997; Austin, 1992).

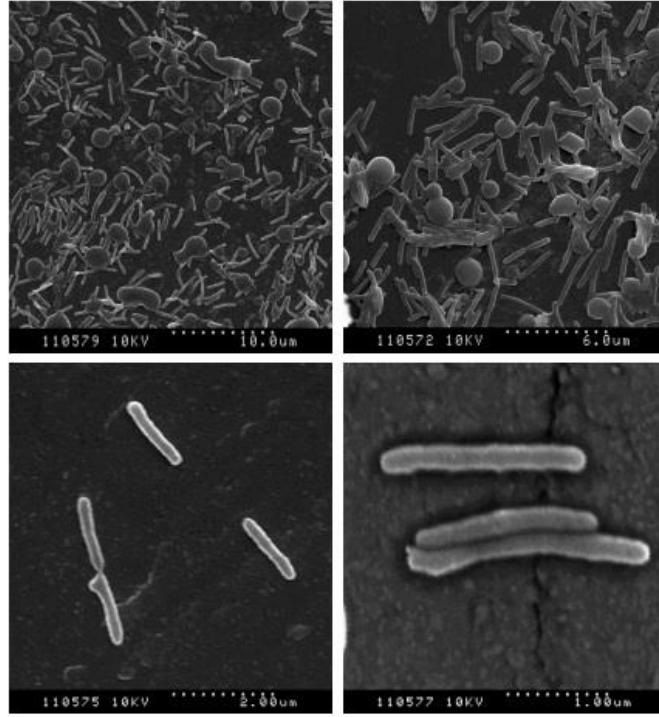
F. psychrophilum'un sebep olduğu enfeksiyon bakteriyel soğuksu hastalığı olarak bilinmektedir. Hastalığa yakalanan balıkların sırt kısmında içeriye doğru bir oyuk oluşturduğu için hastalığa "Eğer hastalığı" da denmektedir. Ayrıca gökkuşağı alabalığı fry sendromu (RTFS) olarak da isimlendirilmektedir (Balta, 1997; Timur vd., 2003, Kubilay vd., 2009).

RTFS son 10-15 yıl boyunca Avrupa'nın büyük bir bölümünde özellikle gökkuşağı alabalıkları haçerilerinde en ciddi bakteriyel hastalıklarından biri olarak bildirilmektedir (Madsen vd., 2008; Barker vd., 1989).

F. psychrophilum 0,2-2gr'lık salmonid balıkların çok duyarlı olduğu, fingerling ve daha büyük balıkların ise bu hastalıktan etkilenebildiklerini ancak mortalitenin düşük olduğu tespit edilmiştir (Balta, 1997; Toranzo vd., 1993).

F. psychrophilum (Şekil 2.10) hasta balıklardan izole edilebildiği gibi sağlıklı görünen balıklarından da izole edilebilmektedir. Herhangi bir hastalık semptomunu göstermeyen *F. psychrophilum*'un latent taşıyıcıları hastalığın potansiyel kaynağı olabilirler. Bu patojenin konakçı dışında nutrient ilave edilmeden steril bir suda uzun bir periyot canlı kaldığı bildirilmektedir. Derinin ve yüzgeçlerin mekanik yaralanması ile oluşan portantrelerden *F. psychrophilum*'un balığı girebildiği belirtilmektedir (Holt, 1987).

F. psychrophilum süt, ovarian sıvısı, balık yumurtalarının eksternal ve internal bölgesinden izole edildiği ve anaç balıkların da bu patojenin taşıyıcısı ve kaynağı olabileceği bildirilmektedir. Salmonid yumurtaları ve keseli frylarda kabuk yumuşamasına, yumurtanın erken çatlamasına, yumurta kesesinin yırtılmasına sebep olabilmektedir (Holt, 1987; Rangdale vd., 1996; Holt vd., 1993).



Şekil 2.10. *F. psychrophilum* (SEM) (Huyben, 2012)

2.8.4.1. *F. psychrophilum*'da biyofilm üretimi

F. psychrophilum mutantları düşük seviyelerde hücre dışı proteaz aktivitesi, virülens ve sitotoksiteye rağmen yüksek biyofilm geliştirme kabiliyetine sahiptir. Dahası, bazı virüent *F. psychrophilum* suşlarının yapışma (adherence) kapasitesi, virülense bağımlı olmaktan ziyade yüzeye özgü bir yetenek olabilir ve dolayısıyla virülensle ilgili olmayabilir. Bununla birlikte, diğer çalışmalar (Donlan, 2002; Högfors-Rönholm vd., 2015; Levipan ve Avendaño-Herrera, 2017), virülens ve biyofilm oluşumu arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir (Levipan ve Avendaño-Herrera, 2017).

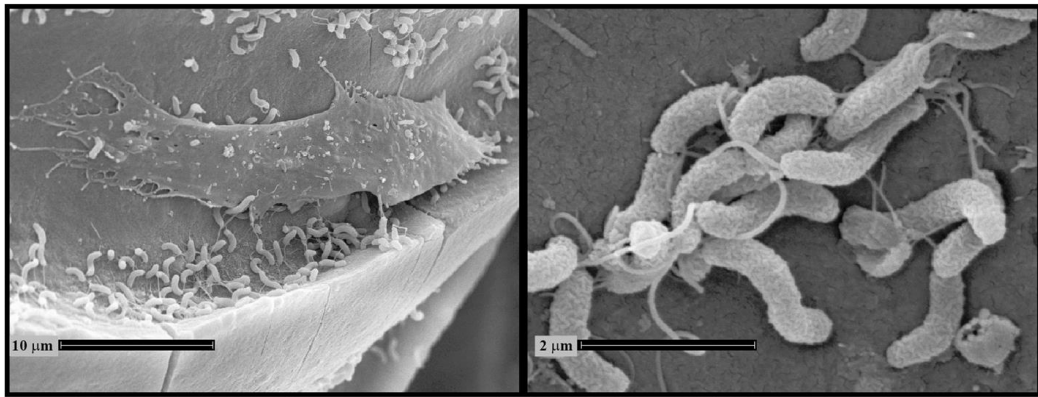
2.8.5. *Vibrio anguillarum* (*Listonella anguillarum*)

L. anguillarum, çeşitli deniz ve taze su balıklarını, midyeleri ve kabukluları etkileyen ölümcül hemorajik septisemik bir hastalık olan Vibriosisin etkenidir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde, bu hastalık ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Frans vd., 2011).

Vibrio'lar, Gammaproteobakterilere aittir ve deniz suları ve su ürünleri yetiştirme tesisleri gibi deniz ortamlarında bulunan optimum büyüme sıcaklığı 18-20°C olan Gram negatif çubuk virgül şeklinde bakterilerdir. Vibrio cinsi hastalıklara neden olabilen 50'den fazla türe sahiptir (Şekil 2.11) (Lindell, 2012).

V. anguillarum balıkların sağlık veya bağışıklık sistemi bozulduğunda veya balıkların mukozal yüzeyleri hasar görürse, 50'den fazla deniz balıkları türünde yüksek oranda ölüm yapan hemorajik septisemiye (vibriosis) neden olur. Hemolizinerler, proteazlar, lipazlar ve nörotoksik asetilkolinesteraz gibi saflaştırılmış hücre dışı ürünler Vibrio'nun patolojisinde rol oynayabilir (Milton, 2006).

V. anguillarum 23 serotipten (O1-O23) oluşur. Fırsatçı patojenler olarak düşünülen O1-O3 serotipi haricinde tüm serotipleri patojen değildir. *V. anguillarum*'a bağlı vibriosis semptomları, deri renginin bozulması, ülserler, bağırsaklarda ve balık gövdesinin ventral ve lateral yanında kırmızı nekrotik lezyonlardır. Bağırsak ve rektum uzamış ve yapışkan sıvı içerir. Akut epizootiklerde, enfeksiyon seyri hızlıdır ve balık ölümünden önce klinik bulgular saptanmaz (Lindell, 2012). *V. anguillarum*'un neden olduğu vibriosis %50'yi aşan mortaliteyle letarji, iştah kaybı, yüzeysel yüzme, deride matlık, kırmızı ve ölü nekrotik alanlar ile yüzgeç ve ağız çevresinde eritemlerin şekillendiği, sistemik seyrettiğinde ise ekzoftalmus, sıvı (kanlı) dolu bağırsak, hemorojik ve şişkin karaciğerin gözlendiği bir hastalıktır (Woo ve Bruno, 2003).



Şekil 2.11. *V. anguillarum* (SEM) (Holm vd., 2015)

2.8.5.1. *V. anguillarum*'da biyofilm üretimi

In vivo doğal fizyolojik durumda, mikroorganizma, başlangıçta mikrobiyal yapışması, mikroorganizmaların eksopolimer üretimi yoluyla bağlanma başarısı, bağlanmış mikroorganizmaların büyümesi ve devam eden eksopolimer salınımı dahil olmak üzere, ardışık bir zinciri takiben yüzeyin kontaminasyon sürecine ve daha yakın yüzeylerin kolonizasyonuna izin verir. Yapışık ve biyofilm oluşturan mikroorganizmalar kolonize yüzeyde ısı transferini azaltmak veya korozyona neden olmak gibi diğer olumsuz etkilere de neden olabilir. Yüzeye bağlanma mekanizması, yüzeyin geri dönüşümlü olarak bağlanmasına neden olan spesifik yapışkan proteinin birikimi ile başlayan organize bir diziyi izler. Birbirini izleyen hücrelerin birikimi, hücre ile hücre birleşmesine ve hücre bağlayıcı proteinlere karşı kuvvetli bir bağ oluşturur. Prosese dahil olan hücre adhezyon molekülleri önce hücre dışı enzimler tarafından hidrolize edilir. Bakteriyel yapışma doğrudan protein adsorpsiyonu ile ilgilidir (Cortés vd., 2011).

V. anguillarum'da, transkripsiyonel düzenleyici, VanT, pozitif olarak hücre dışı proteaz aktivitesini, pigment üretimini ve biyofilm oluşumunu düzenlediği gösterilmiştir (Croxatto vd., 2002)

Croxatto vd. (2002) *V. anguillarum*-vanT mutanti ve sat-vps73 DNA loküsünde polar mutasyon taşıyan bir mutantın, hatalı biyofilmler ürettiğini göstermiştir. Dolayısıyla, *V. harveyi* LuxR transkripsiyonel aktivatör ailesinin yeni bir üyesi *V. anguillarum*'da serin, metalloproteaz, pigment ve biyofilm üretimini pozitif tespit etmişlerdir.

Vibrio'lar, su ortamında doğal olarak bulunur ve ökaryotik konaklarla simbiyotik veya patojenik ilişkiler oluştururlar. Son zamanlardaki çalışmalar *Vibrio*'ların biyofilm oluşturmalarının özel genetik yapılarına (Flagella, pili ve ekzopolisakkarit biyosentezi) ve düzenleyici işlemlere (iki düzenleyici bileşen, çevreyi algılamak için c-di-GMP molekülleri) bağlı olduğunu göstermektedir (Yildiz ve Visick, 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriyel suşlar (*S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* suşlarının üretim ve depolanması)

Araştırmada ISUBÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarından temin edilen bazı bakteriyel balık patojenlerinden *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* suşları kullanılmıştır. *F. psychrophilum* 15°C'de, diğer patojenler 25°C'de üretilmiştir. Suşlar kullanılıncaya kadar -80°C'de ve %20 gliserin içerisinde muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılan her bakteri suşları uzun süreli saklama amacıyla (3-6 ay), -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Depolanan bakteriler günlük kullanım için -80°C'den alınarak -20°C'de bekletildikten sonra *F. psychrophilum* Ordal Agar, diğer patojenler TSA besiyerlerine ekilmiştir. Ekimleri yapılan *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* 25°C'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ekimleri yapılan *F. psychrophilum* suşu ise 15°C'de 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra günlük kullanım amacıyla maximum 7 gün süreyle +4°C'de saklanmıştır.

3.1.2. Kimyasal maddeler

Çalışmada; gliserin, kristal viyole, safranin, glikoz, kongo red, sakaroz, etanol, metanol, NaCl, PBS, lizozim, malik asit, sarımsak yağı, kekik yağı gibi kimyasal maddeler kullanılmıştır. Biyofilm inhibisyon testinde kullanılan lizozim (Sigma Aldrich), malik asit (Acros Organics), sarımsak yağı (Sinerji Lab.), kekik yağı (Sinerji Lab.) maddeleri ve diğer tüm kimyasal maddeler ticari olarak temin edilmiştir.

3.1.3. Besiyeri ve çözeltiler

Besiyerleri ve kullanılan tüm çözeltiler saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Aynı zamanda besiyeri ve çözeltiler için otoklavda 121°C'de 15 dakika süreyle sterilizasyon işlemi uygulanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Adezyon testi

S. warneri, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* patojenlerinin adezyon kuvvet kabiliyeti testi bazı değişikliklerle Alvarez vd., (2006) göre yapılmıştır. Kısaca testin yapılışı 96 çukurlu düz tabanlı mikropklarda yapılan bu testte bakteriler McFarland 0.5'e göre standardize edilen bakteri süspansiyonları 3 paralel olacak şekilde mikropklara 100 µl ilave edilmiş ve *F. psychrophilum* 15°C diğer bakteriler 25°C'de 1 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Negatif kontrol olarak; steril saf su 3 çukura ilave edilmiştir. Takiben 2 kez plaklar %0,5'lik NaCl ile yıkanmıştır. Daha sonra yapışan hücreler %0,1'lik kristal viyole (etonel ile %0,1'lik kristal ile yıkanmıştır) solüsyonu ile 45 dakika oda sıcaklığında boyanarak fazla boyalar %0,5'lik NaCl ile 4 kez yıkanarak çukurlardan uzaklaştırılmıştır. Bakteri hücrelerin yapışma ve adezyon kabiliyeti 630 nm'de ELISA okuyucusunda ölçülmüştür (Högfors-Rönholm vd., 2015).

3.2.2. Patojenlerin biyofilm testi

Tüp yöntemi, mikropklak yöntemi ve congo red agar yöntemi olmak üzere 3 farklı metotta araştırılmıştır.

3.2.2.1. Tüp yöntemi

Christensen vd., 1985'de tarafından bildirilen yöntemine göre, test edilecek *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* suşlarının, agar'da üreyen saf kültüründen tek bir koloni alınarak, içinde 5 ml % 0,25 glukoz içeren TSB besiyerine inokule edilmiş, 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüp içerikleri boşaltılmış, %1'lik safranin solüsyonu ile oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir. Boya dökülecek, tüpler steril PBS ile iki defa yıkandı ve ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün tüpün iç yüzeyinde renkli bir film tabakasının oluşumu ve

yoğunluğuna göre (+), (++) , (+++) ve (-) olarak değerlendirilmiştir. Tüm patojenler 3 paralel olarak çalışılmıştır (Demir ve İnanç, 2015).

3.2.2.2. Mikroplak yöntemi

O'Toole ve Kolter 1998'de tanımladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir (Ye vd.,2008). Kısaca *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* suşları Triptik Soy Broth (TSB)'da 16 saat, *F. psychrophilum* 15°C, 72 saat üretilmiştir. Kültürlerin tümünden McFarland 0.5'e göre standardize edilen bakteri süspansiyonları düz tabanlı 96 çukurlu mikroplaklara 100 µl olarak çukurlara ilave edilmiş ve 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben çukurlar distile su ile yıkanmış ve biyofilmle ilişkili hücre kalıntıları %1'lik kristal viole ile 15 dk süresince boyanmıştır. Boya fazlası hafif akan eşme suyunda dikkatli bir Şekil yıkanmış ve bakterilerin oluşturduğu 96 çukurlu plakalara tutunmuş biyofilm fotoğraflanmıştır. Biyofilm oluşumunu kantitatif olarak belirlemek için mikroplaklara 2x200 µl %95 etanol saf su ile 4 ml ye tamamlanarak ilave edilmiştir. Plakların 630 nm'de ELISA okuyucusunda optik yoğunlukları llmştir (Ye vd., 2008). Her bakteri için 24 sonucun OD değerleri ortalamaları alınmıştır. Test sırasında steril TSB negatif kontrol olarak çalışılıp değerlendirilmiştir.

3.2.2.3. Kongo red agar yöntemi

Freeman vd., 1989'da tarafından bildirilen metoda göre hazırlanmıştır. Kongo kırmızılı besiyeri litrede 50 gr sakkaroz, 37 gr BHI (Brain Heart Infusion) Agar ve 0,8 gr Kongo kırmızısı içererek Şekilde hazırlanmıştır. Suşlar kongo kırmızılı agara ekim yapıldıktan sonra *F. psychrophilum* 15°C, diğer suşlar 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda, kuru kristalize siyah koloniler oluşturan suşlar biyofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan suşlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Tüm patojenler 2 paralel olarak çalışılmıştır (Demir ve İnanç, 2015).

3.2.3. Lizozim, malik asit, sarımsak yağı, kekik yağı maddeleriyle biyofilm inhibisyon testi

Modifiye edilmiş O'Toole ve Kolter 1998'de tanımladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir (Ye vd., 2008). Kısaca *F. psychrophilum* OA'da 15°C, 72 saat, *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* suşları Triptik Soy Broth (TSB)'de 16 saat üretilmiştir. Daha sonra McFarland 0.5'e göre standardize edilen bakteri süspansiyonları düz tabanlı 96 çukurlu mikropklara 100 µl olarak ilave edilmiştir. İnhibisyon için malik asit, lizozim, sarımsak yağı, kekik yağı ½ oranında metanol ve steril saf suyla 6 kez seyreltilerek bakterilerin bulunduğu bu çukurlara 100 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan mikropklar 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben çukurlar distile su ile yıkanmış ve biyofilmle ilişkili hücre kalıntıları %1'lik kristal viole ile 15 dk süresince boyanmıştır. Boya fazlası hafif akan çeşme suyunda dikkatli bir şekil yıkanmış ve bakterilerin oluşturduğu 96 çukurlu plakalara tutunmuş biyofilm fotoğraflanmıştır. Biyofilm oluşumunu kantitatif olarak belirlemek için plaklara 2x200 µl %95 etanol saf su ile 4 ml ye tamamlanarak ilave edilmiştir. Plaklara 630 nm'de ELISA okuyucusunda optik yoğunlukları ölçülmüştür (Ye vd., 2008). Her bakteri için elde edilen sonuçların OD değerleri ortalamaları alınmıştır.

3.2.4. Balık patojenlerinin ahşap, çelik, fiberglas, cam üzerinde biyofilm oluşturması

Modifiye edilmiş İset (2016)'in tanımladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılacak yüzeyler için su ürünleri yetiştiriciliğinde en çok kullanılan ahşap, çelik, fiberglas, cam yüzeylerle çalışılmaya karar verilmiştir. Bu amaçla 10 cm² yüzey alanı olacak şekilde kesilen farklı yüzeyler çalışma öncesi 10 dakika %70 etanol ile temizlenmiştir. Steril distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra cam kaplar içerisine yerleştirilip otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmişlerdir. 16 saat TSB ve OB (Ordal Broth)'da üretilen bakterilerin bulunduğu falkon tüplerine steril edilen bu materyaller teker teker konulmuş ve *F. psychrophilum* 15°C 72 saat, *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* 25°C 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben

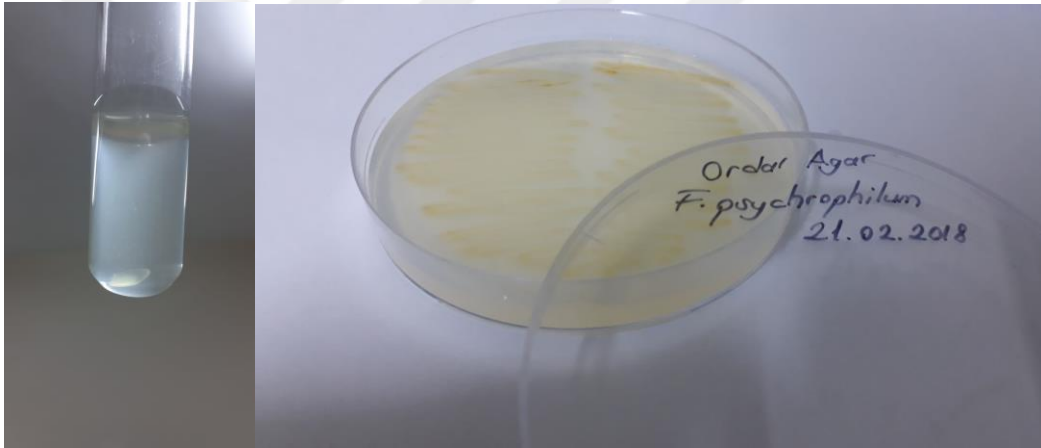
biyofilm tutunmasını görmek üzere materyaller steril penslerle alınmış %1'lik kristal viyole ile 15 dk boyanmıştır. Materyalin boyanması pozitif sonuç, boyanmaması negatif olarak değerlendirilmiştir. Tüm patojenler 2 paralel çalışılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Balık Patojenleri *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum*'un Koloni Morfolojileri

Araştırmada 5 farklı balık patojeni kullanılmıştır. *F. psychrophilum* üretilmesi ve gençleştirilmesinde Ordal Agar kullanılmıştır. Bakteriler 15°C de 72 saat inkübe edilmiştir ve OA'da sarı turuncu renkte üremişlerdir (Madetoja, 2002; Wiklund, 1994) (Şekil 4.1.). *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* patojenlerinin üretilmesi ve gençleştirilmesinde Triptik Soy Agar (TSA) kullanılmıştır. Bakteriler 25°C de 24 saat inkübe edilmiş ve TSA üzerinde krem renkli koloniler oluşturmuşlardır. *S. warneri* (Şekil 4.2.), *A. sobria* (Şekil 4.3.), *Y. ruckeri* (Şekil 4.4.), *V. anguillarum* (Şekil 4.5.) bakterileri kullanılmıştır.



Şekil 4.1. *F. psychrophilum* OA ve OB'da koloni morfolojisi



Şekil 4.2. *S. warneri* koloni morfolojisi



Şekil 4.3. *A. sobria* koloni morfolojisi



Şekil 4.4. *Y. ruckeri* koloni morfolojisi



Şekil 4.5. *V. anguillarum* koloni morfolojisi

4.2. Adezyon Testi Bulguları

Mikroplaklarla yapılan adezyon testinde plaklarda oluşan bir saatlik tutunma absorbans değerleri negatif kontrolde 0,036 iken *V. anguillarum*'da 0,044, *A. sobria*'da 0,056, *S. warneri*'de 0,040, *Y. ruckeri*'de 0,050, *F. psychrophilum*'da 0,059 olarak belirlenmiş ve tüm bakterilerin adezyon oluşturduğu bulunmuştur. Bir saatlik yüzeye tutunma gücü *F. psychrophilum*'da diğer patojenlere oranla

çok güçlü saptanmıştır. *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri*'de bir saat sonunda yüzeye ilk yapışma Şekil 4.6.'da verilmiştir. Adezyon testinde absorbans değerlerine göre yüzeye yapışma gücü sırayla *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum*, *S. warneri* olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. *A. sobria*, *S. warneri* ve *Y. ruckeri*'de adezyon oluşumu

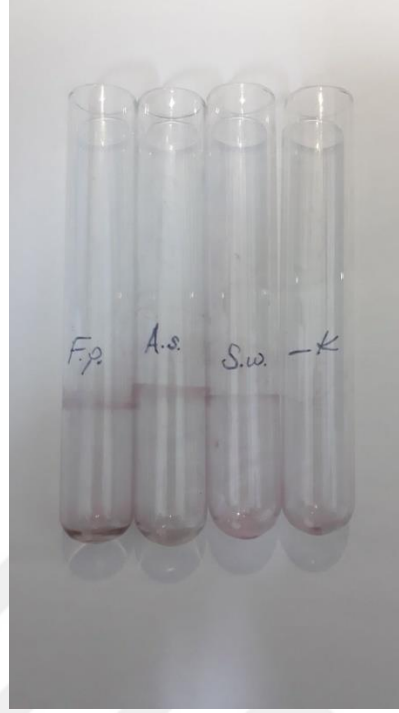
4.3. Biyofilm Testleri Bulguları

Tüp yöntemi, mikropalak yöntemi ve kongo red agar yöntemi olmak üzere 3 biyofilm tespit yöntemleriyle ilgili patojenlerin biyofilm virülens gücü araştırılmıştır.

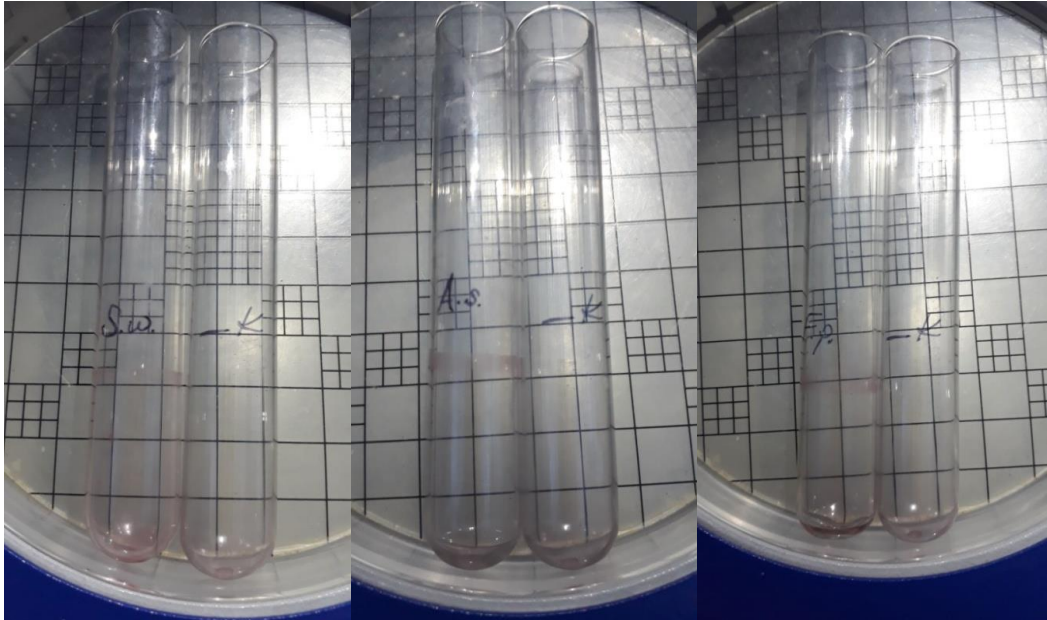
4.3.1. Tüp yöntemi bulguları

Tüp yönteminde bakteri kültürü dökülerek safraninle boyanan tüplerde besiyerinin bittiği hizada safranin boyasıyla bakteri tutunmasından kaynaklanan biyofilm çizgisi belirlenmiştir. Tüp yönteminde tüpün iç yüzeyinde renkli bu film tabakasının oluşumu ve yoğunluğuna göre (+), (++), (+++) ve (-) olarak değerlendirme yapıldığında biyofilm *S. warneri*'de (+), *A. sobria*'da (++), *Y. ruckeri*'de (-), *F. psychrophilum*'da (++), *V. anguillarum*'da (-) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9.). Tüp testinde tüpün iç yüzeyinde oluşan film tabakasının kalınlığına göre sırayla *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S.*

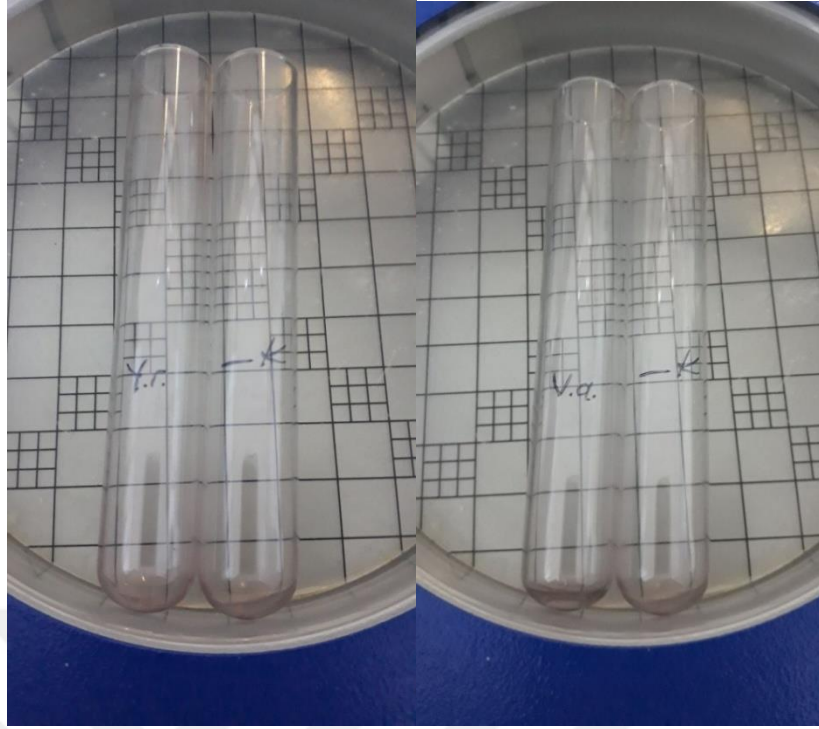
warneri, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum* olarak belirlenmiştir. En güçlü biyofilm oluşumu *F. psychrophilum* ve *A. sobria*'da görülmüştür.



Şekil 4.7. Tüp yöntemi ile *F. psychrophilum* (++) , *A. sobria* (++) , *S. warneri* (+) suşlarında film tabakası varlığıyla biyofilm oluşumu



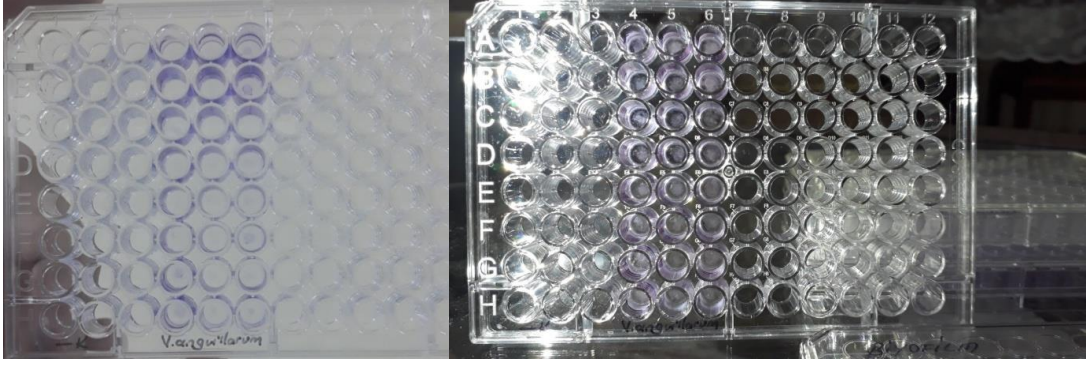
Şekil 4.8. Tüp yönteminde *S. warneri* (+) , *A. sobria* (++) ve *F. psychrophilum* (++) suşlarında biyofilm oluşumu



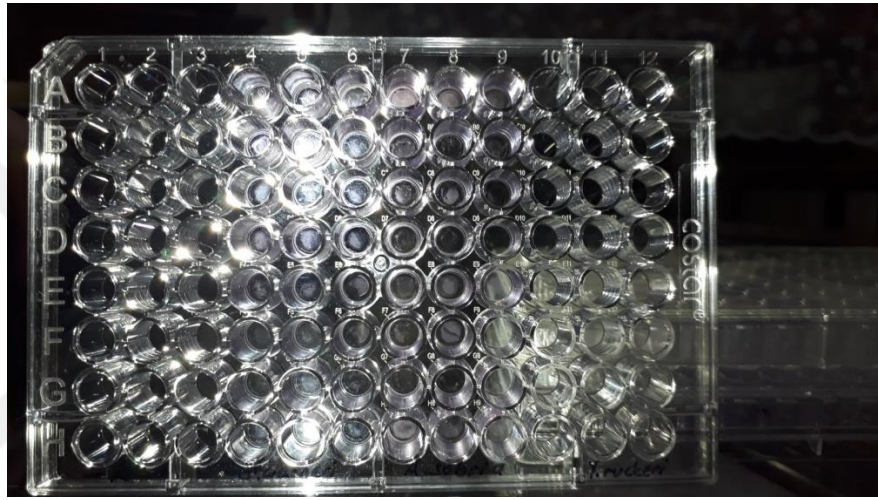
Şekil 4.9. Tüp yönteminde *Y. ruckeri* ve *V. anguillarum* suşlarında film tabakası yokluğuyla biyofilm oluşmaması

4.3.2. Mikroplak yöntemi bulguları

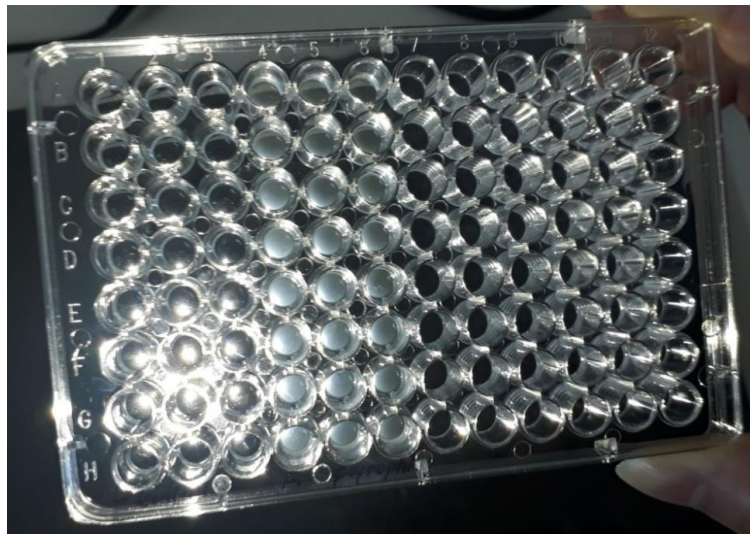
Mikroplaklarla yapılan biyofilm testinde plaklarda oluşan biyofilm ELİSA okuyucusunda 630 nm’de ölçüldü ve absorbens değeri negatif kontrolde 0,048, *S. warneri*’de 0,121, *A. sobria*’da 0,158, *Y. ruckeri*’de 0,071, *F. psychrophilum*’da 0,172, *V. anguillarum*’da 0,212 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışılan tüm bakteriyel balık patojenleri biyofilm oluşturmaktadır (Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12.). Mikroplak testinde absorbens değerlerine göre biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Mikroplak yönteminde en güçlü biyofilm oluşumu *V. anguillarum*’da bulunmuştur.



Şekil 4.10. *V. anguillarum*'da biyofilm oluşumu



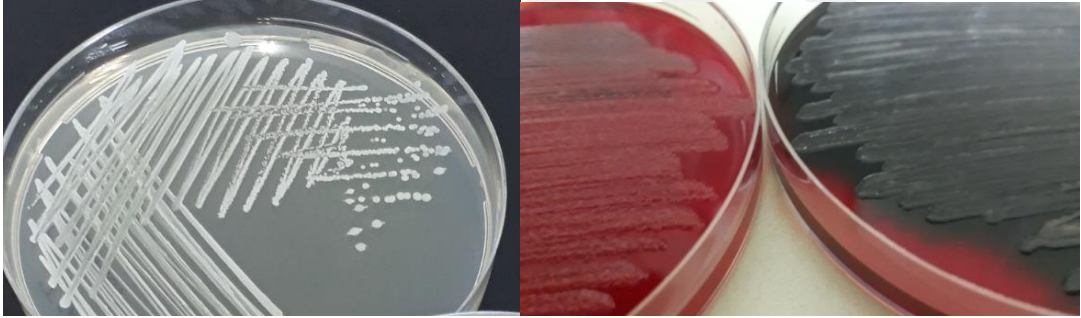
Şekil 4.11. *S. warneri*, *A. sobria* ve *Y. ruckeri*'de biyofilm oluşumu



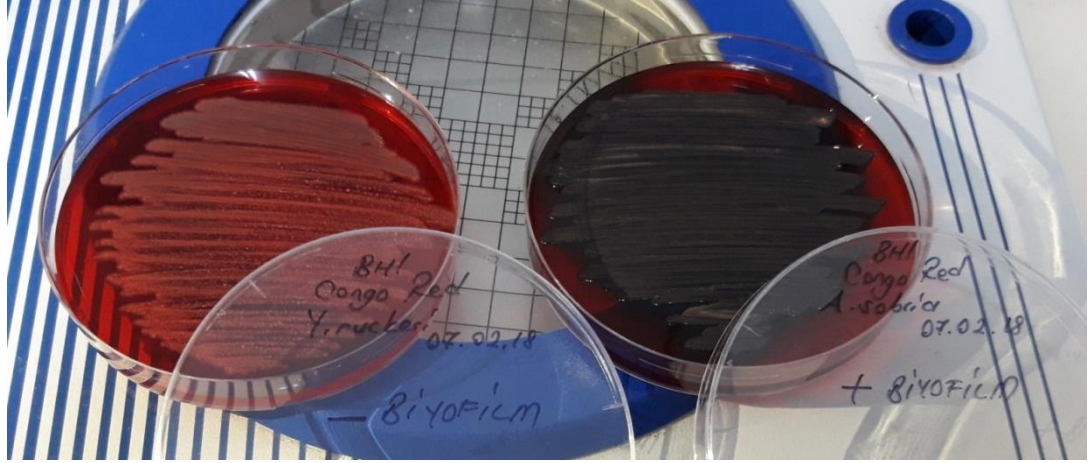
Şekil 4.12. *F. psychrophilum*'da biyofilm oluşumu

4.3.3. Kongo red agar yöntemi bulguları

Doğası gereği krem renkte olan bakteriyel balık patojenleri bu biyofilm testiyle krem renkten farklı renge dönüşmektedir (Şekil 4.13.). Kolonin pembe renge dönüşmesi biyofilm oluşturmadığını, siyah renge dönüşmesi biyofilm oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 4.14.). Koloni morfolojisi incelendiğinde koloni rengiyle biyofilm oluşumunun tespit edildiği prensibe dayanan CRA testiyle *A. sobria*, *S. warneri* ve *V. anguillarum* suşları Congo Red Agarda kuru kristalize siyah koloni üreterek biyofilm (slime) üretimi pozitif bulunmuştur (Şekil 4.15., Şekil 4.16., Şekil 4.17.). *Y. ruckeri* ve *F. psychrophilum* suşları pembe koloni üreterek biyofilm üretimi negatif bulunmuştur (Şekil 4.18., Şekil 4.19.). Kongo red agar testinde biyofilm oluşturan bakterilerin koloni morfolojisinin renk değiştirmesine göre biyofilm oluşumu sırayla *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Kongo red agar testinde en güçlü biyofilm oluşumu *V. anguillarum*, *A. sobria*, *S. warneri*'de bulunmuştur.



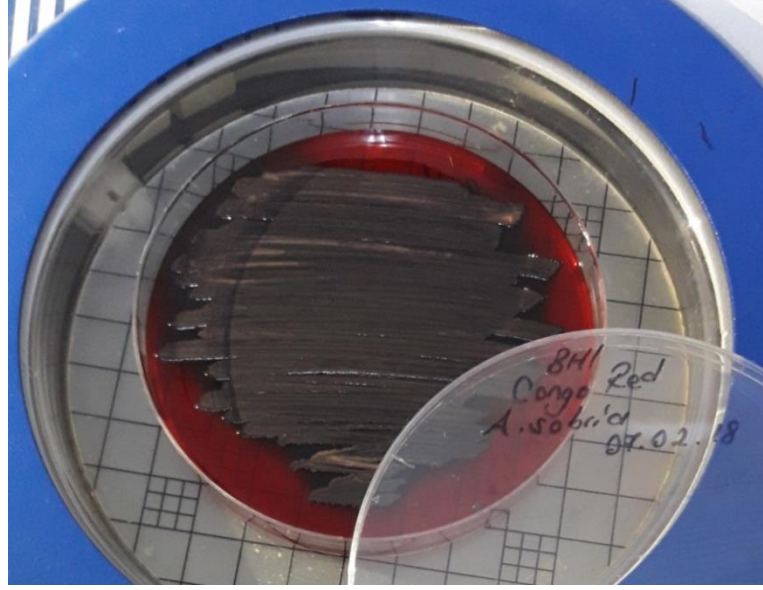
Şekil 4.13. Bakteri koloni renkleri: doğal krem koloni – biyofilm oluşmamasıyla pembe koloni – biyofilm oluşmasıyla siyah koloni



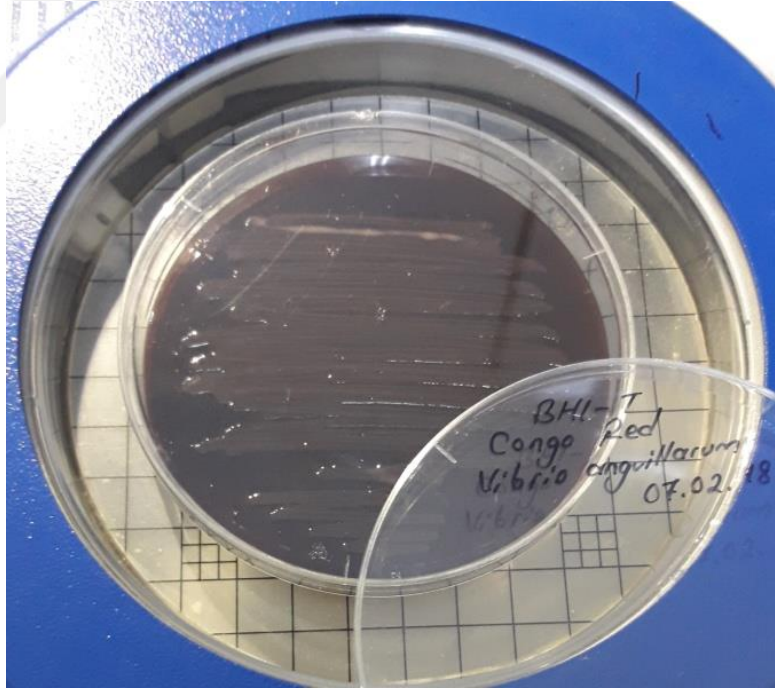
Şekil 4.14. CRA testinde pembe renk koloni morfolojisiyle negatif, siyah renk koloni morfolojisiyle pozitif sonuç



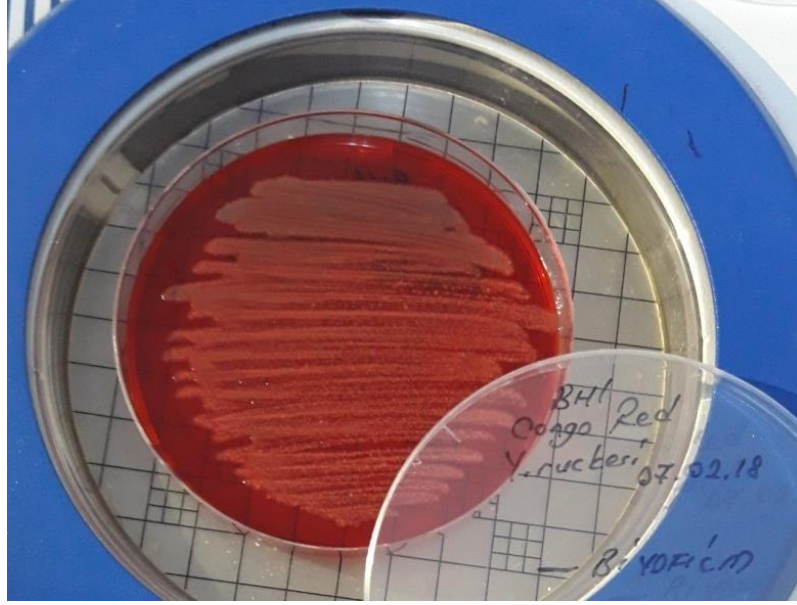
Şekil 4.15. Siyah pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturan *S. warneri* suşu



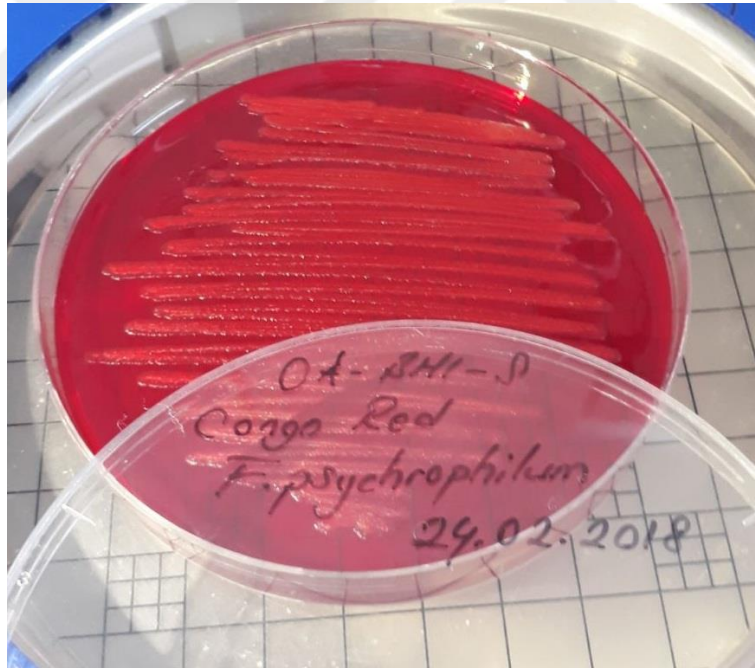
Şekil 4.16. Siyah pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturan *A. sobria* suşu



Şekil 4.17. Siyah pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturan *V. anguillarum* suşu



Şekil 4.18. Pembe pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturmayan *Y. ruckeri* suşu



Şekil 4.19. Pembe pigmentli koloni morfolojisiyle biyofilm oluşturmayan *F. psychrophilum* suşu

Çizelge 4.1. Farklı metotlarda uygulanan biyofilm testine göre patojen bakterilerin biyofilm oluşturma güçleri

	<i>F. psychrophilum</i>	<i>sobria</i>	<i>S. warneri</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>V. anguillarum</i>
Tüp yöntemi	++	++	+	-	-
Mikroplak yöntemi	++	++	++	+	+++
Kongo red agar yöntemi	-	+++	+++	-	+++

Biyofilm oluşturan bakterilerin en iyi hangi yöntemle biyofilm oluşturdıklarının belirlenmesi amacıyla çalışılan bakterilerin tüp yöntemi, mikroplak yöntemi ve kongo red agar yöntemleriyle biyofilm oluşturmalarının karşılaştırılması Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

4.4. Lizozim, Malik Asit, Sarımsak Yağı, Kekik Yağı Maddeleriyle Biyofilm İnhibisyon Testi Bulguları

Mikroplaklarla yapılan biyofilm testinde plaklarda oluşan biyofilm ELİSA okuyucusunda 630 nm'de ölçüldü ve absorbands değeri negatif kontrolde 0,048, *S. warneri*'de 0,121, *A. sobria*'da 0,158, *Y. ruckeri*'de 0,071, *F. psychrophilum*'da 0,172, *V. anguillarum*'da 0,212 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar biyofilm inhibisyon testi için pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

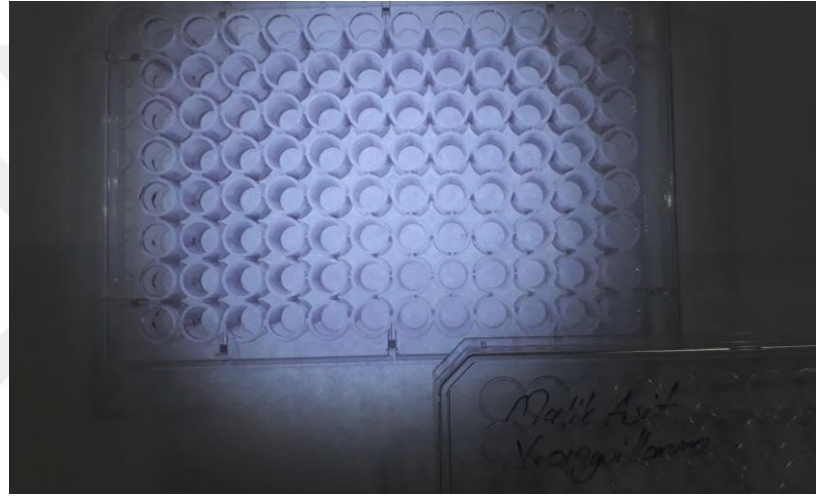
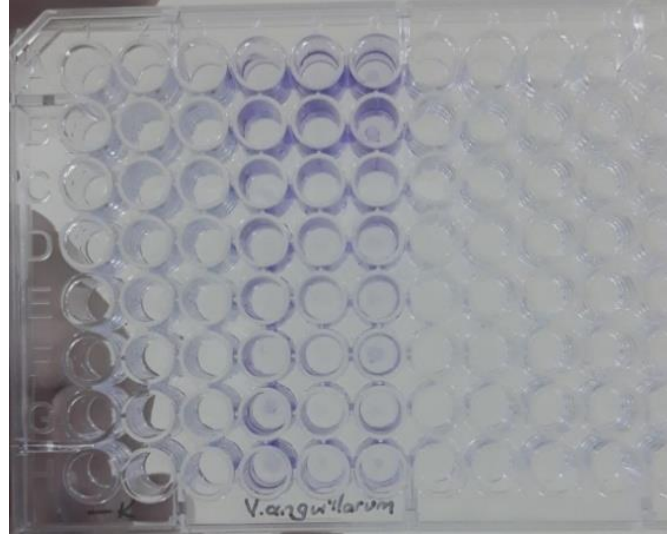
Lizozim, malik asit, sarımsak yağı, kekik yağı maddelerinin antibiyofilm etkisi araştırıldığında bu maddelerin farklı dilüsyonları ile 2 paralel çalışılmıştır. Aynı mikroplaklarda aynı zamanda biyofilm testi yapılmıştır. Lizozim, malik asit, sarımsak yağı, kekik yağı maddelerinin çok etkili bir biyofilm inhibisyon maddesi olduğu tespit edilmiştir. Örneğin *V. anguillarum*'un biyofilm oluşturduğu (pozitif kontrol) ve bu maddelerden malik asidin *V. anguillarum*'da biyofilm oluşturmalarını engellediği (inhibisyonu) mikroplaklarda görüntülenmiştir (Şekil 4.20.).

Lizozim için dilüsyon oranı 10 mg/ml olarak başlatılmış ½ oranında 6 kez steril saf suyla seyreltilerek 0,312 mg/ml'ye kadar azaltılmıştır. Test edilen bakteriler için en düşük ve en yüksek absorbands değeri sırasıyla; $0,052 \leq S. warneri \leq 0,065$; $0,063 \leq A. sobria \leq 0,083$; $0,042 \leq Y. ruckeri \leq 0,057$; $0,052 \leq F. psychrophilum \leq 0,06$; $0,072 \leq V. anguillarum \leq 0,122$ aralıklarında etki değerinin olduğu belirlenmiştir.

Malik asit için dilüsyon oranı 50 mg/ml olarak başlatılmış ½ oranında 6 kez steril saf suyla seyreltilerek 1,56 mg/ml'ye kadar azaltılmıştır. Bakteriler için en düşük ve en yüksek absorbans değeri sırasıyla; $0,05 \leq S. warneri \leq 0,09$; $0,044 \leq A. sobria \leq 0,074$; $0,041 \leq Y. ruckeri \leq 0,051$; $0,054 \leq F. psychrophilum \leq 0,09$; $0,054 \leq V. anguillarum \leq 0,084$ etki değerinin olduğu belirlenmiştir.

Sarımsak yağı için dilüsyon oranı dilüsyon oranı 10 ml/ml olarak başlatılmış ½ oranında 6 kez metanolle seyreltilerek 0,312 ml/ml'ye kadar azaltılmıştır. Absorbans değeri en düşük ve en yüksek olarak sırasıyla; $0,041 \leq S. warneri \leq 0,152$; $0,046 \leq A. sobria \leq 0,131$; $0,043 \leq Y. ruckeri \leq 0,05$; $0,05 \leq F. psychrophilum \leq 0,128$ etki değerinin olduğu belirlenmiştir.

Kekik yağı için dilüsyon oranı dilüsyon oranı 10 ml/ml olarak başlatılmış ½ oranında 6 kez metanolle seyreltilerek 0,312 ml/ml'ye kadar azaltılmıştır. Test edilen bakteriler için en düşük ve en yüksek absorbans değeri sırasıyla; $0,043 \leq S. warneri \leq 0,682$; $0,044 \leq A. sobria \leq 0,696$; $0,045 \leq Y. ruckeri \leq 0,644$; $0,049 \leq F. psychrophilum \leq 1,846$; $0,048 \leq V. anguillarum \leq 0,502$ etki değerinin olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.20. *V. anguillarum*'da biyofilm oluşumu (pozitif kontrol) ve *V. anguillarum*'da malik asitle biyofilm inhibisyonu

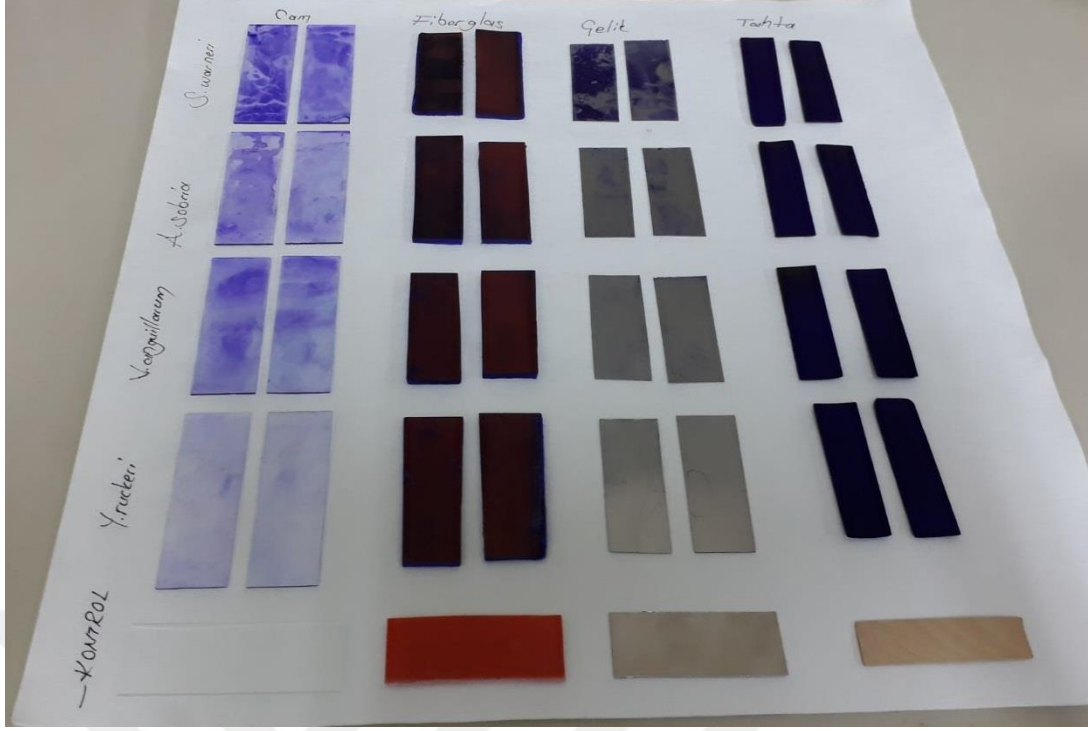
4.5. Balık Patojenlerinin Ahşap, Çelik, Fiberglas, Cam Üzerinde Biyofilm Bulguları

Bakteriyel balık patojenlerinin materyallerdeki biyofilm tutunması en güçlü *S. warneri*'de tespit edilirken bu suşu sırasıyla *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum* ve *Y. ruckeri* suşları takip etmiştir. *S. warneri* tüm materyallere özellikle de çelik ve cama güçlü yapışma göstermiştir (Şekil 4.22., Şekil 4.23.). *A. sobria*'nın cama yapıştığı ancak fiberglas ve çeliğe daha az tutunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24.). *V. anguillarum*'un cama ve fiberglasa tutunduğu, çeliğe tutunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.28.). *F. psychrophilum*'un cama ve fiberglasa tutunduğu, çeliğe az tutunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.26., Şekil 4.27.). *Y. ruckeri* cama ve fiberglasa az tutunduğu ancak çeliğe tutunmadığı

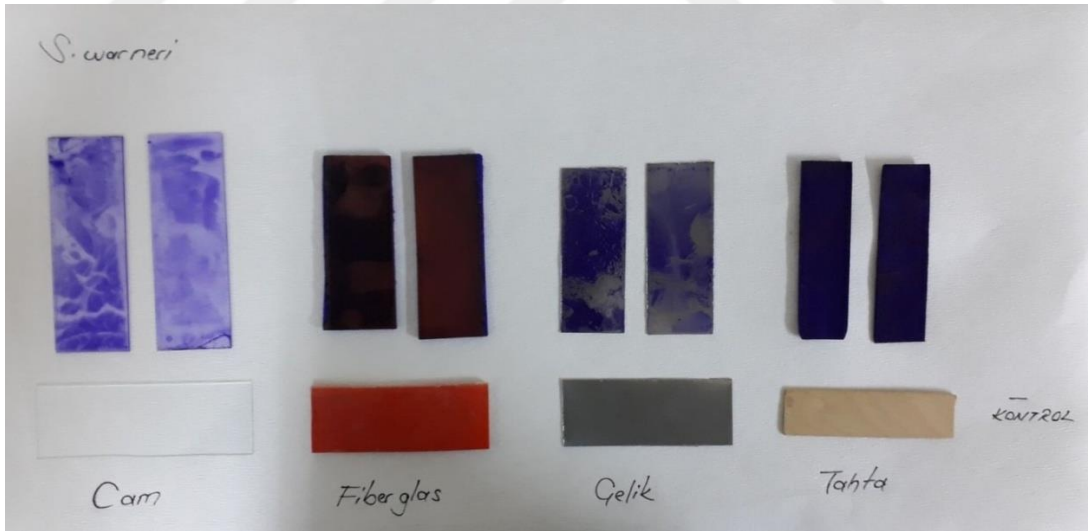
tespit edilmiştir (Şekil 4.25.). Sonuçta patojenlerin tamamının yetiştiricilik tesislerinde birçok alanda kullanılan bu materyallere tutundukları kanıtlanmıştır (Şekil 4.21.). Genel olarak cam, fiberglas, çelik ve ahşap yüzeylerde biyofilm oluşumu sırayla *S. warneri*, *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum*, *Y. ruckeri* olarak belirlenmiştir. Bakterilerin farklı materyal yüzeylerinde biyofilm oluşturmalarının derecelendirilmesi Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Bakterilerin farklı materyal yüzeylerinde biyofilm oluşturmalarının derecelendirilmesi

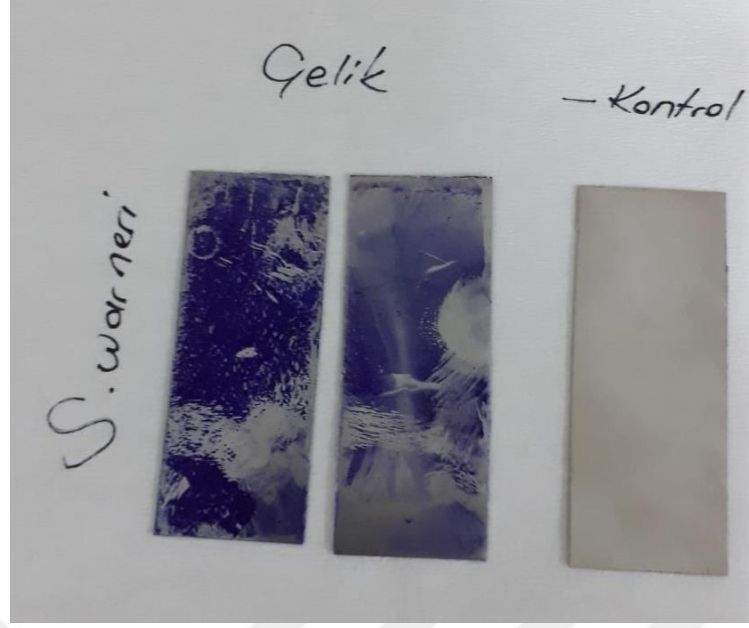
Bakteri	Cam	Fiberglas	Çelik	Ahşap
<i>S. warneri</i>	+++	+++	+++	+
<i>A. sobria</i>	++	++	++	+
<i>V. anguillarum</i>	++	++	++	+
<i>F. psychrophilum</i>	+	+	+	+
<i>Y. ruckeri</i>	+	+	+	+



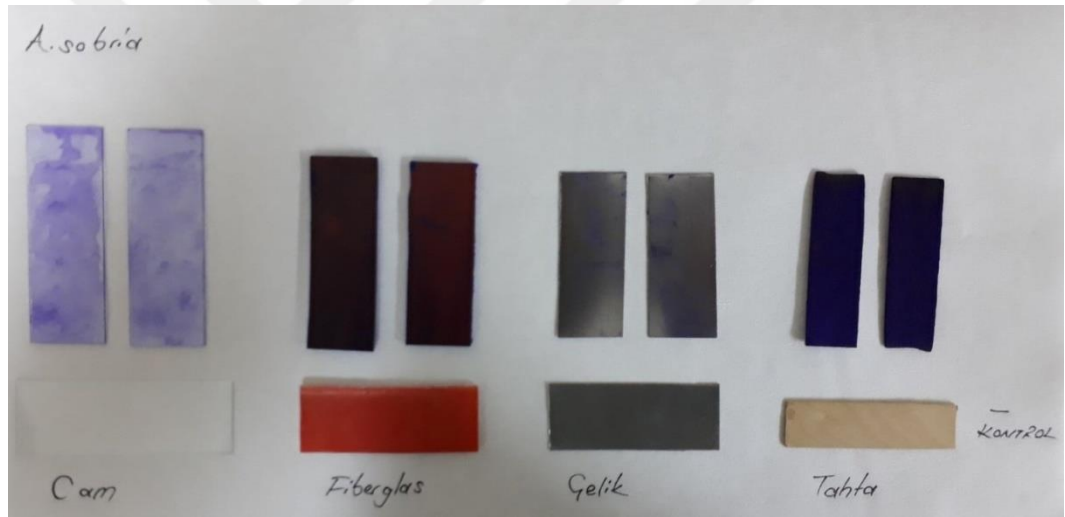
Şekil 4.21. *S. warneri*, *A. sobria*, *V. anguillarum*, *F. psychrophilum* ve *Y. ruckeri* suşlarının cam, fiberglas, çelik ve tahta materyallerinde biyofilm oluşturmaları



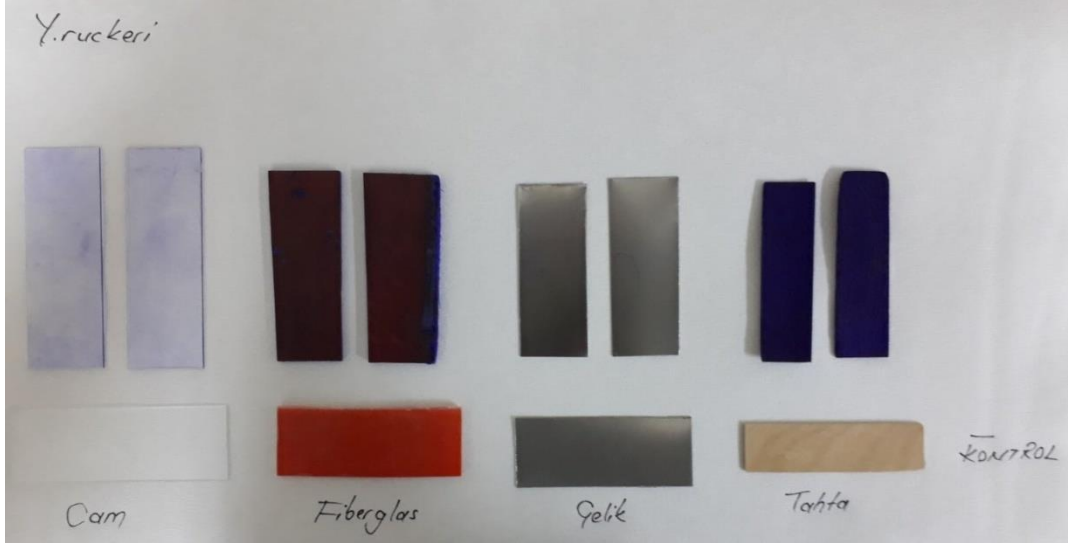
Şekil 4.22. *S. warneri*'nin cam, fiberglas, çelik, tahta gibi farklı materyallerde biyofim oluşturmaları



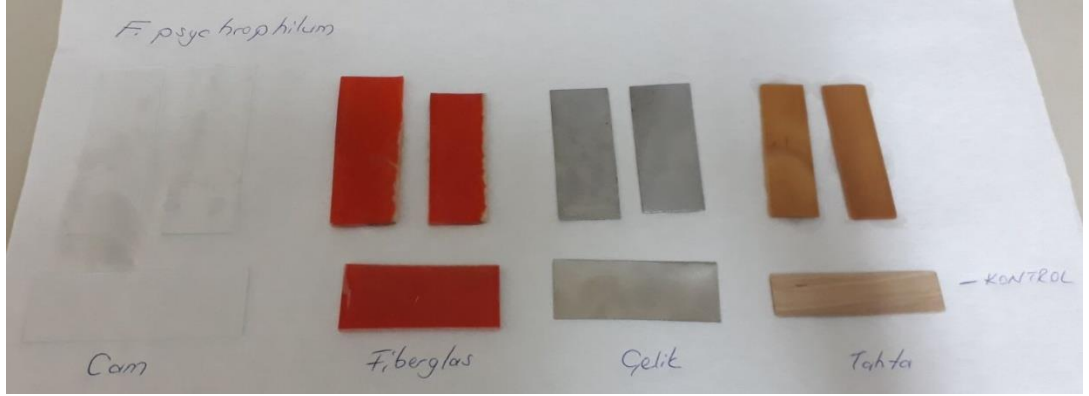
Şekil 4.23. Çeliğe en güçlü tutunmayla *S. warneri*'de biyofilm oluşumu



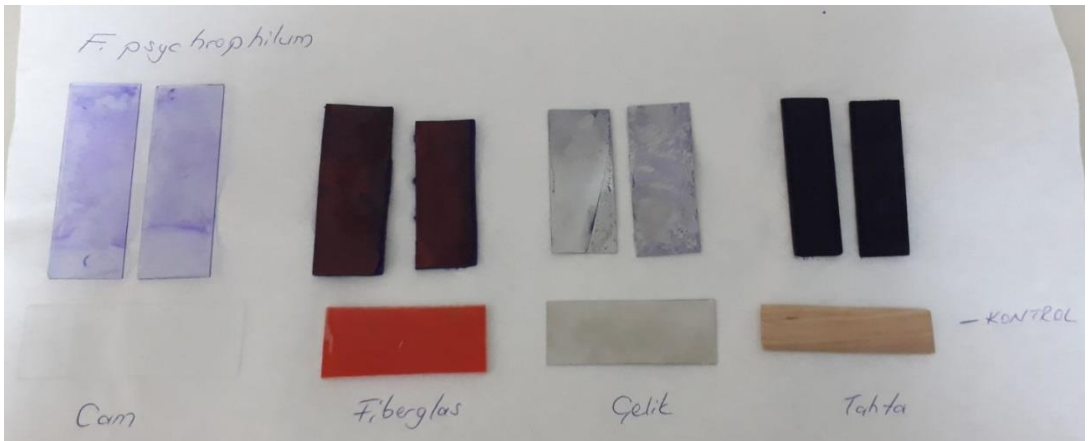
Şekil 4.24. *A. sobria*'nın cam, fiberglas, çelik, tahta gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturması



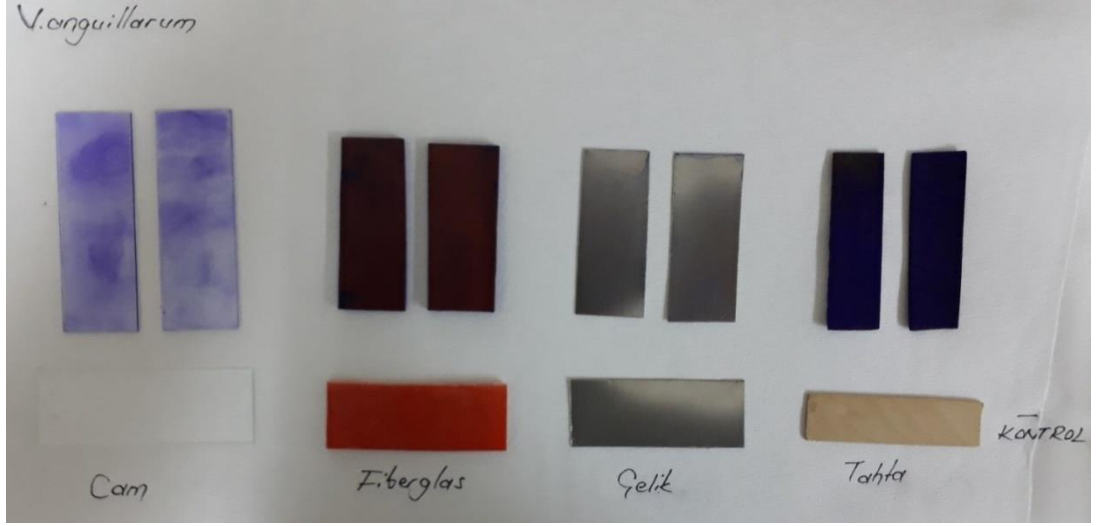
Şekil 4.25. *Y. ruckeri*'nin cam, fiberglas, çelik, tahta gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturması



Şekil 4.26. *F. psychrophilum* araştırılmasında kristal viyole ile boyama öncesi farklı materyaller



Şekil 4.27. *F. psychrophilum*'un kristal viyole ile boyama sonrası cam, fiberglas, çelik, tahta gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturması



Şekil 4.28. *V. anguillarum*'un cam, fiberglas, çelik, tahta gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturması

5. TARIŞMA VE SONUÇ

Biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyotiklere, planktonik formlarına göre 100-10000 kat daha dirençli oldukları bilinmektedir (Szczyka ve Kaznowski, 2014).

Bakteriler canlı ve cansız yüzeylere tutunur ve hücre dışı polimerlerden meydana gelen biyofilmleri oluştururlar. Bu durumda, mikroorganizmalar antimikrobiyal tedaviye yüksek derecede direnç gösterir ve yüzeye kuvvetli bir şekilde bağlanır. Biyofilmlerin antimikrobiyal ilaç direncindeki rolü araştırılmalı ve biyofilm kontaminasyonu hasta balık enfeksiyonu arasındaki bağlantı tespit edilmelidir (Donlan, 2002).

Biyofilm bakterilerinin konvensiyonel yöntemlerle (antibiyotikler, dezenfektalar, biyositler, antimikrobiyal ajanlar gibi) öldürülmesi genellikle etkili olamamaktadır. Antimikrobiyallerin yüksek dozları gerek çevresel (çevresel döngüleri olumsuz yönde etkiler) gerekse klinik açıdan (hasta balıklar üzerinde toksik etki gösterirler) tercih edilmemektedir. Biyofilmi tamamen yok etmenin klasik yöntemlerle mümkün olamayacağı açıktır. Kontamine tüm klinik aparatlarda biyofilm oluşumunun kaçınılmaz olduğu, oluşan EPS'nin ve biyofilmin, bakterileri kalkan gibi koruyacağı ve bakterilerin biyofilm yapısına katıldığında genetik değişimlere uğrayabilecekleri şüphesizdir. Klinik olarak antibiyotiklerin bilinçsiz ve gereksiz kullanımlarının patojenik biyofilm organizmalarının neden olduğu infeksiyonların inatçılıklarını arttırıcı özellik göstereceği kaçınılmazdır (Ceyhan, 2008).

Bakteriler bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak yapıştıklarında ve yapışmayı kolaylaştıran ve yapısal bir matris sağlayan hücre dışı polimerler oluşturduklarında, mikrobiyal biyofilmler gelişir. Bu yüzey inert, cansız bir materyal olabileceği gibi canlı bir doku da olabilir. Biyofilmle ilişkili mikroorganizmalar, üreme hızları ve antimikrobiyal tedavilere karşı direnç gösterme özellikleri açısından planktonik organizmalara göre farklı davranmakta ve dolayısıyla balık sağlığı hususunda sorun oluşturmaktadır (Donlan, 2002).

Biyofilm kültürü ve ölçümü için birkaç farklı yöntem geliştirilmiştir (Deighton vd., 2001; Arciola vd., 2002; Harraghy vd., 2006). Bu yöntemlerden; tüp testi (Mathur vd., 2006), mikroplak testi (Stepanovic, 2000), radiolabeling mikroskopi (Deighton vd., 2001) ve kongo red agar testi (Arciola vd., 2002) gibi testler biyofilm tayini için kullanılmaktadır. Fakat mikroplak metodu biyofilm incelenmesi için yapılan ölçümlerde diğerleri arasında en sık kullanılanıdır (Stepanovic vd., 2007).

Leroy vd., (2008) biyofilm oluşturucu deniz mikroorganizma veya makroorganizmalarının dirençliliklerinden dolayı, öldürülmesinden ziyade enzimatik olarak biyofilm matriksin (EPS'nin) parçalanması ile adhezyonun inhibisyonunu önermiştir. Hücre dışı polimerik matriksin yapışkanlığının enzimatik olarak giderilmesiyle biyofilm kontrol stratejilerinin mümkün olabileceği kinetik bir modelin önerildiği modelleme çalışmasıyla da ortaya koymuşlardır.

İlk birkaç saniye yani dokunma anı, enfeksiyonlar için genellikle kritiktir. Prof. Urs Jenal liderliğindeki Biozentrum ekibi, bakterilerin bir yüzey üzerinde olduklarını nasıl algıladıklarını ve kritik olan ilk birkaç saniyede tam olarak neler olduğunu keşfetmiştir. Bu ifadeden yola çıkarak adezyonun varlığı bu araştırma da ortaya konmaktadır. Adezyon testinde *V. anguillarum*'un, *A. sobria*'nın, *S. warneri*'nin, *Y. ruckeri*'nin, *F. psychrophilum*'un adezyon oluşturduğu bulunmuştur. Bir saatlik yüzey yapışma gücü *F. psychrophilum*'da diğer patojenlere oranla çok güçlü saptanmıştır.

Sundell ve Wiklund (2011) *F. psychrophilum* direncini araştırmışlar ve *F. psychrophilum*'un biyofilm oluşturduklarını kanıtlamışlardır. *F. psychrophilum* enfeksiyonunda patojen bakterileri barındıran dirençli biyofilmleriyle ve tekrarlayan enfeksiyonlarla daha karmaşık hale gelebildiğini bildirmişlerdir. Bu tez araştırmasında da *F. psychrophilum*'un biyofilm oluşturduğu tüp testinde ve mikroplak testinde kanıtlanmıştır.

Duru (2016) *F. psychrophilum* suşlarının biyofilm ve adezyon yeteneğine sahip olduğunu tespit etmiştir. Bu araştırma da *F. psychrophilum* suşlarında adezyon ve biyofilm oluşumu tespit edilmiştir.

Bakteri pilileri doku hücreleri gibi katı yüzeylerde tutunmayı kolaylaştıran ve birçok patojen bakteride önemli bir virülens faktör olduğu bilinen ekstraselüler bir organeldir. Gram negatif bakterilerde tanımlanan dört tip piliden yalnız tip IV pili tutunma ve bakterinin virülens özelliğinden sorumludur (Ormancı, 2010). Tip IV pilusunun tutunmada kritik bir önemi olduğu görülmüştür (Kirov vd., 1996). Bu konuda yapılan son çalışmalar *Aeromonas*'ların flagellalarının yüzeylerde biyofilm oluşturmasını kolaylaştırdığını göstermiştir (Gavin vd., 2002; Gavin vd., 2003; Rabaan vd., 2001). Söz konusu açıklamalardan yola çıkıldığında çalışmamızda da *A. sobria*'da güçlü biyofilm oluşumu tespit edilmiştir.

Hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunun incelendiği çalışmada ve *A. veronii biovar sobria*'da, *A. hydrophila* ve *A. caviae*'ya göre daha yüksek oranda biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir (Gavin vd., 2003). Tez çalışmamızda da aynı durum söz konusu olup *A. sobria*'da biyofilm oluşumu tespit edilmiştir.

Biyofilm oluşumunun makroskobik saptanmasında kongo red agar yöntemi sıklıkla kullanılan, görsel sonuçlara dayalı bir yöntem olduğunu ifade edilmiştir (Aslan, 2015). Bu yöntemin ilk olarak Freeman vd., (1989) stafilkoklar üzerinde biyofilm üretiminin araştırılmasında kullanıldığını da ifade etmiştir. Araştırmamız da kongo red agar testinde balık patojenlerinin makroskobik incelemelerinde *A. sobria*, *S. warneri* ve *V. anguillarum* suşlarının siyah pigment oluşturmalarıyla biyofilm oluşturdıkları bulunmuştur.

Ormancı (2010) yaptığı çalışmada mikropalak yöntemiyle yapılan biyofilm çalışmasında *Aeromonas*'ların tür bazında tutunmalarına baktığında, kuvvetli pozitif değerlerde en fazla tutunma balığın deri, solungaç ve bağırsağından izole edilen *A. veronii biovar sobria*'da olduğunu bildirmiştir. Biyofilm ölçümü için yaptığı tüp testinde *A. veronii biovar sobria* %61,43 ile yüksek kuvvetli pozitif biyofilm oluşumunda birinci sırada yer aldığını ifade etmişlerdir. Biyofilm ölçümü için diğer test olan kongo red agar testi ile de tayin etmiş ve sonuçta *A. veronii biovar sobria* izolatlarının %59,37 kuvvetli pozitif biyofilm oluşturduğunu bildirmiştir. Tez çalışmamızda da aynı durum görülmüş ve çalışılan patojenler arasında en güçlü sonucu kongo red agarda siyah koloni

oluşturarak *A. sobria* vermiştir. Tüp testinde ise *A. sobria*'da (++) yorumuyla güçlü biyofilm oluşumu saptanmıştır.

Jahid vd., (2013) *A. hydrophila*'nın çeşitli glikoz konsantrasyonlarına yanıt olarak biyofilm oluşturup oluşturmadığını araştırmışlardır. Bu çalışmada tüp yönteminde glikoz kullanılmıştır ve *A. sobria*'da biyofilm oluşumu (++) derecesiyle pozitif bulunmuştur.

Musharrafieh vd., (2014) yaptıkları çalışmalarında *V. anguillarum*'un *S. warneri* varlığında veya yokluğunda gökkuşağı alabalığı pulları üzerinde biyofilmler oluşturmasını incelemişlerdir. Sonuçta, *S. warneri*'nin varlığında, *V. anguillarum*'un biyofilm oluşturabildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte *S. warneri* patojenin *V. anguillarum*'un büyümesi ve biyofilm oluşturması için bir katalizör görevi görerek enfeksiyon başarısını artırdığını bildirmişlerdir. *S. warneri* ve *V. anguillarum* suşlarının biyofilm oluşturmaları bu tez araştırmasında kanıtlanmıştır.

Bakteriyofajlar potansiyel olarak bakteriyel patojenleri kontrol etmek için kullanılabilir; bununla birlikte, fajların başarılı bir şekilde uygulanması hem serbest yaşayan hem de yüzey ile ilişkili büyüme koşulları altında faj-konak etkileşimlerinin ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasının gerektiği bildirilmiştir (Tan vd., 2015). Mikro koloniler, biyofilmler ve serbest alıcı hücrelerde büyüme sırasında iki farklı *V. anguillarum* suşunda (BA35 ve PF430-3) *in vitro* faj-konak etkileşimlerini araştırıldığı çalışma da vibriyofaj, ΦH20 (Siphoviridae) ve KVP40 (Myoviridae), biyofilm gelişimi üzerinde tamamen farklı etkilere sahip olduğunu görmüşlerdir.

Nurcan (2010) yaptığı çalışmada, *V. anguillarum*'un mikroplak yönteminde biyofilm oluşturması bu çalışmayı desteklemektedir.

Černohorská ve Votava (2004), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *S. warneri* suşları üzerinde yaptıkları araştırma da bu suşların tamamının biyofilm oluşturdıklarını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da incelenen *S. warneri*'de de aynı durum söz konusu olup biyofilm oluşturduğu görülmüştür.

Lee vd., (2003) sucul canlılar, tekne, kaya, alg, ağların düğüm kısımlarında oluşan biyofilmlerden *S. warneri* izole ettiklerini açıklamışlardır. Bu çalışmada olduğu gibi *S. warneri*'nin biyofilm oluşumu birçok çalışmada (Altuğ vd., 2007; Demirel, 2012; Cai ve Arias, 2017; Coquet vd., 2002) rapor edilmesiyle desteklenmektedir.

Staphylococcus epidermis bakterisinin hücre içi polisakkarit ürettiğini bu şekilde yüzeye tutunup mikrokoloni geliştirip olgun biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır (Gerke vd., 2008). Araştırmamızda da *S. warneri*'nin tüp yöntemi, kongo red agar yöntemi ve mikropalak yöntemlerinin tamamında biyofilm oluşturduğunu kanıtlanmıştır.

Yildiz ve Visick, (2009) *Vibrio* türlerinden, *cholerae*, *parahaemolyticus*, *vulnificus* ve *fischeri*'deki biyofilm oluşumunu karşılaştırdığı çalışmalarında, çok yönden aynı olduğunu fakat farklılıklar da gösterdiğini bildirmiştir. Biyofilm ile koloni morfolojisi arasında bir korelasyon olduğunu belirterek biyofilm üreten hücrelerin koloni yapılarının kıvrımlı ya da akışkan olabileceğini bildirmişlerdir. Biyofilmin matriks kimliğini tespit etmek için kolonideki değişimlere bakıldığını rapor ederek kongo red agar yönteminde koloninin renginin önemini vurgulamıştır. Bu çalışma baz alındığında araştırmamızda da *V. anguillarum* kolonisinin renginin kongo red agar testinde siyah olması bu bakterinin biyofilm oluşturduğunu göstermiştir.

Abdallah vd., (2009) *Vibrio alginolyticus* ve *V. parahaemolyticus* suşlarının fenotipik slime (yapışkan madde) üretimi congo red agar plate testiyle araştırmışlardır. Ayrıca abiyotik yüzeylere ve Vero cell-line (hücre hatlarına) yapışma yeteneklerini incelemişlerdir. Sadece *V. alginolyticus* ATCC 17749 suşu congo red agar plakasında slime üreten siyah koloniler geliştirdiğini rapor etmişlerdir. Yapışmanın ise *V. alginolyticus* suşlarında *V. parahaemolyticus* suşlarına göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez araştırmasında da congo red agarda *V. anguillarum*'un siyah koloni oluşturarak slime ürettiği tespit edilmiştir.

Bitki esansiyel yağları yüzlerce yıldır bakteri, mantar ve virüs gibi çok sayıda patojenle savaşmak için doğal ilaçlar olarak kullanılmaktadır. Esansiyel yağlar,

hücre duvarı ve membrana zarar vererek, hücre lizisine, hücre içindekilerin sızıntısına ve proton kuvvetinin önlenmesine yol açarak antimikrobiyal etkinlik kazandırır. Buna ek olarak, bakterinin direnç kazanmadan etkili bir şekilde öldürdüğüne dair kanıtlar vardır. Son olarak, pek çok uçucu yağın elde edilmesi nispeten kolaydır, suda ve toprakta çabucak bozunmasından dolayı çevre dostudur (Kavanaugh ve Ribbeck, 2012).

Al-Shuneigat vd., (2005) kateter ucundan izole edilen *S. warneri*'de OD 490 nm'de $0,323 \pm 0,098$ biyofilm oluşumunu tespit etmişlerdir. Tez araştırmamızda *S. warneri* suşunda biyofilm oluşumu pozitif kaydedilmiştir. Polytoxinol™ (PT) *Eucalyptus globulus* (Mavi Okalıptüs), *Melaleuca alternifolia* (Hint Defnesi), *Thymus sp.* (Kekik), *Syzygium aromaticum* (Karanfil) ve turunçgillerden buharla saflaştırılmış hidrokarbon (ağırlıklı olarak monoterpenoid ve phenylpropanoid) içeren antiseptik formülasyonda olup bütildihidroksitoluen, triklozan denatüre edilmemiş etanol içeren bir üründür. Polytoxinol™ (PT) ürünün *S. warneri*'nin polistiren yüzeylerde adezyonunu önemli ölçüde azalttığını ve biyofilm oluşumunu önlediğini bildirmişlerdir. Tez araştırmamızda kekik yağı tek başına kullanılmış ve *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* suşları üzerinde antibiyofilm etkisi bulunmuştur.

Bu tez araştırmamızda lizozim, malik asit, sarımsak yağı, kekik yağı maddelerinin çok etkili bir biyofilm inhibisyon maddesi olduğu tespit edilmiştir. Bu maddeler mikroplaklardaki bakterilerin üremesine engel olduğu için biyofilm tabakası oluşmamıştır. Su ürünlerinde enfeksiyonlara neden olan *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* bakterilerine karşı lizozim, malik asit, sarımsak yağı, kekik yağı maddelerinin *in vitro* etkisi net olarak görülmüştür.

Farklı patojenlere uygulanan çalışmalar balık patojenleri için bu tez kapsamında araştırılmıştır.

Sert 2014'de yüzey üzerinde biyofilm oluşumunu engellemek için kullanılan alternatif yaklaşımlardan bir tanesinin de enzimlerin kullanılması olduğunu ifade etmiştir. Biyofilm oluşumunu engellemek için kullanılan toksik kimyasallar ile kıyaslandığında enzimlerin önemli bir üstünlüğü, enzimlerin çevreye zarar

vermemesi olduğunu belirtmiştir. Farklı tür mikroorganizmalar belirli bir yüzeye bağlanmak için farklı polimerler kullanmalarına rağmen yapılan çalışmalarda ticari olarak satılan proteazların biyofilm oluşturan mikroorganizmaların yüzeye bağlanma olasılığını düşürdüğünün tespit edildiğini de belirtmiştir. Ayrıca lizozim ve polietilen glikolün kovalent olarak yüzeye bağlandıklarında yüzeyin antibakteriyel ve antiyapışma özellikler gösterdiği tespit edilmiştir. Tez araştırmamızda da lizozim tüm bakteriler üzerinde etkili olmuş ve biyofilm oluşumunu engellemiştir.

Lizozim ticari olarak kullanım alanına sahip olan tek antimikrobiyal enzim olarak bilinmektedir. Özellikle Gram pozitif bakterilerde, hücre zarının en önemli yapısı olan peptidoglikan tabakadaki β -1,4-glukozidik bağları hidrolize etmesi suretiyle, hücre zarının yapısal bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır (Gill ve Holley, 2000).

Lizozim ve nisin gıda sektöründe gıda patojenlerine karşı kullanılan en önemli biyokoruyucu maddeler arasında yer almaktadır. Nisinin peynirlerde anaerobik spor oluşturan bakterilerde gelişimi engellediği, laktik asit bakterilerinin yoğurtta gelişimini sınırlayarak raf ömrünü uzattığı, *C. botulinum* ve bozulmaya neden olan birçok bakterinin konserve gıdalar ile küflenmiş et ve balıklarda gelişiminin engellenmesinde, alkollü içeceklerden birada bozulmaya neden olan laktik asit bakterilerinin inhibisyonunda kullanıldığı bildirilmiştir (Ünlütürk, 2003).

Caro vd., 2009'da iki tip makromolekülün PEI (poly ethylene imine) modifiye paslanmaz çelik yüzeylere kimyasal grafitlanması (aşılması) sağlanmışlardır. Glikozidaz Tavuk Yumurtası Beyaz Lizozim'i (Hen egg white lysozyme, HEWL) ve PEG'yi (Sentetik Polimer Poli (Etilen Glikol)) içeren ince filmler, PM-RAIRS (Kutuplaşmanın Modülasyonu ile Yansıma-Emme Kızılötesi Spektroskopisi) ve XPS (X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi) vasıtasıyla karakterize etmişlerdir. Enzim ile kaplanmış ("İmmünolojik" yüzeyler) yüzeyler, çıplak paslanmaz çelik yüzeyi ile karşılaştırıldığında *Listeria ivanovii*'ye karşı yüksek antiyapışma aktivitesi göstermiştir. Ayrıca, *Micrococcus luteus* süspansiyonlarında belirgin bir biyosit etkinliği ölçülmüştür. *L. ivanovii* yapışmasında PEG ile kaplanan yüzeylerde çıplak yüzeye göre %96 azaldığını görmüşlerdir. Sonuç olarak, PEI

ile kaplanmış paslanmaz çelik yüzeye HEWL, PEG veya PEG+HEWL katmanlarının aşılması bu yüzeylere protein/bakteri yapışmasını önemli ölçüde azalttığını ve antifouling ajanlar olarak ilginç bir perspektif olabileceğini rapor etmişlerdir. Araştırmamızda da lizozimin bakterilerin biyofilm oluşumunu engellediği görülmüştür.

Sudağdan ve Aydın, 2013'de yaptıkları bir çalışmada lizozimin *S. aureus* suşlarına karşı etkisiz bir biyokoruyucu olduğu ve gelişimi üzerine etkisi olmamasına rağmen biyofilm yapımını tetikleyici bir rolü olduğunu bulmuş, nisinin yüksek konsantrasyonlarda bakteri gelişmesi üzerine inhibisyon etkisinin yanında biyofilm yapımını da azalttığını belirlemişlerdir. Lizozimin tek başına kullanımının yeterli olmayacağı, dirençli suşların inhibisyonu için yüksek miktarlarda nisine veya diğer biyokoruyucu maddeler ile kombine edilebileceğini iddia etmişlerdir. Araştırmamızda lizozimin tek başına kullanılması bakteriyel balık patojenlerinde etkili olmuş ve biyofilm oluşumunu durdurmuştur.

Singla vd., 2014'de son yıllarda yapılan bir çalışmada %2 malik asitin 2 ppm ozon ile birlikte kullanımının gıda temaslı plastik ve PVC (polivinil karbon) yüzeylerde *Salmonella typhimurium*'un oluşturduğu biyofilmlerin kontrolü için etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bu patojene etki eden malik asit *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* suşlarına etki ederek biyofilm oluşumunu engellemiştir.

Kökümer ve Yeşilçimen Akbaş (2016) %10 (w/v) malik asit uygulaması polistren yüzeylerde biyofilm oluşumunun en fazla %47 oranında önlendiğini, oluşan biyofilmin de en fazla %85 oranında ortadan kaldırıldığını; paslanmaz çelik yüzeylerde, biyofilm oluşumunun en fazla %79 oranında önlendiği, oluşan biyofilmin de en fazla %95 oranında ortadan kaldırıldığını belirlemişlerdir. Malik asit ve klor uygulamalarının biyofilmler üzerindeki etkileri hem polistren hemde çelik yüzeylerde incelemişlerdir. Malik asit uygulamalarının, *S. aureus* biyofilmlerini klor uygulamasından daha etkin bir şekilde engellediğini ve ortadan kaldırdığını belirtmişlerdir. Araştırmamızda malik asit uygulamasının *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* suşlarına etki ederek biyofilm oluşumunu engellediği belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında da, antibakteriyel özelliği iyi bilinen sarımsak yağının bakteriyel balık patojenleri üzerinde antibiyofilm etkisinin olup olmadığı incelenmiştir.

Sarımsak özsuyunun *S. aureus*, *Brucella abortus*'un üretimini inhibe ettiğini, alisinin 1/125000 lik konsantrasyonda *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, basil ve vibriolara etkili olduğu bildirilmiştir. Benzer çalışmalarda sarımsak ekstresinin disk tekniği ile *P. aeruginosa* haricinde birçok bakteriye etkili olduğu saptanmıştır. Alisin antibakteriyel etkisinin Asetil CoA sentetazı inhibe etmek suretiyle asetik asitten asetil CoA oluşumunu önlemesi ve lipit sentezi blokajıyla olduğu öne sürülmüştür. Sarımsak ekstreleri, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Candida albicans* ve *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* gibi birçok mantara etkili bulunmuştur. Dermatofitlerin değişik türleri 130-200 mg/l alisin konsantrasyonlarında inhibe edilmişlerdir. İnhibe edilmiş dermatofitler mikroskopik olarak incelendiğinde, hücre bozulması ile birlikte sitoplazma boşalması, hücre balonlaşması gibi morfolojik değişiklikler görülmüştür. Sarımsak ekstrelerinin *In vitro* tavşan deri hücrelerinde *Herpes simplex* virüs Tip I ve civciv embriyo *H. influenza B* virüsünün infektivitesini anlamlı olarak azalttığı bildirilmektedir (Ankri ve Mirelman, 1999; Focke vd., 1990; Sokemn vd., 1999; Tazıcı, 1996; Özçelik vd., 2007). Bu tez çalışmasında da benzer olarak *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* suşlarında sarımsak yağının biyofilmi engellediği görülmüş ve antibiyofilm etkisi bulunmuştur.

Biyofilm oluşumu bakterinin bir substrata yapışması ile başlar, bu nedenle biyofilm oluşumunu anlayabilmek ve böylece konağın enfeksiyonunu önlemek için farklı substratlarda bakteri adezyonunun arkasındaki mekanizmaları araştırmak önemlidir (Klemm vd., 2010).

Characklis vd., (1990) yüzey pürüzlülüğü arttıkça mikrobiyal kolonizasyonunda arttığını göstermişlerdir. Howell ve Behrends 2006, mikrobiyal yapışma ile yüzey pürüzlülüğü arasındaki pozitif ilişkiyi rapor etmişlerdir. Bunun sebebini yüzey geriliminin azalması ve pürüzlü yüzeylerde yüzey alanının daha fazla olmasıyla açıklamışlardır. Cam gibi yüzeyler yüksek yüzey enerjisine sahip olduklarından daha hidrofilitirler.

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarında biyofilm oluşturacakları yüzeyin yapısı, hidrofilik veya hidrofobik karakterde oluşu önemlidir. Yüze yapışarak biyofilm oluşturabilme, aynı zamanda bir bakterinin sahip olduğu yüzey yapılarının karakteristiği ile de ilgili olabilir (Williams ve Fletcher, 1996).

Veenstra vd. (1996) "slime" olarak adlandırılan biyofilm bakterilerin birçok yüzeye tutunmasını sağladığını bildirmişlerdir. Slime faktörünün mikroorganizmanın plastik ve metal yüzeylere yapışmasını arttıran ve fagositozunu önleyen bir faktör olduğunu belirtilmiştir (Güler vd., 2005). *S. warneri*, *A. sobria* ve *V. anguillarum* bakterilerinin CRA testinde siyah pigment ürettiği ve ilgili referansların belirttiği gibi tez araştırmamızda da çelik yüzeye yapıştıkları tespit edilmiştir.

Lynch vd., (2002) *A. hydrophila* AH-1N biyofilmlerini paslanmaz çelikte büyütmüşler ve büyüme hızları ve gelişim özelliklerini incelemişlerdir. *A. hydrophila*'nın ilk 8 saat boyunca tutunduğunu ve bakterilerin paslanmaz çelik yüzeyine genel olarak tutunabildiklerini bildirmişlerdir. Araştırmamız da *A. sobria*'nın çeliğe yapışarak biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir.

Cai ve Arias, (2017) yayın balıklarında enfeksiyona neden olan bakteriyel patojenlerin yüzeye adezyonunu ve kolonize olmasını araştırmışlardır. Aynı zamanda biyofilm oluşturmalarında kalsiyumun rolünü de incelemişlerdir. *F. columnare*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *E. tarda* ve *E. piscicida* patojenlerinin polistiren plaklara yapışarak biyofilm oluşturmasını araştırmışlardır. Kalsiyum *F. columnare* ve *A. hydrophila*'da biyofilmi oldukça artırmıştır. Test ettikleri *Edwardsiella* türlerinde biyofilm oluşumunu düşük olarak belirlemişler ve kalsiyumunda herhangi bir etkisinin olmadığını rapor etmişlerdir. *F. columnare*'nin PVC yüzeyde ve ağlarda biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır. Bambuda *F. columnare*'nin adezyon oluşturmadığını ve hücre gelişimini engellediğini bildirmişlerdir. *A. hydrophila* ve *E. ictaluri* suşlarının test edilen tüm materyallerde biyofilm oluşturduğunu belirlemişler, substratlar arasında önemli farklılıklar olduğunu bulmuşlardır. *E. ictaluri* suşunun mikrotiter polistiren plakaları üzerinde biyofilm oluşturmadığını gördükleri halde, test edilen tüm su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan materyallerde kolonileşme ve çoğalma kabiliyetine sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Elde

edilen sonuçlara göre, bakteriyel patojenlerinin balık çiftliklerindeki materyallerde yüzeyleri kolonize etme potansiyeline sahip olduğunu ve biyofilmi patojen rezervuarları olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu tez kapsamında da bakteriyel balık patojenlerinin yetiştiricilikte oldukça fazla kullanılan ahşap, metal, fiberglas, cam gibi yüzeylerde kolonileşmesinin oldukça fazla olduğu ve biyofilm oluşumunun çok güçlü kendini gösterdiği belirlenmiştir.

Högfors-Rönholm vd., (2015) patojenik *F. psychrophilum*'un pürüzsüz polistiren yüzeylere daha yapışkan olduğunu bildirmiştir. Bu tez kapsamında *F. psychrophilum*'un pürüzsüz olan cam yüzeye yapışması net olarak belirlenmiştir. Ancak çelik yüzeye yapışmanın daha az olduğu tespit edilmiştir.

Coquet vd., (2002) bir balık patojen bakteri olan *Y. ruckeri*'nin iki suşunun, balık çiftliklerinde yaygın olarak bulunan dört materyal olan ahşap, beton, polivinilklorür (PVC) ve fiberglas üzerine yapışma kabiliyetine göre karakterize etmişlerdir. Yapışma, bakteri ve destek hidrofobiklikleri ile yüzey pürüzlülüğü arasındaki ilişkileri araştırmışlardır. Sonucunda *Y. ruckeri* güçlü bir hidrofilitir yani bir molekülün hidrojen bağları kurarak suya bağlanabilme özelliğine sahip olma özelliği kanısına varmışlardır. Referansa kıyasla daha yüksek bir yapışma kabiliyeti sergilediğini ifade etmişlerdir. İki suş içinde, destek maddesinin pürüzlülük genliği ile yapışma kabiliyeti arasında güçlü bir korelasyon gözlemişlerdir. *Y. ruckeri*'nin azda olsa fiberglasa tutunduğu araştırmamızda da belirlenmiştir.

Coquet vd., (2002) Fransa'daki balık çiftliklerinde *Y. ruckeri*'nin varlığını araştırmışlardır. *Y. ruckeri* esas itibariyle sudan ziyade alg ve sediment örneklerinden izole etmişlerdir. Yirmi iki *Y. ruckeri* suşu elde edilmişler ve bu suşların katı maddelere yapıştığını ifade etmişlerdir. *Y. ruckeri* biyofilmlerinin balık tanklarının yüzey kolonizasyonunda sürekli tekrarlayan enfeksiyon kaynağı olabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmamızda *Y. ruckeri*'nin fiberglasa azda olsa tutunduğu tespit edilmiştir. Balık tanklarının materyalinin daha çok fiberglas olması nedeniyle *Y. ruckeri*'nin tehlikesi araştırmamız da vurgulanmıştır.

Altuğ vd., 2007, deniz ortamında kullanılan materyallerden olan ahşap, galvaniz, sac, paslanmaz çelik, pamuk halat, cam ve alüminyum materyalleri üzerinde oluşan bakteriyel biyofilm tabakasında bulunan bakteri düzeylerini araştırmışlardır. En yüksek bakteri düzeyi pamuk halatta gözlenirken bunu ahşap, alüminyum, sac, cam, paslanmaz çelik ve galvanizin takip ettiğini belirtmişlerdir. Materyallerde tespit edilen bakteri düzeyinin deniz suyundakinden yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmamızda da benzer durum söz konusu olup patojenlerin yetiştiricilik ortamlarında kullanılan materyallere yapışarak biyofilm oluşturdukları bulunmuştur.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde biyofilmle mücadele de etkin koruma yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İletişim, tüm canlılarda olduğu gibi bakterilerde de çok etkin bir olgudur. Bakteriler salgıladıkları AHL molekülleri aracılığıyla iletişim kurarak bakteri-bakteri anlaşmasını sağlamaktadırlar. Bunun neticesinde de enfeksiyon oluşturan virülens faktörlerinin kritik gen ekspresyonlarını gerçekleştirmektedirler. Burada ki en önemli virülens faktörü son zamanlarda fenomen olan biyofilmdir. İletişimin gücüyle mikroorganizma virulent olmakta, klinik biyofilm oluşturmayla balık üzerinde ölümcül olmaktadır. Biyofilmin temeli olan QS'nin başarısız bir sistem haline getirilmesi bakteri için çok büyük bir kayıp olacaktır. Bu esasla QS'in durdurulması devamında da hastalığı daha da güçlü hale getiren zararlı biyofilm gücünün hiç var olmaması su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalıktan korunmanın alternatif bir metodu olarak önerilebilir.

Biyofilm enfeksiyon oluşum sürecinde bakteriye ciddi bir etkinlik kazandırmaktadır. Biyofilm oluşturan bakteriler yüzeye kuvvetli bir şekilde bağlanır ve antimikrobiyal tedaviye yüksek derecede direnç gösterirler. Bu nedenle bakteriye güç katan ve oldukça tehlikeli olan biyofilmlerin hasta balık enfeksiyonlarında antimikrobiyal ilaç direncindeki rolünü araştırmalı ve biyofilm kontaminasyonu hasta balık enfeksiyonu arasındaki bağlantı tespit edilmelidir. Biyofilm içine antibiyotikğin düşük orandaki penetrasyonu, burada besin maddelerinin sınırlı olması, yavaş üreme ve adaptif stres yanıtının oluşu, bakterinin çok aşamalı savunmasını oluşturmaktadır. Aynı zamanda antibiyotikle tedavi gibi mevcut tedavi yöntemleri kimyasal olduğu için balık

üzerinde etki de bırakmaktadır. Balığın tedavi sürecinde vücudunun iyileşme sürecini hızlandıracaktır. Bu nedenle hasta balık üzerinde yorucu eski yöntemler yerine yeni, daha hızlı, kimyasal odaklı olmayan antibiyofilm yaklaşımları dikkat çekmektedir.

Araştırmacılar biyofilmlerin ölçümü için daha güvenilir teknikler ve kontrol stratejilerinin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere daha iyi model sistemleri geliştirdikçe, daha etkili biyofilm kontrol stratejilerinin ortaya çıkması beklenmektedir. Ayrıca, biyofilmlerin antimikrobiyal ilaç direncindeki rolü araştırıldıkça ve biyofilm kontaminasyonu ile hasta balık enfeksiyonu arasındaki bağlantı daha iyi kuruldukça, biyofilmlerin yetiştiricilik sağlığındaki önemi konusunda daha net bir tablonun ortaya çıkacağına inanılmaktadır.

Balık patojenlerinin ahşap, metal, fiberglas, cam üzerinde güçlü biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Yetiştiricilik ünitelerinde çokça kullanılan bu dört materyalde bu denli güçlü biyofilm oluşumunun varlığı balık sağlığı üzerinde ciddi bir tehdit unsurudur. Costerton vd., (1999) belirttiği gibi birçok çalışmada biyofilm oluşturma kabiliyetinde olan bakterilerin antibiyotiklere karşı daha dirençlidir. Antibiyotiğe direnç kazanmış birçok bakteriyel balık patojenini durdurma çalışmalarının devam ettiği bu süreçte araştırmamızda biyofilmin engellenmesi için malik asit, lizozim, sarımsak yağı, kekik yağı araştırılmış ve çok etkili bir biyofilm inhibisyon maddesi olduğu tespit edilmiştir. Antibiyotiğe direnç kazanmış bakterilerle mücadele sürecinde bu inhibisyon maddelerinin biyofilmi engellediği araştırmamızda net olarak görülmüştür. Biyofilmin engellenmesi için çalışmada kullanılan malik asit, lizozim, sarımsak yağı, kekik yağı çevreyle dost bir yaklaşımdır ve önerilmektedir. Bir sonraki adım olarak bu maddelerin ve diğer farklı maddelerin kombin kullanımının antibiyofilm açısından da güçlü etki yaratabileceğini düşünmekteyiz.

Ayrıca bakteriyel kaynaklı enfeksiyonlarda önemli bir virülens faktörü olan biyofilmi CRA yöntemiyle saptamanın pratik, güvenilir ve az maliyetli olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan bazı suşların, neden olduğu vakalarının tedavisinde, antibiyogramla birlikte CRA yönteminin kombine kullanımı, direnç gelişim mekanizmasını engelleyebilecek olan bir adım gibi gözüktüğü bazı araştırmalarda ifade edilmiştir. Örneğin Freeman vd., (1989) özel bir besiyeri

olan kongo red agarda üreyen kolonilerin özelliklerine göre biyofilm yeteneğini belirlemeye çalışan yöntemlerin de bulunduğunu bildirmiştir. Bu durumun balık hastalıkları enfeksiyonları tedavi çalışmalarında da fayda sağlayıp sağlamadığını tespit etmek için yapılacak çalışmalara bu tezdeki CRA verileri ilk adım olabilir.

Sonuç olarak *S. warneri*, *A. sobria*, *Y. ruckeri*, *F. psychrophilum*, *V. anguillarum* bakterilerinde biyofilmin varlığı, materyallere yapışma kapasitesi ve tehlike potansiyeli çalışmamızda açıkça ortaya konmuştur. Bu nedenle bu alanda çalışmaların artırılması ve inhibisyon stratejilerinin geliştirilmesi şarttır. Bu bakteriyel biyofilm inatçılığının bir sonucu olarak, klinik ilişkili biyofilm oluşumunu önlemek amacıyla klasik antimikrobiyal ajan tedavi yaklaşımları dışında daha etkili ve komplike teknolojilere gereksinim olduğu savunulmaktadır. Söz konusu biyofilm hastalıkların alt yapısını ciddi anlamda güçlendirmektedir. Bu çalışma da bakteri dünyasındaki enfeksiyon gücünün azaltılması, bakterinin kimliğinin ve doğasının çok iyi tanınması, bunun bir sonucu olarak bakteriyel güçlerden belki de en etkili olan biyofilm virülens gücünün önüne geçilmesi hedeflenmektedir. Burada esas vurgulanan amaç bakterinin daha biyofilmi oluşturmadan önce farklı yüzeylere yapışmasını engellemek onun ortamda hiç var olmamasını sağlamaktır. Biyofilm oluşturamamış bakteri enfeksiyon gücü açısından zayıf bakteridir dolayısıyla biyofilmin engellenmesinin balık hastalıklarıyla mücadelede etkin role sahip olduğu ve büyük çığır açacağı görüşündeyiz.

6. KAYNAKLAR

- Abdallah, F.B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., Bakhrouf, A., 2009. Adherence Assays and Slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Brazilian Journal of Microbiology, 40(2), 394-398.
- Akan, E., Kınık Ö., 2014. Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi. Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisi/Journal of Food ve Feed Science – Technology, 14, 42-51, 1303-3107.
- Al-Shuneigat, J., Cox, S.D., Markham, J.L., 2005. Effects of a Topical Essential Oil-Containing Formulation on Biofilm-Forming Coagulase-Negative *Staphylococci*. Letters in Applied Microbiology, 41, 52-55, doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01699.x.
- Altuğ, G., Çardak, M., Çiftçi, P.S., Gürün, S., 2007. Farklı Materyallerde Oluşan Bakteriyel Biyofilm Tabakasından İzole Edilen Aerobik Heterotrofik Bakteri Düzeyleri. Ulusal Su Günleri, 16-18 Mayıs, Antalya, Türkiye, 561-566.
- Altun, S., Onuk, E.E., Çiftçi, A., Duman, M., Büyükekiz, A.G., 2013. Determination of Phenotypic, Serotypic ve Genetic Diversity ve Antibiotyping of *Yersinia ruckeri* Isolated from Rainbow Trout, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(2), 225-232.
- Altun, H.U., Şener, B., 2008. Biyofilm İnfeksiyonları ve Antibiyotik Direnci. Derleme Hacettepe Tıp Dergisi, 39, 82-88.
- Amagase, H., Petesch, B.L., Matsuura, H., 2001. Intake of Garlic and its Bioactive Components. The Journal of Nutrition. 131, 955-62.
- Ankri, S., Mirelman, D., 1999. Antimicrobial Properties of Alicin from Garlic. Microbes and Infection, 1, 125-129.
- Anonim, 2018. *Staphylococcus warneri*. Erişim Tarihi: 07.03.2018. <http://www.wikizero.info/index.php?q=aHR0cHM6Ly90ci53aWtpcGVkaWEub3JnL3dpa2kvRG9zeWE6U3RhcGh5bG9jb2NjdXNfYXVvZXVzXzAxLm pwZw>.
- Anonim, 2018. University of Basel, Biozentrum. Erişim Tarihi: 18.09.2018. <https://www.unibas.ch/en/News-Events/News/Uni-Research/Bacteria-have-a-sense-of-touch.html>.
- Anonim, 2018. European Bioinformatics Institute. Erişim Tarihi: 07.03.2018. <http://www.ebi.ac.uk/chebi/chebiOntology.do?chebiId=CHEBI:6650>.
- Anonim, 2018. Malik Asit Nedir? Erişim Tarihi: 07.03.2018. <http://www.bilgiustam.com/malik-asit-nedir/>.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Ravaoli, S., Montanaro, L., 2015. Polysaccharide Intercellular Adhesin in Biofilm: Structural and Regulatory Aspects. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5(7), 1-10, doi: 10.3389/fcimb.2015.00007.

- Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati, M., Donati, E., Montanaro, L., 2002. Detection of Slime Production by Means of an Optimised Congo Red Agar Plate Test Based on a Colourimetric Scale in *Staphylococcus epidermidis*. Clinical Isolates Genotyped for İca Locus, Biomaterials, 23, 4233-4239.
- Aslan, H., 2015. *Candida* Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal Dyarlılığa Etkisi. T.C. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, 96s, Ankara 2015.
- Ataol, Ö., 2011., Gıda Örneklerinden İzole Edilen Staphylococcus'larda Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Dirençliliğinin Araştırılması. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 163s, Ankara.
- Auschill, T.M., Artweiller, N.B., Brex, M., Reich, E., Sculean, A., Netuschil, L., 2002. The Effect of Dental Restorative Materials on Dental Biofilm. European Journal of Oral Sciences, 110, 48-53.
- Austin, B., 1992. The recovery of *Cytophaga psychrophila* from Two Cases of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Fry Syndrome in the U.K. Bulletin European Association Fish Pathology, 12, 207-208.
- Baillie, G.S., Douglas, L.J., 1998. Effect of Growth Rate on Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents. Antimicrobial Agents Chemother, 42, 1900-5.
- Balta, F., 2016. T.C. Balık Hastalıkları. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Hastalıklar Anabilim Dalı, 109s, Rize.
- Balta, F., 1997. Kültürü Yapılan Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) Görülen *Flexibacter psychrophila* Enfeksiyonu. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 19 Eylül 1997, Eğirdir-Isparta, Cilt II, 621-648.
- Bardouniotis, E., Ceri, H., Olson, M.E., 2003. Biofilm Formation And Biocide Susceptibility Testing of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium marinum*. Current Microbiology, 46 (1), 28-32.
- Barker, G.A., Smith, S.N., Bromage, N.R. 1989. The Bacterial Flora of Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Brown Trout, *Salmo trutta* L., Eggs and its Relationship to Developmental Succes. Journal of Fish Diseases, 12, 281-293.
- Batı Kutlu, S., 2006. Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direnci Ve E -Test İle Vankomisin MIC Değerlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 126s, İstanbul.
- Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, ISBN No: 9754200211.

- Beale, D.J., Morrison, P.D., Key, C., Palombo, E.A., 2014. Metabolic Profiling of Biofilm Bacteria Known to Cause Microbial Influenced Corrosion. *Water Science & Technology*, 69, 1-8.
- Bjarnsholt, T., 2013. The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infections. *APMIS Journal of Pathology Microbiology and Immunology*, 136, 1-51.
- Bryers, J.D., 2008. Medical Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*. 100(1), 1-18, PubMed PMID, 18366134.
- Busch, R.A., 1982. Enteric Redmouth Disease (*Yersinia ruckeri*). In, Veerson DP, Dorson M, Dubpurget P (Eds), Marcel Merieox, Lyon. *Antigens of Fish Pathogens*, 201-223.
- Cai, W., De La Fuente, L., Arias, C.R., 2013. Biofilm Formation by the Fish Pathogen *Flavobacterium Columnare*: Development and Parameters Affecting Surface Attachment. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5633-5642.
- Cai, W., Arias, C.R., 2017. Biofilm Formation on Aquaculture Substrates by Selected Bacterial Fish Pathogens. *Journal of Aquatic Animal Health*, 29, 95-104.
- Carl Wilhelm S., 1785. Om Frukt-och Bår-syran (On Fruit and Berry Acid). *Kongliga Vetenskaps Academiens Nya Hvelingar (New Proceedings of the Royal Academy of Science)*, 6, 17-27.
- Caro, A., Humblot, V., Me´thivier, C., Minier, M., Salmain, M., Pradier, C.M., 2009. Grafting of Lysozyme and/or Poly(ethylene glycol) to Prevent Biofilm Growth on Stainless Steel Surfaces. *Journal of Physics*, 113, 2101-2109.
- Cengiz, S.A., Us, E., Cengiz, A.T., 2006. Slime Faktörünün Klinikteki Yeri ve Önemi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3), 193-197.
- Černohorská, L. Votava M., 2004. Determination of Minimal Regrowth Concentration (MRC) in Clinical Isolates of Various Biofilm-Forming Bacteria. *Folia Microbiology*, 49 (1), 75-78.
- Ceyhan, N., 2008. Klinikte Biyofilmlerin Önlenmesi İçin Antibiyofilm Stratejileri (Antibiofilm Strategies for Prevention of Biofilms in the Clinic). *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 22 (4), 227-240.
- Chang, Y.W., Fragkopoulos, A.A., Marquez, S.M., Kim, H.D. Angelini, T.E., Fernández-Nieves, A., 2015. Biofilm Formation in Geometries with Different Surface Curvature and Oxygen Availability. *New Journal of Physics*, 17, 17-33.
- Characklis, William, G., Kevin, C., 1990. *Biofilms*. Marshall, 1990, New York, Wiley.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.A., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M. vd., 1985. Adherence of Coagulase Negative *Staphylococci* to Plastic Tissue Cultures: a Quantitative Model for the Adherence of *Staphylococci* to Medical Devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-06.

- Coquet, L., Cosette, P., Junter, G.A., Beucher, E., Saiter, J. M., Jouenne, T., 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to Fish Farm Materials: Influence of Cell and Material Surface Properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 26(4), 373-378.
- Coquet, L., Cosette, P., Quillet, L., Petit, F., Junter, G.A., Jouenne, T., 2002. Occurrence ve Phenotypic Characterization of *Yersinia ruckeri* Strains with Biofilm-Forming Capacity in a Rainbow Trout Farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 470-475.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial Biofilms: A common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284, 1318-1322.
- Çağırğan, H., Yürekli Türk, O., 1991. First isolations of *Yersinia ruckeri* in Turkey. *Bulletin European Association Fish Pathology*, 4, 1-10.
- Çiftçi, Z., 2005. Kronik Tonsillitte Biofilmin Rolü. T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi, 69s, İstanbul.
- Dauqan, E.M.A., Abdullah, A., 2017. Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herbial. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5 (2), 017-022, doi: 10.7324/JABB.2017.50203.
- Davey, M.E., O'toole, G.A., 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology Molecular Biology Review*, 64(4), 847-848.
- Davies, D., 2003. Understveing Biofilm Resistance to Antibacterial Agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 114-22.
- Davies, R.L., Frerichs, G.N., 1989. Morphological and Biochemical Differences Among Isolates of *Yersinia ruckeri* Obtained from Wide Geographical Areas. *Journal of Fish Diseases*, 12, 357-365.
- Deighton, M.A., Capstick, J., Domalewski, E., Van Nguyen, T., 2001. Methods for Studying Biofilms Produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Methods in Enzymology*, 336, 177-95.
- Delshad, S.T., Soltanian, S., Sharifiyazdi, H., Bossier, P., 2018. Effect of Quorum Quenching Bacteria on Growth, Virulence Factors And Biofilm Formation Of *Yersinia Ruckeri* *In Vitro* And an *In Vivo* Evaluation of Their Probiotic Effect in Rainbow Trout. *Journal of Fish Diseases*. <https://doi.org/10.1111/jfd.12840>.
- Demir, C., İnanç, B.B., 2015. Investigate Nasal Colonize *Staphylococcus* Species Biofilm Produced (Nazal Kolonize Stafilokok Türlerinde Biyofilm Üretimini Araştırılması). *Journal of Clinical Analytical Mmedicine*, 6(4), 414-8.
- Demirel, Y.K., 2012. Yüzey Kirliliğinin Gemi Direnci Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gemi İnşaatı ve Gemi Makineleri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 175s, İstanbul.

- Dezelic, T., Guggenheim, B., Schmidlin, P.R., 2009. Multispecies Biofilm Formation on Dental Materials and an Adhesive Patch. *Oral Health Preventive Dentistry*, 7, 47-53.
- Di Ciccio, P., Vergara, A., Festino, A.R., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A., 2015. Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* on Food Contact Surfaces: Relationship with Temperature and Cell Surface Hydrophobicity. *Food Control*, 50, 930-936.
- Ding, T., Li, T., Wang, Z., Li, J., 2017. Curcumin Liposomes Interfere with Quorum Sensing System of *Aeromonas sobria* and in Silico Analysis. *Scientific Reports*, 7, 8612, doi:10.1038/s41598-017-08986-9.
- Doğruöz, N., 2014. Endüstriyel Sistemlerde Mikrobiyolojik Korozyon ve Önlenmesi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(1), 26-38.
- Donlan, R.M., Costerton, W.J., 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-93.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 8(9), 881-890.
- Duchaud, E., Boussaha, M., Loux, V., Bernardet, J.F., Michel, C., Kerouault, B., and Benmansour, A., 2007. Balık Patojen *Flavobacterium psychrophilum*'un Tam Genom Dizisi. *Doğa Biyoteknolojisi*, 25(7), 763-769.
- Duman, M., 2017. Determination of Antimicrobial Sensitivity and Antimicrobial Sensitivity Genes of Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*), *Yersinia ruckeri* and *Lactococcus garvieae* in Rainbow Trout. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Doktora tezi, 126 s, Bursa.
- Duru, A. 2016. Elma, Nar Ve Üzüm Sirkesinin *Flavobacterium psychrophilum* Bakteriyel Balık Patojenine Karşı *İn vitro* Antibakteriyel Aktivite ve Biyofilm Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi. T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 66s, Isparta.
- Eswaranveam, S., Hettiarachchy, N.S., Johnson, M.G., 2004. Antimicrobial Activity of Citric, Lactic, Malic, or Tartaric Acids and Nisin-Incorporated Soy Protein Film Against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, O157:H7, ve *Salmonella* Gaminara. *Journal of Food Science*, 69, 79-84.
- Fatimah, AA., 2014. Chemical Composition, Antioxidant and Antitumor Activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 21(10), 1670-1676.
- Focke, M., Feld, A., Lichtenthaler, H.K., 1990. Alicin, a Naturally Occuring Antibiotic from Garlic, Specifically Inhibits Acetyl-Coa Synthetase. *FEBS lett*, 261, 106-108.

- Frans, I., Michiels, C.W., Bossier, P., Willems, K.A., Lievens, B., Rediers, H., 2011. *Vibrio anguillarum* as a Fish Pathogen: Virulence Factors, Diagnosis and Prevention. *Journal of Fish Diseases*, 34, 643–661, doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01279.x.
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T., 1989. New Method For Detecting Slime Production by Coagulase Negative *Staphylococci*. *Journal of Clinical Pathology*, 42(1), 872 - 4.
- Frerichs, G.N., 1993. Isolation and Identification of Fish Bacterial Pathogens. In: *Bacterial Diseases of Fish* (ed. by V. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Bromage), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1(3), 270–272.
- Gavin, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw, J.G., Toma's, J.M., 2003. Lateral Flagella are Required for Increased Cell Adherence, Invasion and Biofilm Formation by *Aeromonas* spp. *Fems Microbiology, Letters*, 224, 77–83.
- Gavin, R., Rabaan, A.A., Merino, S., Tomas, J.M., Gryllos, I., Shaw, J.G., 2002. Lateral Flagella of *Aeromonas* Species are Essential for Epithelial Cell Adherence and Biofilm Formation. *Molecular Microbiology*, 43, 383-397.
- Gil, P., Vivas, J., Gallardo, C.S., Rodríguez L.A., 2000. First Isolation of *Staphylococcus warneri*, from Diseased Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northwest Spain. *Journal of Fish Diseases*, 23, 295–298.
- Gill, A.O., Holley, R.A., 2000. Inhibition of Bacterial Growth on Ham and Bologna by Lysozyme, Nisin ve EDTA. *Food Research International*, 33, 8390.
- González-Fveos, E., Herrera, B., 2013. Efficacy of Malic Acid Against *Listeria monocytogenes* Attached to Poultry Skin During Refrigerated Storage. *Poultry Science*, 92(7), 1936-1941.
- Görs, S., Schumann, R., Häubner, N., Karsten, U., 2007. Fungal and Algal Biomass In Biofilms on Artificial Surfaces Quantified by Ergosterol and Chlorophyll A As Biomarkers. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 60, 50-59.
- Güler, L., Ok, U., Gündüz, K., Gülcü, Y., Hadimli, H.H., 2005. Antimicrobial Susceptibility and Coagulase Gene Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Clinical Mastitis Cases in Turkey. *Journal of Dairy Sciences*, 88(9), 3149-54.
- Gün, İ., Ekinci, F.Y., 2009. Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda*, 34 (3), 165-173.
- Güvensen, N.C., Ekmekçioğlu, S., 2016., Biyofilm Kontrolünde Biyositler ve Etki Tarzları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi)*, 14(1), 1-19, www.mikrobiyoloji.org/pdf/702160101.pdf.

- Harraghy, N., Seiler, S., Jacobs, K., Hannig, M., Menger, M.D., Herrmann, M., 2006. Advances In *In Vitro* and *In Vivo* Models for Studying the *Staphylococcal* Factors Involved in Implant Infections. *International Journal of Artificial Organs.*, 29, 368–78.
- He, Y., Xu, T., Fossheim, L.E., Zhang, X.H., 2012. FliC, A Flagellin Protein, Is Essential for the Growth and Virulence of Fish Pathogen *Edwardsiella tarda*. *Public Library of Science*, 7(9), 45-70.
- Hesami, S., Metcalf, D.S., Lumsden, J.S., MacInnes, J.I., 2011. *Flavobacterium psychrophilum*'da Soğuk Sıcaklık Düzenlemeli Genlerin Tanımlanması. *Uygulamalı ve Çevresel Mikrobiyoloji*, 77(5), 1593–1600. doi: 10,1128/AEM.01717-10.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B., Kve Molin, S., 2000. Biofilm. *Microbiology*, 146, 2395–407.
- Hina, J., Shazia, E., Sobia, T., Farhana, A., 2013. An Overview On Medicinal Importance of *Thymus vulgaris*. *Journal of Asian Scientific Research*, 3(10), 974-982.
- Holm, K.O., Nilsson, K., Hjerde, E., Willassen, N.P., Milton, D.L., 2015. Complete Genome Sequence of *Vibrio anguillarum* Strain NB10, a Virulent Isolate from the Gulf of Bothnia. *Stevards in Genomic Sciences*, 10 (60), doi 10.1186/s40793-015-0060-7.
- Holt, R.A., Rohovec, J.S., Fryer, J.L., 1993. Bacterial Coldwater Disease. In, Inglis V., Roberts, R.J., Bromage, N.R., (Eds): *Bacterial Diseases of Fish*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 3-23,
- Holt, R.A., 1987. *Cytophaga psychrophila*, The Causative Agent of Bacterial Cold-Water Disease in Salmonid Fish. PhD Thesis, Oregon State University, Corvallis OR, USA., 2(2), 97-108.
- Horne, M.T., Barnes, A.C., 1999. Enteric Redmouth Disease. In, Woo, PTK, Bruno DW (Eds): *Fish Diseases and Disorders*. Vol. 3, Viral, Bacterial and Fungal Infections., CABI Publishing, 455-477.
- Howell, D., Behrends, B., 2006. A Review of Surface Roughness in Antifouling Coatings Illustrating the Importance of Cut off Length. *Biofouling*, 22(6), 401-410.
- Högfors-Rönholm, E., Norrgård, J., Wiklund, T., 2015. Adhesion of Smoothan Drough Pheno types of *Flavobacterium psychrophilum* to Poly Styrene Surfaces, *Journal of Fish Diseases*, 38(5), 429-437.
- Huyben, D.C., 2012. Evaluation of Membrane Filtration ve UV Irradiation for the Control of *Flavobacterium psychrophilum* in Recirculation Aquaculture Systems. A Thesis Presented to The University of Guelph, In partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science in Animal ve Poultry Science, Guelph, Ontario, Canada.

- İset, Ş., 2016. Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen *Salmonella* ve *Listeria monocytogenes* Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması ve Elektron Mikroskopik Tekniklerle Değerlendirilmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 66s, Eskişehir.
- Jahid, I.K., Lee, N.Y., Kim, A., Ha, S.D., 2013. Influence of Glucose Concentrations on Biofilm Formation, Motility, Exoprotease Production, and Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*. Journal of Food Protection, 76(2), 239-247.
- Jansen, B., Schumacher-Perdreau, F., Peters, G., Pulverer, G., 1989. New Aspects in the Pathogenesis and Prevention of Polymer-Associated Foreign-Body Infections Caused By Coagulase-Negative *Staphylococci*. Journal of Investigate Surgery, 2, 361-80.
- Javaherdashti, R., 2009. A Brief Review of General Patterns of MIC of Carbon Steel and Biodegradation of Concrete. IUFS Journal of Biology, 68, 65-73.
- Jurcisek, J.A., Bakaletz, L.O., 2007. Biofilms Formed by Nontypeable Haemophilus Influenzae *In Vivo* Contain Both Double-Stranded DNA and Type IV Pilin Protein. Journal of Bacteriology, 189(10), 3868-75.
- Karaca, N., Koç, A.N., Karagöz, S., 2001. Kan Ve Vajen Örneklerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Slime Aktiviteleri. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 31, 224-6.
- Khelissa, S.O., Abdallah, M., Jama, C., Faille, C., Chihib, N.E., 2017. Bacterial Contamination and Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and Strategies to Overcome Their Persistence. Journal of Materials and Environmental Sciences, 8(9), 3326-3346.
- Khorshed, A., Özbal, Y., 2012. Kan Kültürlerinde İzole Edilen Koagülaz Negatif Stafilokokların Tiplendirilmesi ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences), 21(3), 153-163.
- Kloos, B.İ.Z., Schleifer, K.H., 1975. İnsan Deri Stafilokoklarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu II: Yeni Dört Türün Tanımları: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* ve *Staphylococcus simulans*. Uluslararası Sistemik Bakteriyoloji Dergisi, 25 (1), 62-79. ISSN 0020-7713. doi: 10.1099 / 00207713-25-1-62 .
- Kikuchi, Y., Graf J., 2007. Spatial and Temporal Population Dynamics of A Naturally Occurring Two-Species Microbial Community Inside the Digestive Tract of the Medicinal Leech. Applied and Environmental Microbiology, 73, 1984-1991.
- Kirov, S.M., Castrisios, A., Shaw, J.G., 2003. *Aeromonas* Flegella (Polar and Lateral) are Enterocyte Adhesins That Contribute to Biofilm Formation on Surfaces. American Society for microbiology, 7,1939-45.

- Kirov, S.M., Sveerson, K., 1996. Characterization of A Type IV Bundle-Forming pilus (SFP) from a Gastroenteritis-Associated Strain of *Aeromonas veronii biovar sobria*. *Microbolgy Pathology*, 21,23-34.
- Klemm, P., Vejborg, R. M., Hancock, V., 2010. Prevention of Bacterial Adhesion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), 451-459.
- Kojic, E.M., Darouiche, R.O., 2004. Candida Infections of Medical Devices. *Clinical Microbiology Review*, 17(2), 255-267.
- Kökümer, T., Yeşilçimen, Akbaş, M., 2016. Malik Asit Uygulamalarının *S.aureus* Biyofilmleri Üzerinde Antibiyofilm Etkileri. *KSÜ Doğa Bilimleri. Dergisi*, 19(1), 37-42.
- Kubilay, A., Altun, S., Didinen, B. I., Ekici, S., Diler, Ö., 2009. Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* in Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(5), 709-715.
- Kütevin, Z., Türkeş, T., 1987. Sebzeçilik ve Genel Sebze Tarımı Prensipleri ve Pratik Sebzeçilik Yöntemleri. *İnkılap Kitabevi, Ankara cad, 95, İstanbul.*
- Larson, T.D., 2011. Why do we polish? Part one, *Northwest Dent*, 90, 17-22.
- Lee, Y.K., Kwon, K.K., Cho, K.H., Kim, H.W., Park, J.H., Lee, H.K., 2003. Culture ve Identification of Bacteria from Marine Biofilms. *The Journal of Microbiology*, 41(3), 183-188.
- Leroy, C., Delbarrea, C., Ghillebaertb, F., Comperec, C., Combes, D., 2008. Effects of Commercial Enzymes on the Adhesion of A Marine Biofilm-Forming Bacterium. *Biofouling*, 24, 11-22.
- Levipan, H.A., Avendaño-Herrera, R., 2017. Different Phenotypes of Mature Biofilm in *Flavobacterium psychrophilum* Share a Potential for Virulence That Differs from Planktonic State. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology Cellular Infection Microbiology*, www.frontiersin.org, 7(76), 7-76, doi: 10.3389/fcimb.2017.00076.
- Lindell, K., 1012. Cell-to-Cell Communication and Virulence in *Vibrio anguillarum*. Department of Molecular Biology, Department of Molecular Biology, Umeå Center for Microbial Research UCMR, Umeå University, 63p, Sweden.
- Lu, H.J., Frederick Breidt, J.R., Pérez-Díaz, I.M., Osborne, J.A., 2011. Antimicrobial Effects of Weak Acids on the Survival of *Escherichia coli* O157:H7 Under Anaerobic Conditions. *Journal of Food Protection*, 74(6), 893-898.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E., Williams, P., 2002. The Regulation of Biofilm Development by Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology*, 4(1), 18-28.
- Madetoja, J., 2002. *Flavobacterium psychrophilum*: Characterisation, Experimental Transmission and Occurrence in Fish and Fish Farming Environments. Academic Dissertation, Finland, 1-37.

- Madsen, L., Dalsgaard, I., 2008. Water Recirculation and Good Management: Potential Methods to Avoid Disease Outbreaks with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Disease*, 31, 799-810.
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T., Rattan, A., 2006. Detection of Biofilm Formation among the Clinical Isolates of *Staphylococci*: an Evaluation of Three Different Screening Methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24, 25-9.
- Metin, S., Kubilay, A., Onuk, E. E., Didinen, B. I., Yildirim, P., 2014. First Isolation of *Staphylococcus warneri* from Cultured Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Broodstock in Turkey. *Bulletin European Associate Fish Pathology*, 34, 165-174.
- Middleton, B., Rodgers, H.C., Camara, M., Knox, A.J., Williams, P., Hardman, A., 2002. Direct Detection of *N*-Acylhomoserine Lactones in Cystic Fibrosis Sputum. *FEMS Microbiology Letters*, 207, 1-7.
- Molobela, I. P., Cloete, T.E., Beukes, M., 2010. Protease and Amylaseenzymes for Biofilm Removal Vedegradation of Extracellular Polymericsubstances (EPS) Produced by *Pseudomonas fluorescens* Bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(14), 1515-1524.
- Monroe, D., 2007. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *Public Library of Science Biology*, 5,11. Erişim tarihi: 14.10.2018. <http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.0050307>
- Mortensen, B.K., 2014. Problems Caused by Biofilms. *Bactoforce International*, 5. A/S. <http://www.bactoforce.se/wp-content/uploads/2014/09/Problems-caused-by-biofilms.pdf>.
- Nurcan, N., 2010. Bazı Gram-Negatif Bakteriyel Balık Patojenlerinde Çevreyi Algılama Sisteminin İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 76s, Isparta.
- Orhon, H., Özbakkaloğlu, B., Sürücüoğlu, S., Tünger, Ö., Arısoy, A.S., 1998. İnfeksiyon Etkeni Olan *Candida albicans* Suşlarında Slime Üretimi ve Antifungal Ajanlara Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi*, 28, 103-6.
- Ormancı, S., 2010. Hayvansal ve Çevresel Kaynaklardan İzole Edilen Hareketli *Aeromonas* Türlerinde Biyofilm Oluşununun İncelenmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 117s, Ankara.
- O'Gara, E.A., Hill, 1.D.J., Maslin, D.J., 2000. Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, ve Their Diallyl Constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2269-2273.
- O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Initiation of Biofilm Formation in *Pseudomonas fluorescensecs* 365 Proceeds Via Multiple, Convergent Signalling Pathways: A Genetic Analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461.

- Özçelik, S., Sümer, Z., Değerli, S., Ozan, F., Sökmen, A., 2007. Sarımsak (*Allium Sativum*) Özütü Skolosidal Ajan Olarak Kullanılabilir Mi? Türkiye Parazitoloji Dergisi, 31(4), 318-321.
- Öztürk, R.Ç., Altınok, İ., 2014. Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 14(1), 275-297.
- Öztürk, Ş.B., Sakarya, S., Öncü, S., Ertuğrul, M.B., 2008. Biyofilmler ve Yabancı Cisim İnfeksiyonları. Klimik Dergisi, 21(3), 79-86.
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGravin, M. J., Hook, M., 1994. MSCRAMM-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissue. Annual Review of Microbiology, 48, 585-617.
- Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Ehrlich, G.D., 2004. The Role of Biofilms in Otolaryngologic Infections. Current Opinion in Otolaryngol & Head and Neck Surgery, 12(3), 185-90.
- Post, J.C., Hiller, N.L., Nistico, L., Stoodley, P., Ehrlich, G.D., 2008. Biyofilmlerin Otolaringolojik İnfeksiyonlardaki Rolü:2007 Yılına Ait Bir Güncelleme. Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery, 2(1), 52-58.
- Potera, C., 1999. Forging a Link Between Biofilms and Disease. Science, 283, 1837-9.
- Pranoto, Y., Salokhe, V.M., Rakshit, S.K., 2005. Physical and Antibacterial Properties of Alginate-Based Edible Film Incorporated with Garlic Oil. Food Research International, 38, 267-272.
- Rabaan, A.A., Gryllos, I., Toma's, J.M., Shaw, J.G., 2001. Motility and the Polar Flagellum are Required for *Aeromonas caviae* Adherence to Hep-2 Cells. Infection and Immunology, 69, 4257-4267.
- Rahman, M., Simm, R., Kader, A., Basseres, E., Römling, U., Möllby, R., 2007. The Role of C-Di-GMP Signaling in an *Aeromonas veronii biovar sobria* Strain. FEMS Microbiology Letters, 273, 172-179.
- Rangdale, R.E., Richards, R.E., Alderman, D.J., 1996. Isolation of *Cytophaga psychrophila*, Causal Agent of Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS) From reproductive Fluids and Egg Surfaces of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Bulletin European Association Fish Pathology, 16, 63-67.
- Raybaudi-Massilia, M.R., Melgar, J.M., Sobrino López, A., Martín-Belloso, O., 2009. Inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 and Shelf Life Extension of Fresh-Cut Pears Using Malic Acid and Quality Stabilizing Compounds. Journal of Food Quality, 32(5), 539-565.
- Rendueles, O., Ghigo, J.M., 2012. Multi-Species Biofilms: How to Avoid Unfriendly Neighbors. FEMS Microbiology Reviews, 1-18, doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x.
- Richards, J.J., Melveer, C., 2009. Controlling Bacterial Biofilms. Chembiochem, 10 (14), 2287- 94.

- Ross, A.J., Rucker, R.R., Ewing, W.H., 1966. Description of a Bacterium Associated with Redmouth Disease of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Canadian Journal of Microbiology, 12, 763–770.
- Rucker, R., 1966. Redmouth Disease of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Bulletin De L Office International Des Epizooties, 65, 825–830.
- Sapmaz Karabağ, S., 2010. Santral Venöz Kateterlerde Kullanılan Materyaller İle Kveidaların Biyofilm Üretimi Arasındaki İlişki. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 76s, İzmir.
- Schuster, J.J., Markx, G.H., 2014. Biofilm Architecture. Advances Biochemical Engineering Biotechnology, 146, 77-96.
- Sert, A., 2014. Development of Enzyme-Based Coating Methods For The Prevention of Bacterial Biofilm Formation (Bakteriyel Biyofilm Oluşumunu Engellemeye Yönelik Enzim Bazlı Kaplama Yöntemlerinin Geliştirilmesi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Molecular Biology-Genetics and Biotechnology Department, Doktora Tezi, 84s, İstanbul.
- Sequences, 2008. Bakteri Hücreleri Arasında Arasında Haberleşme (Cell-to-cell Communication: Quorum Sensing) <https://genotyping.wordpress.com/2008/05/12/bakteri-hucreleri-arasinda-haberlesme-cell-to-cell-communication-quorum-sensing/>. Erişim Tarihi : 31.07.2018.
- Sharon, J.P., 2006. Staphylococcus. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections 10E Priad V J Mahy ve Volker Ter Meulen (Eds), Edward Arnold Pub, 771-831.
- Shiau, A.L., Wu, C.L., 1998. The Inhibitory Effect of *Staphylococcus epidemidis* Slime on the Phagocytosis of Murine Peritoneal Macrophages is Infection Indepent. Microbiology Immunology, 42, 33-40.
- Shiina, Y., Li, K., Iwanaga, M., 2004. An *Aeromonas veronii biovar sobria* Infection with Disseminated Intravascular Gas Production. Journal of Infection and Chemotherapy, 10, 37–41.
- Singla, R., Goel, H., Ganguli, A., 2014. Novel Synergistic Approach to Exploit the Bactericidal Efficacy of Commercial Disinfectants on the Biofilms of *Salmonella enterica serovar typhimurium*. Journal of Bioscience Bioengineering, 118(1), 34-40.
- Sokmen, A., Jones, B.M., Erturk, M., 1999. The *In Vitro* Antibacterial Activity of Turkish Plants. Journal of Ethnopharmacology, 67, 79-86.
- Starliper, C.E., 2011. *Flavobacterium psychrophilum*'un Neden Olduğu Balıkların Bakteriyel Soğuk Su Hastalığı. İleri Araştırma Dergisi, 2(2), 97-108.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Ventura, G.B., Djukic, S., Irkovic, I.C., Ruzicka, F., 2007. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by *Staphylococci*. Apmis, 115, 891–9.

- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M., 2000. A Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation. *Journal of Microbiology Methods*, 40, 175–9.
- Stephens, C., 2002. Microbiology: Breaking Down Biofilms. *Current Biology*, 12 (4), 132-4.
- Stevenson, R., Flett, D., Raymond, B.T., 1993. Enteric Red Mouth (ERM) and Other Enterobacterial Infections of Fish. In, Inglis V, Roberts RJ, Bromogo NR (Eds): *Bacterial Diseases of Fish*, Blackwell Science Ltd., 80-99, London.
- Sudağıdan, M., Aydın, A., 2013. Lizozim ve Nişinin Gıda Kaynaklı *Staphylococcus aureus* Suşlarında Gelişim ve Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 39(2), 254-263.
- Suh, J.D., Ramakrishnan, V., Palmer, J.N., 2010. Biofilms. *Otolaryngol Clinics North America*, 43(3), 521-30.
- Sundell, K., Wiklund, T., 2011. Effect of Biofilm Formation on Antimicrobial Tolerance of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 34, 373–383, doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01250.x.
- Sutherland, I.W., 2001. Biofilm Exopolysaccharides: A Strong and Sticky Framework. *Microbiology*, 147, 3-9.
- Sutherland, I.W., 2001. The Biofilm Matrix an Immobilized but Dynamic Microbial Environment. *Trends Microbiology*, 9(5), 222-227.
- Szczuka, E., Kaznowski, A., 2014. Antimicrobial Activity of Tigecycline Alone or in Combination with Rifampin against *Staphylococcus epidermidis* in Biofilm. *Folia Microbiology (Praha)*, 59, 283-8, <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-013-0296-9>.
- Şahin, M, Midilli, R., 2013. Kulak Burun Boğaz Enfeksiyonlarında Biyofilmler. *Derleme, Turkish Journal of Rhinology*, 2(3), 127-36.
- Tabelle I of Fruchtsäuren., 2016. *Wissenschaft Online Lexikon der Biologie*. Archived From the Original, 84, 924.
- Tan, D., Dahl, A., Middelboe, M., 2015. Vibriophages Differentially Influence Biofilm Formation by *Vibrio anguillarum* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4489-4497.
- Tazıcı, K.N., 1996. Klinik Materyallerden İzole Edilen Çeşitli Mikroorganizmalara Karşı Sarımsağın (*Allium sativum*) Etkisinin Araştırılması. Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, 57s, Ankara.
- Timur, G., Timur, M., 2003. Balık Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No: 5, 538, Dilek Ofset İstanbul.
- Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., Chiers, K., 2007. *Yersinia ruckeri* Infections in Salmonid Fish. *Journal of Fish Diseases*, 30 (5), 257-68.

- Toranzo, A.E., Barja, J.L., 1993. Fry Mortality Syndrome (FMS) in Spain. Isolation of the Causative Bacterium *Flexibacter psychrophilus*. Bulletin European Association Fish Pathology, 13, 30-32.
- Ulusoy, S., 2007. Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında N-Açıl Homoserin Lakton Üretiminin Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 100s, Isparta.
- Ünlütürk, A., 2003. Mikrobiyal Gelişmenin İnhibisyonu. In: Ünlütürk, A., Turantaş, F. (Eds), Gıda Mikrobiyolojisi, 3. baskı. Meta basım Matbaacılık hizmetleri, 188s, İzmir.
- Veenstra, G.J., Cremers, F.F., van Dijk H., Fleer, A., 1996. Ultrastructural Organisation and Regulation of a Biomaterial Adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. Journal of Bacteriology, 178(2), 537-41.
- Voung, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., et.al., 2004. Polysaccharide Intercellüler Adhesin (PIA) Protect *Staphylococcus epidermidis* Against Major Components of Human Innate Immune System Cell. Microbiology, 6, 269-75.
- Waldvogel, F.A., 2000. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mveell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (eds). Mveell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. New York, Churchill Livingstone, 6(6) 2069-2092.
- Wang, E.W., Jung, J.Y., Pashia, M.E., Nason, R., Scholnick, S., Chole, R.A., 2005. Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Strains as Competent Biofilm Formers. Archives of Otolaryngology Head and Neck Surger., 131, 983-989.
- Welch, T.J., Verner-Jeffreys, D.W., Dalsgaard, I., Wiklund, T., Evenhuis, J.P., Garcia Cabrera, J.A., Hinshaw, J.M., Drennan, J.D., LaPatra, S.E., 2011. Independent Emergence of *Yersinia ruckeri* Biotype 2 in the United States and Europe. Applied and Environmental Microbiology, 77(10), 3493-3499, doi:10.1128/AEM.02997-10.
- Wiklund, T., Kaas, K., Lönnström, L., Dalsgaard, I., 1994. Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from Wild and Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finlve. Bulletin European Associate Fish Pathology, 14, 44-46.
- Willems, R.J.L., Bonten, M.J.M., 2007. Glikopeptid Dirençli Enterokoklar: Virülans, Direnç ve Epidemiyeye Ait Özellikler. Current Opinion in Infectious Diseases Türkçe Baskı, 2(3).
- Williams, V., Fletcher, M., 1996. *Pseudomonas fluorescens* Adhesion and Transport Through Porous Media are Affected by Lipopolysaccharide Composition. Applied and Environmental Microbiology, 62, 1004.
- Woo, P.T.K., Bruno, D.W., 2003. Fish Disease and Disorders, Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, Oxfordshire, 903p., UK.

- Wu, H., Moser, C., Wang, H.Z., Hoiby, N., Song, Z.J., 2015. Strategies for Combating Bacterial Biofilm Infections. *International Journal of Oral Science*, 7(1), 1-7.
- Xu, T., Su, Y., Xu, Y., He, Y., Wang, B., Dong, X., Zhang, X. H., 2014. Mutations of Flagellar Genes *Flic12*, *Flia* and *Flhdc* of *Edwardsiella tarda* Attenuated Bacterial Motility, Biofilm Formation and Virulence to Fish. *Journal of Applied Microbiology*, 116(2), 236-244.
- Xu, C., Yagiz, Y., Hsu, W.Y., Simonne, A., Lu, J., Marshall, M.R., 2014. Antioxidant, Antibacterial and Antibiofilm Properties of Polyphenols from Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) Pomace Against Selected Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62(28), 6640-6649.
- Yasuda, H., Ajiki, Y., Aoyama, J., Yolota, I., 1994. Interaction Between Human Polymorphonuclear Leucocytes and Bacteria Released from *In Vitro* Bacterial Biofilms Models. *Journal of Medical Microbiology*, 41, 359-67.
- Ye, J., Ma, Y., Liu, Q., Zhao, D.L., Wang, Q.Y., Zhang, Y.X., 2008. Regulation of *Vibrio alginolyticus* Virulence by the *Luxs* Quorum-Sensing System. *Journal of Fish Diseases*, 31, 161-169.
- Yılmaz, M., Yuvalı Çelik, G., 2007. Bakteriyel Ekstraselüler Polisakkaritler (EPS). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2), 7-13, www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070202.pdf.
- Yildiz, F.H., Visick, K.L., 2009. *Vibrio* Biofilms: So Much the Same Yet So Different. *Trends in Microbiology*, 17(3), 109-118.
- Zineb, G., Mostafa, M.E., Youssef, G., Abdellatif, K., Salwa, O., Abdellah, H., Saad, K.I., Naima, E., Mohammed, T., 2014. Anti-Adhesion and Anti-Biofilm Effectiveness of Disinfectants Used in Hemodialysis against both *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus sciuri* Biofilms. *Journal of Engineering Research and Applications*, 2248-9622, 4(7), 86-92.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fethi FİLİK

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir 1986

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İzmir Karataş Lisesi

Lisans : SDÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi 2009

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

1-Emniyet Genel Müdürlüğü Polis Memuru 2015- Devam Ediyor

Yayınları (SCI ve diğer makaleler)

1- Filik, F., Kubilay, A., Filik, N., 2017. Biofilm Formation In Bacterial Fish Pathogens. Limnofish. 04-06 October 2017. Eğirdir-Isparta-Türkiye.