

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİSİN BAKTERİYOSİNİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN *ENTEROCOCCUS*  
CİNSİNİN QUORUM-SENSİNG MEKANİZMASININ İNHİBİSYONUNA VE  
VİRÜLANS FAKTÖRLERE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Betül Cansu YAZICI

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Mart  
2020

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere baēlı kalmarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Betül Cansu YAZICI

## ONAY

Doç. Dr. Nefise AKÇELİK danışmanlığında, Betül Cansu YAZICI tarafından hazırlanan bu çalışma .../.../2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Rahime ŞİMŞEK

İmzası:

Üye: Dr. Öğr. Üy. Evren Doruk ENGİN

İmzası:

Üye: Doç. Dr. Nefise AKÇELİK(Danışman)

İmzası:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Nisin Bakteriyosininin ve p-Coumaric asitin *Enterococcus* Cinsinin Quorum-Sensing Mekanizmasının İnhibisyonuna ve Virülans Faktörlere Etkisinin Araştırılması

Betül Cansu YAZICI

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kontrolsüz antibiyotik kullanımı, çoklu ilaç dirençli suşların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların çoğu biyofilm yapısı ile ilişkilidir ve bu yapının oluşmasına quorum sensing (QS) adı verilen mekanizma aracılık etmektedir. Bu çalışmada, nisin ve p-coumaric asitin (pCA) tek başlarına ve kombine halde uygulanmasının fırsatçı bir patojen olan *Enterococcus faecalis* türündeki 3 suşta (74, 114 ve OG1RF) AI-2 aracılıklı QS mekanizmasına ve çeşitli virülans faktörlere etkileri belirlenmiştir. Böylece, bu organizma ile mücadelede antibiyotik kullanımına alternatif olabilecek AI-2' yi hedef alan yeni bir stratejinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle test edilen ajanların MİK değerleri belirlenmiştir. Ardından, her suşun ekspanansiyel fazdaki planktonik formlarından izole edilen süpernatantlarına MİK dozlarında nisin (OG1RF için 0,5 mg/ml; 74 ve 144 için ise 0,25 mg/ml), pCA (üç suş için de 1 mg/ml) ve nisin+pCA kombinasyonu uygulanmıştır. AI-2 aktivitesindeki değişimlerin hesaplanmasında raportör suş *Vibrio harveyi*'den yararlanılmıştır. AI-2 aktivitesi üzerinde en yüksek inhibisyon etkisini tek başına pCA gösterirken (%60-66), nisinin tek başına istatistiki olarak anlamlı bir etkisi belirlenmemiştir. İki ajanın birlikte uygulanması sonucunda ise, etkinlikte bir artış gözlenmemiştir. Ajanların *E. faecalis* biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, *E. faecalis* gelişme ortamlarına ajanlar MİK dozlarında (0,25 veya 0,5mg/ml nisin ve 1 mg/ml pCA) hem tek başlarına hem de kombine halde ilave edilmiştir. 24 h ve 48 h'lik inkübasyon sonrasında biyofilm oluşum düzeylerindeki farklılıklar canlı hücre sayısı belirlenmek suretiyle incelenmiştir. Nisin tek başına uygulandığında tüm suşların biyofilm oluşumunu  $\leq$ %11 oranında azaltırken, pCA uygulamasıyla biyofilm oluşumunda % 10-17 arasında azalma tespit edilmiştir. İki ajanın birlikte uygulanmasının, 24 h ve 48 h'lik inkübasyon sonucunda OG1RF suşunun biyofilm oluşumunu tamamen engellediği, 114 ve 74 suşunda 24 h' te sırasıyla inhibisyon oranının %30 ve %15; 48 h' te ise %26 ve %16 oranında olduğu belirlenmiştir. Ajanların virülans genlerin ifadesi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar sonucunda, nisin ve nisin+pCA kombinasyonunun *sprE* geni üzerinde 30-40 kat düzeyinde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Yalnızca pCA ajanının ise *sprE* geninin ifadesinde değişime neden olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte test edilen koşullarda *ace* ve *gelE* genlerinin suşlarda ifade edilmediği belirlenmiştir. Denemelerimiz ile nisin ve pCA' nın *E. faecalis* AI-2 sinyal molekülü inhibisyonu hem de biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri literatürde ilk kez araştırılmıştır. pCA tek başına AI-2 inhibisyonu üzerinde anlamlı düzeyde etkili bulunurken, nisin ve pCA'nın birlikte kullanılması halinde *E. faecalis* suşlarının biyofilm oluşumu

anlamli düzeyde azalmiş/engellenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular, bu iki ajanın fırsatçı patojen *E. faecalis* ile m¼cadelede önemli ajanlar olabileceğini ortaya koymaktadır.  
2020, 91 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Enterococcus faecalis*; Quorum sensing; Biyofilm; Nisin; p-coumaric asit; Vir¼lans genler



## ABSTRACT

Master Thesis

Investigation of the Effect of Nisin Bacteria and p-Coumaric Acid On The Inhibition Of Quorum-Sensing Mechanism of *Enterococcus* Species and the Effect on Virulence Factors

Betül Cansu YAZICI

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Nefise AKÇELİK

Uncontrolled use of antibiotics in the treatment of bacterial infections leads to the emergence of multi-drug resistant strains. Most of the infections caused by bacteria are related to the structure of the biofilm and this structure occurs as a result of the communication of bacteria through the mechanism called quorum sensing (QS). In this study, determination of the effects of nisin and p-coumaric acid and the combination of these two agents on AI-2 QS mechanism and various virulence factors in 3 strains (74, 114 and OG1RF) of *Enterococcus faecalis*, an opportunistic pathogen, were investigated. Thus, it is aimed to determine a new strategy targeting AI-2 which may be an alternative to antibiotic use in the fight against this organism. For this, the MIC values of the tested agents were determined first. Subsequently, to the supernatants, isolated from planktonic forms of each strain in the exponential phase, at MIC doses of nisin (0.5 mg / ml for OG1RF; 0.25 mg / ml for 74 and 144), pCA (1 mg / ml for all three strains) and nisin + pCA combination was applied. Reporter strain *Vibrio harveyi* was used to calculate the changes in AI-2 activity. While pCA alone (60-66 %) showed the highest inhibition effect on AI-2 activity, it was not determined that nisin had a statistically significant effect alone. As a result of the application of the two agents together, no increase in effectiveness was observed. In order to determine the effects of agents on *E. faecalis* biofilm formation, agents were added to *E. faecalis* growth media both at the MIC doses (0.25 or 0.5mg / ml nisin and 1 mg / ml pCA) individually and in combination. After 24h and 48h incubation, the differences in biofilm formation levels were examined by determining the number of live cells. When nisin was applied alone, all strains reduced biofilm formation by  $\leq 11\%$ , whereas pCA application reduced biofilm formation by 10-17 %. In combination with the two agents, the OG1RF strain completely prevented the formation of biofilms as a result of the incubation of 24h and 48h, 114 and 74 strains, the rate of inhibition at 24h was 30 % and 15 %; at 48h, 26 % and 16 % inhibition was observed respectively. As a result of studies investigating the effects of agents on the expression of virulence genes, nisin and the combination of nisin + pCA showed an inhibition effect of 30-40 times on the *sprE* gene. The pCA agent was found to cause no change in the expression of the *sprE* gene. However, it was determined that *ace* and *gelE* genes were not expressed in strains under the tested conditions. With our experiments, the effects of nisin and pCA on *E. faecalis* AI-2 signal molecule inhibition and biofilm formation were investigated for the first time in the literature. While pCA was found to have a significant effect on AI-2 inhibition alone, biofilm formation of *E. faecalis* strains was significantly reduced / inhibited

when nisin and pCA were used together. Our findings reveal that these two agents may be important agents in the fight against opportunistic pathogen *E. faecalis*.

2020, 91 pages

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*; Quorum sensing; Biofilm; Nisin; p-coumaric acid; Virulence genes



## TEŞEKKÜR

Tezimin projelendirilmesi başta olmak üzere yüksek lisans hayatımın her aşamasında yanımda olan, fikirleri ve akademik katkıları ile bana her daim yardımcı olan, kendimi geliştirmemde her türlü fırsatı bana tanıyan, tezimi tamamlama sürecimde geçirdiğim stresli dönemi en hafif hasarla atlatmam için elinden gelen her türlü yardımda bulunan, tarzı ve eğitimci rolü ile bana tüm süreç boyunca ilham veren çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Nefise AKÇELİK' e tüm bunların yanı sıra göstermiş olduğu sevgi, hoşgörü ve sabrından dolayı,

Çalışmalarım esnasında meydana gelen taşınma sürecindeki karmaşa dolu zaman diliminde deneylerimin tamamlanması için kendi laboratuvarında bana yer açan ve bu süreçte ihtiyacım olan tüm imkanları sağlayan, kahve saatlerindeki söyleşilerde yeni bakış açıları kazanmamı sağlayarak kendimi geliştirmemde rol oynayan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e,

Sıcak karşılamaları, ikramları ve yardımları için tüm Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı ekibine,

Mutlu, üzgün, acılı, stresli tüm zamanlarımda benimle birlikte bu anları paylaşan, destek ve motivasyonlarını asla esirgemeyen, enstitüde geçirdiğim yıllar boyunca her günümün keyifli geçmesinde çok büyük katkıları olan, kahve ve yemek zincirimizin ayrılmaz parçaları, bu enstitünün bana kazandırdığı değerli arkadaşlarım Onur BENDER, Edibe Ece ABACI, Berşan Seçil DUREL' e,

Yapmış olduğu tüm yardımlardan dolayı çalışma arkadaşım Melih AŞAN'a,

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü hocaları ve çalışanlarına,

Tez çalışmamı 118Z697 numaralı proje olarak, 1002- Hızlı Destek Programı ile destekleyen TÜBİTAK'a,

Son olarak, beni yetiştirip bu günlere getiren, yaşadığım zorluklarda, hayata ve eğitimime dair aldığım tüm kararlarda daima yanımda olan, bu süreçlerde desteklerini sonuna kadar



hissettiren, eğitim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak sonuna kadar destekleyen sevgili annem Hatice YAZICI ve babam Hilmi YAZICI'ya,

En içten teŐekkürlerimi sunarım.

Betül Cansu YAZICI



## İÇİNDEKİLER

|  |             |
|--|-------------|
| <b>ETİK BEYAN</b> .....  | <b>i</b>    |
| <b>ONAY</b> .....  | <b>ii</b>   |
| <b>ÖZET</b> .....  | <b>iii</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>v</b>    |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....  | <b>vii</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....   | <b>ix</b>   |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....   | <b>xiii</b> |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....   | <b>xv</b>   |
| <b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....   | <b>xvi</b>  |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....  | <b>1</b>    |
| <b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....  | <b>4</b>    |
| <b>2.1. ENTEROCOCCUS CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ</b> .....                        | <b>4</b>    |
| <b>2.2. ENTEROKOKLARDA PATOJENİTE VE VİRÜLANS FAKTÖRLER</b> .....                | <b>5</b>    |
| <b>2.3. BAKTERİYEL BİYOFİMLER</b> .....  | <b>8</b>    |
| <b>2.4. BAKTERİYEL BİYOFİMLERİN OLUŞUM AŞAMALARI</b> .....                       | <b>9</b>    |
| 2.4.1. BİRİNCİ AŞAMA: TUTUNMA .....  | 10          |
| 2.4.2. İKİNCİ AŞAMA: MİKROKOLONİ OLUŞUMU VE OLGUNLAŞMA .....                     | 10          |
| 2.4.3. ÜÇÜNCÜ AŞAMA: BİYOFİLM DEN AYRILMA .....                                  | 11          |
| <b>2.5. QUORUM SENSİNG</b> .....   | <b>12</b>   |
| 2.5.1. <i>ENTEROCOCCUS</i> CİNSİ BAKTERİLERDE QUORUM SENSİNG MEKANİZMALARI ..... | 15          |
| 2.5.1.1. Fsr Aracılığı ile Sinyalizasyon .....                                   | 15          |

|   |                  |
|---|------------------|
| 2.5.1.2. Otoindüktör-2 Aracılığı ile Quorum Sensing Sinyalizasyonu .....  | 16               |
| <b>2.6. BİYOFİLM YAPISI İLE MÜCADELEDE KULLANILAN ANTİMİKROBİYALLERİN ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMALARI .....</b>               | <b>17</b>        |
| 2.6.1. NİSİN.....   | 17               |
| 2.6.2. P-COUMARİC ASİT .....  | 20               |
| <b><u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u></b>   | <b><u>23</u></b> |
| <b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>  | <b><u>25</u></b> |
| <b>4.1. MATERYAL.....</b>   | <b>25</b>        |
| 4.1.1. BAKTERİLER .....   | 25               |
| 4.1.2. BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLER.....   | 25               |
| 4.1.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN ANTİMİKROBİYAL MADDELER.....  | 28               |
| 4.1.3.1. Nisin .....  | 28               |
| 4.1.3.2. P_Coumaric Asit.....   | 28               |
| 4.1.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ .....   | 28               |
| <b>4.2. YÖNTEM.....</b>   | <b>29</b>        |
| 4.2.1. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN <i>E. FAECALİS</i> SUŞLARININ PLANKTONİK FORMLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ ..... | 29               |
| 4.2.1.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri .....   | 29               |
| <b>4.3. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN <i>VİBRİO HARVEYİ</i> BB170 ‘İN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.....</b>         | <b>29</b>        |
| 4.3.1. TEST EDİLEN ENTEROKOK SUŞLARININ AI-2 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ.....  | 30               |
| 4.3.1.1. Suşlardan Süpernatant Eldesi .....   | 30               |
| 4.3.1.2. Suşların Otoindüktör-2 Aktivitesinin Belirlenmesi .....  | 30               |
| 4.3.2. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN SUŞLARIN OTOİNDÜKTÖR-2 MEKANİZMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI .....                          | 31               |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN VİRÜLANS GENLERİN SUŞLARIMIZDAKİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ .....   | 31        |
| 4.3.3.1. DNA İzolasyonu .....  | 31        |
| 4.3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....  | 32        |
| 4.3.4. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN VİRÜLANS GENLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.....   | 32        |
| 4.3.4.1. RNA İzolasyonu .....  | 32        |
| 4.3.4.2. cDNA Sentezi.....   | 33        |
| 4.3.4.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) ile Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi.....  | 34        |
| 4.3.5. <i>ENTEROCOCCUS</i> SUŞLARININ BİYOFİLM ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ.....   | 36        |
| 4.3.6. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN <i>E. FAECALİS</i> SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞUMUNUN ENGELLENMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ . | 37        |
| 4.3.7. İSTATİSTİKİ ANALİZLER.....  | 37        |
| <b><u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u></b>  | <b>38</b> |
| <b>5.1. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN <i>E. FAECALİS</i> SUŞLARININ PLANKTONİK FORMLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ .....</b>     | <b>38</b> |
| 5.1.1. ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ .....  | 38        |
| <b>5.2. <i>E. FAECALİS</i> SUŞLARININ OTOİNDÜKTÖR-2 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ.....</b>  | <b>38</b> |
| <b>5.3. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN SUŞLARIN OTOİNDÜKTÖR-2 MEKANİZMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.....</b>                               | <b>39</b> |
| <b>5.4. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN <i>VİBRİO HARVEYİ</i> BB170 ‘İN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.....</b>                  | <b>41</b> |
| <b>5.5. ÇALIŞMADA KULLANILAN VİRÜLANS GENLERİN SUŞLARIMIZDAKİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ.....</b>   | <b>42</b> |

|  |                  |
|--|------------------|
| <b>5.6. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN VİRÜLANS GENLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.....</b>  | <b>42</b>        |
| <b>5.7. <i>ENTEROCOCCUS</i> SUŞLARININ BİYOFİLM ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ.....</b>  | <b>43</b>        |
| <b>5.8. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN <i>E. FAECALIS</i> SUŞLARININ BİYOFİLM YAPILARININ OLUŞUMUNUN ENGELLENMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ.....</b> | <b>44</b>        |
| <b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>  | <b><u>49</u></b> |
| <b><u>7. KAYNAKLAR.....</u></b>  | <b><u>57</u></b> |
| <b><u>8. ÖZGEÇMİŞ.....</u></b>   | <b><u>67</u></b> |
| <b><u>9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u></b>  | <b><u>68</u></b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 2.1. Bakteriyel biyofilmlerin oluşum basamakları (i) tutunma, (ii) mikrokoloni oluşumu, (iii) olgunlaşma, (iv) olgun biyofilm yapısı, (v) ayrılma. .... | 10 |
| Şekil 2.2. Otoindüktör 2 molekülünün oluşum aşamaları (58) .....  | 17 |
| Şekil 2.3. Nisin A polipeptit zinciri. ....   | 18 |
| Şekil 2.4. P-coumaric asitin kimyasal formülü (9) .....   | 21 |
| Şekil 5.1. <i>E. faecalis</i> OG1RF suşunun AI-2 sinyal molekülüne nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi .....  | 40 |
| Şekil 5.2. <i>E. faecalis</i> 114 suşunun AI-2 sinyal molekülüne nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi .....  | 40 |
| Şekil 5.3. <i>E. faecalis</i> 74 suşunun AI-2 sinyal molekülüne nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi .....   | 41 |
| Şekil 5.4. Virülans genlerin çalışmada kullanılan enterokok suşlarındaki varlığının belirlenmesi .....  | 42 |
| Şekil 5.5. OG1RF suşunda <i>sprE</i> gen ifadesindeki kat değişimleri.....  | 43 |
| Şekil 5.6. <i>Enterococcus faecalis</i> suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde biyofilm üretim düzeyleri.....   | 44 |
| Şekil 5.7. <i>E. faecalis</i> OG1RF suşunun 24h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi .....   | 45 |
| Şekil 5.8. <i>E. faecalis</i> OG1RF suşunun 48h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi .....   | 45 |
| Şekil 5.9. <i>E. faecalis</i> 114 suşunun 24h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi .....   | 46 |
| Şekil 5.10. <i>E. faecalis</i> 114 suşunun 48h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi .....  | 46 |

Şekil 5.11. *E. faecalis* 74 suşunun 24h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi .....47

Şekil 5.12. *E. faecalis* 74 suşunun 48h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi .....48



## ÇİZELGELER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| Çizelge 4.1. Çalışmada ifade düzeylerindeki değişimlerin araştırıldığı virülans genler ve bu genlerin araştırılmasında kullanılan primerler..... | 28 |
| Çizelge 4.2. Denatürasyon Karışımı .....   | 33 |
| Çizelge 4.3. Ters Transkripsiyon Karışımı .....  | 33 |
| Çizelge 4.4. Ters Transkripsiyon Sıcaklık Döngüsü .....  | 34 |
| Çizelge 4.5. qRT-PZR için amplifikasyon karışımı .....   | 35 |
| Çizelge 4.6. LightCycler 480 cihazında kullanılan program.....   | 35 |
| Çizelge 5.1. p-coumaric asitin MİK değerleri .....   | 38 |
| Çizelge 5.2. Nisin bakteriyosininin MİK değerleri.....   | 38 |
| Çizelge 5.3. <i>E. faecalis</i> suşlarının bağlı AI-2 aktivitesi.....  | 39 |
| Çizelge 5.4. Antimikrobiyallerin raportör suş <i>V. harveyi</i> BB170 üzerine etkisi.....  | 41 |
| Çizelge 5.5. OG1RF suşunun ajan uygulamalarına karşı <i>sprE</i> genine bağlı ifade değişiminin $\Delta$ Ct değerleri.....                       | 42 |



## SİMGELER DİZİNİ

|                    |                                  |
|--------------------|----------------------------------|
| µg                 | Mikrogram                        |
| µl                 | Mikrolitre                       |
| µm                 | Mikrometre                       |
| °C                 | Santigrat derece                 |
| ATCC               | American Type Culture Collection |
| AI-2               | Otoindüktör-2                    |
| AIP                | Otoindüktör peptit               |
| AB Broth           | Otoindüktör biyoanaliz besiyeri  |
| AHL                | Açıl homoserin lakton            |
| <i>B. cereus</i>   | <i>Bacillus cereus</i>           |
| CA                 | Sinnamaldehit                    |
| Ct                 | Eşik döngüsü                     |
| cDNA               | Komplementer DNA                 |
| <i>C. elegans</i>  | <i>Caenorhabditis elegans</i>    |
| ddH <sub>2</sub> O | Çift distile su                  |
| dk.                | Dakika                           |
| Da                 | Dalton                           |
| DNA                | Deoksiribonükleik asit           |
| <i>E. coli</i>     | <i>Escherichia coli</i>          |
| <i>E. faecalis</i> | <i>Enterococcus faecalis</i>     |
| <i>E. faecium</i>  | <i>Enterococcus faecium</i>      |
| EPS                | Ekstraselüler polimerik madde    |
| FDA                | ABD Gıda ve İlaç İdaresi         |
| g                  | gram                             |
| g kuvveti          | Hızlanma kuvveti                 |
| GI                 | Gastro-intestinal                |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| GRAS                  | Genel Olarak Güvenli                                  |
| HCl                   | Hidroklorik asit                                      |
| KOB                   | Koloni oluşturma birimi                               |
| log                   | logaritma   |
| M                     | Molarite  |
| MHB-II                | Mueller Hinton II Broth                               |
| MİK                   | Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu                     |
| MLK                   | Minimum Letal Konsantrasyon                           |
| mg                    | Miligram  |
| ml                    | Mililitre   |
| N                     | Normalite   |
| ng                    | nanogram  |
| NK                    | Negatif kontrol                                       |
| OD                    | Optik densite (Optik yoğunluk)                        |
| <i>P. aeruginosa</i>  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                         |
| PBS                   | Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi                   |
| pCA                   | P-Coumaric Asit                                       |
| PZR                   | Polimeraz zincir reaksiyonu                           |
| qRT-PZR               | Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu |
| QS                    | Quorum sensing  |
| RNA                   | Ribonükleik asit                                      |
| SEM                   | Taramalı elektron mikroskopu                          |
| <i>S. typhimurium</i> | <i>Salmonella typhimurium</i>                         |
| <i>S. faecalis</i>    | <i>Streptococcus faecalis</i>                         |
| <i>S. pneumoniae</i>  | <i>Streptococcus pneumoniae</i>                       |
| s.                    | Saniye  |
| TSB                   | Tryptic soy broth                                     |

*V. harveyi*

*Vibrio harveyi*



## 1. GİRİŞ

Enterokoklar; Gram pozitif hücre yapısına sahip fakültatif anaeroblardır. Genellikle hayvan ve insan gastrointestinal sisteminde ve kadınlarda genital sistemin normal florasında zararsız olarak değerlendirilen ve pek çok antibiyotiğe karşı doğal direnç gösteren kommensal mikroorganizmalardır. Ancak epidemiyolojilerinde meydana gelen bir takım değişimler sonucunda son 30-35 yılda, başta *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* olmak üzere toplum sağlığını önemli derece etkileyen patojen organizmalar haline gelmişlerdir. Aynı zamanda son yıllarda hastane enfeksiyonlarının başlıca sebeplerinden biri olarak bilinmektedirler (1,2).

Çoklu ilaç dirençli enterokoklar tarafından meydana gelen bağırsak kolonizasyonunda antibiyotiklerin rolü oldukça önemlidir. Bağırsak epitel hücreleri, salgıladıkları C tipi lektin proteini sayesinde; hücre-hücre tutunmasını, patojenlere karşı immün yanıtın oluşturulmasını ve apoptozu teşvik ederek bağırsak mikroflorasının düzenlenmesini sağlar. Bu protein daha çok enterokoklar gibi Gram (+) bakteriler üzerinde etkilidir (3). Ancak antibiyotik kullanımı gibi bir etkiye maruz kalındığında hem yüzeydeki normal flora bakterilerinin sayısında belirgin bir azalma meydana geldiği, hem de epitel hücreleri tarafından salgılanan bu lektin miktarının azaldığı tespit edilmiştir (4). Meydana gelen bu azalmalar sonucunda ilaca dirençli enterokoklar, bu doğal bariyerin yokluğundan faydalanarak konağın bağırsağında kolonileşmektedirler. Bakteriler, mukoza bariyeri boyunca yer değiştirebilir ve kana veya lenf sistemine karışarak özellikle immün yetmezliği olan konaklarda sistemik enfeksiyona neden olabilirler (3).

Enterokok türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar, tedavi edilmesi oldukça zor olan biyofilm ilişkili enfeksiyonlara da neden olduklarından, klinik açıdan daha önemli olmaktadır. Biyofilm oluşumu çoğunlukla venöz ve üriner kateterler, ortopedik implantlar gibi kalıcı tıbbi cihazlarla veya enfektif endokarditte görülür. Endokardit ve intravasküler kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarından elde edilen izolatlar özellikle güçlü biyofilm oluşumu göstermektedir (2).

Patojenin vücuda girişinden sonra bir hastalığın oluşması, büyük ölçüde konak içindeki patojenin sayıca çoğunluğuna bağlıdır. İstenen çoğunluğa ulaşıldığında, patojen etkili bir şekilde kolonileşebilir ve semptomatik hastalıklara yol açan virülans faktörler üretmeye başlayabilir (5). Tüm bu çoğunluğun bakteriler tarafından algılanması ve virülans faktörlerin

ifadesi için gerekli gen düzenlenmelerinin yapılması “quorum sensing” (QS; yeter sayı algılama sistemi) adı verilen kimyasal sinyalizasyon sistemi ile sağlanır. Biyofilm yapısı da QS mekanizmasının bir parçası olan sinyal moleküllerinin çevredeki bakteri hücrelerinin içine alınarak, ilgili bölgelerde gen ifadelerinin düzenlenmesi ile oluşmaktadır. Biyofilm yapısı zaten başlı başına sıcaklık, kuruma ve ışık gibi çevresel faktörlere ve antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek düzeyde dirençli bir mikrobiyal topluluğu temsil etmektedir. Yapıda organizmalar birbirleri ile işbirliği içindedir. Bu tür bir ortamda hedeflenen mikroorganizmaların öldürülmesi son derece zordur (5).

Bakteriyosinler, gıdaların korunması, patojene bağlı hastalıkların tedavisi, kanser tedavisi ve insan sağlığının korunması dahil olmak üzere çeşitli uygulamalara sahip bakteriyel olarak salgılanan antimikrobiyal peptitlerdir. Nisin, negatif yüklü hücre zarlarıyla etkileşime girebilen ve hücre ölümünü teşvik etmek için hücrede gözenekler oluşturabilen katyonik bir bakteriyosindir. Aynı zamanda insan hücrelerinde minimum sitotoksosite sergilediği için Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından genel olarak güvenli (GRAS) şeklinde bir statü kazandırılmış tek bakteriyosindir. Nisin pek çok bakteri türünü hedef alan geniş bir antibakteriyel etkiye sahiptir. *In vitro* bulgular, nisinin, birçok antibiyotığın antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelerini önemli ölçüde geliştirebileceğini ve ayrıca antibiyotiklerin nisin ile birlikte kullanılması halinde, ilaca dirençli patojenlerin inhibisyonunda önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (6). Bu nedenle, bakteriyel enfeksiyonlar için nisinin klinik uygulamaları, tamamlayıcı veya alternatif bir antimikrobiyal ve antibiyofilm ajanı olarak ümit verici olmuştur (7).

P-coumaric asit, birçok hastalığın tedavisinde potansiyel faydaları ile umut vaad eden bir diğer terapötik ajandır. P-coumaric asit gibi fenolik ürünler, yaygın bitki sekonder metabolitleridir ve antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antikarsinojenik etki dahil çok çeşitli biyolojik etkiler gösterebilirler (8,9).

Biyofilm oluşumunun önlenmesi için alternatif bir tedavi yaklaşımının belirlenmesi çalışmaları son yıllarda hız kazanmıştır. Hücre-hücre iletişimini sağlayan QS, yukarıda belirttiğimiz gibi biyofilm yapısının oluşumunda rolü olan önemli bir faktördür. QS aracılığı ile bakterilerin iletişime geçmesinin engellenmesinin, biyofilm oluşumu ile etkili bir mücadele yöntemi olacağı farklı araştırmacılar tarafından önerilmiştir (10,11). Literatürdeki bu bilgilerinden yola çıkarak planladığımız çalışmamızda iki molekülün, nisin ve p-coumaric asitin, enterokokal AI-2 sinyal

molekölünün inhibisyonundaki rolünün araştırılması hedeflenmiştir. Biyofilm yapısının bir virölans özellik olduğu bilgisinden yola çıkarak, çalışmamız kapsamında nisin ve p-coumaric asidin, biyofilm oluşumu ve çeşitli virölans faktörler üzerinde etkisinin araştırılması da çalışmamızın bir diğer hedefidir.

Bildiğimiz kadarıyla literatürde henüz enterokokların QS mekanizmasını hedef alarak bu iki ajanın kullanıldığı bir çalışma mevcut değildir. Nisin bakteriyosini yapısal özellikleri itibari ile bir QS inhibisyon (QSI) molekülünün taşınması beklenen özelliklere sahip bir moleküldür. Mikroorganizmaların bu bakteriyosine karşı direnç geliştirmesinin mümkün olmayışı, nisinin önemini arttırmaktadır. Quorum sensing inhibisyonu çalışmalarında daha önce nisin bakteriyosininin etkisinin araştırıldığı hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda QSI özelliğinin araştırılmasını amaçladığımız bir diğer doğal madde olan p-coumaric asitin biyofilm yapıları üzerindeki yıkıcı etkisi konusunda sınırlı sayıda yayın bulunmakla birlikte enterokoklarda QSI özelliği konusunda literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Nisin bakteriyosini ile p-coumaric asidin kombine halde kullanımının araştırıldığı ve enterokoklarda QS mekanizması üzerine önemli etkinliklerinin belirlendiği bu özgün çalışma, biyofilm yapıları ile mücadelede kullanılacak yeni bir stratejinin belirlenmiş olması açısından önemlidir ve literatüre katkı niteliği taşımaktadır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. *ENTEROCOCCUS* CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

*Enterococcus* cinsi; *Bavariicoccus*, *Catelliococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* ve *Vagococcus* cinsleri gibi insan ve hayvan gastro-intestinal (GI) sisteminde doğal olarak bulunan cinslerin de dahil olduğu Enterococcaceae familyasına aittir. İnsan ve hayvanların gastrointestinal florasının yanı sıra; kuşlar ve bitkilerde, fermente besinler, toprak ve su dahil çeşitli ortamlarda da bulunabilmektedir (3).

Gram-pozitif, çiftler veya zincirler halinde bulunan küresel ya da oval hücre morfolojisine sahip bir türdür. Fizyolojik özellikleri açısından bu mikroorganizmalar; spor oluşturmeyen fakültatif anaerob olmakla birlikte, yüksek tuz konsantrasyonuna dirençlidirler. Genellikle glikoz fermentasyonu ile yalnızca laktik asit üretirler ve bu reaksiyon sırasında gaz açığa çıkmaz. *Enterococcus gallinarum* ve *Enterococcus casseliflavus* gibi bazı türleri hareketlidir. Aynı zamanda geniş pH ve sıcaklık aralığında canlılıklarını sürdürebilirler (3,12,13). Hipotonik ve hipertonic koşullarda canlılığını devam ettirebilmesinin yanı sıra, geniş pH (4-9,6) ve sıcaklık (10-45°C) aralığında canlı kalabildiği için doğadaki geniş bir dağılım gösterirler. Bu hayatta kalma yeteneği Enterokokları, insan sindirim sistemi içindeki ortamlarda canlılığını devam ettirmesinde ve probiyotik olarak kullanımda ideal hale getirmektedir. Böylelikle enterokoklar, geleneksel fermente gıda ve süt ürünlerinin üretiminde aroma ve kıvam arttırmada ve probiyotik veya antimikrobiyal madde üretim özellikleri nedeniyle gıdaların korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (3,14).

*Enterococcus* türlerinden *Enterococcus faecalis*, besin zincirinin tüm evrelerinde; su, toprak, bitkiler, böcekler, kuşlar, sürüngenler, memeliler gibi pek çok yerde bulunur. Bu durum, memelilerin, sürüngenlerin, kuşların ve böceklerin son ortak atalarının zamanı olan Devoniyen döneminin başından beri (~ 412 milyon yıl önce), bu türün bağırsak mikrobiyomlarının bir üyesi olduğunu düşündürmektedir -ki bu da onları GI sistemin ilk kolonilerinden biri yapmaktadır (3). *E. faecalis*, 1900' lü yılların başında *Streptococcus faecalis* olarak biliniyorken, 1960' lı yılların ortalarında *S. faecalis*' in başka bir tür olduğu yönünde bulgular elde edilmeye başlamıştır. 1970' li yıllarda *Enterococcus* adında yeni bir takson tanımlanmış ancak bu 1984'e kadar resmi olarak kabul edilmemiştir. Enterokoklar 1984 yılına kadar Grup D Streptokoklar olarak sınıflandırılmış, ardından *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium*; sırasıyla *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* olarak yeniden

düzenlenmiştir. Daha sonra Schleifer ve Kilpper-Balz genetik kanıtlar ile *S. faecalis* ve *S. faecium* türlerinin streptokok olmadığını tescillemiştir (3,15). 2002' de Facklam vd. 23 ayrı *Enterococcus* türünün varlığını geniş çaplı bir derleme ile belgelemiştir. 2008-2012 ve 2013 yıllarında 8 yeni türün daha tanımlanması ile günümüzde tanımlanmış 35 enterokok türü bulunmaktadır (3).

## 2.2. ENTEROKOKLARDA PATOJENİTE VE VİRÜLANS FAKTÖRLER

*E. faecalis* ve *E. faecium*, insan dışkıсында en bol bulunan enterokok türleri olarak kabul edilir ve çoğu enterokokal hastalığın başlıca etkenleridir. *Enterococcus durans* ise, sağlıklı yetişkinlerin dışkı florasında nadiren görülmektedir. *Enterococcus* cinsinin geniş dağılımı göz önüne alındığında, 1950'den önce tanınan bu üç *Enterococcus* türünün (*E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans*) insanlarda enfeksiyona neden olduğu tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmalar, 1970' lerde ve 1980' lerde çok sayıda ilaç dirençli hastane kaynaklı enfeksiyonların önde gelen nedenleri olarak ortaya çıkmaya başlamıştır. 1990' ların ortasına kadar, *E. faecalis* klinik izolatların % 90–95' ini oluştururken, *E. faecium* enfeksiyonu daha nadirdi. Fakat o tarihten bu yana, *E. faecium* izolatlarının oranı, büyük ölçüde antibiyotiklere, özellikle de vankomisin ve ampiciline karşı direncin yayılması ile birlikte önemli oranda artmıştır. O tarihten beri de dünyanın her yerinde, giderek artan oranlarda rapor edilmiştir (3,16). Enterokoklar genellikle zararsız olarak nitelendirilmelerine karşın pek çok antibiyotiğe doğal direnç gösterebilirler (14). Sahip oldukları antibiyotik direnci ve değişen fiziksel koşullarda hayatta kalma başarıları ve biyofilm oluşturma yetenekleri onlara mücadelesi zor, fırsatçı patojen olma özelliğini kazandırmıştır. Amerika Birleşik Devletleri' nden elde edilen verilere göre bu iki tür; kan dolaşımı, yaralar, üriner sistem ve kalp gibi bölgelerde meydana getirdiği enfeksiyonlardan dolayı hastane enfeksiyonlarının % 10' unun, bakteriyel enfektif endokardit vakalarının % 20' sinin sebebi olarak gösterilmektedirler (14).

Bakterilerin hastalık yapıcı etkisini artıran moleküller veya metabolik sistemler genel bir deyimle virülans faktörler olarak adlandırılır (17). Nazokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyon örneklerinden izole edilmiş olan *E. faecalis* ve *E. faecium'* da bulunan virülans faktörleri arasından; antibiyotik direnci, hücre dışı toksinler, mobil genetik elementler, hücre duvarı bileşenleri, biyofilm oluşumu, tutunma faktörleri ve kolonizasyon faktörü örnek verilebilir (17). Enterokok cinslerinde bulunan virülans faktörler, organizmanın izole edildiği kaynağa bağlı olarak değişebilmektedir. En fazla virülansa sahip olanlar tıbbi izolatlardır. Bu sıralamayı gıda



kaynaklı izolatlar ve başlangıç kültürü olarak kullanılan suşlar izlemektedir (17). Enterokokal türlerin neden olduğu klinik enfeksiyonların her geçen yıl büyük oranlarda artması, tedavi edilmesi oldukça zor olan biyofilm ilişkili enfeksiyonlarla ve mikroorganizmanın sahip olduğu bu virülans faktörlerle doğrudan ilişkilidir.

Enterokoklar; penisilin, ampicilin, aminoglikozitler, tetrasiklinler, karbapenemler, florokinolonlar ve makrolidlerin de dahil olduğu pek çok farklı antibiyotik grubuna karşı doğal ya da kazanılmış direnç gösterebilmektedirler. Enterokokal türlerde *vanA* ve *vanB* direnç genleri sayesinde vankomisin dirençliliğine rastlanabilir. Bu genler plazmidler üzerinde taşındıkları için, özellikle biyofilm gibi yatay gen transferi için uygun olan ortamlarda mikroorganizmalar arasında kolaylıkla yayılmaktadır. Bunların yanı sıra biyofilm oluşumu sırasında ifade edilen virülans genler de artırılmış antibiyotik direncine yol açarak, enfeksiyonlar ile mücadeleyi zorlaştırmaktadır (16).

Bakterinin konak dokularına kolonizasyonu ve bakteri hücrelerinin abiyotik yüzeylere kalıcı olarak bağlanmasını kolaylaştıran yapışkan matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenlerinin sayısı, mevcut olan genom dizilerinden çıkan sonuca göre hem *E. faecalis* hem de *E. faecium*' da bir düzineden fazladır. Test edilen klinik ve klinik olmayan izolatlar arasında en yaygın bulunan üç matriks molekülü: Ace, Acm ve Scm' dir (18).

Adını "Adh<sup>e</sup>sion of collagen from *E. faecalis*" in kısaltmasından alan Ace, *E. faecalis*' in hücre duvarında bulunan bir adezindir (18). Ace üretimi açısından mutant ve doğal tip suşlar ile gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, yüzeylere ilk tutunmanın patojenite için oldukça önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Ace'nin kalp kapakçıkları, aort dokusu gibi kolajen içeren bölgelere tutunmada önemli rol oynadığı belirlenmiştir (19). Özellikle kolajen tip I ve kolajen tip IV' e bağlandığı bilinmektedir. Buna ek olarak Ace proteininin laminin ve dentine bağlandığı da çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (18,20). Acm, *E. faecium*' daki bir Ace homologudur, çoğunlukla kolajen tip I ile etkileşime girmektedir ve kolajen tip IV ile etkileşimi zayıftır. *E. faecium*' daki ikinci adezin olan Scm ise, kollajen V' e ve fibrinojene bağlanmaya aracılık eder.

Enterokokal yüzey adezinlerinden agregasyon substratının, *E. faecalis*' in intestinal epitel boyunca translokasyonunu kolaylaştırdığı, aynı zamanda bağırsak epitel hücreleri, endokard, böbrek tübülleri, nötrofiller gibi çeşitli hücre yüzeylerine bakterinin tutunmasında rol oynadığı

bilinmektedir (21). Ayrıca glikoprotein yapısında olan bu moleküllerin polimorfonükleer lökositlerde ve makrofajlarda sağ kalımı arttırdığı bildirilmiştir (2,20)

Adını enterokokal yüzey proteininin kısaltmasından alan Esp proteini, *esp* geni tarafından sentezlenmektedir. Hücre duvarı ile ilişkili yüksek moleküler ağırlıklı bir protein olan Esp, *E. faecalis* hücrelerinin yüzeyinde yer alır. Bakteriyi konağın immün sistemine karşı koruduğu düşünülen bu protein, aynı zamanda organizmanın üriner sistemdeki kalıcılığı ve kolonizasyonu ile ilişkilendirilmiştir (2,17).

Esp proteininin sentezini ve biyofilm yapısı ile ilişkisini ele alan bazı çalışmalarda Esp'nin polistiren, floroetilen ve silikon gibi cansız yüzeylerdeki biyofilm oluşumunda görev aldığı belirtilmiştir. Hatta bu gen açısından mutant *E. faecalis* suşlarında biyofilm üretiminin gerçekleşmediği öne sürülmüştür (22). Ancak, başka bir çalışmada; yüzeye bağlanmada çok önemli olduğu söylenen Esp proteininin üretiminden sorumlu *esp* geninin incelenen 89 suştan 77' sinde bulunduğu fakat genin varlığı ile biyofilm üretim düzeyi arasında bir korelasyon olmadığı ileri sürülmüştür (20). Bu gibi çalışmalar *esp* ve biyofilm oluşumu ilişkisi hakkında kesin bir yargıya varılmasını güçleştirmektedir. Aynı şekilde bu genin, *Enterococcus virülans*ında önemli rol oynamadığını söylemek de bir o kadar zordur.

Enterokoklarda, Fsr lokusunun biyofilm oluşumu gibi virülans özelliklerin dahil olduğu, patojenite ile çeşitli süreçlerde rol aldığı bilinmektedir (23). Quorum sensing sisteminin insersiyonal inaktivasyon ile mutasyona uğratılmış *fsr* varyantlarında biyofilm oluşumunun ve jelatinaz sentezinin azaldığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Virülans ile ilişkili iki ekstraselüler proteazdan GeE (jelatinaz) ve SprE (serin proteaz), sırası ile jelatin ve kolajeni parçalama özelliğine sahip proteinlerdir. Bu proteinlerin sentezi sırası ile *gelE* ve *sprE* genleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu iki gen bakteri genomunda yanyana konumlanmıştır ve birlikte transkribe edilirler. Bu transkripsiyon Fsr quorum sensing sisteminin kontrolü altındadır (20,24).

Endokardit, peritonit, endoftalmit ve *in vitro* translokasyon modellerinde jelatinazın oldukça önemli virülans etkilere ve biyofilm oluşumunu indüklemeye etkisine sahip olduğu belirlenmiştir (23). Biyofilm ile ilişkili *in vivo* enfeksiyon modellerinde, hem GeE hem de SprE virülans için önemli bulunmuştur (20,24). Thurlow ve ekibi tavşan endokardit modelinde GeE' nin yayılmış enfeksiyon bölgelerinde bakteri sayısının artmasına katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (25). *gelE* geninin delesyonunun, otoliz ve biyofilmde bozulmalara yol açtığı da bilinmektedir. Buna

karşın *sprE*' nin otolize, eDNA salınımına ve erken biyofilm olgunlaşmasına negatif yönde bir etkisi olduğu belirtilmiştir (2). Bu da iki proteazın birbirleri ile dengeli ve uyum içinde ifade olduğu sonucuna varılmasını sağlamıştır.

Bakterilerin doğasında var olan konjugasyon sürecine biyofilm yapısının olumlu yönde destek olması sonucunda, virülans özelliklerin ve antibiyotik direnç genlerinin popülasyonda yayılmasını kolaylaştırmakta ve enterokokal enfeksiyonları ile mücadeleyi daha zor kılmaktadır.

### 2.3. BAKTERİYEL BİYOFİMLER

Biyofilm, bir veya daha fazla mikroorganizmanın kendi sentezledikleri bir ekzopolimerik matriks içine gömülü olarak biyotik ya da abiyotik yüzeylere, tutunması durumunda meydana gelen yapıya verilen isimdir.

Biyofilmlerin keşfinin 17. yüzyıla dayandığı ve ilk olarak Antonie Von Leeuwenhoek tarafından “bir tür varlık” olarak tanımlanmasıyla başladığı bilinmektedir. Bu tanımlamadan sonra uzun yıllar bu konu ile ilgili bir gelişme olmamıştır (26).

Daha sonra, 1940'lı yıllarda bilim insanları, bakterilerin bir yüzey varlığında göstermiş oldukları çoğalma ve aktivitenin aynı bölgedeki sıvı ortamlardaki popülasyonlarına kıyasla daha fazla olduğunu göstermiştir (27,28). Ancak biyofilm yapıları hakkında daha kapsamlı bilgilere ulaşılması, elektron mikroskopisinin gelişmesi ile olmuştur. Bu sayede biyofilm yapısının detaylı analizleri gerçekleştirilmiş ve mikroorganizmaların ürettikleri ekstraselüler polimerik maddeler (EPS) olarak adlandırılan ve biyofilme karakteristik özelliğini veren bu yapının, başta polisakkaritler olmak üzere; su, proteinler, nükleik asitler gibi pek çok organik ve inorganik bileşikten meydana geldiği belirlenmiştir (29).

EPS yapısı biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanması için elzemdir. Olgun bir biyofilmin yaklaşık % 75 ila % 90' ı EPS' den, kalan % 10-25' i ise yapıya katılan organizmalardan oluşmaktadır (29).

Biyofilmler, yapının olduğu ortamın stabilizasyonu, yapıda bulunan mikroorganizmaların sayısı ve çeşitliliği başta olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olarak kendi içinde farklılık gösterebilir. Fakat genel hatları ile biyofilm yapısı; organizma atıkları, su ve besinlerin taşındığı gözenekli kılcal kanallara sahiptir. Besin maddeleri biyofilmin alt tabakalarında bulunan

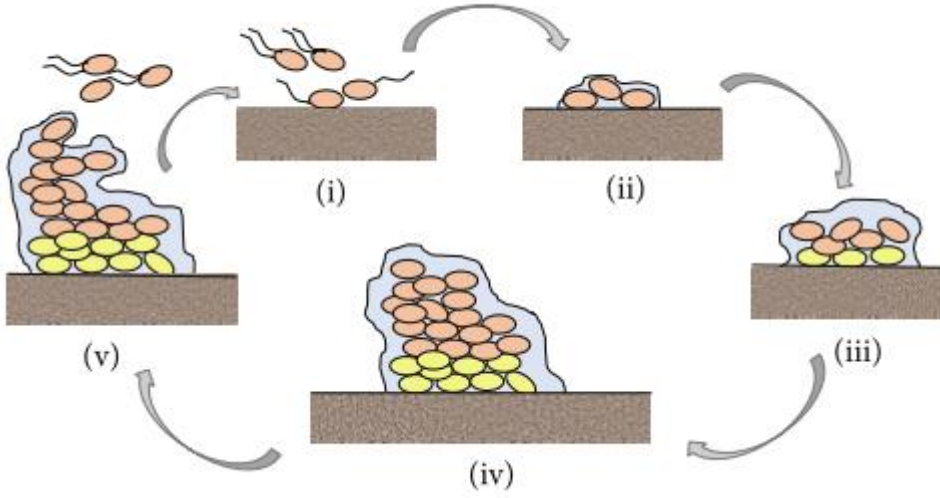
organizmalara bu kapiller kanallar vasıtası ile ulaşır. Aynı şekilde meydana gelen atıklar da bu kanal sistemi ile biyofilmin dışına atılmaktadır (30,31). Bu özellikleri ile biyofilmler gelişmiş organizmaların dokularına benzetilmektedirler.

Biyofilm yapısı mikroorganizmaların çevresel faktörlerden korunarak hayatta kalmasını sağlayan bir kalkan olarak kullanılır. Buna ek olarak dezenfektanlar ve antibiyotikler gibi mikroorganizmalara karşı mücadelede kullanılan çeşitli etkenlere karşı da direnç sağlar. Yapının antimikrobiyalere karşı planktonik formlara kıyasla bin kata kadar daha fazla direnç gösterebildiği bilinmektedir. Gösterilen bu direnç, EPS' nin bileşenleri, biyofilmin olgunluğu ve çevresel büyüme koşullarına bağlı olarak değişmektedir (32,33).

Biyofilm yapısının bakterilere kazandırdığı hayatta kalma başarısı ve ortamdaki organizmalar arasında meydana gelen yatay gen aktarımı ile artan çoklu ilaç direnci, bu oluşumun eradikasyonunu günden güne daha da zorlaştırmaktadır. Hastane kaynaklı enfeksiyonların % 65' i ve bakteriyel enfeksiyonların neredeyse % 80' inin biyofilmlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Biyofilm ilişkili enfeksiyonların her yıl çok sayıda insanın hayatını etkiliyor olması, bilim insanlarını hastalıklar ile mücadelede biyofilmi hedef almaya yöneltmiştir. Bu çalışmalar esnasında da teröpatik ajanların kullanımının yanı sıra alternatif mücadele yolları üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır (32,34).

#### **2.4. BAKTERİYEL BİYOFİMLERİN OLUŞUM AŞAMALARI**

Biyofilm oluşumu; canlı veya cansız bir yüzeye tutunma, mikrokoloni oluşumu, kolonilerin üç boyutlu bir yapı haline gelmesi ve olgunlaşma, en sonunda ise biyofilmden ayrılma ile biten basamaklardan meydana gelmektedir (Şekil 2.1.). Biyofilm oluşumu esnasında mikroorganizmaların fizyolojik fonksiyonlarının düzenlenmesi ve farklılaşması için hücreler arasında "Quorum Sensing" adı verilen sinyal mekanizması görev almaktadır (35).



Şekil 2.1. Bakteriye biyofilmlerin oluşum basamakları (i) tutunma, (ii) mikrokoloni oluşumu, (iii) olgunlaşma, (iv) olgun biyofilm yapısı, (v) ayrılma.

#### 2.4.1. BİRİNCİ AŞAMA: TUTUNMA

Tutunma, biyofilm oluşumunun ilk basamağıdır. Biyofilm oluşturulması planlanan yüzeye dönüşümlü ya da dönüşümsüz olmak üzere iki farklı şekilde tutunma gerçekleştirilebilir. Öncelikle bakteriler tarafından yüzeydeki besin miktarı, kimyası ve mikro mimarisinin yaşamaya elverişli olup olmadığı kontrol edilir. “Geri dönüşümlü tutunma” olarak adlandırılan bu aşamada bakteri yüzey ile temas halindedir ama sıkı bir bağlantı mevcut değildir. Çoğunlukla elektrostatik kuvvetler, Van der Waals etkileşimleri gibi zayıf bağlar söz konusudur. Yüzeyin şartları biyofilm oluşumu için elverişli ise geri dönüşümsüz tutunma gerçekleşir. Bu tutunmada yüzey ile bakteri arasında dipol-dipol, iyon-iyon, iyon-dipol ve kovalent bağlar gibi daha güçlü bağlar meydana gelir. Ayrıca biyofilm oluşumu için bakterinin morfolojik (flagella veya fimbria bulundurması) ve fizyolojik (EPS tabakasının üretilmesi için hücrede yapılan düzenlemeler) özellikleri de yüzeye bağlanmayı etkileyen faktörler arasındadır (26).

#### 2.4.2. İKİNCİ AŞAMA: MİKROKOLONİ OLUŞUMU VE OLGUNLAŞMA

Mikroorganizmanın yüzeye bağlanmasından sonra biyofilm oluşumu için gerekli genlerin ifade edilmesi ve planktonik yaşam formunu oluşturan gen ifadelerinin durdurulması süreci başlar. Bu sırada hücreler aktif bir şekilde bölünerek sayılarını artırır. Çoğalan hücre sayısı ile birlikte EPS salınımı da başlayarak mikrokoloni adı verilen hücre kümelerini oluştururlar. Bu

aşamada bakteriler birbirleri ile quorum sensing adlı sinyal mekanizması sayesinde etkileşim içinde kalırlar (26).

Hücre-hücre etkileşimi ortamdaki hücre yoğunluğunun tespit edilmesini ve EPS üretimi ile ilişkili gen ifadelerini düzenlenmesi sağlar. Meydana gelen yapının biyofilm olarak adlandırılmasında büyük rolü olduğunu bildiğimiz EPS, olgunlaşma basamağı için de oldukça önemlidir. Yapılan gen ifadesi düzenlemeleri ile EPS' nin artan salınımı, ortamdaki mikrokolonilerin büyüyerek içerisinde kapiller taşıma kanalları olan kompleks bir işleyişe sahip üç boyutlu mantar benzeri yapıyı kazanmasını sağlar. Mikrokoloniler arası iletişim ile başlayıp, üç boyutlu yapı kazanmaya kadar giden bu süreç "olgunlaşma" olarak adlandırılır (35).

### **2.4.3. ÜÇÜNCÜ AŞAMA: BİYOFİLM DEN AYRILMA**

Ayrılma basamağı, yapı içerisindeki hücrelerin biyofilmden ayrılmalarına ve planktonik yaşama geri dönmelerine neden olan aktif mekanizmaları belirtir. Bu olay biyofilmdeki mikrokolonilerin gelişme seviyesine ve boyutuna bağlı olarak değişmektedir (36). Biyofilmin makro yapısından ayrılan bu bakteriler, daha sonra yeni biyofilmlerin oluşmasına öncülük ederler. Bu durum enfeksiyonların yayılmasına neden olduğu için, bu basamak önemlidir.

Ayrılma, toplam biyofilm kütlelerinin azalmasını gösteren en genel terimdir, ancak ayrılma özellikleri birkaç farklı tipte sınıflandırılabilir: 1) Atılma, 2) Erozyon ve 3) Serpilme. Atılma, biyofilmin yüzeyden bir bölge olarak sıyrıldığı ve bu nedenle biyofilm kütlelerinin hızlı kaybına neden olan işlemdir. Buna karşılık, erozyon, tek bir hücrenin veya biyofilmin küçük bir bölümünün yavaş yavaş ve sürekli olarak ayrıldığı bir olaydır. Bu ayrılma türleri genellikle pasif işlemler olarak kabul edilirken, serpilme aktif bir işlemdir ve hücrelerin küçük bir bölümünün hızlı bir şekilde orta boşluklardan ayrılarak çevreye dağılmasını ifade eder. Ayrılan hücrelerin yerinde boş oyuklar meydana gelmektedir (36).

Çevresel koşullardaki küçük değişiklikler bile hücrelerin biyofilmlerden dağılmasına neden olabilmektedir. Besinlerin mevcudiyetinde meydana gelen değişiklikler ve buna bağlı olarak gerçekleşen besin kıtlığı durumu, oksijen miktarının azalması, ortam pH' sında meydana gelen değişimlerin ve bazı kimyasalların biyofilm dağılımını indüklediği bilinmektedir (36). Bunun dışında yapı içerisindeki hücre yoğunluğu sonucu biyofilmden kopmalar olduğu düşünülmektedir. Mikroorganizmaların bu ayrımı yaparak biyofilmden ayrılmaya karar vermesinde hücreler arası iletişim mekanizması olan quorum sensing (QS) sinyal sisteminin

görev aldığı düşünülmektedir. QS aracılığıyla ile EPS sentezinin durdurulması sonucu biyofilm yapısında dağılımların başladığı, çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (26,37).

Aynı zamanda mikroorganizmalar tarafından salgılanan EPS degradasyon enzimleri de biyofilm dağılımını etkileyebilir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Francisella novicida*'daki kitinazlar gibi polisakarit parçalayıcı enzimler, *Xanthomonas campestris*'teki beta-mannanaz, *P. aeruginosa*'da aljinat liyaz ve *Pseudomonas fluorescens*'teki exopolisakkarit liyaz bu tip enzimlere örnek olarak verilebilir (38).

## 2.5. QUORUM SENSİNG

Quorum sensing, diğer bir deyişle yeter sayı algılama, hücre yoğunluğuna bağlı kimyasal sinyalizasyon sistemine verilen addır. Hücreler otoindüktör (AI) olarak adlandırılan sinyal molekülleri salgılayarak çevredeki diğer organizmalara kendilerinin de orada bulunduğu bilgisini verir. Salgılanan bu otoindüktör molekülleri ortamdaki diğer mikroorganizmalarca hücre içerisine alınır. Ne kadar çok hücre var ise, o kadar çok sinyal molekülü ortamda birikir ve sinyal moleküllerinin ortamdaki bu yoğunluğuna bağlı olarak bakteriler tarafından cevap oluşturulur. Sinyal molekülünün üretiminden başlayan ve bu sinyale cevap oluşturulması ile sonlanan iletişim ağı neredeyse tüm bakterilerde mevcuttur.

Quorum sensing mekanizması ile ilgili çalışmalara, ilk olarak deniz bakterileri *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi*'nin hücre yoğunluğuna bağlı biyoluminesans ifadesi araştırılırken başlanmıştır. Her iki mikroorganizmanın da ışık üretiminden sorumlu enzimlerinin, çevredeki popülasyon yoğunluğuna bağlı olarak ortamda biriken otoindükleyici moleküllere yanıt olarak ışık ürettiği saptanmıştır (32,39). Mikroorganizmalar quorum sensing mekanizmasını kullanıp, buldukları çevredeki bakteri yoğunluğunu algılayabilmeleri sayesinde, koordine grup davranışları sergileyebilmektedirler. QS ile kontrol edilen en bilindik grup davranışı, biyofilm yapısının oluşumudur. Ancak onun dışında; bioluminesans, ortamdaki rakip mikroorganizmalara karşı savunma ya da ökaryotik konağın immün sistemine karşı kendini koruma da toplu grup davranışlarına örnek olarak verilebilir. Bunlara ek olarak; virülans faktörlerin indüklenmesi, hücre farklılaşması, antibiyotik direnci, besin sekresyon bileşiklerinin sağlanması, ekstraselüler polimer üretimi, yüzeye tutunma, biyosümfaktan sentezi ve sporulasyon quorum sensing kontrolünde düzenlenen mekanizmalardandır (40,41). Her bakteri türünün kendine özgü bir quorum sensing mekanizması vardır. Fakat sinyal üretimi, sinyal

moleküllerinin salınımı, çevrede bu moleküllerin birikimi ve son olarak bakteriler tarafından sinyalin algılanması şeklinde devam eden süreçler tüm türlerde ortaktır (24).

Bakteriler tarafından kullanılan QS sinyal molekülleri; Gram negatif bakteriler tarafından kullanılan açil homoserin laktonlar (AI-1, AHL) (26,41), Gram pozitifler bakteriler tarafından kullanılan linear (düzlemsel) ve siklik (halkasal) otoindüktör peptitler (AIP) (10,30), hem Gram negatif hem de Gram pozitifler tarafından kullanılan ve bu sayede türler arası iletişimi sağlayan otoindüktör-2 (AI-2, furanosil borat diester)' dir (24,42,43).

Gram negatif bakteriler arasında tür içi iletişimi sağlayan açil homoserin laktonların (AHL) üretimi hakkında en iyi bilinen QS sistemi, LuxI/LuxR tipi sistemdir. Bu sistem ilk olarak deniz bakterisi *V. fischeri*' de tanımlanmıştır (44).

Genel hatları ile Gram negatif bakterilerdeki QS sinyal mekanizması, LuxI tipi sinyal üretici tarafından üretilerek hücreler arası ortama salınan AHL moleküllerinin ortamda yüksek konsantrasyonlara ulaşması ile başlamaktadır. Bunun sonucunda AHL moleküllerinin ortamdaki diğer organizmaların hücre içine alınması ve hücrede bulunan LuxR benzeri sinyal reseptörüne bağlanması şeklinde devam eder. Bağlanma sonunda sinyal moleküllerinin LuxR' ın DNA bağlama bölgesini aktive etmesi, bunun sonucunda LuxR' ın katlanarak DNA' da ilgili genlerin transkripsiyonundan sorumlu promotor bölgeye bağlanması ve hedef genlerdeki transkripsiyonu başlatması şeklinde son bulmaktadır (10,44).

Gram pozitif bakterilerde hücreler arası iletişimde görev alan otoindüktör peptitlerin (AIP) birçoğu hücre içinde üretildikten sonra özel sistemler aracılığıyla hücre dışına aktarılır, çeşitli mekanizmalarla post-translasyonel olarak düzenlenir ve nihayetinde diğer hücrelerin zarlarında bulunan reseptörler tarafından tespit edilirler. Böylece virülans, genetik kompetans ve antimikrobiyal bileşiklerin üretiminin dahil olduğu çeşitli fonksiyonların ifadesi hücre yoğunluğu ve üreme fazına bağlı olarak kontrol edilebilir. Bu düzenlenmelere örnek olarak; *Bacillus subtilis* ve *Streptococcus pneumoniae*' daki genetik kompetans, *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis*' deki virülans ve laktik asit bakterilerindeki bakteriyosinlerin ve lantibiyotiklerin de dahil olduğu antimikrobiyal peptitlerin üretimi verilebilir (43,45).

Bakteriler arasındaki sinyalizasyonla iletişim, tür içi ile sınırlı kalmayıp türler arasında da meydana gelmektedir. Bu tip bakteriyel sinyalizasyon ilk olarak 1979 yılında Greenberg ve ekibi tarafından dile getirilmiştir (46). Farklı tür mikroorganizmaların inkübe edildiği ve



inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra ortamdaki bakterilerin uzaklaştırılmasıyla elde edilen gelişme ortamına *V. harveyi* bakterisinin inoküle edilmesiyle, *V. harveyi*'nin biyoluminesans ürettiği tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma, çeşitli bakteriler tarafından salgılanan sinyal moleküllerinin hücre dışı ortama salındığını ve *V. harveyi* bakterisinin bu ortamda mevcut olan diğer türlerin ürettiği sinyal moleküllerine cevap oluşturduğunu kanıtlamıştır (46). 1993 yılında ise Bassler ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, AHL sentezi yapamayan *V. harveyi* mutant suşlarının QS bağımlı gen ifadesi yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir (47). Bu gözlem söz konusu bakteride AHL sistemi dışında bir quorum sensing mekanizması daha olabileceği düşüncesini doğurmuştur. Bu düşüncenin üzerine gitmek için AI-2'ye bağımlı sistemin indüksiyonu üzerine tasarlanan çalışma için AHL-mutant bir suş oluşturulmuştur. Bu suşun, kendisinden farklı bakteri türlerinin kültür sıvılarına QS bağımlı bir cevap oluşturduğu belirlenmiş ve otoindüktör 2 (AI-2) adı verilen sinyal molekülünün varlığı ispatlanmıştır. AI-2 üretim mekanizmasının hemen hemen tüm bakterilerde aynı olmasına rağmen, sinyal molekülü algılanması ve sinyal iletim yolları tür spesifiktir. Bu mekanizmalar yalnızca *V. harveyi*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* gibi birkaç türde açıklığa kavuşturulmuştur.

AI-2 QS mekanizmasının rol aldığı süreçlere; *Campylobacter jejuni* ve *E. coli* bakterilerinin hareket etme yeteneği; *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* ve *V. harveyi*'de demir alımının kontrolü; *Salmonella Typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Vibrio cholerae*'de biyofilm üretimi; *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *E. coli* O157:H7, *Clostridium perfringens*, ve *Vibrio cholerae*'de virülans faktörlerinin ekspresyonu örnek verilebilir. Bunun dışında AI-2'nin *Porphyromonas gingivalis* ve *Streptococcus gordonii* arasında karışık kültürlü biyofilmin oluşumunu düzenlediğinin belirlenmesi, AI-2 sinyalizasyonunun cinsler arası iletişimdeki rolü için yeni kanıtlar sunmaktadır (48,49).

Patojenitede rol oynadığı bilinen pek çok özellik QS sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle bakteriler ile, özellikle de patojenler ile mücadelede QS' i hedef alarak bakteriyel iletişimin engellenmesi yolu ile enfeksiyonun önlenmesi, son yıllarda üzerinde yoğun araştırmalar yapılan bir konudur. QS sisteminin inhibisyonunda üç temel strateji bulunmaktadır. Bunlar; i) sinyal üretiminin inhibisyonu, ii) sinyal molekülünün inhibisyonu ve iii) sinyal alımının inhibisyonudur. Belirlenen bu stratejiler organizmanın bazal metabolik aktivitelerini hedef almadığından, mikroorganizmaların bu uygulamalara direnç geliştirmesi söz konusu

olmamaktadır. Bu özelliği nedeniyle QSI (Quorum sensing inhibisyonu), enfeksiyonun önlenmesinde etkili bir mücadele yöntemi olarak kabul görmektedir.

## **2.5.1. ENTEROCOCCUS CİNSİ BAKTERİLERDE QUORUM SENSİNG MEKANİZMALARI**

### **2.5.1.1. Fsr Aracılığı ile Sinyalizasyon**

*Enterococcus* cinsinde en iyi karakterize edilmiş sinyal iletim sistemi, bir histidin kinazdan ve benzer yapıdaki cevap regülatörü bölgesinden oluşan iki bileşenli sistemlerdir. Bu sistemlerden en iyi çalışılmış olanı da *fsr* (*E. faecalis* sensör regülatörü) bağımlı QS sinyalizasyonudur. Fsr sisteminde yer alan sinyal molekülü ise GBAP molekülüdür. Bu molekül adını Jelatinaz sentezini aktive eden feromonun (gelatinase biosynthesis activating pheromone) kısaltmasından almaktadır. GBAP tipik bir otoindüktör peptittir ve patojenite ile ilişkili iki ekstraselüler proteazın ifadesini kontrol eder. Bu molekül kimyasal yapısı ve histidin kinaz reseptörünü harekete geçiren etki mekanizması sayesinde Fsr sinyalizasyonuna katılır (24).

*E. faecalis* 'in Fsr quorum sensing sistemi, bir histidin kinazın (FsrC), GBAP birikimine tepki gösterdiği ve cevap regülatörünün (FsrA) fosforillenmesi basamakları ile stafilokokal Agr sistemine kısmen benzemektedir (50). 11 amino asit içeren peptit laktonu olan GBAP molekülü, FsrD tarafından kodlanan ve 53 amino asitten oluşan propeptitin işlenmesi sonucu meydana gelir (20). GBAP' in olgun formu FsrB tarafından hücre dışına salınır. GBAP molekülleri FcrC' ye bağlanarak hücre içine alınır ve FsrA' nın fosforilasyonunu başlatır. Fosforillenen FsrA, *fsrBCD* gen bölgesine ya da *gelE* ve *sprE* ' nin promotor bölgesine bağlanır ve bu operonların çalışmasını düzenler (24).

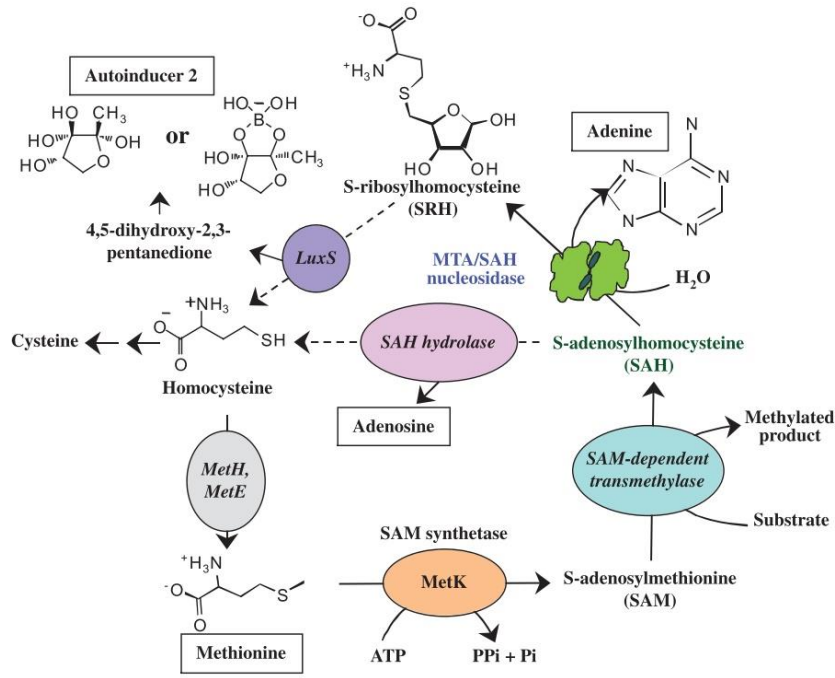
*gelE* ve *sprE* sırasıyla jelatinaz (GelE) ve serin proteazı (SprE) kodlayan genlerdir. Bu iki proteaz *E. faecalis* ' in hücre yüzey proteinlerinin proteolitik aktivitesi, morfolojisi ve adezyon özelliklerinin düzenlenmesinde etkilidir. Bu da direkt veya indirekt yolla *E. faecalis* ' in biyofilm oluşumu ile ilişkilidir (24). Hatta Pinkston ve arkadaşları, *E. faecalis* ' te biyofilm yapısı ile ilişkili proteinlerden Ace' nin de Fsr QS mekanizması ile kontrol edildiğini göstermişlerdir (51). Tüm bunlar Fsr sisteminin *E. faecalis* ' in virülansı ile büyük ölçüde ilişkili olduğunu ifade etmektedir.

### 2.5.1.2. Otoindüktör-2 Aracılığı ile Quorum Sensing Sinyalizasyonu

Enterokokların da dahil olduğu pek çok bakteri cinsinin AI-2 üretme özelliğine sahip olduğu bilinmektedir (52,53). Fakat diğer bakteriyel sinyal mekanizmalarının aksine AI-2 sinyalizasyonu, aynı çevresel nişe sahip farklı cins bakteriler arasında etkileşimi sağlamak üzere gelişmiştir (20).

Gerçekleştirilen çeşitli araştırmalar sonucunda farklı mikroorganizmaların genomunda AI-2 üretiminden sorumlu genin *luxS* olduğu belirlenmiştir (54–56). Günümüze kadar elde edilen karşılaştırmalı dizi analizli verileri ışığında, incelenen 1402 bakterinin 537' sinin genomunda *luxS* homologları olduğu belirtilmiştir. *luxS* genini ya da homologunu içeren tüm mikroorganizmaların gelişme ortamlarında AI-2 moleküllerinin tespit edilmesi, bu bakterilerin türler arası iletişimde AI-2 molekülünü kullandığı görüşünü güçlendirir niteliktedir (48).

AI-2' nin üretimi LuxS adı verilen enzime bağlı olarak gerçekleşmektedir (57). Aktive metil döngüsü sırasında S-adenozil metiyonin bağımlı metil transferaz reaksiyonunda DNA, RNA, protein ve metabolitler metillenir ve S-adenozil homosistein oluşur. Metiladenozin/S-adenozil homosistein nükleozidaz enzimi, S-adenozil homosistein' i S-ribozil homosistein' e dönüştürür. Sonrasında LuxS (S-ribozil homosistein bölücü enzim) S-ribozil homosistein'i homosistein ve 4,5-dihidroksi-2,3-pentandion' a ayırır. AI-2 öncü molekülü olan 4,5-dihidroksi-2,3-pentandion (DPD) halkasal forma geçerek AI-2 enantiyomerlerini oluşturur (57,58) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Otoindüktör 2 molekülünün oluşum aşamaları (58)

AI-2 sinyalizasyonunun, *S. pneumoniae* gibi enterokoklar ile benzerlik gösteren Gram pozitif bakterilerde biyofilm oluşumunda önemli olduğu bilinmektedir (59). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, AI-2 sinyalini pnömokoklarda, rakip organizmalarla mücadelede önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (60). Enterokok biyofilmleri ve diğer virülans faktörleri söz konusu olduğunda, AI-2 mekanizmasının süreçler boyunca nerelerde ve nasıl rolü olduğu hala yeterince açık değildir. Açık olan şey, enterokok biyofilm gelişimindeki hücre-hücre iletişiminin incelenmesinin, biyofilm yapısının doğasının anlaşılması açısından oldukça önemli olduğudur.

## 2.6. BİYOFİLM YAPISI İLE MÜCADELEDE KULLANILAN ANTİMİKROBİYALLERİN ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMALARI

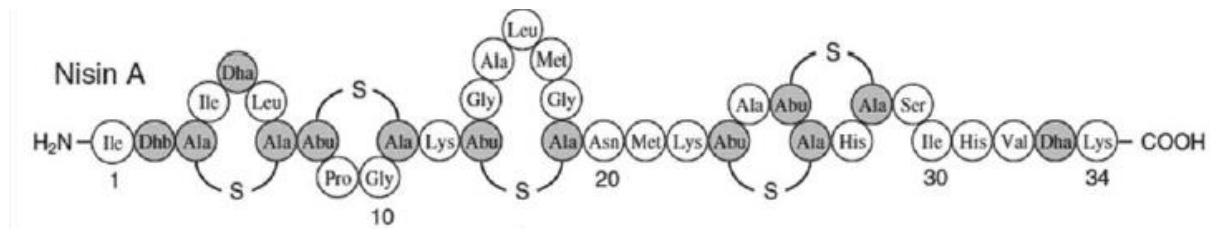
### 2.6.1. NİSİN

Bakteriyosinler, aynı yaşam alanını paylaşan bakterilerin, ortamdaki rekabette hayatta kalmaya devam etmeleri için zayıf olanları öldürmekte kullandığı düşük molekül ağırlıklı peptitlerdir. Bir bakteri türü tarafından sentezlenen bakteriyosin aynı tür bakterileri inhibe edebildiği gibi, farklı cins bakteriler üzerinde de inhibisyon etkisi gösterebilir. İstisnai durumlarda bazı bakteriyosinler sahip oldukları antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra anti-viral ve anti-fungal

özellikler de sergilemektedir. Bakteriyosinler genellikle Gram pozitif bakteriler tarafından sentezlenmekle birlikte, Gram negatif bakteriler ve arkeler tarafından da sentezlenmektedir (61).

Bakteriyosinlerin mikroorganizmalar üzerindeki inhibitör etkisi dolayısıyla araştırmacılar bu peptitler üzerinde daha detaylı çalışmalar yapmaya başlamışlardır. Bu çalışmalar bakteriyosinlerin gıda koruyucu etkileri üzerine yoğunlaşarak ilerletilmiştir. En iyi çalışılmış bakteriyosin grubu, laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen bakteriyosinlerdir. En basit hali ile üç sınıfa ayrılırlar; Sınıf I- küçük, post-translasyonel olarak düzenlenen peptitler (lantibiyotikler); Sınıf II- küçük, ısıya dayanıklı, düzenlenmeyen bakteriyosinler ve Sınıf III- büyük ve ısıya aşırı duyarlı peptitler (62). Gıda koruma ile ilişkili bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinlerin çoğu, Sınıf-I ve Sınıf-II' ye aittir. Bu bakteriyosinlerin en önemli sınıfı spesifik biyolojik aktivitelere sahip ender bir aminoasit olan, lantionin (Lan) içeren “lantibiyotikler”dir. Günümüzde 25’ ten fazla lantibiyotik tanımlanmıştır. İçlerinden en önemlisi ve en çok çalışılan “nisin”dir (63,64).

Nisin, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen 3500 Da moleküler ağırlığa sahip 34 amino asit içeren, dimer (7.000 Da) ve tetramerler (14,000 Da) oluşturma yeteneğine sahip bir polipeptittir (61,63). Nisin üretiminden ve dirençlilikten sorumlu genler kromozomal DNA'da bulunur. 57 aminoasit uzunluğunda öncü bir peptid zinciri olarak eksprese edilir, post transkripsiyonel olarak modifiye edilir ve hücrelerin dışına salgılanır (61). Nisin aromatik aminoasit içermediği için, diğer proteinlerin aksine 280 nm' de absorbands vermez. Katyonik bir polipeptittir, hidrofobiktir ve ısıya dayanıklıdır (63). Nisinin primer yapısı oldukça basittir. Beş pozisyonda tiyoeter köprüleri oluşturan, dört ender amino asit içerir. Bunlar; dehidroalanin (DHA), dihidrobutirin (DHB), lantionin ve  $\beta$ -metillantionindir (61,63) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Nisin A polipeptit zinciri.

Bugüne kadar, sekiz nisin çeşidi tanımlanmıştır. Bunlar; nisin A (65), nisin Z (66), nisin Q (67), nisin P, nisin U ve U2 (68), nisin F (69) ve nisin H' tir (70). Nisin A ve Z en aktif formlardır.

Bu iki varyant, 27. pozisyonadaki bir aminoasit ile farklılık gösterir: Nisin A' da histidin ve Nisin Z' de ise asparajin bulunmaktadır (63).

Nisinin keşfi ile ilgili ilk makale 1933 yılında Whitehead tarafından yayınlanmıştır (71). Daha sonra nisin, 1950'lerde ilk kez, peynir kontaminasyonundan sorumlu *Clostridium tyrobutyricum*' un gelişimini engellemek amacıyla ticari olarak kullanılmıştır (63). Nisin 1969 yılında, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nün onayını almıştır ve E234 numarası ile Avrupa gıda katkı maddeleri listesine eklenmiştir. Nisinin kullanımının onaylanmasının birçok nedeni vardır. Özetle; geniş antimikrobiyal etkisi, sindirim enzimleri tarafından kolayca parçalanabilir olması, insan sağlığı açısından risk oluşturmuyor olması ve yiyeceklerin tadı, kokusu, rengi ve görünüşü üzerinde değişikliğe yol açan bir etkisinin olmaması başlıca tercih sebepleridir. Kullanımına izin verilen maksimum nisin miktarı ile ilgili mevzuat ülkeler bazında değişiklik göstermektedir. Nisin, gıda korumasında (E234) kullanıldığı süre boyunca hiçbir sağlık problemine neden olmadığı için, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 1988'da Genel Olarak Güvenli (GRAS) şeklinde onaylanmıştır ve aksi bir durum tespit edilmediği için günümüzde de GRAS olarak kabul görmektedir. Nisin FDA tarafından gıda koruyucu olarak kullanımı onaylanan tek bakteriyosin oluşu ile de dikkat çekmektedir (63).

Nisin, gıda patojenleri *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*, başta olmak üzere Gram-pozitif bakterilere karşı oldukça etkili olmakla birlikte, *Clostridium* ve *Bacillus* türlerinde spor gelişimini önleyici etkileri de vardır. Ayrıca, EDTA, ısıtma işlemi ve donma gibi hücre duvarının yapısının değişmesine neden olan herhangi bir uygulama ile birlikte kullanıldığında *Escherichia coli* ve *Salmonella* gibi Gram-negatif patojen türlerini de inhibe edebilmektedir. Bu nedenle günümüzde pastörize sütün, geleneksel peynirlerin, hazır çorbalar, konserve yiyecekler ve sebzelerin korunmasında sıklıkla kullanılır (63,72).

Nisinin antimikrobiyal özelliği kristal yapısından kaynaklanmaktadır. Pozitif yüke sahip olan nisin ve negatif yüklü membran fosfolipitleri arasındaki elektrostatik etkileşimler sonucunda, nisin antimikrobiyal etkisini gösterir. Nisin, bakteriyel hücre duvarının temel bir bileşeni olan ve peptidoglikan sentezinde önemli rol oynayan lipit-II molekülünün NH<sub>2</sub> terminal bölgesine bağlanarak hücrenin peptidoglikan sentezini inhibe eder. Nisinin lipit-II' ye entegrasyonunun etkinliği, hedef bakteri suşlarının hücre zarı fosfolipidlerinin doğasına ve içeriğine bağlıdır (6,61,63).

Buna ek olarak nisin, sitoplazma zarı potansiyelinin değişmesi ve sonuçta zarda hücre ölümüne yol açan porları oluşturmak için de lipit-II ile etkileşir. Oluşan gözenekler dolayısıyla sitoplazma bileşenleri hücre dışına çıkar ve bakteri ölümü gerçekleşir. Bakteriyosinler genelde bu iki mekanizmadan birini kullanarak etkinlik gösterirken, nisin her iki mekanizmayı da kullanabilir (62). Sahip olduğu bu etkiler sayesinde bakteri hücrelerinin bir cevap oluşturmasına fırsat vermeden onların ölümüne sebep olması, organizmaların nisine direnç geliştirmesini zorlaştırmaktadır. Bu da mikroorganizmalar ile mücadelede nisine oldukça önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Nisinin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus* ve *Clostridium difficile* gibi bakteri suşlarının üremesini önleyebileceği kanıtlanmıştır (73). Nisin, birçok antibiyotiğin antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelerini önemli ölçüde geliştirebilir. Antibiyotikler ile kombine halde kullanıldığında, antibiyotiğe karşı direnç sahibi patojenler üzerinde dahi etkili olabilmektedir (6).

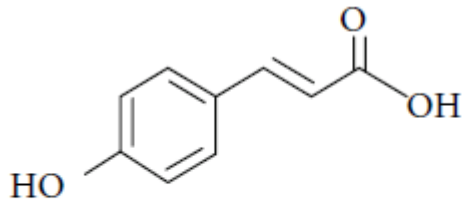
Son yıllarda yeni nesil ilaç uygulamaları kapsamında biyofilmleri ve dirençli mikroorganizmaları hedeflemek amacıyla nisin kullanılmasına artan bir ilgi duyulmaktadır (7,73). Nisinin sahip olduğu antibiyofilm karakteristikleri ve terapötik ilaçlarla kombine edildiğinde gösterdiği sinerjik aktivite ve hücre zarı üzerindeki etkileri sayesinde nisine karşı direnç geliştirilmesinin zor oluşu, biyofilm ile mücadelede bu ajanı önemli bir konuma getirmektedir. Ek olarak, konak savunma peptitleri gibi adaptif immün yanıt aracılarını aktive edebilmekte ve bir immünomodülatör olarak rol oynamaktadır (73). Günümüzde farklı mekanistik özelliklerdeki terapötiklerin biraraya getirilmesiyle oluşan daha etkin ilaç tasarımlarından faydalanıldığı gözlenmektedir. Tüm bu bilgiler işığında biyoaktif bir ajan olan nisinin endojenik güçlü anti-mikrobiyal etkileri güncel deneysel terapötik gelişim protokollerine uygunluk sağlamaktadır.

## 2.6.2. P-COUMARİC ASİT

4-hidroksisinamik asit ( $C_9H_8O_3$ ), yaygın olarak bilinen adıyla p-coumaric asit (pCA), 164,16 g/mol moleküler ağırlıklı, sarı renkli kristal toz halinde bulunan bir molekdr. 221,5°C erime sıcaklığına sahiptir. Etanol, DMSO, dimetilformamid gibi organik zcler ile üzülür. Suda ve sulu tamponlarda znmez (8).

pCA, şikimat metabolik yoldan sentezlenen bir fenilpropenoik asittir; nc aromatik amino asitler tirozin ve fenilalaninden elde edilir (74). Coumaric asit, sinnamik asitin hidroksi türevidir

ve üç izomeri vardır. Bunlar; o-coumaric, m-coumaric ve p-coumaric asittir. Bu izomerler arasındaki fark aromatik halkadaki hidroksi grubun pozisyonundan kaynaklanmaktadır (Şekil 2.4.). pCA doğada en bol bulunan izomeri olup; domates, havuç, soğan, elma, armut, kahve, çilek, mısır ve buğday gibi çok sayıda meyve, sebze ve tahılda bulunur. Bitkilerdeki yaygın bulunması nedeniyle insan ve hayvanlarda beslenme yolu ile sıklıkla alınmaktadır. Bitkilerde serbest formda bulunabilir veya aminler, organik asitler, alkoller, mono veya oligosakaritler ve lignin gibi diğer moleküllere konjuge edilebilir. Bağlı formlar daha fazla miktarda bulunur ve serbest pCA'dan daha güçlü biyolojik aktivitelere sahiptir (8).



p- coumaric asit

Şekil 2.4. P-coumaric asitin kimyasal formülü (9)

pCA gibi fenolik bileşiklerin reaktif oksijen türlerini temizleme ve endojen antioksidan enzimlerini düzenleme gibi antioksidan özellikleri olduğu bilinmektedir. Böylece biyomoleküllerde oksidatif hasarı önlerler. Bu antioksidan özellik kimyasal yapı ile de ilişkilidir ve pCA'nın sahip olduğu fenil hidroksi grubu bu antioksidan aktiviteden sorumludur (8). Aynı zamanda böbrek ve karaciğer koruyucu etkileri sayesinde hipotoksisite ve nefrotoksisiteyi tedavi etmede de kullanılmaktadırlar (75).

Bu özelliklerin yanı sıra pCA'nın hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde antibakteriyel etkileri kanıtlanmıştır. Deneysel veriler ışığında, p-coumaric asidin, hücre zarı geçirgenliğini geri dönüşümsüz olarak değiştirerek hücrelerin sitoplazma makromoleküllerini muhafaza etme yeteneğini kaybetmesine ve DNA'ya bağlanarak hücre fonksiyonlarının inhibisyonuna sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca Gram negatif bakterilerde, AHL moleküllerini belirgin bir şekilde inhibe ettiği ve bu sayede flagella ve biyofilm oluşumu gibi QS bağımlı fenotiplerin bozulmasına yol açtığı da yine araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (9,76,77).



Sonuç olarak, düşük toksisite, doğada geniş dağılım ve ilginç farmakolojik etkiler gibi biyolojik özelliklere sahip olması; kimya, gıda, sağlık, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde kullanım için pCA' nın benimsenmesine yol açmış ve araştırmalarda sıklıkla kullanılmıştır (8,78–80).



### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Antibiyotikler, yirminci yüzyılda insan ve hayvan sağlığını korumak için oldukça sık kullanılmaktaydı. Bu dönemde milyonlarca insanın hayatını kurtarmakla birlikte, yaygın ve kontrolsüz kullanımları sonucunda patojen bakterilerin antibiyotiklere dirençli suşlarının seçiliminin gerçekleşmesi söz konusu olmuştur. Günümüzde, antibiyotik tedavisi başarısızlıklarından ötürü dünyada her yıl yüzbinlerce ölüm meydana gelmektedir. Şu anda, bu sorunun aşılabilmesi için yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi çalışmaları devam etmektedir. Bununla birlikte, denenen yeni ilaç moleküllerine karşı patojen mikroorganizmaların dirençli olma veya zaman içerisinde direnç geliştirme riskleri mevcuttur.

Enterokok türlerinden *Enterococcus faecalis*, dünya çapında hastane enfeksiyonlarının önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır. *E. faecalis*, çeşitli antibiyotiklere karşı hem doğal hem de kazanılmış bir direnç sahiptir ve yalnızca antibiyotik tedavisi uygulanarak bu patojenle mücadele etmek oldukça zordur (2). Dolayısı ile mikroorganizmalar ile mücadelede doğal bileşiklerin kullanılması ve onlar üzerinde seçilimsel bir baskı kurmayacak ve bu sayede direnç gelişiminin önüne geçilecek yeni stratejilerin araştırılması gerekmektedir.

TÜBİTAK 118Z697 kodlu proje desteği ile gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasında, yeni strateji ajanları olarak, bitkilerde yaygın bir şekilde bulunan sekonder metabolitlerden p-coumaric asit ve mikroorganizmaların kendi savunma sistemlerinin bir parçası olarak kullandıkları nisin bakteriyosini seçilmiştir. *E. faecalis*' in planktonik formları üzerinde nisin yüksek düzeyde etkinlik gösterdiği daha önce çalışma grubumuz tarafından belirlenmiştir (81). Nisin çeşitli ajanlar ile beraber uygulanmasının biyofilm yapısı üzerinde oldukça etkili olduğu da daha önce çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (6,82,83). Fakat daha önce de belirtildiği üzere, bakterilerin biyofilm oluşturma süreçlerinde QS mekanizmasının rol aldığı bilinmekle birlikte, bu güne kadar *E. faecalis* türlerinin biyofilm yapısı ile mücadelede quorum sensing mekanizmasının hedef alındığı bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Tez çalışmamız, nisin ve pCA'nın *E. faecalis* biyofilm oluşumu üzerine etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olması ile özgündür ve elde ettiğimiz bulgular literatürdeki önemli bir eksikliği de tamamlayacak niteliktedir.

Tez çalışmamızda ayrıca *E. faecalis* patojenitesinde önem taşıyan 3 virülans genin (*sprE*, *ace*, *gelE*) ifadeleri üzerine bu iki ajanın etkisi de araştırılmıştır.

Çalışmamız sonucunda elde etmiş olduğumuz bulgular, nisin ve pCA'nın kombine olarak uygulanması sonucunda, *E. faecalis* suşunda, QS sinyal moleküllerini inhibe ettiği ve biyofilm oluşumunu önlemede oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, enterokok enfeksiyonları ile mücadelede bu iki ajanın kullanılması halinde başarı sağlanacağına işaret etmektedir. Daha önemlisi, söz konusu bulgu biyofilm yapısı ile mücadelede yeni bir formülasyonun oluşturulmasına öncülük edecek niteliktedir.



## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

#### 4.1.1. BAKTERİLER

Çalışmada kullanılan 2 adet *Enterococcus faecalis* (gıda kökenli 74 ve klinik kökenli 114 kodlu suşlar) suşları ile kontrol suşu olarak kullanılan *E. faecalis* OG1RF suşu kendi kültür koleksiyonumuzdan sağlanmıştır. Suşların quorum sensing özelliklerinin araştırılmasında kullanılan *Vibrio harveyi* BB170 suşu ise ATCC (American Type Culture Collection) kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Planktonik formdaki *E. faecalis* örnekleri Tryptic Soy Broth (TSB) ortamında 37 °C' de statik koşullarda geliştirilirken, biyofilm üretimi çalışmalarında gelişme ortamına % 1 oranında glukoz ilave edilmiştir. *Vibrio harveyi* BB170 örnekleri ise otoindüktör biyoanaliz besiyerinde (AB Broth) 30 °C' de çalkalamalı koşullarda geliştirilmiştir. Kültürlerin stokları hazırlanırken, gelişme ortamları içerisine % 30 oranında gliserol ilave edilerek -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

#### 4.1.2. BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLER

##### **Tryptic Soy Broth (TSB)(22092) ve Agar (Merck, Germany)(101613)**

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Pepton                      | 17 g   |
| Soyton                      | 3 g    |
| di-Potasyum Hidrojen Fosfat | 2,5 g  |
| D(+)-Glukoz                 | 2,5 ml |
| NaCl                        | 5 g    |
| Agar                        | 15 g   |

Besiyeri içerikleri ve agar 800 mL dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldükten sonra besiyeri hacmi 1000 ml'ye tamamlanır. Besiyerinin pH'sı 7,3 ± 0,02'ye ayarlanıp otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Su banyosunda 55 °C'ye kadar soğutulup Petri kaplarına dökülür ve 4°C'de muhafaza edilir.

### **Mueller Hinton II Broth- Katyon Eklenmiş (BD, USA)(212322)**

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Sığır Eti Ekstraktı     | 3 g    |
| Kazein Asit Hidrolizatı | 17,5 g |
| Nişasta                 | 1,5 g  |

Besiyeri içerikleri 800 mL dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldükten sonra besiyeri hacmi 1000 ml'ye tamamlanır. Besiyerinin pH'sı  $7,3 \pm 0,1$ 'ye ayarlanıp otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

### **Otoindüktör Biyoanaliz Besiyeri (2746 AB Medium)**

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| NaCl (Merck, Germany)               | 17,5 g |
| MgSO <sub>4</sub> (BioShop, Canada) | 12,3 g |
| Casamino asit (BD, USA)             | 2,0 g  |

Yukarıdaki içerik 970 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldükten sonra 3N NaOH ile pH' sı  $7,5 \pm 0,02$ 'ye ayarlanıp otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Tamamen soğuduktan sonra aşağıdaki içeriklerin steril stoklarından belirtilen hacimlerde eklemeler yapılarak son hacim 1000 ml' ye tamamlanır.

|  |       |
|--|-------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH=7.0) (BioShop, Canada) | 10 ml |
| 0,1 M L-arginine (Merck, Germany)                          | 10 ml |
| Gliserol (Sigma, USA)                                      | 10 ml |

### **Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi (PBS)**

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 8 g    |
| KCl                              | 0,2 g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1,44 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,24 g |

İçerikler 800 ml distile su içerisinde çözülür pH'sı HCl ile  $7,4 \pm 0,02$ 'ye ayarlandıktan sonra son hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121°C' de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilir.

### **Glukoz Cözeltisi (%5)**

Glukoz 5 g

100 ml distile su ile iyice çözünmesi sağlandıktan sonra, 0,45µm por çaplı filtre ile sterilize edilir.

### **Marine Broth (BD, USA)(279110) ve Agar (Merck, Germany)(101613)**

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Pepton                           | 5g     |
| Maya Ektraktı                    | 1g     |
| Ferrik Sitrat                    | 0,1g   |
| NaCl                             | 19,45g |
| MgCl                             | 5,9g   |
| MgSO <sub>4</sub>                | 3,24g  |
| CaCl <sub>2</sub>                | 1,8g   |
| KCl                              | 0,55g  |
| NaHCO <sub>3</sub>               | 0,16g  |
| KBr                              | 0,08g  |
| SrCl <sub>2</sub>                | 34mg   |
| Borik Asit                       | 22mg   |
| Sodyum Silikat                   | 4mg    |
| NaF                              | 2,4mg  |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>  | 1,6mg  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 8mg    |
| Agar                             | 15g    |

800 ml distile su ile kademeli olarak ısıtılarak karıştırılır, tozun tamamen çözünmesi için 1 dakika kaynatıldıktan sonra pH'sı  $7,6 \pm 0,02$ 'ye ayarlanır ve son hacim 1000 ml' ye tamamlanarak otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Son sıcaklığı 55 °C'ye geldiğinde Petri kaplarına dökülür ve 4°C'de muhafaza edilir.

### 4.1.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN ANTİMİKROBİYAL MADDELER

#### 4.1.3.1. Nisin

Toz halinde bulunan nisin bakteriyosini (Sigma-Aldrich/ABD) (N5764) 0,02N hidroklorik asit (HCl) içerisinde çözülmüş, ardından 0,45 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve çalışma hacimlerine bölünerek -20 °C' ye kaldırılmıştır. Çalışmalarda kullanılacak nisin çözeltisi, her suş için belirlenen konsantrasyonlar baz alınarak denemelerden önce hazırlanmıştır. Belirlenen konsantrasyonlar kısım 5.1.1.' de belirtilmiştir.

#### 4.1.3.2. P\_Coumaric Asit

P-Coumaric asit (Sigma-Aldrich/ABD) (C9008) stok çözeltisi 40 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde etanol (Sigma-Aldrich/ABD) içinde homojen bir çözelti elde edilinceye kadar karıştırıcı yardımıyla çözülmüş ve sonrasında 0,45 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Stok çözelti -20 °C'de muhafaza edilmiştir. P-Coumaric asitin kullanılacağı denemelerde ise, her suş için belirlenen MİK konsantrasyonlara göre stok çözelti seyreltilerek kullanılmıştır.

### 4.1.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN PRİMER DİZİLERİ

Çalışmamızda; nisin, p-coumaric asit ve bu iki ajanın kombinasyonu *E. faecalis* suşlarımızın virülans genleri üzerine etkilerinin araştırılmasında kullanılan primer dizileri Çizelge 4.1.' de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada ifade düzeylerindeki değişimlerin araştırıldığı virülans genler ve bu genlerin araştırılmasında kullanılan primerler

| Genin Adı   | Genin Fonksiyonu                            | İfadesinin Araştırılan Genin Primer Dizisi |
|-------------|---|--|
| <i>sprE</i> | Serin proteaz üretiminden sorumlu gen       | F' 5'-CGACCATTGCGTGTGGTTTT-3'              |
|             |   | R' 5'-ATTGCGGTAGTGACTGTCCGG-3'             |
| <i>ace</i>  | Kolajene adezyondan sorumlu proteini kodlar | F' 5'-AAAGTAGAATTAGATCCACAC-3'             |
|             |   | R' 5'-TCTATCACATTCGGTTGCG-3'               |

|             |                                   |                                 |
|-------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| <i>gelE</i> | Jelatinaz üretiminden sorumlu gen | F' 5'-AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC-3' |
|             |                                   | R' 5'-CTTCATTATTTACACGTTTG-3'   |

## 4.2. YÖNTEM

### 4.2.1. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN *E. FAECALİS* SUŞLARININ PLANKTONİK FORMLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

#### 4.2.1.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testlerimizde kullanacağımız ajan konsantrasyonları, daha önceki çalışmalarda belirlenen konsantrasyonlardan yola çıkarak 0.5-0.0038 mg/ml olarak belirlenmiştir (84). Çalışmanın ilk aşamasında 96 kuyulu polistiren plakların her bir kuyusuna, 50 µl katyonu ayarlanmış Mueller Hinton II Broth aktarılmıştır. İkinci aşamada plakların ilk sırasına test edilecek ajanın araştırılmak istenilen konsantrasyonunun 4 katı konsantrasyonda ajandan 50 µl aktarılmıştır. 1 numaralı kuyucuktan 11 numaralı kuyucuğa kadar iki kat seri dilüsyon yapılmıştır ve 11. kuyucukta dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra 50 µl sıvı kuyudan uzaklaştırılmıştır. Mikroorganizmaları içeren ancak antimikrobiyal eklenmeyen 12 numaralı kuyucuk üreme kontrolü olarak kullanılmıştır. Hazırlanan tüm kuyuların üzerine, 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanan bakteri süspansiyonu 100 kat sulandırılarak (1-2x10<sup>6</sup> KOB/ml) 50 µl' lik hacimlerde eklenmiştir. Plaklar 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün bulanıklığın görülmediği ilk kuyudan 10 µl sıvı alınarak TSB agar plaklarına damlatma ekimleri yapılmıştır. Agar üzerinde üremenin gözlemlenmesi halinde, test edilen kuyudaki ajan konsantrasyonu Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), üremenin olmaması durumunda ise damlatılmış olan konsantrasyon Minimum Letal Konsantrasyon (MLK) değeri olarak belirlenmiştir. Denemeler her suş için farklı günlerde 3 tekrar olarak yapılmıştır.

### 4.3. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN *VİBRİO HARVEYİ* BB170 'İN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Nisin ve p-coumaric asitin raportör *Vibrio harveyi* BB170 suşu üzerinde bir inhibisyon etkisi olması halinde, doğabilecek hatalı değerlendirmelerin önüne geçebilmek amacı ile kontrol



olarak bu ajanların *Vibrio harveyi* BB170' in canlılığı üzerindeki etkisine bakılmıştır. En yüksek inhibitör etkiyi gösteren inhibitör konsantrasyonlarının (0,5mg/ml nisin, 1mg/ml pCA ve 0,5mg/ml nisin+1mg/ml pCA) kullanıldığı denemede, AB broth içerisinde bu konsantrasyonlara ayarlanan ajanlar 96' lık mikropklara 10 µl olarak dağıtılmıştır, üreme kontrolü olan kuyuya 10 µl AB broth eklenmiştir. Bu kuyuların üzerine 90 µl 1:5000 dilüe edilmiş bir gecelik *V. harveyi* BB170 kültürü eklenmiş ve AI-2 tahlilindeki süre kadar, yani 3 saat çalkalamalı olarak 30 °C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde yapılan seri dilüsyonlar sonrasında Marine Agar üzerine 10 µl hacimle damlatma ekimler yapılarak canlı hücre sayısı tespit edilmiştir. Denemeler üç farklı günde tekrar edilerek gerçekleştirilmiştir. Kontrol ile test grubu arasındaki canlı hücre sayıları t testi yapılarak değerlendirilmiştir. Test sonucunda hesaplanan p değerlerinin 0,05' ten büyük olup olmadığına bakılarak hücre sayıları arasındaki farklılığın anlamlı olup olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken bu durum göz önüne alınmıştır.

#### **4.3.1. TEST EDİLEN ENTEROKOK SUŞLARININ AI-2 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

##### **4.3.1.1. Suşlardan Süpernatant Eldesi**

*E. faecalis* suşlarımız Tryptic Soy Broth (TSB) ortamına % 1 oranında inoküle edilmiş, statik koşullarda 37 °C'de eksponansiyel fazın ortalarına kadar (OD=0.3-0.5) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra test edilecek olan *Enterococcus* örneklerinden 1.5 mL alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve 10.000 g 'de 2 dk boyunca santrifüj uygulaması ile hücreler çöktürülmüştür (84,85). Hücrelerin tamamen uzaklaştırılması amacı ile supernatant, 0,22 µm por çaplı filtrelerden geçirilerek steril bir başka mikrosantrifüj tüpünde toplanmıştır. Suşlardan toplanan süpernatantlar otoindüktör aktivitesi tahliline kadar -20 °C' de saklanarak muhafaza edilmiştir.

##### **4.3.1.2. Suşların Otoindüktör-2 Aktivitesinin Belirlenmesi**

Kontrol suşumuz olan *Vibrio harveyi* BB170 otoindüktör biyoanaliz (AB Broth) besiyerine % 1 oranında inoküle edilerek 200 rpm çalkalamalı koşullarda 30 °C'de 18h inkübasyona bırakılmıştır. Ardından bir gecelik aktif *V. harveyi* BB170 kültürü steril AB besiyerinde 1:5000 oranında dilüe edilmiş ve 96 kuyulu polistiren mikrodilüsyon plaklarına 90' ar µl dağıtılmıştır. Çalışmada kullanılan 3 adet *E. faecalis* kültürlerimizin otoindüktör aktivitesinin belirlenmesi

için, bir önceki aşamda hazırlanan süpernatantlardan 10'ar µl alınarak *V. harveyi* BB170 suşunun üzerine transfer edilmiştir. Kontrol kuyularına ise 10µl AB Broth eklenmiş ve 30°C' de 200 rpm' de 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde mikropilaka okuyucuda luminometrik ölçümler ile okumalar gerçekleştirilmiştir (Perkin-Elmer Victor V3). Suşların otoindüktör-2 (AI-2) aktiviteleri süpernatant içeren örnek kuyularından elde edilen okumaların, AB Broth eklenen kontrol kuyularından elde edilen okumalara oranlanması ile yüzde (%) kat değişimi olarak hesaplanmıştır (86).

% kat değişimi = (supernatant kuyuları / kontrol) x100

#### **4.3.2. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN SUŞLARIN OTOİNDÜKTÖR-2 MEKANİZMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nisinin ve p-coumaric asitin suşların AI-2 mekanizması üzerine etkisinin araştırılmasında Jesudhasan vd. (2010) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (85). Başlık 4.3.1.2.' de anlatıldığı şekilde 1:5000 oranında dilüe edilmiş *Vibrio harveyi* BB170 suşundan 90 µl içeren 96 kuyulu polistiren mikrodilüsyon plakları kuyularına; hücrelerden arındırılmış *Enterococcus* süpernatantları kullanılarak önceden belirlenmiş olan konsantrasyonlarda (Örneğin; OG1RF suşu için 1mg/ml pCA ve 0,5mg/ml nisin ve kombinasyonları) seyreltilerek nisin, p-coumaric asit ve nisin+pCA kombinasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu süpernatant-ajan süspansiyonu kuyulara 10'ar µl olarak dağıtılmıştır. Antimikrobiyal ajanları içeren mikrodilüsyon plağı 30°C' de 3 saat çalkalamalı olarak inkübe edilmiş ve mikropilaka okuyucuda kuyulardan alınan luminometrik ışımalar ölçülmüştür. Antimikrobiyal eklenmeyen süpernatant kuyularındaki AI-2 aktivitesi ile nisin, pCA, nisin+pCA içeren süpernatantların bulunduğu kuyulardaki AI-2 aktivitesi arasında meydana gelen farklılık yüzde inhibisyon olarak hesaplanmıştır.

#### **4.3.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN VİRÜLANS GENLERİN SUŞLARIMIZDAKİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ**

##### **4.3.3.1. DNA İzolasyonu**

Çalışmada ifade düzeylerinin araştırılacağı virülans genlerin test ve kontrol suşumuzda varlığının araştırılması amacı ile ilk olarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon için, kullanılan kitin (GenElute Bacterial Genomic DNA Kit, Sigma/ABD) üretici firması tarafından "Gram pozitif bakterilerde genomik DNA izolasyonu" kısmında belirtilen aşamalar izlenmiştir.

İzolasyon sonrası elde edilen DNA' ların saflık ve miktar tayini Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific/ABD) kullanılarak yapılmış ve saflıkları agaroz jel elektroforezinde ikinci kez kontrol edilmiştir. Beklenen DNA görüntüsü elde edildikten sonra örnekler -20' de muhafaza edilmiştir.

#### **4.3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Virülans genlerin tanımlanması için Çizelge 4.1 'de verilen primerler kullanılarak PZR amplifikasyonu yapılmıştır. Reaksiyon parametreleri 95 °C' de 1 dk, *sprE* için 60 °C, *ace* ve *gelE* için 54 °C' de 30 sn ve 72 °C' de 1 dk olmak üzere 30 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun sonuna, en son uzama basamağı için 72 °C' de 10 dakikalık bir süre eklenmiştir. Çoğaltılan fragmentlerin büyüklükleri, 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren % 1 agaroz jelde ve 1 kb marker (Fermentas, Finlandiya) kullanılarak belirlenmiştir. Elektroforez işlemi 100 voltta bir saat süre ile yapılmıştır. Jel yürütme işleminin sonunda jeller ultraviyole ışık altında incelenmiştir.

#### **4.3.4. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN VİRÜLANS GENLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nisin ve p-coumaric asitin hem tek başına hem de kombinasyonlarının virülans faktörleri kodladığı bilinen genlerin ifadesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bu denemede; ajan muamelesi yapılmamış örneklerden elde edilen cDNA' lar ile ajan muamelesi sonrası örneklerden elde edilen cDNA' lar ile gerçekleştirilen Q-RT PZR sonrası, elde edilen gen ifade düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla aşağıda sırası ile özetlenen işlemler gerçekleştirilmiştir.

##### **4.3.4.1. RNA İzolasyonu**

Çalışmamızın bu aşamasında kontrol olarak kullanılacak *E. faecalis* örnekleri statik koşullarda TSB ortamında 37 °C' de bir gece geliştirilmiştir. Ardından taze besiyerine inokülasyonları yapılarak AI-2 tahlilindeki süre kadar (3h) aynı inkübasyon koşullarında inkübasyonları sağlanmıştır. Aynı şekilde ajanların etkisinin deneneceği örnekler de, yine bir gece uygun besiyeri ve inkübasyon koşullarında geliştirildikten sonra, OG1RF suşu için 1mg/ml pCA ve 0,5mg/ml nisin ve bu konsantrasyonlardaki kombinasyonları; 114 ve 74 suşları için 1mg/ml pCA ve 0,25mg/ml nisin ve bu konsantrasyonlardaki kombinasyonlarını içeren ortamlara inoküle edilerek 3h boyunca inkübe edilmişlerdir. Bu sürenin sonunda örneklerden RNA

izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonunda, kullanılan kitin (High Pure RNA Isolation Kit (11828665001), Roche/Germany) üretici firması tarafından önerilen basamaklar izlenerek izolasyon gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon sonrası elde edilen RNA'nın saflığı ve miktar tayini Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific/ABD) kullanılarak yapılmış ve saflıkları agaroz jel elektroforezinde ikinci kez kontrol edilmiştir. Beklenen RNA görüntüsü elde edildikten sonra cDNA sentezine geçilmiştir.

#### 4.3.4.2. cDNA Sentezi

RNA örneklerinden (1000 ng) cDNA sentezi için "cDNA Synthesis Kit"i (04896866001; Roche, Germany) kullanılmıştır. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımları ve uygulanan sıcaklık döngüsü Çizelge 4.2., Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.' de verilmiştir. Elde edilen her cDNA, qRT-PZR denemelerinde kullanılmaya kadar -20°C' de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 4.2. Denatürasyon Karışımı

| İçerik                | Konsantrasyon    | Final Konsantrasyon | $\mu$ l   |
|-----------------------|------------------|---------------------|---|
| RNA                   | -                | 1000ng              | -   |
| Random hexamer primer | 600pmol/ $\mu$ l | 60 $\mu$ M          | 2   |
| Su (PCR grade)        | -                | -                   | Son hacmi 13 $\mu$ l'ye tamamlayacak kadar ilave edilir |

Hacim 13 $\mu$ l' ye tamamlandıktan sonra tüpler 65°C' de 10 dk RNA denatürasyonu için bekletilir. Süre bitiminde hemen buz üzerine alınarak üzerine Çizelge 4.3.' te belirtilen miktarda Ters Transkripsiyon Karışımı eklenir.

Çizelge 4.3. Ters Transkripsiyon Karışımı

| İçerik                                | Konsantrasyon                | Final Konsantrasyon            | $\mu$ l   |
|---------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------|
| Ters Transkriptaz<br>Tamponu (Buffer) | 5x                           | 1x (8 mM MgCl <sub>2</sub> )   | 4         |
| RNaz İnhibitörü                       | 40 U/ $\mu$ l                | 20 U                           | 0,5       |
| dNTP Karışımı<br>(Mix)                | Her bir nükleotitten<br>10mM | Her bir nükleotitten<br>1 mM - | 2         |
| Ters Transkriptaz                     | 20 U/ml                      | 10 U                           | 0,5       |
| <b>Son Hacim</b>                      | -                            | -                              | <b>20</b> |

Listede belirtilen içerikler sırası ile steril bir tüpe aktarıldıktan sonra, pipet yardımı ile nazikçe karıştırılır. Ardından Ters Transkripsiyon reaksiyonuna geçilir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Ters Transkripsiyon Sıcaklık Döngüsü

| Basamak      | Sıcaklık (°C) | Zaman (dk) | Döngü Sayısı |
|--------------|---------------|------------|--------------|
| Uzama 1      | 25            | 10         | 1            |
| Uzama 2      | 50            | 60         | 1            |
| İnaktivasyon | 85            | 5          | 1            |

Döngü sonunda tüpler buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulur ve örnekler -20°C’ de saklanır.

#### 4.3.4.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) ile Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu Light Cyler 480 (Roche Germany) cihazı kullanılarak, “5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix” (08-36-00001; Solis BioDyne, Estonia) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm genler için kullanılan amplifikasyon karışımları kitin önerileri doğrultusunda Çizelge 4.5.’te belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 4.5. qRT-PZR için amplifikasyon karışımı

| İçerik                 | Konsantrasyon       | Final Konsantrasyon | µl  |
|------------------------|---------------------|---------------------|-----|
| EvaGreen qPCR Supermix | 5x                  | 1x                  | 2   |
| İleri Primer           |                     | 10pmol/µl           | 0,5 |
| Geri Primer            |                     | 10pmol/µl           | 0,5 |
| cDNA                   | 1:100 sulandırılmış | 10ng                | 1   |
| ddH <sub>2</sub> O     |                     |                     | 6   |
| Son hacim              |                     |                     | 10  |

LightCycler 480 cihazında amplifikasyon için kullanılan döngü programı Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. LightCycler 480 cihazında kullanılan program

| Basamak                            | İşlem            | Sıcaklık(°C) | Süre | Artış(°C/s) |
|------------------------------------|------------------|--------------|------|-------------|
| <b>1-İlk Denatürasyon</b>          | İlk Denatürasyon | 95           | 15'' | 4.4         |
| <b>2- Amplifikasyon (40 Döngü)</b> | Denatürasyon     | 95           | 15'' | 4.4         |
|                                    | Bağlanma         | 60*          | 20'' | 2.2         |
|                                    | Uzama            | 72           | 20'' | 4.4         |
| <b>3- Erime Eğrisi</b>             | Denatürasyon     | 95           | 30'' | 4.4         |
|                                    | Re-Bağlanma      | 60           | 30'' | 2.2         |
|                                    | Denatürasyon     | 99           |      | 0.11        |
| <b>4- Soğuma</b>                   | Soğuma           | 40           | 30'' | 2.2         |

\*Primer bağlanma sıcaklığı *sprE* geni için 60°C iken *16S* için primer bağlanma sıcaklığı 55°C olarak belirlenmiştir.

Amplifikasyon reaksiyonları 96 kuyulu PZR plaklarında gerçekleştirilmiştir. cDNA kalıbını içermeyen reaksiyon karışımı negatif kontrol (NK) olarak kullanılmıştır. Hedef genlerin mRNA ifade seviyeleri *16S* rRNA ifade seviyesine normalize edilmiştir.

Gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda verilerin analiz edilmesi için; ajan uygulanan örnekteki belli bir genin mRNA düzeyindeki değişimin, kontrol olarak kullanılan örnekteki o hedef genin mRNA düzeyindeki değişime oranını esas alan bağıl kantifikasyon stratejisi seçilmiştir. Bu yöntem, en basit olanıdır, çünkü hedef gen ve referans gen arasındaki Ct değerlerinin doğrudan bir karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Bununla birlikte, hem hedefin hem de referans genin PZR verimleri % 100'e yakın olmalı ve % 10' dan fazla farklılık göstermemelidir. Schmittgen vd. (2008)' de belirttiği gibi sadece ilk deneyde, hedef ve kontrol geninin PZR verimliliğini karşılaştırmak için standart bir eğri gerektirir (87). Bu çalışmada kullanılan primer setlerinin PZR verimlerinin aynı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, PZR sonuçlarının değerlendirilmesinde reaksiyon verimini hesaba katmayan yaklaşım metodu kullanılmıştır.

$\Delta\Delta Ct$  olarak da bilinen bu yöntemin uygulanmasından ilk olarak, hedef gen ifadesi ve referans gen arasındaki  $\Delta Ct$  değeri her örnek için hesaplanmıştır. Bu metot ile veriler, referans gene (*16S*) göre normalize edilmiş olur. Ardından, işlem görmüş örneğin  $\Delta Ct$  değeri ile işlem görmeyen kontrolün  $\Delta Ct$  değeri arasındaki fark hesaplanır. Normalleştirilmiş örnekler arasındaki kat değişimi değerini veren bu değer,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeridir ve örneklerdeki ifade seviyelerini karşılaştırmak için kullanılmıştır.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{referans gen}}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = [(Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{referans gen}})_{\text{işlem gören örnek}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{referans gen}})_{\text{işlem görmeyen örnek}}]$$

#### **4.3.5. ENTEROCOCCUS SUŞLARININ BİYOFİLM ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Suşların biyofilm üretimi 96 kuyulu polistiren plaklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (88). *E. faecalis* suşları, 595 nm' de optik yoğunluğu (OD) 0,07' ye ayarlanmış ( $10^7$  KOB/ml) bir gecelik aktif kültür kullanılarak, % 1 oranında glikoz içeren TSB besiyerinde biyofilm

oluşturmak üzere 37 °C’ de 24h, 48h ve 72h inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, kuyulardaki supernatant biyofilm yapısının zarar görmemesine dikkat edilerek uzaklaştırılmıştır. Zayıf tutunan bakterilerin yıkama ile uzaklaştırıldığı bu aşamadan sonra, biyofilm yapısına katılan canlı bakteri sayısını belirlemek amacıyla kuyu içeriği 200 µl PBS içerisinde çözülmüştür. Ardından bu ortamdan 10 µl sıvı alınarak TSB agara damlatma ekimler yapılmış ve canlı hücre sayısı aşağıda belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

KOB/ml= [Paralel plaklardaki koloni sayısı ortalaması x dilüsyon faktörü x 100 (Damlatma katsayısı)]

#### **4.3.6. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN *E. FAECALIS* SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞUMUNUN ENGELLENMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Bu çalışma, *E. faecalis* örneklerimizin biyofilm oluşumunun engellenmesi üzerindeki etkisinin araştırılması amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, planktonik *E. faecalis* suşları için kullanılan konsantrasyondaki (OG1RF suşu için 1mg/ml pCA ve 0,5mg/ml nisin ve bu konsantrasyonlardaki kombinasyonları; 114 ve 74 suşları için 1mg/ml pCA ve 0,25mg/ml nisin ve bu konsantrasyonlardaki kombinasyonları) tekli ve ikili ajanlar bakteri örneklerinin gelişme ortamına eklenmiş ve biyofilm üretimi için uygun koşullarda (37 °C, 24 ve 48 h) inkübasyonu sağlanmıştır. Ardından başlık 4.3.5’ te anlatılan şekilde canlı hücre sayısı hesaplanmıştır ve log10 tabanında ifade edilmiştir. Ajanların etkisinin yüzde değeri hesaplanırken antimikrobiyal uygulanmayan biyofilmlerdeki canlı hücre sayısına oranlanmıştır.

% inhibisyon= [(KOB/ml kontrol - KOB/ml işlem) / KOB/ml kontrol ] x100

#### **4.3.7. İSTATİSTİKİ ANALİZLER**

Elde ettiğimiz değerlerin istatistikî analizlerinde SPSS (26.0) istatistik yazılımından yararlanılmıştır. Bağımlı örneklem t testi kullanılarak, nisin, p-coumaric asit ile nisin ve pCA kombinasyonunun uygulandığı örnekler ve işlem görmeyen örnekler arasında bir fark olup olmadığına bakılmıştır. P değeri <0,05 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ham mikroorganizma koloni sayılarının kullanılacağı denemelerde, veriler normalleştirilmek için log10 değerlerine dönüştürülmüştür.



## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN *E. FAECALİS* SUŞLARININ PLANKTONİK FORMLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

#### 5.1.1. ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ

Çalışmada kullanılan pCA ve nisin bakteriyosininin *E. faecalis* örneklerine MİK değerlerinin hesaplanması denemeleri sonucunda belirlenen ajan konsantrasyonları Çizelge 5.1 ve 5.2’de sunulmuştur.

Çizelge 5.1. p-coumaric asitin MİK değerleri

| Suşlar                   | P-Coumaric Asit |
|--------------------------|-----------------|
| <i>E. faecalis</i> OG1RF | 1 mg/ml         |
| <i>E. faecalis</i> 114   | 1 mg/ml         |
| <i>E. faecalis</i> 74    | 1 mg/ml         |

Çizelge 5.2. Nisin bakteriyosininin MİK değerleri

| Suşlar                   | Nisin      |
|--------------------------|------------|
| <i>E. faecalis</i> OG1RF | 0,5 mg/ml  |
| <i>E. faecalis</i> 114   | 0,25 mg/ml |
| <i>E. faecalis</i> 74    | 0,25 mg/ml |

### 5.2. *E. FAECALİS* SUŞLARININ OTOİNDÜKTÖR-2 AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Başlık 4.3.1.2.’ de anlatılan şekilde üç farklı zamanda yaptığımız denemelerin luminometrik ölçüm sonuçları doğrultusunda her suş için bağıl otoindüktör-2 (AI-2) aktivitesi hesaplanmıştır. Bu işlem süpernatant içeren örnek kuyularının, süpernatant içermeyen kontrol kuyularına göre yüzde (%) kat değişiminin belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz veriler

doğrultusunda OG1RF, 114 ve 74 suşlarının her birinde pozitif yönde kat artışı olduğu belirlenmiştir. Luminometrik ölçümlerde belirlenen ışımaların bağıl ışık ünitesi (Relative Light Unit, RLU) olarak adlandırılan sayısal değere çevrilmiş hali Çizelge 5.3.' te verilen şekildedir.

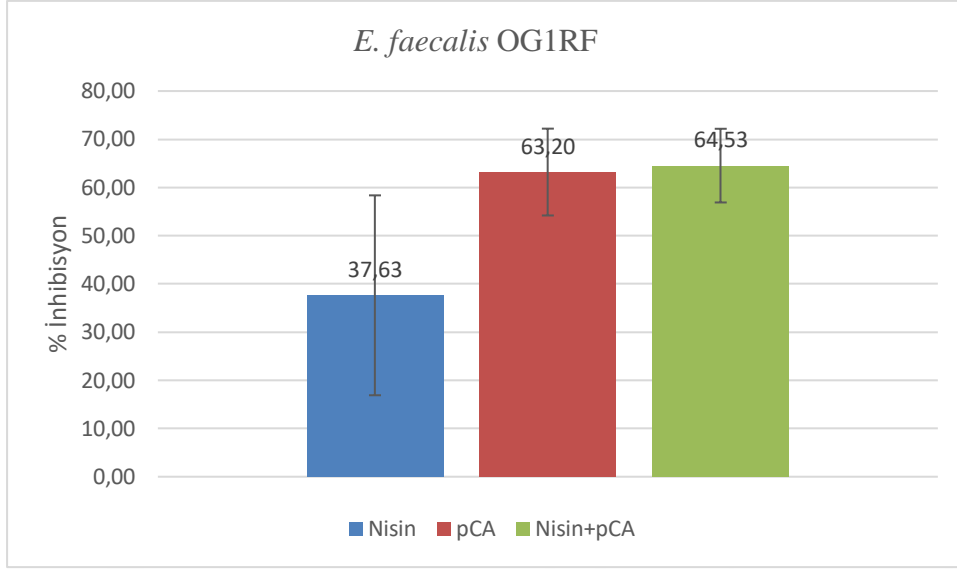
Çizelge 5.3. *E. faecalis* suşlarının bağıl AI-2 aktivitesi

| Suşlar                   | Bağıl AI-2 Aktivitesi |
|--------------------------|-----------------------|
| <i>E. faecalis</i> OG1RF | 249                   |
| <i>E. faecalis</i> 114   | 253                   |
| <i>E. faecalis</i> 74    | 285                   |

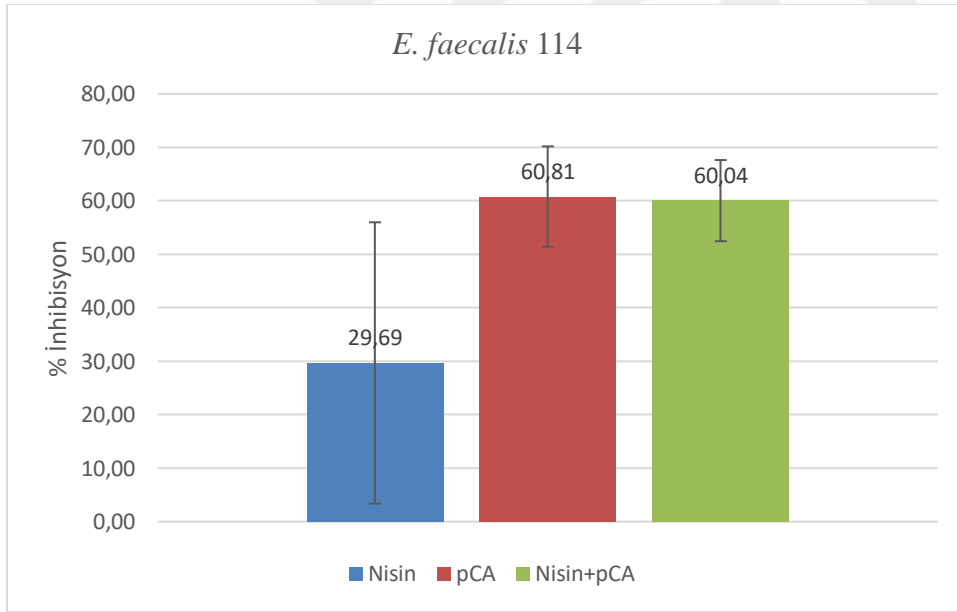
Suşların otoindüktör aktiviteleri arasında sayısal olarak fark var gibi gözükse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

### 5.3. NİSİNİN VE P-COUMARİK ASİTİN SUŞLARIN OTOİNDÜKTÖR-2 MEKANİZMASINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

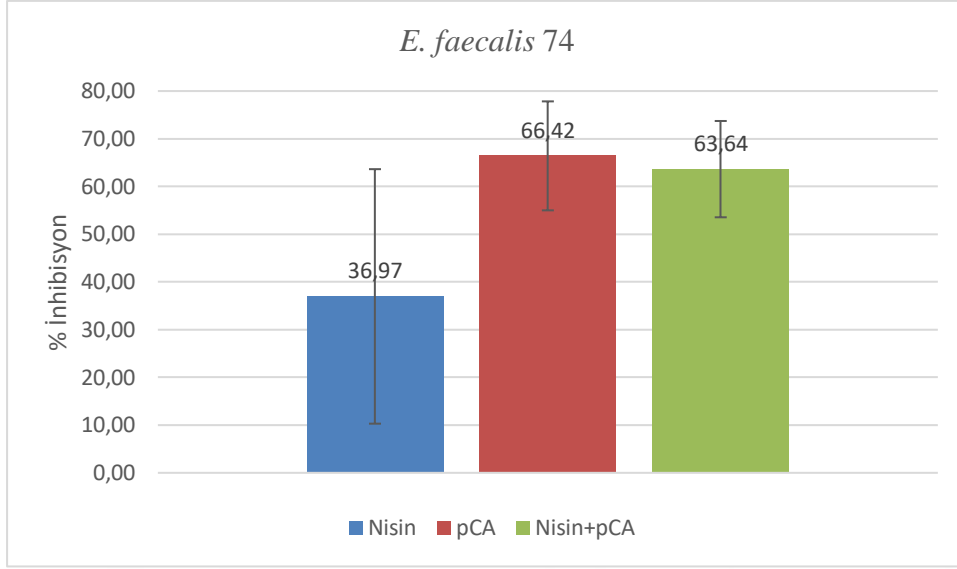
Test edilen her üç suş (*E. faecalis* 74, 114 ve kontrol suşu OG1RF) için de nisin bakteriyosininin tek başına AI-2 mekanizmasını engellemede etkili olmadığı, pCA'nın (1mg/ml) tek başına AI-2 aktivitesini  $\geq$  % 60 oranında azalttığı belirlenmiştir. pCA'nın nisin bakteriyosini ile birlikte uygulanması sonucunda ise AI-2 aktivitesinin tek başına pCA'nın etkisinden biraz daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). (Şekil 5.1 – Şekil 5.3).



Şekil 5.1. *E. faecalis* OG1RF suşunun AI-2 sinyal molekülüne nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi



Şekil 5.2. *E. faecalis* 114 suşunun AI-2 sinyal molekülüne nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi



Şekil 5.3. *E. faecalis* 74 suşunun AI-2 sinyal molekülüne nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi

#### 5.4. NİSİNİN VE P-COUMARİK ASİTİN *VİBRİO HARVEYİ* BB170 'İN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

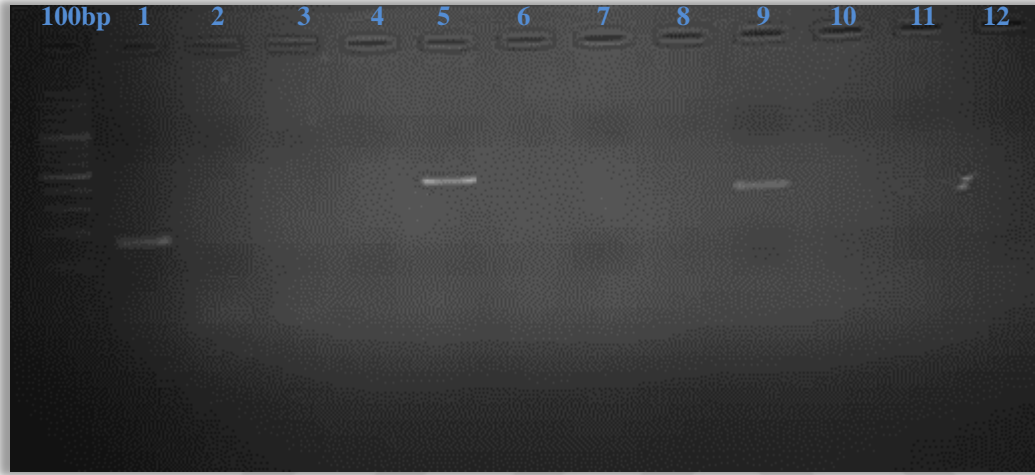
*V. harveyi* suşunun nisin, pCA ve nisin+pCA ile inkübasyonu sonucunda, ajan içermeyen ortamda gelişen *V. harveyi* bakteri sayısı ile ajanlı ortamda inkübasyon sonucunda bir farklılık olmadığı görülmüştür. Dolayısı ile test edilen ajanların *V. harveyi*'nin canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu durum çalışmalarımızın ileri aşamalarına geçmemizde bir sakınca olmadığını, ajanlarımızın raportör suşumuz üzerinde herhangi bir letal etki göstermediğini ortaya koymuştur (Çizelge 5.4.).

Çizelge 5.4. Antimikrobiyallerin raportör suş *V. harveyi* BB170 üzerine etkisi

| Gelişme Ortamı                | Canlı Hücre sayısı (KOB/ml) (log10) |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| AB Broth                      | 5,55 ± 0,3                          |
| 0,5 mg/ml Nisin               | 5,64 ± 0,6                          |
| 1 mg/ml pCA                   | 5,85 ± 0,7                          |
| 0,5 mg/ml Nisin + 1 mg/ml pCA | 5,72 ± 0,3                          |

## 5.5. ÇALIŞMADA KULLANILAN VİRÜLANS GENLERİN SUŞLARIMIZDAKİ VARLIĞININ BELİRLENMESİ

DNA izolasyonu ve ardından yapılan PZR denemeleri sonucunda; *sprE*, *ace* ve *gelE* genlerinin çalışmamızda kullanılan suşlar arasında yalnızca OG1RF suşunda bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 5.4.). Bu nedenle antimikrobiyallerin bu virülans genler üzerindeki etkisinin araştırılacağı denemelerde sadece OG1RF suşu kullanılmıştır.



Şekil 5.4. Virülans genlerin çalışmada kullanılan enterokok suşlarındaki varlığının belirlenmesi  
*ace* (1-4); 1:OG1RF, 2:114, 3:74,4: NK; *gelE* (5-8); 5:OG1RF, 6:114, 7:74,8: NK; *sprE* (9-12); 9:OG1RF, 10:114, 11:74, 12: NK

## 5.6. NİSİNİN VE P-COUMARİK ASİTİN VİRÜLANS GENLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yapılan q-RT-PZR reaksiyonları sonucunda, OG1RF suşunun *sprE* genindeki ifade seviyeleri 16S rRNA genine göre normalize edilmiştir ( $Ct_{sprE} - Ct_{16S}$ ) (87). Elde edilen  $\Delta Ct$  değerleri Çizelge 5.5.' te verilmiştir.

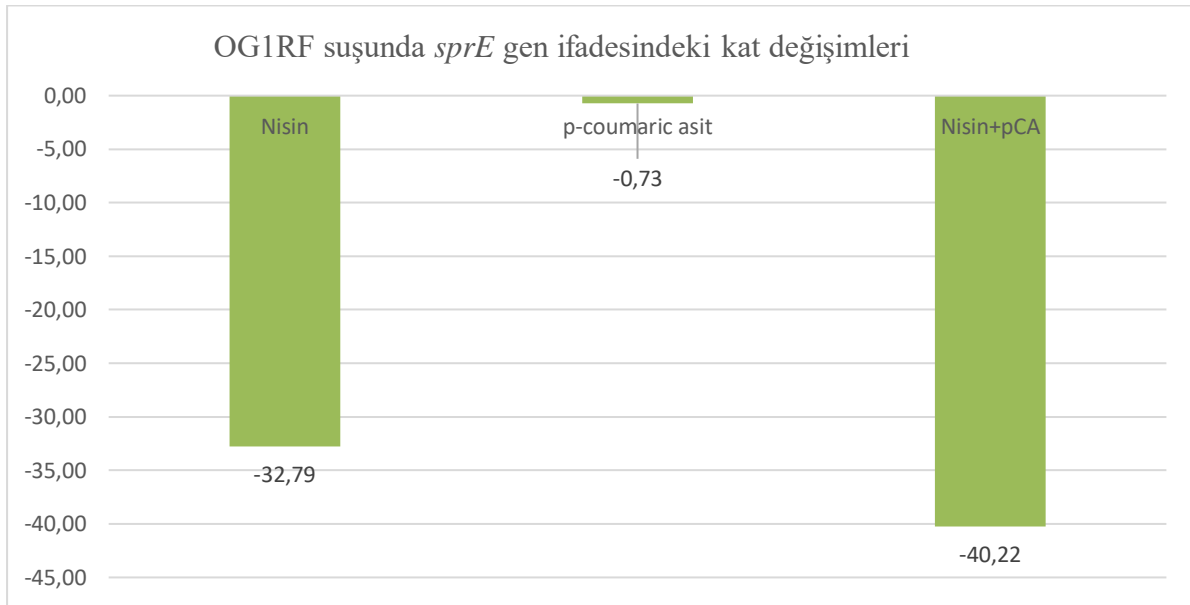
Çizelge 5.5. OG1RF suşunun ajan uygulamalarına karşı *sprE* genine bağlı ifade değişiminin  $\Delta Ct$  değerleri

| Hedef Gen   | Kontrol | Nisin | pCA   | Nisin+pCA |
|-------------|---------|-------|-------|-----------|
| <i>sprE</i> | 8,965   | 14,00 | 8,515 | 14,295    |

Daha sonra  $\Delta Ct$  değerleri arasındaki ifade değişimlerinin kaç kat olduğunu belirlemek adına  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  hesaplaması yapılmıştır (87).

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = [(\Delta Ct)_{\text{ajan uygulanan örnek}} - (\Delta Ct)_{\text{kontrol}}]$$

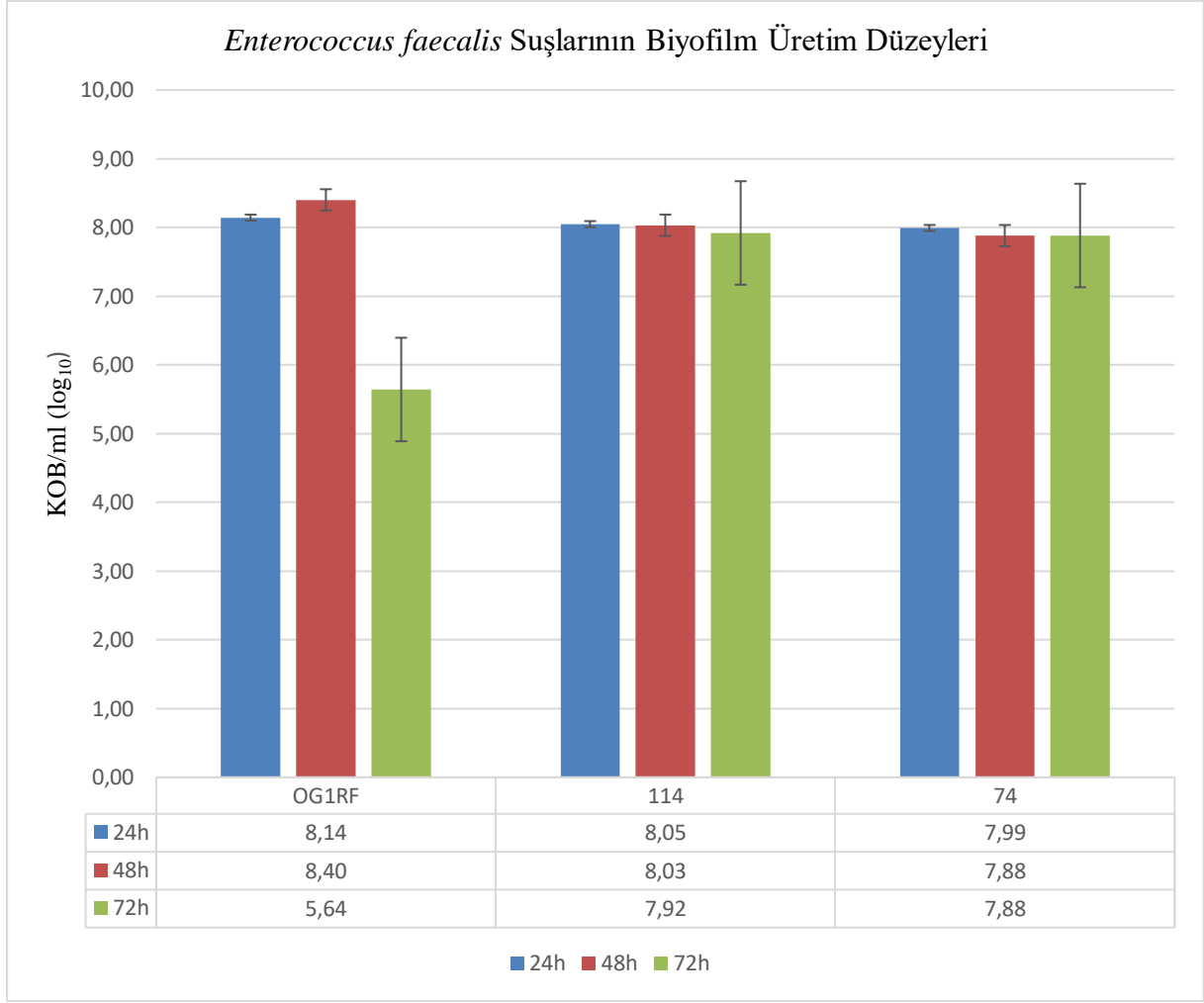
Hesaplama sonrası çıkan değer <1 ise gen ifadesi azalma, >1 ise artma olduğu sonucuna varılmıştır. OG1RF suşunda *sprE* geni için yalnızca nisin (0,5mg/ml) ve nisin+pCA (0,5mg/ml nisin+1mg/ml pCA) kombinasyonunun *sprE* geninin ifadesinde sırasıyla 32,78 ve 40,22 kat azalmaya sebep olurken, yalnızca pCA uygulamasının *sprE* gen ifadesinde anlamlı bir etkisinin olmadığı (-0,73 kat) belirlenmiştir (Şekil 5.5.). *ace* ve *gelE* genleri ile yapılan denemelerde, tüm koşullar değiştirilerek denemenin tekrarlanması sonucunda dahi, ifadeleri belirlenemmiştir. Bu durum genlerin, çalışmamızda denediğimiz koşullar altında mRNA ifadelerinin olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 5.5. OG1RF suşunda *sprE* gen ifadesindeki kat değişimleri

## 5.7. ENTEROCOCCUS SUŞLARININ BİYOFİLM ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Farklı inkübasyon sürelerinde gerçekleştirilen biyofilm üretim denemelerinde, biyofilm yapısındaki canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Biyofilm yapılarındaki canlılığın zamana bağlı olarak değişim göstermediği, yalnızca OG1RF suşunun 72 saatlik biyofilm yapısında canlılığın anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.6.). Sonuçlarımızın “false negatif” olarak yorumlanmaması adına, yalnızca 24h ve 48h’lik biyofilm kültürleri ile ileri çalışmaların gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.



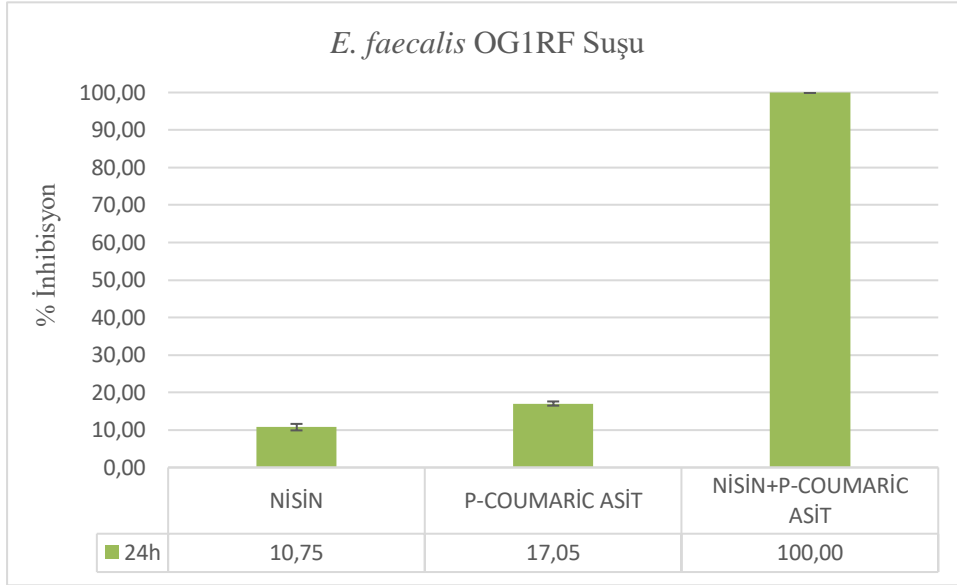
Şekil 5.6. *Enterococcus faecalis* suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde biyofilm üretim düzeyleri

### 5.8. NİSİNİN VE P-COUMARİC ASİTİN *E. FAECALİS* SUŞLARININ BİYOFİLM YAPILARININ OLUŞUMUNUN ENGELLENMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

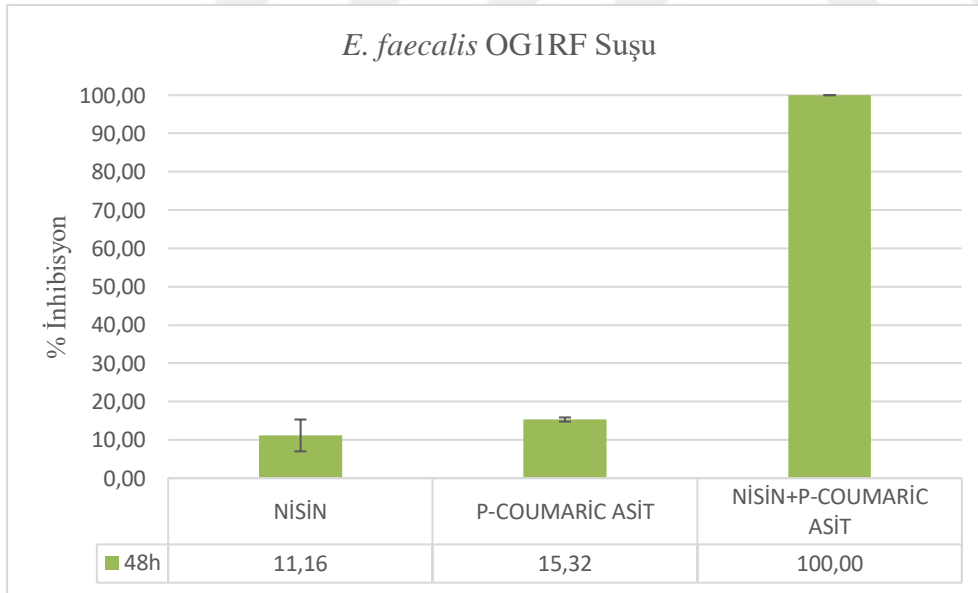
Gerçekleştirilen denemeler sonucunda, her üç suşta da 24 ve 48 saatlik biyofilmlerde nisin+p-coumaric asit kombinasyonunun biyofilm oluşumunu tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir.

Test edilen üç suş açısından sonuçlar değerlendirildiğinde, nisin+pCA' nın birlikte uygulanması (1mg/ml pCA+ 0,5 mg/ml nisin) sonucunda OGR1F suşunda hem 24 hem 48 saat sonunda biyofilm yapısı oluşmaz iken, bunu 24 h sonunda % 17, 48 h sonunda ise % 15,32 inhibisyon ile p-coumaric asit izlemiştir. Nisin bakteriyosini ise tek başına uygulandığında, OG1RF

suşunun biyofilm oluşumunu 24 h inkübasyon sonunda % 10,75, 48 h inkübasyon sonunda ise % 11,16 oranında azaltmıştır (Şekil 5.7.-Şekil 5.8.).



Şekil 5.7. *E. faecalis* OG1RF suşunun 24h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi

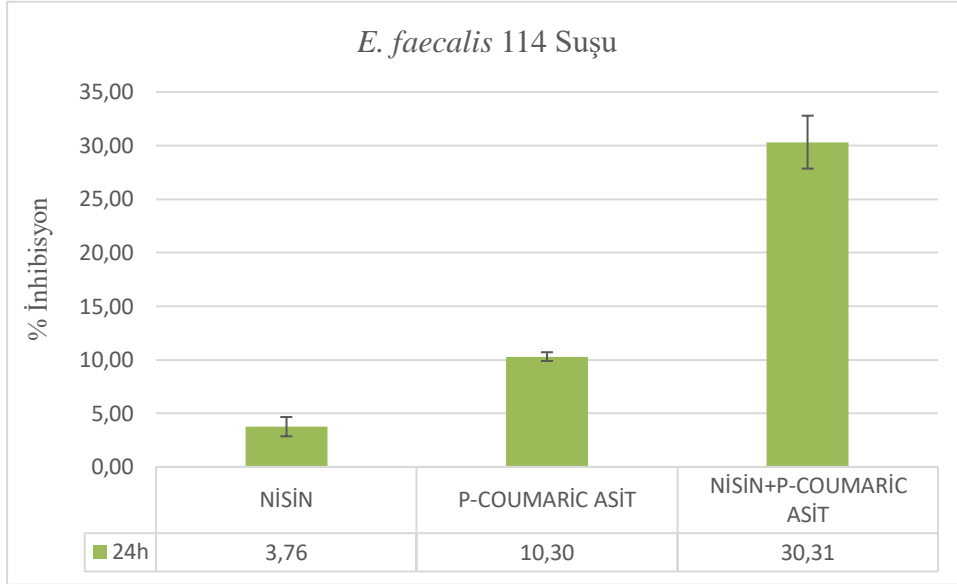


Şekil 5.8. *E. faecalis* OG1RF suşunun 48h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi

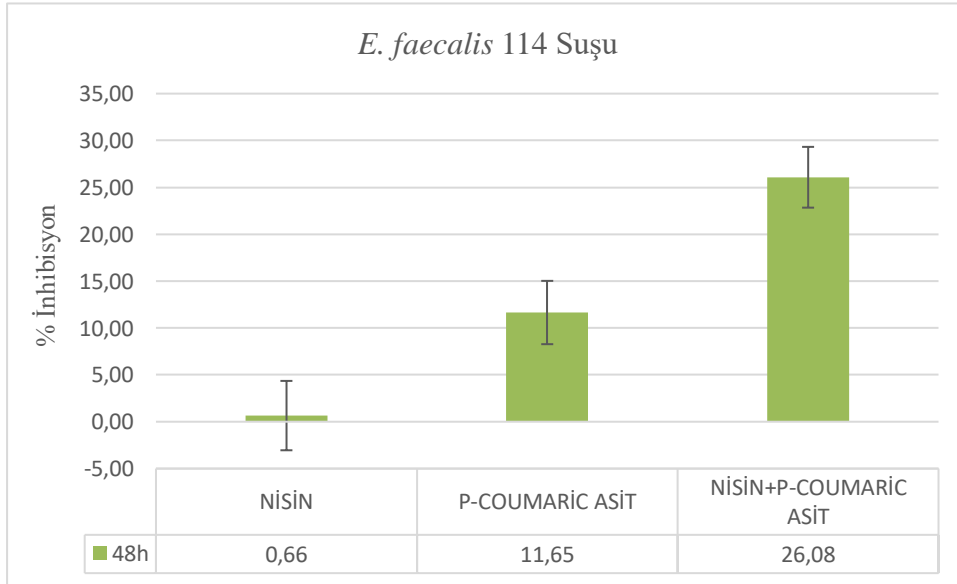
114 kodlu *E. faecalis* suşunun antimikrobiyal uygulamalar sonucunda biyofilm inhibisyon yüzdesi incelendiğinde yine en yüksek inhibisyonun, her iki inkübasyon süresinde de, nisin ve pCA kombinasyonunda (1 mg/ml pCA+ 0,25 mg/ml nisin) meydana geldiği tespit edilmiştir.



Bunu yine pCA' nın tek başına uygulaması izlemiştir. Nisinin tek uygulanması bu suşta da en düşük inhibisyon yüzdesine sahiptir. Özellikle 48 h' lik biyofilm yapısında nisinin inhibisyon yüzdesi oldukça düşük olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 5.9.- Şekil 5.10.).



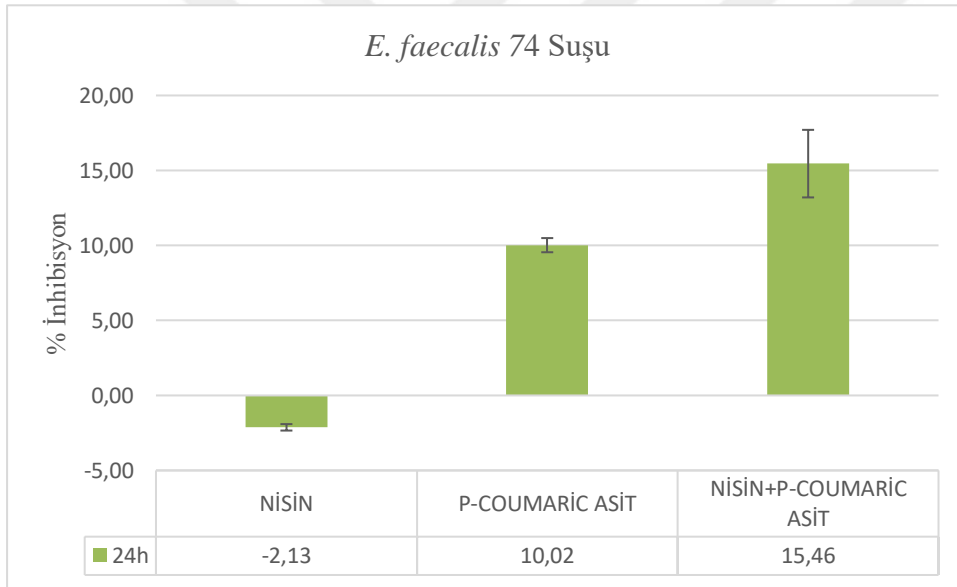
Şekil 5.9. *E. faecalis* 114 suşunun 24h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi



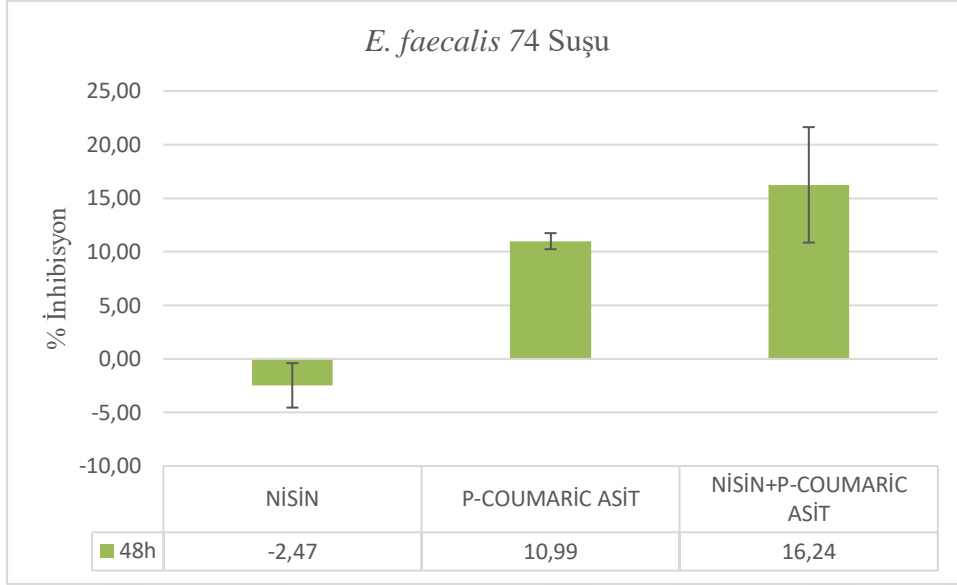
Şekil 5.10. *E. faecalis* 114 suşunun 48h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi

Test edilen ajanların en az etki gösterdiği suş, *E. faecalis* 74 kodlu suş olmuştur. Yine de, test edilen diğer iki suşta olduğu gibi 74 kodlu suşun biyofilm oluşumunun engellenmesinde etkili ajan hem 24 h hem de 48 h için nisin+pCA (1mg/ml pCA+0,25mg/ml nisin) olmuştur. P-coumaric asitin tek başına uygulandığı denemelerde iki inkübasyon süresinde de biyofilm oluşumu inhibisyonu % 10 oranında belirlenmiştir.

Diğer suşlardan farklı olarak 74 kodlu suşta nisin tek başına gelişme ortamına uygulandığı denemelerde, biyofilm oluşumunda herhangi bir inhibisyon olmadığı gibi, canlı bakteri sayısında artışa neden olduğu gözlenmiştir. Yaptığımız analizler sonucunda 24 saatlik inkübasyon süresinde canlılık artışına pozitif etkisi (% -2,13 inhibisyon) istatistiki olarak anlamlı bulunmuşken, 48 saatlik biyofilmde nisin uygulamasının biyofilm oluşumu üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı belirlenmiştir (Şekil 5.11.-Şekil 5.12.).



Şekil 5.11. *E. faecalis* 74 suşunun 24h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi



Şekil 5.12. *E. faecalis* 74 suşunun 48h' lik biyofilm oluşumuna nisin, pCA ve kombinasyonlarının etkisi

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

*E. faecalis* yüksek antibiyotik direncine sahip bakteriler arasında ilk sıralarda gelen türlerdendir. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu patojenin antibiyotik direnç özelliğinin ne kadar ciddi boyutlara ulaştığını göstermektedir. Jabbari vd. (2019) tarafından kan izolatı *E. faecalis* suşları ile yapılan çalışmada, incelenen 291 suşun 125' inde antibiyotik dirençlilik özelliği bildirilmiştir (89). Araştırma sonucunda; Amerika ülkeleri, *E. faecalis*' te linezolid için en düşük direnç prevalansını göstermiştir. Vankomisin direnci yaygınlığı ile ilgili olarak, Batı Pasifik, Avrupa ve Amerika ülkeleri en düşük direnç seviyesine sahipken, Güneydoğu Asya ve Doğu Akdeniz ülkeleri en yüksek direnç seviyesini göstermiştir. Buna ek olarak araştırmada 21 antibiyotikten her birinde değişen oranlarda dirence rastlanmıştır. Bahsi geçen 21 antibiyotik arasında prevalansı en yüksek olanın (%97) kinupristin / dalfopristin olduğu tespit edilmiştir (89). Yine kan izolatı olan *E. faecalis* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı sahip olduğu direncin, 2000-2016 yılları arasındaki süreç boyunca artmakta olduğu belirlenmiştir (89). Direnç prevalansı coğrafi bölgelere göre farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca bu organizmanın kendi cins ve türlerinin yanı sıra, diğer bakteriler tarafından üretilen QS sinyalleri ile antibiyotik direnç genlerini hızlı bir şekilde alma ve yayma kabiliyetine sahip olduğu, yapılan araştırmalar sonucunda açıkça ortaya koyulmuştur (73,89). Bu da dengelerin kısa sürede değişebileceğini işaret etmektedir.

Biyofilmler, biyotik veya abiyotik yüzeylerde meydana gelen, mikroorganizmalar tarafından salgılanan polimerler ile, onları yoğun bir şekilde çevreleyerek koruma sağlayan, mikrobiyal hücre topluluklarıdır. Bilindiği üzere implant edilen tıbbi cihazlara veya hasarlı dokuya tutunan bakteriler bu yüzeylerde biyofilm oluşturabilmekte ve kronik enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Biyofilm yapılarının, mikroorganizmaları antimikrobiallere karşı 1000 kata kadar daha dirençli hale getirdiği bilinmektedir. Enterokoklar antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumu gibi virülans faktörleri aracılığıyla gerek tıbbi, gerek ekonomik açıdan insan hayatını olumsuz etkilemektedirler. Biyofilmlerin tedavisi ABD' de her yıl sağlık giderlerinde 1 milyar \$' ın üzerinde bir paya sahiptir (73). Bu nedenle, *E. faecalis*' in etkili bir şekilde eradikasyonu üzerine yeni yöntemlerin belirlenmesi hem sağlık sorunlarının ortadan kaldırılması, hem de ekonomik kayıpların engellenmesi açısından önemlidir.

Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda *E. faecalis*' in biyofilm yapıları veya planktonik formları ile mücadelede; ampisilin, eritromisin, gentamisin, tetrasiklin, triklosan, vankomisin,

kalsiyum hidroksit (Ca(OH)<sub>2</sub>), sodyum hipoklorit, aleksidin, klorhekzidin, oktenisept, asetilsistein gibi antimikrobiyal ajanların yanı sıra; tripala, yeşil çay polifenolleri, meyankökü gibi bitkisel bileşenler test edilmiştir (90–94). Genel olarak, bu ajanların *E. faecalis* ile mücadelede olumlu bir etki gösterdiği sonucuna ulaşılmakla birlikte, bu etki mutlak eradikasyon için yeterli olmamıştır.

Mikrobiyal biyofilm yapılarının eradikasyonu çalışmalarında araştırmacılar, antimikrobiyal peptitlerin (AMP) çeşitli antimikrobiyal ajanlarla kombine olarak kullanılması yolu ile ajan etkinliklerinin artırılması, dolayısı ile ihtiyaç duyulacak etkin dozun düşürülmesi yönünde çalışmalar da gerçekleştirmişlerdir. AMP' ler arasında, üzerinde en çok çalışılan moleküllerden biri de nisindir. Nisinin çeşitli antibiyotikler ile kombine halde *Enterococcus* türlerinin de dahil olduğu pek çok türde inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmalar sonucunda, bu bakteriyosinin çeşitli ajanlarla kombine halde kullanılması halinde planktonik veya biyofilm formları üzerinde ajanların tek başına etkisinden daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamıştır. Gerçekleştirdiğimiz tez çalışması, literatürde ilk defa yapılan denemeleri içermektedir. Yaptığımız araştırma sonucunda, daha önce *E. faecalis* hücrelerinin planktonik ve biyofilm formları üzerine nisin ve pCA'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum, verilerimizin literatür ile karşılaştırılarak tartışılmasını mümkün kılmamaktadır. Bu nedenle söz konusu ajanların farklı kombinasyonlarla ya da başka bakteriler kullanılarak denendiği çalışmalar sonuçlarımızın değerlendirilmesinde dikkate alınmıştır.

Tong vd. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 18 antibiyotığın nisin ile kombine halde enterokok türlerinin üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Planktonik formlar üzerinde penisilin, kloramfenikol, vankomisin ve linezolid ile nisinin kombine etkisinin enterokokların canlılığına etkisinin araştırıldığı denemede nisin; penisilin ve kloramfenikol ile birlikte uygulandığında organizmanın gelişimini tamamen inhibe etmiş, vankomisin ve linezolid ile birlikte uygulanması sonucunda ise inhibisyona olumlu katkı sağlamıştır. Aynı çalışmada biyofilm yapıları ile yapılan bir başka denemede ise; 24 h' lik biyofilm yapılarına 12 h boyunca siprofloksasin, kloramfenikol ve penisilin antibiyotikleri hem tek başına hem nisin ile kombine olarak uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüsü analizleri yapılmış ve siprofloksasin ile kloramfenikolün tek başlarına çok etkili değilken, nisin ile kombine halde etkilerinin arttığı görülmüştür. Penisilin ile nisin kombinasyonunun ise enterokokların tamamını öldürebildiği belirlenmiştir (6). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da nisin ve pCA' nın biyofilm oluşumunu önlemedeki etkisi kombine halde uygulandıklarında

artmış, hatta OG1RF suşunda tamamen canlılığın önüne geçilmiştir. Farklı olarak söz konusu çalışmada test edilen suşlar için MİK değeri 1 mg/ml olarak belirlenirken, bizim çalışmamızda bu oran 0,25-0,5 mg/ml aralığında bulunmuştur. Bu farklılık, gelişme ortamındaki pH' a bağlı olarak nisin aktivitesindeki değişimden kaynaklanıyor olabilir. Kajwadkar vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise nisin Z ile sodyum hipoklorit uygulaması sonrasında *Enterococcus* biyofilmlerinin; hacim, kalınlık ve pürüzlülük özelliklerindeki değişimler konfokal mikroskopta incelenmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda nisin ile çok düşük konsantrasyonlarda sodyum hipokloritin birlikte uygulanmasının biyofilmin yapısında ciddi bozulmalara neden olduğu belirtilmiştir (7). Gram (-) bakteriler ile gerçekleştirilen farklı bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Colistin ve polimiksin ile nisin kombinasyonlarının, *P. aeruginosa* biyofilm yapısı üzerinde etkili olduğu, bu eradikasyon etkisinin nisin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (82). Tarafımızca gerçekleştirilen denemeler sonucunda nisin bakteriyosininin MİK değeri OG1RF suşunda 0,5 mg/ml iken, 114 ve 74 kodlu suşlarda 0,25 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara paralel olarak 24 ve 48h' te OG1RF suşunda biyofilm oluşumu ve canlılığın inhibisyonu 114 ve 74 kodlu suşlara göre daha çok olmuştur. İnhibisyon düzeylerindeki farklanmanın ortamdaki nisin konsantrasyonu yüksekliği ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Çalışmalarda kontrol suş olarak yaygın bir şekilde, özellikle de biyofilm çalışmalarında sıklıkla kullanılan standart *E. faecalis* OG1RF suşunun biyofilm oluşumu sırasında ortamda bulunan nisin+pCA kombinasyonu ile canlı hücrelerin tamamının öldürülmesi, bu patojen ile mücadelede elde ettiğimiz sonuçların ne kadar önemli olduğunu gözler önüne sermektedir.

pCA' nın ve benzer yapıdaki diğer bileşiklerin antibiyofilm etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada pCA uygulamasının *Escherichia coli* biyofilm yapısı üzerinde yapılan denemelerde canlı hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmada *E. coli* biyofilminin önlenmesi ve inaktivasyonu üzerine üriner katater parçaları üzerinde organizmalar geliştirilmiştir. Biyofilmin önlenmesi için yapılan denemede 2 h süresince yalnız besiyeri içeren ortamda üretilen bakteriler üzerine % 0.1, % 0.25, % 0.5 pCA içeren 10 ml TSB broth eklenerek 1, 3, 5 gün inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda PBS ile yapılan ilk yıkamanın ardından, sonikatör yardımıyla biyofilm yapıları parçalanmıştır. Elde edilen lizatın seri dilüsyon ve damlatma ekimleri yapılmış ve bakterilerin canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Biyofilmin inaktivasyonu denemelerinde ise 5 gün katater içerisinde geliştirilen biyofilmlere PBS ile yıkama yapıldıktan sonra, gelişme ortamı % 1, % 1.2, % 1.5 pCA içerecek şekilde

değiştirilmiş ve bu şekilde 1, 3, 5 gün daha inkübasyona devam edilmiştir. Süre sonunda yine sonikatör yardımıyla elde edilen lizattan canlı hücre sayımı yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda % 0.5 ve % 0.25' te p-CA, sırasıyla 3 ve 5 gün sonra biyofilm oluşumunu önlerken, 5 günlük inkübasyondan sonra % 0.1 pCA, biyofilmdeki *E. coli* hücrelerinin sayısını sadece yaklaşık 4.5 log KOB/ml' ya indirdiğini; bu ve kontrol biyofilmdeki ortalama *E. coli* hücresi sayısının (yaklaşık 5.8log KOB/ml) arasındaki farkın  $P < 0.0001$ ' de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Öte yandan pCA konsantrasyonlarının hiçbiri üriner kateterin lümeninden biyofilmli tamamen ortadan kaldırmamıştır. Bununla birlikte, biyofilmdeki ortalama *E. coli* hücrelerinin sayısı, kontrol biyofilmine (6.4 log KOB/ml' nin üzerinde) kıyasla pCA konsantrasyonları mevcudiyetinde daha düşük olduğu (1.9-2.2 log KOB/ml) ve bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (9).

Antibiyotikler dışında nisin bitkisel moleküller ile beraber uygulandığı çalışmalarda da kombine uygulamaların etkiyi arttırdığı belirlenmiştir. Nisine karşı bazı türlerde direncin gelişebileceği araştırmacılar tarafından belirlendiğinden, nisine karşı gelişebilecek direnci minimize etmek adına, farklı antibakteriyel ajanlar ile birlikte kullanımı yoluna gidilmektedir. Sinaldehit (CA, tarçın kabuğundan elde edilen esansiyel bir yağ) geniş antimikrobiyal aktivite gösteren ve özellikle gıda korumada umut vaat eden bir doğal ajandır. Gerçekleştirilen bir çalışmada, nisin ile sinaldehit gıda kaynaklı 13 *Staphylococcus aureus* suşuna karşı kombine checkerboard testi ile denenmiştir. Nisin ile CA kombinasyonu sonucunda FICI değerinin 0,1875 ile 0,375 arasında değiştiği, dolayısı ile bu iki ajanın birlikte sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu pozitif etkileşim, pastörize süt ve agar difüzyon testi ile doğrulanmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri ise, her iki ajanın birlikte kullanılmasının hem hücre zarı hem de hücre duvarında hasara neden olduğu ve bu hasarın nisin ve CA'nın tek başına kullanılması halinde oluşan hasardan fazla olduğu belirlenmiştir (95). Bu bulgular nisin ve CA'nın birlikte kullanımının sadece doğal gıda koruyucusu olarak kullanım açısından umut verici olmadığını, aynı zamanda bakteriyel direnç riskinin azaltılmasına neden olması açısından da önemli olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Nisin bakteriyosini dünya genelinde gıdalara eklenmesine izin verilen ilk ve tek bakteriyosin olması açısından önem taşımaktadır. Ancak son yıllarda nisine karşı farklı bakteriler tarafından direnç geliştirilmiş olması, bu ajanın başka, özellikle de doğal antimikrobiyal ajanlar ile birlikte kullanımı araştırmalarının artmasına neden olmuştur (96–98). Çalışmamız sonucunda nisin tek başına etkisinden ziyade, doğal bir antimikrobiyal olan pCA ile birlikte kullanımı sonucunda *E.*

*faecalis* biyofilm yapılarının eradikasyonunu güçlendirdiği sonucu elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında elektron mikroskopisi denemeleri gerçekleştirilmediği için, hücre zarı ve hücre duvarı bakımından nasıl bir etkinin olduğu belirlenmemiş olmakla birlikte, hücre duvarında por yapıları oluşturmak suretiyle etki eden nisin bakteriyosininin bu etkisine pCA' nın katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Yine nisinin membran üzerindeki etkisine bağlı olarak üreme inhibisyonunun tespit edildiği başka bir çalışmada, nisin gibi gıda koruyucu olarak kullanılan ve etki mekanizması olarak da nisin ile benzer şekilde membran elektrik potansiyelini bozan bir molekül olan  $\epsilon$ -polilisin' in nisin ile kombine etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar;  $\epsilon$ -polilisin' in hücrelere alınmasının nisin yoluyla desteklendiğini ve nisin kombinasyonunun *E. faecalis* R612Z1 hücrelerinde yüksek reaktif oksijen türleri üretebileceğini ortaya koymuştur. Böylece hücre büyümesinin inhibisyonuna yol açabileceği gösterilmiştir (101). Bu uygulamalar bakteriyel direnci azaltmak adına araştırmacılar için umut vaat eden uygulamalardır. pCA' nın da doğal bir bileşik olması nisin ile kombine halde gıda koruma uygulamalarında rol alabileceği ihtimalini güçlendirmektedir.

Bag ve Chattopadhyay (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, bir esansiyel yağ olan linalool, pCA ve nisin bakteriyosininin gıda kaynaklı *Bacillus cereus* ve *Salmonella Typhimurium* bakterilerine karşı antibakteriyel ve antibiyofilm etkinlikleri araştırılmıştır (99). Nisin+pCA kombinasyonu test edilen her iki bakterinin planktonik hücrelerine sinerjik etki gösterirken, nisin+linalool kombinasyonu *B. cereus*' a karşı sinerjik etki, *S. Typhimurium*' a karşı ise sinerjik olmamakla birlikte, inhibisyona pozitif yönde katkı sağlamıştır. Gerçekleştirilen biyofilm denemelerinde nisin tek başına kullanıldığında her iki bakteri için de > %50 etki göstermede başarısız olurken, linalool ve pCA ile kombine edildiğinde bu etki > %50 olmuştur. Bizim çalışmamızda ise nisin bakteriyosini tek başına kullanıldığında < %11 düzeyinde etki gösterirken, pCA ile kombine edildiğinde bu etki OG1RF suşunda %100'e ulaşmış, 74 ve 114 kodlu suşlarda ise % 15-30 düzeylerine yükselmiştir. Bu olumlu etki pCA' nın asidik karakterde bir bileşik olması ve nisinin asidik pH' da etkinliğinin artmasından kaynaklanabilir. Nisin A molekülünün stabilitesinin asidik pH' da arttığı 1995 yılında Rollema ve ekibi tarafından gösterilmiştir (100). Dolayısı ile nisinin pCA ile birlikte kullanılması sonucu etkinliğinin artışı, pCA aracılığı ile ortamın asidik oluşundan kaynaklanma olasılığı yüksektir.



Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal ajanların, biyofilm oluşum sürecinin ilk ve en önemli basamağı olan yzeeye tutunma (adezyon) basamağının nlenmesine aracılık ettiği, böylece biyofilm oluşumunun engellendiği bildirilmiştir (102). Bizim çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular, MİK düzeylerinde kullanılan nisin ve pCA ajanlarının birlikte kullanılması halinde yüzey tutunmasını farklı düzeylerde inhibe ettiği ve böylece test edilen suşların biyofilm oluşumunu engellediği şeklinde yorumlanabilir.

pCA' nın QS zerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar literatürde mevcut olmakla birlikte, bu araştırmalar yalnızca Gram negatif bakteriler kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve dolayısı ile AI-2 molekülü üzerine etkisinden ziyade AHL sinyal moleküllerine etkileri araştırılmıştır (77,103). pCA' nın ve nisinin AI-2 sinyal molekülü üzerine etkisi literatürde daha önce araştırılmamış olup, ilk kez bu çalışma kapsamında enterokoklar kullanılarak çalışılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda nisinin AI-2 moleklnn inhibisyonu üzerinde tek başına bir etkisi olmadığı gibi, pCA ile kombine halde uygulandığında da etkinliğinde bir değişikliğin gerçekleşmediği belirlenmiştir. Nisinin aksine pCA, AI-2 molekülünü test edilen tüm suşlarda  $\geq$  %60 düzeyinde inhibe etmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi özellikle bakterilerin günümüzde kullanılan antibakteriyel ajanlara karşı direnç geliştirmesi nedeniyle, QS mekanizmalarını hedef alan moleküllerin belirlenmesi önem taşımaktadır. Elde ettiğimiz bu sonuçlar doğrultusunda pCA' nın literatür verileri ile uygun şekilde tıpkı AHL inhibisyonunda rol aldığı gibi, AI-2 moleküllerinin inhibisyonunda da etkili olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular enterokok biyofilm yapıları ile mücadelede pCA' nın etkin ve umut veren bir molekülü olduğunu göstermektedir.

Virülans, patojen mikroorganizmaların diğer canlıları enfekte etmesi ve onlara zarar verme kapasitesini ifade etmekte kullanılan bir terimdir. Bakterilerin virülans özellikleri şitli faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Bazı bakteriler, *in vivo* veya *in vitro* olarak salgıladıkları toksinler ile virülans özellikler sergilerler. Kimi zaman yaşamsal fonksiyonları için kullandıkları, proteazlar gibi bazı faktörler, diğer canlılar üzerinde virülans etki gösterebilir. Bakteriyel proteazlar genellikle bir organizmanın proteoliz yoluyla besin eldesini arttıran faktörler olarak kabul edilirken, enfeksiyonlar sırasında konak dokularına verilen hasarda sıklıkla görev alırlar. *sprE* geni enterokoklarda serin proteaz üretiminden sorumlu genidir ve bu nedenle bu cinsin virülansında önemli rol oynamaktadır. *Caenorhabditis elegans* modelinde ve tavşan endoftalmit modelinde *sprE* mutantı olan suşların virülansında ciddi

düzeyde azalma meydana geldiği farklı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (104,105). Çalışmamızın bir diğer basamağı olan virülans genlerin ifadesi üzerinde nisin, pCA ve nisin+pCA kombinasyonunun etkisi incelenmiştir. Bu denemeler sonucunda, test edilen üç virülans genden (*ace*, *sprE*, *gelE*) yalnızca birinin test edilen suşlardan birinde, OG1RF’de ifade edildiği belirlenmiştir. qRT-PZR denemelerimiz sonucunda, bu genin ifadesinin yalnızca nisin tarafından engellendiği, pCA’ nın *sprE* geninin ifadesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Nisinin *sprE* üzerindeki etkisi organizmanın epitel yüzeyi ile etkileşimini azaltacağından, kronik üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisi veya katater gibi kalıcı tıbbi cihazlarda enterokokal enfeksiyonların önlenmesi çalışmaları açısından kritik bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Özetle, enterokokların virülans özelliklerinin engellenmesinde nisin bakteriyosini aday bir molekül olarak önerilebilir.

2006 yılında Nallapareddy ve ekibinin yapmış olduğu bir çalışmada *ace* ifadesinin gelişme koşullarına bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Çalışmada Ace proteininin sentezinin sıcaklığa ve gen ifadesinin ise ortamdaki kollajen varlığı ile paralel olarak değiştiği belirlenmiştir. Ace proteininin 37 °C’ deki koşullarda saptanamadığı, sıcaklığın 46 °C’ye yükseltilmesi sonrasında söz konusu proteinin ifade edildiği belirlenmiştir. *ace* gen ifadesinin ise kollajen varlığında arttığı, hatta kollajenin *ace* regülasyonu için bir sinyal olabileceği öne sürülmüştür (106). Bu bilgilerden yola çıkarak, test ettiğimiz suşlarda söz konusu virülans genlerin ifadesinin belirlenmemesi, çalışmamızda kullandığımız inkübasyon sıcaklığı olan 37 °C’ nin bu genin ifadesi için uygun bir koşul olamayabileceğini bizlere düşündürmüştür. Yine *ace* geninin ifadesinin kollajen varlığında arttığının farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiş oluşu, bu genin konak organizmayı enfekte etme sürecinde ifade edildiğini göstermektedir. Çalışmamızda *ace* geninin ifadesini belirleyememiş olmamız, denemelerimizi memeli hücre kültürlerinde gerçekleştirilmememizden kaynaklanabilir. Ancak, özellikle QS sinyal molekülleri üzerine nisin+pCA’nın etkisini araştırdığımız bu tez çalışmasında, virülans genlerin ifade denemeleri için ileri analizlerin gerçekleştirilmesine ihtiyaç duyulmamıştır.

Test ettiğimiz suşlarda ifade edilmeyen bir diğer gen ise *gelE* genidir. *gelE*’ nin eksponansiyel fazın sonlarında ve durağan fazda ifadesinin arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (107,108). Shepard ve Gilmore yaptıkları çalışmada bu genin büyüme fazına ve gelişme ortamına bağlı olarak ifadesinin değiştiğini göstermiştir (109). Ancak yapmış oldukları çalışmada QS sinyallerinin olası bir etkisini göz ardı edebilmek adına, düzenli aralıklarla hücreleri süpernatantlarından ayırarak gelişme fazlarını takip etmişlerdir. Elde edilen bulgular

serum ve idrar ortamlarında gen ifadesinin arttığı yönündedir. Araştırmacılar bu durumu ortam pH'ının değişmesi ile ilişkilendirmiştir. Bu durumu destekleyen bir başka çalışma da Wang ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılmıştır (110). Kanal tedavisi görmüş hastalardan izole edilen suşlarda biyofilm oluşumu ve *gelE* ifadesi arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada, *gelE*'nin biyofilm üreticisi olsun olmasın her suşta olduğu fakat gelişme ortamına bağlı olarak ifadesinin etkilendiğini belirlemişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada biyofilm üretici suşlarda, üretici olmayanlardan daha yüksek düzeyde gen ifadesi tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu ile *gelE* arasındaki ilişki hakkında araştırmacılar tarafından kesin bir yargıya henüz varılamamış olsa da, bu genin ifadesinin gelişme koşulları ve büyüme fazına bağlı olarak farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda hedeflenen üreme fazı erken ekspanansiyel faz olduğu için, büyük olasılıkla bu fazda söz konusu genin ifadesi henüz gerçekleşmediğinden, qRT-PZR analizleri sonucu *gelE* geninin ifadesi tanımlanamamıştır.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar nisin+pCA'nın önemli bir patojen olan *E. faecalis* ile mücadelede umut verici ajanlar olduğunu göstermiştir. Nisinin gıdalara ilave edilmesine izin verilen bir ajan oluşu, pCA'nın da yine gıda temelli bir ajan oluşu bu iki maddenin birlikte gıda koruyucusu olarak da kullanım potansiyellerini arttırmaktadır. Böylece özellikle son yıllarda tüketicilerin doğal gıda ürünlerine yöneldikleri düşünüldüğünde, büyük ölçekli analizleri sonrasında etkinliklerinin devam etmesi halinde, bu iki ajan pazarda önemli bir yere sahip olabilir.

Çalışmamızda da olduğu gibi nisin odaklı kombinasyonel yaklaşımlarla anti-biyofilm farmasötik formülasyonlar ortaya çıkarılmaktadır. Bu da insan sağlığı açısından endüstriyel öneme de sahip bir ajan olan nisinin mikrobiyal/medikal biyoteknoloji alanındaki etki değerini göstermektedir. Çalışmamız esas alınarak daha geniş ölçekte dizayn edilecek denemelerle nisinin anti-biyofilm etki profili genişletilebilir. Ek olarak pCA'nın enterokok biyofilm yapıları ve AI-2 molekülü üzerine inhibisyon etkisi ilk kez bu çalışma sonucunda gösterilmiştir. Organizmaların QS sinyallerini inhibe edecek ajanlara karşı direnç geliştiremeyecek oluşu, biyofilm ile mücadelede pCA'yı önemli bir yere taşımaktadır. Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular, pCA'nın biyofilm temelli enfeksiyona neden olan diğer Gram pozitif bakteriler ile mücadelede kullanım için umut veren bir ajan olduğunu göstermiştir. İlerleyen aşamalarda, bu maddenin manyetik nanopartikül haline getirilmek sureti ile biyofilm yapısından geçiş düzeyinin artırılması ve tedavide kullanılan antibiyotikler ile kombine denemelerinin yapılması planlanmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2015;5(7):509–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001>
2. Paganelli FL, Willems RJ, Leavis HL. Optimizing future treatment of enterococcal infections: Attacking the biofilm? *Trends Microbiol* [Internet]. 2012;20(1):40–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.001>
3. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. *Enterococci From Commensals to Lead Causes Drug Resist Infect* [Internet]. 2014;1–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649513>
4. Brandl K, Plitas G, Mihiu CN, Ubeda C, Jia T, Fleisher M, et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*. 2008;455(7214):804–7.
5. Begde DN, Bundale SB, Pise M V., Rudra JA, Nashikkar NA, Upadhyay AA. In vitro modulation of *E. coli* community behavior and human innate immune system by lantibiotic nisin. *Int J Pept Res Ther*. 2012;18(3):171–83.
6. Tong Z, Zhang Y, Ling J, Ma J, Huang L, Zhang L. An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *PLoS One*. 2014;9(2).
7. Kajwadkar R, Shin JM, Lin GH, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. High-purity Nisin Alone or in Combination with Sodium Hypochlorite Is Effective against Planktonic and Biofilm Populations of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* [Internet]. 2017;43(6):989–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.034>
8. Ferreira PS, Victorelli FD, Fonseca-Santos B, Chorilli M. A Review of Analytical Methods for *p*-Coumaric Acid in Plant-Based Products, Beverages, and Biological Matrices. *Crit Rev Anal Chem* [Internet]. 2018;0(0):1–11. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408347.2018.1459173>
9. Kot B, Wicha J, Piechota M, Wolska K, Gruzewska A. Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, *p*-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*. *Turkish J Med Sci*. 2015;45(4):919–24.
10. Jayaraman A, Wood TK. Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. *Annu Rev Biomed Eng* [Internet].

- 2008;10(1):145–67. Available from:  
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160536>
11. Li YH, Tian XL. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms: Bacterial Cooperation and Competition. *Stress Environ Regul Gene Expr Adapt Bact.* 2016;2:1197–205.
  12. Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol.* 2003;88(2–3):123–31.
  13. Murray BE. The life and times of the enterococcus. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(1):46–65.
  14. Hew CM, Korakli M, Vogel RF. Expression of virulence-related genes by *Enterococcus faecalis* in response to different environments. *Syst Appl Microbiol.* 2007;30(4):257–67.
  15. Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1984;34(1):31–4.
  16. Extremina CI, Costa L, Aguiar AI, Peixe L, Fonseca AP. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J Microbiol Methods.* 2011;84(2):167–73.
  17. Akpınar Kankaya D, Özden Tuncer B, Tuncer Y. Gıda Kaynaklı Enterokokların Potansiyel Risk Faktörleri. *Gıda / J Food.* 2017;42:8–19.
  18. Madsen KT, Skov MN, Gill S, Kemp M. Virulence Factors Associated with *Enterococcus Faecalis* Infective Endocarditis: A Mini Review. *Open Microbiol J.* 2017;11(1):1–11.
  19. Singh K V., Nallapareddy SR, Sillanpää J, Murray BE. Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. *PLoS Pathog.* 2010;6(1).
  20. Dunny GM, Hancock LE, Shankar N. Enterococcal Biofilm Structure and Role in Colonization and Disease. *Enterococci From Commensals to Lead Causes Drug Resist Infect [Internet].* 2014;1–17. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649508>
  21. Baylan O, Ongen B. A surveillance of nosocomial candida infections: Epidemiology and influences on mortality in intensive care units View project Investigation of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance among *Campylobacter* Strains View project

- Burak çitil Mugla Üniversitesi [Internet]. 2011 [cited 2019 Dec 3]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/51659583>
22. Toledo-arana A, Valle J, Solano C, Jesu A, Arrizubieta S, Cucarella C, et al. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in Enterococcus faecalis Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2001 [cited 2019 Dec 3];67(10):4538–45. Available from: <http://aem.asm.org/>
  23. Diani M. İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası The nature of enterococcal biofilm structure , a risk factor for human and animal health. 2016;73(1):71–80.
  24. Kalia VC. Quorum sensing vs quorum quenching: A battle with no end in sight. *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with no end in Sight*. 2015. 1–391 p.
  25. Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD, Hancock LE. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by Enterococcus faecalis. *Infect Immun*. 2010;78(11):4936–43.
  26. Padera RF. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovasc Pathol*. 2006;15(5):264–70.
  27. Zobell CE. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* [Internet]. 1943;46(1):39–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=373789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  28. Heukelekian H, Heller a. Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *J Bacteriol*. 1940;40(4):547–58.
  29. Flemming H, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(9):623–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2415%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676145>
  30. Poulsen LV. Review : Article Microbial Biofilm in Food Processing. *Rev Lit Arts Am*. 1999;32(6):321–6.
  31. Costerton JW. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* (80- ) [Internet]. 1999;284(5418):1318–22. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5418.1318>
  32. Soto SM. Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. *Adv Biol* [Internet]. 2014;2014:1–13. Available from:

- <http://www.hindawi.com/journals/ab/2014/543974/>
33. Poulsen LV. Review : Article Microbial Bio " Im in Food Processing. Rev Lit Arts Am. 1999;326:321–6.
  34. Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. J Intern Med. 2012;272(6):541–61.
  35. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. J Chinese Med Assoc [Internet]. 2017;5–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1726490117302587>
  36. Kim SK, Lee JH. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. J Microbiol. 2016;54(2):71–85.
  37. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. Curr Opin Microbiol. 2014;18(1):96–104.
  38. Guilhen C, Forestier C, Balestrino D. Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties. Mol Microbiol. 2017;105(2):188–210.
  39. Bassler BL. How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. Curr Opin Microbiol. 1999;2(6):582–7.
  40. Campos-Galvão MEM, Leite TDS, Ribon AOB, Araújo EF, Vanetti MCD. A new repertoire of informations about the quorum sensing system in *Salmonella enterica* serovar enteritidis PT4. Genet Mol Res. 2015;14(2):4068–84.
  41. Nadell CD, Xavier JB, Levin SA, Foster KR. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. PLoS Biol [Internet]. 2008 [cited 2017 Mar 14];6(1):0171–9. Available from: <http://journals.plos.org/plosbiology/article/file?id=10.1371/journal.pbio.0060014&type=printable>
  42. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol [Internet]. 2002 Feb 15 [cited 2017 Dec 21];184(4):1140–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807075>
  43. Sturme MHJ, Kleerebezem M, Nakayama J, Akkermans a DL, Vaughan EE, de Vos WM. Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram- positive bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2002;81(1–4):233–43.
  44. Rutherford ST, Bassler BL, Hayes CS, Koskiniemi S, Ruhe C, Ben-tekaya H, et al.

- Bacterial Quorum Sensing : Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. 2012;1–26.
45. Ali L, Goraya M, Arafat Y, Ajmal M, Chen J-L, Yu D. Molecular Mechanism of Quorum-Sensing in *Enterococcus faecalis*: Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017;18(5):960. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/5/960>
  46. Greenberg EP, Hastings JW, Ulitzur S. Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria. *Arch Microbiol*. 1979;120(2):87–91.
  47. Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol Microbiol* [Internet]. 1993 Aug 1 [cited 2017 Oct 30];9(4):773–86. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01737.x>
  48. Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37(2):156–81.
  49. Taga ME, Miller ST, Bassler BL. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*. 2003;50(4):1411–27.
  50. Novick RP, Geisinger E. Quorum Sensing in Staphylococci. *Annu Rev Genet*. 2008;42(1):541–64.
  51. Pinkston KL, Gao P, Diaz-Garcia D, Sillanpää J, Nallapareddy SR, Murray BE, et al. The Fsr quorum-sensing system of *Enterococcus faecalis* modulates surface display of the collagen-binding MSCRAMM Ace through regulation of gelE. *J Bacteriol*. 2011;193(17):4317–25.
  52. Schauder S, Shokat K, Surette MG, Bassler BL. The LuxS family of bacterial autoinducers: Biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol*. 2001;41(2):463–76.
  53. Federle MJ. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: Complexities of interspecies signaling. *Contrib Microbiol*. 2009;16:18–32.
  54. Bassler BL, Wright M, Silverman MR. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol*. 1994;13(2):273–86.
  55. Bassler BL, Greenberg EP, Stevens AM. Cross-Species Induction of Luminescence in the Quorum- Sensing Bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol*. 1997;179(12):4043–5.
  56. Surette MG, Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella*



- typhimurium, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999;96(4):1639–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=15544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
57. Winzer K, Hardie KR, Williams P. Bacterial cell-to-cell communication: Sorry, can't talk now - Gone to lunch! *Curr Opin Microbiol*. 2002;5(2):216–22.
  58. Parveen N, Cornell KA. Methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase, a critical enzyme for bacterial metabolism. *Mol Microbiol*. 2011;79(1):7–20.
  59. Vidal JE, Ludewick HP, Kunkel RM, Zähler D, Klugman KP. The luxs-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by streptococcus pneumoniae strain D39. *Infect Immun*. 2011;79(10):4050–60.
  60. Trappetti C, Potter AJ, Paton AW, Oggioni MR, Paton JC. LuxS mediates iron-dependent biofilm formation, competence, and fratricide in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2011;79(11):4550–8.
  61. Juturu V, Wu JC. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2018;36(8):2187–200. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007>
  62. Silva CCG, Silva SPM, Ribeiro SC. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Front Microbiol*. 2018;9(APR).
  63. Gharsallaoui A, Oulahal N, Joly C, Degraeve P. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016;56(8):1262–74.
  64. Akkoç N, Şanlıbaba P, Akçelik M. Bakteriyosinler: Alternatif Gıda Koruyucuları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilim Enstitüsü Derg* [Internet]. 2009;25(1–2):59–70. Available from: <http://www.cilginbiyologlar.com/makaleler/nakkoc-psanlibaba-makcelik.pdf>
  65. Gross E, Morell JL. The Structure of Nisin. *J Am Chem Soc*. 1971;93(18):4634–5.
  66. MULDER JWM, BOERRIGTER IJ, ROLLEMA HS, SIEZEN RJ, de VOS WM. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur J Biochem*. 1991;201(3):581–4.
  67. Zendo T, Fukao M, Ueda K, Higuchi T, Nakayama J, Sonomoto K. Identification of the lantibiotic nisin q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003;67(7):1616–9.

68. Wirawan RE, Klesse NA, Jack RW, Tagg JR. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(2):1148–56.
69. De Kwaadsteniet M, Ten Doeschate K, Dicks LMT. Characterization of the structural gene encoding nisin F, a new lantibiotic produced by a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolate from freshwater catfish (*Clarias gariepinus*). *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(2):547–9.
70. O'Connor PM, O'Shea EF, Guinane CM, O'Sullivan O, Cotter PD, Ross RP, et al. Nisin H is a new nisin variant produced by the gut-derived strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(12):3953–60.
71. Whitehead HR. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochem J*. 1933;27(6):1793–800.
72. Özel B, Şimşek Ö, Akçelik M, Saris PEJ. Innovative approaches to nisin production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(15):6299–307.
73. Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical applications of nisin. *J Appl Microbiol*. 2016;120(6):1449–65.
74. Bernards MA. Plant natural products: a primer. *Can J Zool*. 2010;88(7):615–27.
75. Akdemir FNE, Albayrak M, Çalik M, Bayir Y, Gülçin I. The protective effects of p-Coumaric acid on acute liver and kidney damages induced by cisplatin. *Biomedicines*. 2017;5(2):1–11.
76. Lou Z, Wang H, Rao S, Sun J, Ma C, Li J. P-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control* [Internet]. 2012;25(2):550–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.022>
77. Myszka K, Schmidt MT, Białas W, Olkowicz M, Leja K, Czaczyk K. Role of gallic and p-coumaric acids in the AHL-dependent expression of *flgA* gene and in the process of biofilm formation in food-associated *Pseudomonas fluorescens* KM120. *J Sci Food Agric*. 2016;96(12):4037–47.
78. Garrait G, Jarrige JF, Blanquet S, Beyssac E, Cardot JM, Alric M. Gastrointestinal absorption and urinary excretion of trans-cinnamic and p-coumaric acids in rats. *J Agric Food Chem*. 2006;54(8):2944–50.
79. Ouimet MA, Stebbins ND, Uhrich KE. Biodegradable coumaric acid-based poly(anhydride-ester) synthesis and subsequent controlled release. *Macromol Rapid Commun*. 2013;34(15):1231–6.

80. Kiliç I, Yeşiloğlu Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of p-coumaric acid. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 2013;115:719–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.06.110>
81. Akko N, Ak M. Identification and Characterisation of Antimicrobial Activity of Nisin A Produced by *Lactococcus lactis* subsp . *lactis* LL27. 2009;27(1):55–64.
82. Field D, Seisling N, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Synergistic nisin-polymyxin combinations for the control of pseudomonas biofilm formation. *Front Microbiol*. 2016;7(OCT):1–7.
83. Field D, O'Connor R, Cotter PD, Ross RP, Hill C. In vitro activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against *Staphylococcus* biofilms. *Front Microbiol*. 2016;7(APR):1–11.
84. Choi J, Shin D, Ryu S. Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence: The *luxS* gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island 1. *Infect Immun*. 2007;75(10):4885–90.
85. Jesudhasan PR, Cepeda ML, Widmer K, Dowd SE, Soni KA, Hume ME, et al. Transcriptome Analysis of Genes Controlled by *luxS* /Autoinducer-2 in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Foodborne Pathog Dis* [Internet]. 2010;7(4):399–410. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77950591551&partnerID=tZOtx3y1%5Cnhttp://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/fpd.2009.0372>
86. Lu L, Hume ME, Pillai SD. Autoinducer-2–like Activity Associated with Foods and Its Interaction with Food Additives. *J Food Prot*. 2004;67(7):1457–62.
87. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–8.
88. Maryam D, Ozlem GE, M. NA, Fatma NY, Evrim GA, Nefise A. The interactions between *esp*, *fsr*, *gelE* genes and biofilm formation and pfge analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains. *African J Microbiol Res* [Internet]. 2014;8(2):129–37. Available from: <http://academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/81E921C42590>
89. Jabbari SM, Shiadeh, Pormohammad A, Hashemi A, Lak P. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated enterococcus faecalis and enterococcus faecium: A systematic review and meta-analysis. *Infect Drug Resist*. 2019;12:2713–25.
90. Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and

- eradicates biofilm of enterococcus faecalis. J Endod. 2012 Jan;38(1):81–5.
91. Sun J, Song X. Assessment of Antimicrobial Susceptibility of *Enterococcus Faecalis* Isolated From Chronic Periodontitis in Biofilm Versus Planktonic Phase. J Periodontol [Internet]. 2011 Apr [cited 2019 Dec 10];82(4):626–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1902/jop.2010.100378>
  92. Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Herbal Alternatives (Triphala and Green Tea Polyphenols), MTAD, and 5% Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilm Formed on Tooth Substrate: An In Vitro Study. J Endod. 2010 Jan;36(1):83–6.
  93. Bukhary S, Balto H. Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilms. J Endod. 2017 Apr 1;43(4):643–7.
  94. Chittrarasu M, Sathyanarayana SS, Ahamed S, Aberna A, Bhavani S, Rajaraman G. Antimicrobial efficacy of liquorice against *Enterococcus faecalis* biofilms in various concentrations at time-dependent variables: An in vitro study. J Conserv Dent. 2019 Jan 1;22(1):7–11.
  95. Shi C, Zhang X, Zhao X, Meng R, Liu Z, Chen X, et al. Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. Food Control [Internet]. 2017;71:10–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.020>
  96. Szweda P, Schielmann M, Frankowska A, Kot B, Zalewska M. Antibiotic resistance in staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis in eastern poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: Lysostaphin, nisin and polymyxin B. J Vet Med Sci. 2014;76(3):355–62.
  97. Russell JB. Nisin Resistance of of *Streptococcus bovis*. Appl Environ Microbiol. 2001;67(2):808–13.
  98. Mazzotta AS, Crandall AD, Montville TJ. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. Appl Environ Microbiol. 1997;63(7):2654–9.
  99. Bag A, Chattopadhyay RR. Synergistic antibacterial and antibiofilm efficacy of nisin in combination with *p*-coumaric acid against food-borne bacteria *Bacillus cereus* and *Salmonella typhimurium*. Lett Appl Microbiol [Internet]. 2017;65(5):366–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/lam.12793>
  100. Rollema HS, Kuipers OP, Both P, De Vos WM, Siezen RJ. Improvement of Solubility

- and Stability of the Antimicrobial Peptide Nisin by Protein Engineering [Internet]. Vol. 61, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 1995 [cited 2019 Dec 10]. Available from: <http://aem.asm.org/>
101. Liu F, Liu M, Du L, Wang D, Geng Z, Zhang M, et al. Synergistic antibacterial effect of the combination of e-polylysine and nisin against enterococcus faecalis. *J Food Prot.* 2015;78(12):2200–6.
  102. Furneri PM, Garozzo A, Musumarra MP, Scuderi AC, Russo A, Bonfiglio G. Effects on adhesiveness and hydrophobicity of sub-inhibitory concentrations of netilmicin. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;22(2):164–7.
  103. Bodini SF, Manfredini S, Epp M, Valentini S, Santori F. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Lett Appl Microbiol.* 2009;49(5):551–5.
  104. Engelbert M, Mylonakis E, Ausubel FM, Calderwood SB, Gilmore MS. Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun.* 2004;72(6):3628–33.
  105. Sifri CD, Mylonakis E, Singh K V, Qin X, Garsin D a, Murray BE, et al. Virulence Effect of. *Society.* 2002;70(10):5647–50.
  106. Nallapareddy SR, Murray BE. Ligand-signaled upregulation of *Enterococcus faecalis* ace transcription, a mechanism for modulating host-E. faecalis interaction. *Infect Immun.* 2006;74(9):4982–9.
  107. Nakayama J, Cao Y, Horii T, Sakuda S, Akkermans ADL, De Vos WM, et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: A peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol.* 2001;41(1):145–54.
  108. Qin X, Singh K V., Weinstock GM, Murray BE. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol.* 2001;183(11):3372–82.
  109. Shepard BD, Gilmore MS. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect Immun.* 2002;70(8):4344–52.
  110. Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, et al. Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J Endod* [Internet]. 2011;37(5):631–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.02.006>

## 8. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Betül Cansu YAZICI

**Doğum Yeri:** Ankara

**Doğum Tarihi:** 04.01.1993

**Medeni Hali:** Bekar

**Yabancı Dili:** İngilizce (İleri Seviye)

### **Eğitim Durumu:**

**Lise:** Özel Yüce Fen Lisesi, Ankara

**Lisans:** Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2011-2016)

## 9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

### **Uluslararası Kongrede Sunulan Sözlü Bildiri**

Zeynep Eran, B. Cansu Yazıcı, Olgü Ors, Mustafa AKÇELİK, Nefise AKÇELİK “Biofilm Producing Capacities of Wild Type Salmonella Typhimurium 14028 Strain and Mutants at Different Incubation Periods”, “International Conference on Food Science and Technology” November 13-15, 2017 Rome, Italy. (Sözlü Bildiri)

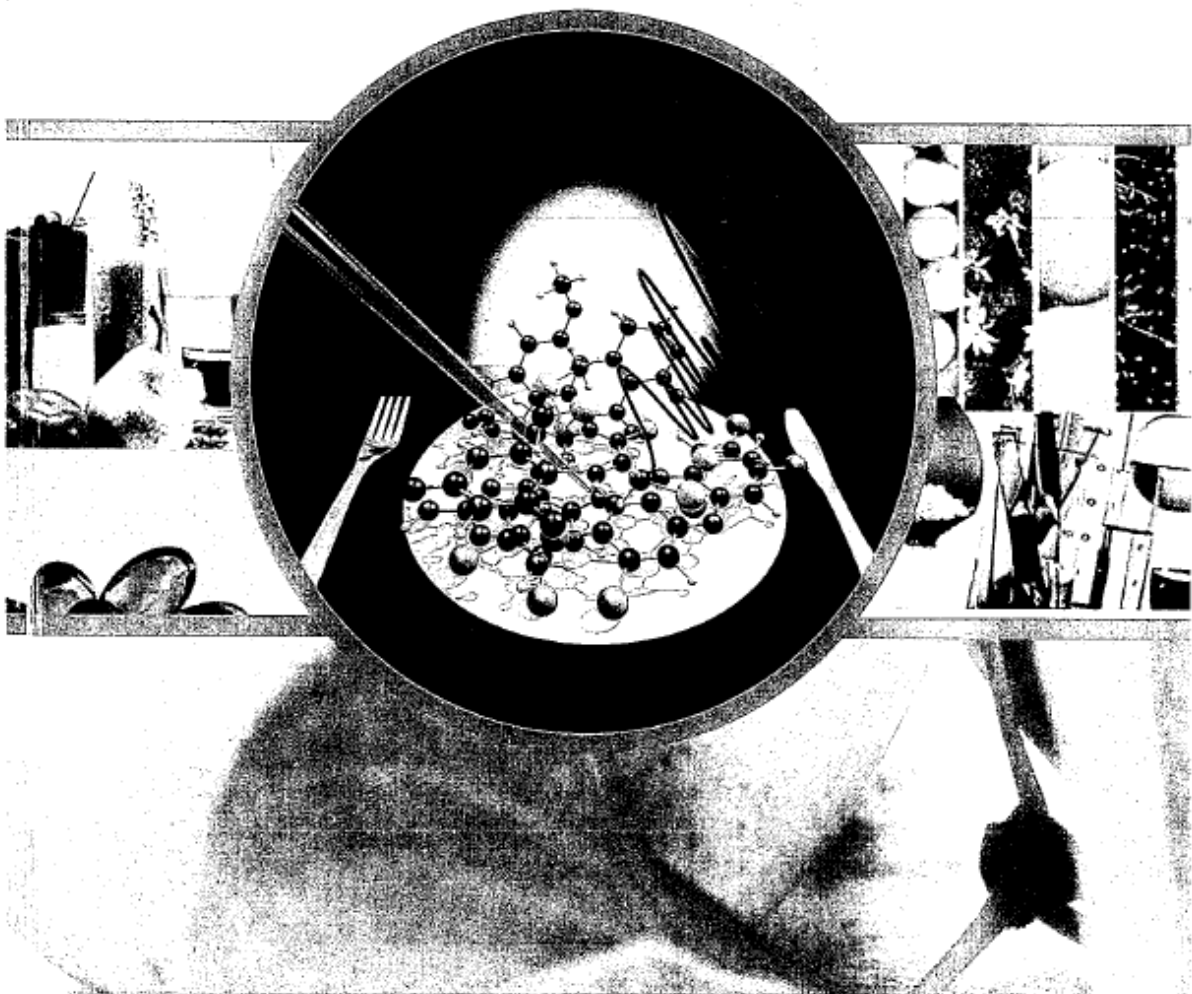
Betül Cansu YAZICI, Mustafa AKÇELİK, Nefise AKÇELİK “Bakteriyel Biyofilm Yapılarında Quorum-Sensing Mekanizmasının Rolü”, International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF). April 2-5, 2018 Çeşme İzmir/ Turkey (Sözlü Bildiri).





# International Conference on **Food Science and Technology**

November 13-15, 2017  
Holiday Inn Rome - Aurelia  
Rome, Italy





## International Conference on **Food Science and Technology**

Holiday Inn Rome - Aurelia, Rome, Italy | November 13-15, 2017

**Biofilm producing capacities of wild type *Salmonella Typhimurium* 14028 strain and mutants at different incubation periods**

Zeynep Eran, B. Cansu Yazıcı, Olgu Ors, Mustafa Akcelik, Nefise Akcelik\*

Ankara University, Turkey

**S**almonella is one of the most widely distributed food borne illness factor bacteria on earth that capable of biofilm formation on different type of surfaces. Biofilms are defined as complex microbial communities embedded in a self-produced extracellular polymeric matrix that attach to surfaces and are the predominant mode of microbial growth in nature. Biofilms cause health problems and lead to economic losses in the food industry. Since that, it is important to understand genetic nature of the structure is obligatory to fight with it. For this purpose, we studied the biofilm forming abilities of 9 *Salmonella Typhimurium* strains (8 mutant, 1 wild type), lack of genes which thought to be important for biofilm production. The mutant strains were created via kanamycin cassette insertion. Following the incubation at 20 °C for 24 h, 48 h, and 72 h time periods, biofilm production abilities of mutants and wild type strains was evaluated using 96 well polystyrene microtiter plate assay. After staining the biofilm with crystal violet, the amount of bounding dye to the biofilm cells was measured using ELISA reader. We determined that 2 genes (*csgA*, *csgD*) out of 8 (*bapA*, *FimA*, *FimD*, *FimE*, *FimH*, *FlhZ*) are more important for biofilm production since strains, carrying mutation on *csgA* and *csgD* genes, cannot form biofilm at any of the tested incubation periods. On the other hand, other 6 strains enhanced their biofilm production capacity at the end of the 72 h incubation, despite their biofilm production was very less after 24 h incubation at 20° C. In the light of our findings, it is possible to say we will achieve more efficient results if researchers focuses on these two genes to combat with biofilm structures.

### Biography

Nefise Akcelik works at Ankara University, Biotechnology Institute Central Laboratory. During her master thesis, she studied genetic determination of the industrial properties of lactic acid bacteria. She did her PhD on the subject of elucidation of *Salmonella pathogenesis* via examining MisL autotransporter protein and protein-protein interactions. Current issues of her study are determining the nature of biofilm structures of *Salmonella* genus members and *Enterococcus* genus members and to identify new strategies for combating these organisms mature biofilms. She has published 31 research papers in journals covered in SCI. She has 29 presentations at international congresses. According to Scopus her h index is 7.

nefise.akcelik@ankara.edu.tr

**Food Science 2017**

November 13-15, 2017



# ICAFOF

## 2018

2-5 April 2018  
Cesme-Izmir / Turkey

# Proceeding Book

*Editors*

*Asst.Prof.Dr. M.Cüneyt BAGDATLI*

*Assoc.Prof.Dr. Erkan KALIPCI*

*Assoc.Prof.Dr. Serkan SAHINKAYA*



**INTERNATIONAL CONFERENCE ON  
AGRICULTURE, FOREST, FOOD  
SCIENCES AND TECHNOLOGIES  
2-5 April 2018 Cesme-Izmir/Turkey**

Oral Presentation

**Bakteriyel Biyofilm Yapılarında Quorum-Sensing Mekanizmasının Rolü**

**Betül Cansu YAZICI<sup>1</sup>, Mustafa AKÇELİK<sup>2</sup>, Nefise AKÇELİK<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: nakcelik@ankara.edu.tr

**Özet**

Mikroorganizmalar zorlu çevresel koşullarda hayatta kalabilmek adına biyofilm olarak adlandırılan yapılar oluştururlar. Bakteriyel biyofilm yapıları, mikroorganizmaların kendi sentezledikleri ekzopolimerik bir madde içinde kümelenmeleri olarak ifade edilir. Bu yapılar sayesinde bakteriler; antimikrobiyal ajanlar, konak immün sistemi ve/veya çevresel etkenlere karşı planktonik formlarına kıyasla daha dirençli hale gelirler. Bu nedenle biyofilmler, sağlık alanı ve gıda endüstrisi başta olmak üzere pek çok alanda çeşitli sorunlara yol açmaktadır. Quorum sensing adı verilen mekanizma diğer pek çok özelliğin yanı sıra, planktonik mikroorganizmaların biyofilm fenotipine geçişte de kullandıkları bir mekanizmadır. “Yeter sayı algılama” olarak da bilinen bu mekanizma; bakterilerin, çevredeki diğer mikroorganizmaların salgıladıkları sinyal moleküllerini reseptörler aracılığı ile algılaması ve ortamdaki mikroorganizma sayısını belirlemesi esasına dayalıdır. Hücre popülasyonunun enfeksiyon gibi çeşitli süreçleri başlatmak için yeterli eşik değerine ulaştığı belirlendiğinde, hücrenin çeşitli fenotipik özellikleri ve gen ifadesi değişime uğrar. Hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler bu sinyalizasyon mekanizmasını kullanmaktadır. Yalnızca Gram negatifler (AHL) ve yalnızca Gram pozitifler (AIP) tarafından kullanılan quorum sensing mekanizmalarının yanı sıra hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler tarafından kullanılan ortak bir quorum sensing mekanizması (AI-2) da mevcuttur. Bu sayede yalnızca tür içi değil, türler arası iletişim de sağlanmış olur. Biyofilm oluşumu ve ilerleyişi gibi süreçlerde quorum sensing mekanizmasının rol aldığı belirlenmiştir. Bu nedenle son yıllarda, biyofilm yapıları ile mücadelede bu sistemin hedef alınması, mücadelede kullanılan yeni bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır. Quorum sensing inhibisyonunun, biyofilm oluşumu ve dolayısıyla biyofilm ilişkili enfeksiyonların önlenmesinde önemli bir yöntem olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm, Quorum sensing, AHL, AIP, AI-2.