

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

*ENTEROCOCCUS FAECALIS* BİYOFİLM YAPISINDA eDNA'NIN ROLÜ VE  
BİYOFİLM İLE MÜCADELEDE ENZİM VE ANTİBİYOTİK UYGULAMASI  
YOLUYLA BİYOFİLM YAPILARININ ZAYIFLATILMASI

Burak GÜNEŞ

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Mayıs  
2018

## ETİK BEYAN

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

Burak GÜNEŞ

## ONAY

Doç. Dr. Nefise AKÇELİK danışmanlığında, Burak GÜNEŞ tarafından hazırlanan bu çalışma .../05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

İmzası:

Üye:

İmzası:

Üye: Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

İmzası:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

*Enterococcus faecalis* Biyofilm Yapısında eDNA'nın Rolü ve Biyofilm ile Mücadelede Enzim ve Antibiyotik Uygulaması Yoluyla Biyofilm Yapılarının Zayıflatılması

Burak GÜNEŞ

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Bu tez çalışmasında, Gram pozitif fırsatçı bir patojen olan *Enterococcus faecalis*'e ait 4 suşta (74, 114, ATCC 29212 ve ATCC OG1RF) eDNA'nın biyofilm üretimindeki rolünün tanımlanması ve bu patojenle abiyotik yüzeylerde mücadelede enzimler ve antibiyotiklerin kullanım olanaklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Denemelerde kullanılan tüm suşlarda en yüksek düzeyde eDNA üretiminin, 24 saat inkübasyon sonunda gerçekleştiği belirlenmiştir. Öncelikle; 20, 50 ve 100 ng/μl eDNA (hücre dışı DNA) ve gDNA (genomik DNA) ilave edilmiş ortamlarda 24 ve 48 saat süresince geliştirilen biyofilmlerin miktarsal tayinleri yapılarak her iki tip DNA'nın biyofilm oluşumu üzerindeki etkinliği saptanmıştır. Daha sonra ise aynı ortamlara eDNA ve gDNA'nın yanında çeşitli enzimler de ilave edilerek, bu ajanların biyofilm yapıları üzerine kombine etkileri tanımlanmıştır. Çalışmalar sonucunda, eDNA'nın ve gDNA'nın Enterokok biyofilmleri üzerine, suştan suşa ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişen bir etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Antibiyotik ve enzim çalışmalarında, kanamisin uygulamasının biyofilm miktarını artırdığı, nalidiksik asit uygulamasının herhangi bir etkinlik göstermediği, tetrasiklin ve ampisilin uygulamalarının ise biyofilm yapıları üzerinde düşük inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. DNaz I ve Benzonaz® enzimlerinin antibiyotiklerle birlikte kombine edilerek kullanımı, antibiyotiklerin genel etkinlik biçiminde önemli bir değişime yol açmamıştır.

2018, 160 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Enterococcus faecalis*; Biyofilm; DNaz; Hücre dışı DNA

## ABSTRACT

Master Thesis

The Role of eDNA on Biofilm Structures of *Enterococcus faecalis* and Combat with Biofilm Structure via Enzyme and Antibiotic Treatment to Weakening of the Biofilm Structure

Burak GÜNEŞ

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Nefise AKÇELİK

In this thesis, it was aimed to define the role of eDNA (extracellular DNA) in the production of biofilms of 4 strains belong to *Enterococcus faecalis* (74, 114, ATCC 29212 and ATCC OG1RF), a Gram positive opportunistic pathogen and to determine the possibilities of using enzymes and antibiotics in combating with this pathogen on abiotic surfaces. It was determined that the highest level of eDNA production, in all the strains used in the experiments, was performed after 24 hours incubation. Firstly; quantitative determination of the biofilms developed in 24 and 48 hours in media supplemented with 20, 50 and 100 ng / $\mu$ l eDNA and gDNA (genomic DNA) was performed to determine the activity of both types of DNA on biofilm formation. Then, various enzymes were added to the same media along with eDNA and gDNA, and the combined effects of these agents on biofilm structures were defined. The results of the study indicated that eDNA and gDNA showed an altered activity on enterococci biofilms depending on strain diversity and incubation time. In antibiotic and enzyme studies, it was determined that the application of kanamycin increased the amount of biofilm, nalidixic acid application did not show any activity, while tetracycline and ampicillin had a low inhibitory effect on biofilm structures. The combined use of DNaz I and Benzonase® enzymes with antibiotics did not cause a significant change in the overall effectiveness of antibiotics.

2018, 160 pages

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*; Biofilm; DNase; Extracellular DNA

## TEŞEKKÜR

Bu tezin yazılması, projelendirilmesi ve mezun olma hayallerim şüphesiz ki çok sevdiğim sayın danışmanım Doç. Dr. Nefise AKÇELİK olmasaydı gerçek olmayacaktı. Tanıştığımız ilk günden, bu tezin TEŞEKKÜR kısmını yazma aşamasına kadar dünyanın en şanslı yüksek lisans öğrencisi olarak kendisinden belki de başka hiçbir öğrencinin elde edemeyeceği desteği gördüm. Çoğu öğrencinin sahip olamadığı bir çalışma ortamını ve fırsatları öğrencilerine sunabilmek için gece gündüz çalışan, mevcut şartları fırsatlara dönüştürebilen ve bunları hem öğrencilerini hem de işini çok sevdiği için yapan, detaylı çalışmayı öğreten, sadece başarılı akademisyenliğiyle değil aynı zamanda mükemmel ekip arkadaşlığıyla da laboratuvarındaki her günümün mutlu ve huzurlu geçmesini sağlayan, bana sadece deney yapmayı değil, iş hayatını da öğreten, zorlu ve yoğun deney günlerinin havasını mükemmel kahvaltılarla yumuşatan, omuz omuza deney yapmayı ömrümün sonuna kadar keyifle ve özlemle hatırlayacağım, her zaman iletişim halinde olacağım sevgili ve sayın danışmanım, iyi ki varsınız. Tüm bunlar ve buraya sığdıramadığım nice değerli katkılarınız için size teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarımı yorumlaması ve tezimi okuması bile benim için çok büyük bir şans olan, her cümlesiyle ufkumu açan, sadece bilimsel tecrübelerinden değil, hayat görüşünden de ders aldığım hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü),

Değerli Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü hocaları ve çalışanlarına,

Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarları'ndaki ilk günümünden itibaren bana her gün dost olan, çalışma disiplini her zaman örnek aldığım, her türlü problemimde beni bıkmadan usanmadan dinleyebilen, kariyer planlarımda her daim arkamda ve bir telefonumla yanımda olan, gönlümün doktoru Onur BENDER'e,

Çalışmalarımın tamamlanmasında büyük emeği olan, hiçbir zaman yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşım Cansu YAZICI'ya,

Oda arkadaşlığı ile başlayan süreçte, başka birinin sahip olamayacağı en iyi "ev arkadaşına" dönüştüğün için, 6 sene boyunca birbirimize (özellikle aynı anda bir evde iki tez yazıyorken)

tahammül ettiğimiz için, her anımda yanımda durduğum için, aldığım kararlarda beni hep desteklediğim için, ailemin bir parçası olduğum için Cihan Akın GÜRSOY'a,

Hacettepe Biyoloji'nin bana kazandırdığı en önemli kişi, aynı yerde okuduk, staj yaptık. Belki yüksek lisansı aynı yerde yapamadık ama aslında hep beraberdik. Çalışmalarına her zaman yardımcı olan, *Şehzadem* Okan AYDOĞAN'a,

Hayatım boyunca arkadaşım kalacak, kararlarımın en güzel destekçisi, “hastalıkta sağlıkta” her zaman arkamda ve her daim yanımda olan Begüm ÖZBEK'e,

Birbirimize hak ettiğimiz değeri henüz üç sene önce vermeye başladığımız enstitünün bana kazandırdığı en önemli “ikinci” insan Merve SUCU'ya (birinci diyemiyorum biliyorsun, kür),

İş ile laboratuvar arasında geçen zorlu günlerde beni anladıkları, destekledikleri ve güvendikleri için hem Biyoteknoloji Enstitüsü'nden çok sevdiğim arkadaşlarım, hem de iş yerindeki sevgili Tetkik ve Analiz Sorumlularım olan Cemre DEMİR ve Hatice YILDIZHAN'a,

Tezimin istatistiksel analizlerini yapan, sayfalarca veri ile gece gündüz uğraştığı ve tüm paniklemelerime katlandığı için Zeynep ÖZKESERLİ'ye,

Tez çalışmamı 116Z067 numaralı proje olarak, 1002- Hızlı Destek Programı ile destekleyen TÜBİTAK'a,

Son olarak, bugün olduğum insan olmamı sağlayan, maddi manevi desteklerini bir gün bile esirgemeyen, zor zamanlarımda her an arkamda hissettiğim ve bundan gurur duyduğum, “hadi artık bitsin şu tez” diye sabırsızlıkla bekleyen annem Dirayet GÜNEŞ'e, babam Bahtiyar GÜNEŞ'e, başarılarımı her zaman destekleyen, hayattaki şansım, güzeller güzeli canım ablam Mesude GÜNEŞ'e – you are the best *ally*,

Teşekkür ederim.

Burak GÜNEŞ

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN .....</b>	<b>İ</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>vii</b>
<b>SEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>xii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</b>	<b>xx</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ.....</b>	<b>xxi</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. BİYOFİLMİN TANIMI .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. BİYOFİLMİN OLUŞUM AŞAMALARI .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3.1. MİKROBİYAL TUTUNMA.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1.1. Geri Dönüşümlü Tutunma .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1.2. Geri Dönüşümsüz Tutunma .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.2. BAKTERİ HÜCRELERİNİN EPS ÜRETEREK YÜZEYE BAĞLANMASI.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.3. KOLONİ OLUŞUMU VE BİYOFİLM YAPISININ OLGUNLAŞMASI .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.4. OLGUNLAŞAN BİYOFİLMDEKİ HÜCRELERİN GÖÇÜ (DAĞILMA).....</b>	<b>11</b>
<b>2.4. BİYOFİLM MATRİKSİ VE ELEMANLARI.....</b>	<b>12</b>
<b>2.4.1. POLİSAKKARİTLER .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4.2. PROTEİNLER.....</b>	<b>13</b>



2.4.2.1. Enzimler.....	13
2.4.2.2. Yapısal Proteinler.....	13
2.4.3. SÜRFAKTANLAR VE LİPİTLER.....	14
2.4.4. SU.....	14
2.4.5. HÜCRE DIŞI DNA (eDNA).....	14
2.4.5.1. eDNA'nın Kökeni.....	15
2.4.5.2. eDNA'nın Keşfi.....	15
2.4.5.3. <i>Enterococcus</i> Cinsi Bakterilerde eDNA Salımı.....	16
2.4.5.4. eDNA'nın Yapısal Rolü.....	18
2.4.5.5. eDNA'nın Fonksiyonel Rolü.....	19
2.4.5.5.1. Yatay Gen Transferinde eDNA'nın Rolü.....	19
2.4.5.5.2. Quorum Sensing Mekanizmalarında eDNA'nın Rolü.....	20
2.4.5.5.3. Antibiyotik Direncinde ve Konak İmmün Sistemine Karşı Savunmada eDNA'nın Rolü.....	22
<b>2.5. BİYOFİLM İLE MÜCADELEDE eDNA'NIN KULLANIMI.....</b>	<b>23</b>
2.5.1. BİYOFİLM YAPILARININ KONTROLÜNDE DNaz KULLANIMI.....	25
<b>2.6. ÇALIŞMADA KULLANILAN ANTİMİKROBİYAL AJANLARIN ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMALARI.....</b>	<b>27</b>
2.6.1. KANAMİSİN.....	27
2.6.2. TETRASİKLİN.....	29
2.6.3. NALİDİKSİK ASİT.....	31
2.6.4. AMPİSİLİN.....	32
2.6.5. DEOKSİRİBONÜKLEAZ I (DNaz I).....	33
2.6.6. RNAz A.....	34
2.6.7. BENZONAZ.....	35

2.6.8. PROTEİNAZ K.....	36
<b>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</b>	<b>38</b>
<b>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. MATERYAL.....</b>	<b>40</b>
4.1.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BAKTERİLER VE GELİŞME KOŞULLARI.....	40
4.1.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLER.....	40
4.1.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER VE ENZİMLER.....	43
4.1.3.1. Kanamisin .....	43
4.1.3.2. Tetrasiklin .....	44
4.1.3.3. Ampisilin .....	44
4.1.3.4. Nalidiksik asit .....	44
4.1.3.5. Proteinaz K.....	44
4.1.3.6. RNaz A.....	45
4.1.3.7. DNaz I.....	45
4.1.3.8. Benzonaz®.....	45
<b>4.2. YÖNTEM.....</b>	<b>45</b>
4.2.1. PLANKTONİK HÜCRELERİN eDNA ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ.....	45
4.2.2. PLANKTONİK HÜCRELERDEN GENOMİK DNA İZOLASYONU .....	46
4.2.3. BAKTERİLERİN BİYOFİLM ÜRETİM DÜZEYLERİNİN VE BİYOFİLM YAPISINDA BULUNAN eDNA MİKTARININ BELİRLENMESİ.....	47
4.2.4. BİYOFİLM YAPILARI ÜZERİNE ANTİBİYOTİKLERİN, BENZONAZ'IN VE DNaz I ENZİMİNİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ.....	49
4.2.5. BİYOFİLM YAPISINDAN eDNA'NIN İZOLASYONU .....	50

4.2.6. İZOLE EDİLEN NÜKLEİK ASİTLERİN DNaz I, RNaz, BENZONAZ VE PROTEİNAZ K İLE MUAMELESİ.....	51
4.2.7. ENZİM MUAMELESİNE TABİ TUTULAN NÜKLEİK ASİTLERİN BİYOFİLM YAPISINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ .....	52
4.2.8. İSTATİSTİKİ ANALİZLER .....	52
<b><u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u></b>	<b>53</b>
<b>5.1. PLANKTONİK HÜCRELERİN eDNA ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2. PLANKTONİK HÜCRELERDEN gDNA İZOLASYONU .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3. BİYOFİLM ÜRETİMİNİN VE BİYOFİLM YAPISINDA BULUNAN eDNA MİKTARININ BELİRLENMESİ .....</b>	<b>55</b>
5.3.1. BİYOFİLM ÜRETİM MİKTARININ BELİRLENMESİ .....	55
5.3.2. BİYOFİLM YAPILARINDAKİ eDNA MİKTARININ BELİRLENMESİ .....	56
<b>5.4. BİYOFİLM YAPILARI ÜZERİNE ANTİBİYOTİKLERİN, BENZONAZ VE DNaz I ENZİMLERİNİN VE BU ENZİMLERİN ANTİBİYOTİKLERLE OLUŞTURULAN KOMBİNASYONLARININ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ.....</b>	<b>59</b>
5.4.1. BİYOFİLM YAPILARI ÜZERİNE ANTİBİYOTİKLERİN ETKİSİ .....	59
5.4.2. BİYOFİLM YAPILARI ÜZERİNE BENZONAZ VE DNaz ENZİMLERİNİN VE BU ENZİMLERİN ANTİBİYOTİKLERLE OLUŞTURULAN KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ .....	68
<b>5.5. BİYOFİLM YAPISINDAN eDNA’NIN İZOLASYONU.....</b>	<b>86</b>
5.5.1. BİYOFİLM YAPISINDAN İZOLE EDİLEN eDNA VE gDNA’NIN AGARoz JELDE GÖRÜNTÜLENMESİ .....	86
5.5.2. FARKLI OLGUNLAŞMA DÜZEYLERİNDEKİ BİYOFİLM YAPILARINDAN İZOLE EDİLEN eDNA’NIN MİKTARININ BELİRLENMESİ .....	88
<b>5.6. İZOLE EDİLEN NÜKLEİK ASİTLERİN DNaz I, RNaz A, BENZONAZ VE PROTEİNAZ K İLE MUAMELESİ .....</b>	<b>91</b>
<b>5.7. ENZİM MUAMELESİNE TABİ TUTULAN NÜKLEİK ASİTLERİN BİYOFİLM YAPISINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ.....</b>	<b>92</b>
<b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>	<b>117</b>

<b><u>7. KAYNAKLAR.....</u></b>	<b><u>122</u></b>
<b><u>8. ÖZGEÇMİŞ.....</u></b>	<b><u>134</u></b>
<b><u>9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u></b>	<b><u>135</u></b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyofilm oluşum basamakları (25) .....	8
Şekil 2.2. Koloni oluşumu ve biyofilmin olgunlaşması (35).....	11
Şekil 2.3. Biyofilm yapısından hücrelerin göçü (29).....	12
Şekil 2.4. Biyofilm yapısına DNaz I enziminin etkileri (48).....	16
Şekil 2.5. Biyofilm hücreleri arasındaki filamentöz yapılar (52) .....	17
Şekil 2.6. Gram pozitif bakterilerde hücre lizisi (54) .....	18
Şekil 2.7. Biyofilimde Quorum Sensing sinyallerinin başlangıç aşaması (66).....	21
Şekil 2.8. Biyofilm yapısının konak immün sistemine karşı korunmasında eDNA'nın rolü (45).....	23
Şekil 2.9. DNaz uygulamasının biyofilm yapısına etkisi (76).....	25
Şekil 2.10. Kanamisin antibiyotiğinin kimyasal formülü (87) .....	28
Şekil 2.11. Aminoglikozitlerin hücre zarına olan etki mekanizması (88) .....	28
Şekil 2.12. Aminoglikozitlerin neden olduğu hücre içi süperoksitlerin artışı ve hücre ölüm mekanizması (88).....	29
Şekil 2.13. Tetrasiklin antibiyotiğinin kimyasal formülü (90) .....	30
Şekil 2.14. Nalidiksik asit antibiyotiğinin kimyasal formülü (94).....	31
Şekil 2.15. Nalidiksik asidin etki mekanizması (88) .....	31
Şekil 2.16. Ampisilin antibiyotiğinin kimyasal formülü (95).....	32
Şekil 2.17. Deoksiribonükleaz I enziminin etki mekanizması (101).....	33
Şekil 2.18. Ribonükleaz A enziminin etki mekanizması (108) .....	35
Şekil 2.19. Benzonaz enziminin etki mekanizması (112).....	36

Şekil 2.20. Proteinaz K enziminin etki mekanizması (115).....	37
Şekil 4.1. İzole edilen eDNA konsantrasyonlarının belirlenmesinde referans alınan $\lambda$ DNA standart eğri grafiği.....	48
Şekil 5.1. <i>E. faecalis</i> suşlarının planktonik formlarının ürettiği eDNA miktarları.....	53
Şekil 5.2. 1 kb marker için referans alınan bant büyüklükleri (129).....	54
Şekil 5.3. <i>E. faecalis</i> suşlarının genomik DNA'larının agaroz jel görüntüsü.....	55
Şekil 5.4. <i>E. faecalis</i> suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde oluşturdukları biyofilm miktarlarının spektrofotometrik ölçüm sonuçları.....	56
Şekil 5.5. <i>E. faecalis</i> 74 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapısındaki eDNA miktarları.....	57
Şekil 5.6. <i>E. faecalis</i> 114 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapısındaki eDNA miktarları.....	57
Şekil 5.7. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapısındaki eDNA miktarları.....	58
Şekil 5.8. <i>E. faecalis</i> OG1RF suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapısındaki eDNA miktarları.....	58
Şekil 5.9. <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri.....	60
Şekil 5.10. <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri.....	60
Şekil 5.11. <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri.....	61
Şekil 5.12. <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri.....	62
Şekil 5.13. <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri.....	62

Şekil 5.14. <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri .....	63
Şekil 5.15. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri .....	64
Şekil 5.16. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri .....	65
Şekil 5.17. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri .....	65
Şekil 5.18. <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri .....	66
Şekil 5.19. <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri .....	67
Şekil 5.20. <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri .....	67
Şekil 5.21. <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	68
Şekil 5.22. <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	69
Şekil 5.23. <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	70
Şekil 5.24. <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	71
Şekil 5.25. <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	72
Şekil 5.26. <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	72

Şekil 5.27. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	73
Şekil 5.28. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	74
Şekil 5.29. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	74
Şekil 5.30. <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	75
Şekil 5.31. <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	76
Şekil 5.32. <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	76
Şekil 5.33. <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	77
Şekil 5.34. <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	78
Şekil 5.35. <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	79
Şekil 5.36. <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	80
Şekil 5.37. <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	80
Şekil 5.38. <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	81
Şekil 5.39. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi ..	82



Şekil 5.40. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	83
Şekil 5.41. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	83
Şekil 5.42. <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	84
Şekil 5.43. <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	85
Şekil 5.44. <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi .....	86
Şekil 5.45. Enterokok suşlarına ait gDNA'nın agaroz jel görüntüsü.....	87
Şekil 5.46. <i>E. faecalis</i> suşlarının 24 saatlik biyofilm yapısından izole edilen eDNA'ların PicoGreen ölçüm değerleri .....	88
Şekil 5.47. <i>E. faecalis</i> 74 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları .....	89
Şekil 5.48. <i>E. faecalis</i> 114 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları .....	89
Şekil 5.49. <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları .....	90
Şekil 5.50. <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları .....	90
Şekil 5.51. <i>E. faecalis</i> 74 suşundan izole edilen nükleik asitlerinin, enzim muamelesi sonrası agaroz jel görüntüsü.....	91
Şekil 5.52. 20 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	93

Şekil 5.53. 50 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	94
Şekil 5.54. 100 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	95
Şekil 5.55. 20 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	96
Şekil 5.56. 50 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	97
Şekil 5.57. 100 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	98
Şekil 5.58. 20 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	99
Şekil 5.59. 50 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	100
Şekil 5.60. 100 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	101
Şekil 5.61. 20 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	102

Şekil 5.62. 50 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	103
Şekil 5.63. 100 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	104
Şekil 5.64. 20 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	105
Şekil 5.65. 50 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	106
Şekil 5.66. 100 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 74 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	107
Şekil 5.67. 20 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	108
Şekil 5.68. 50 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	109
Şekil 5.69. 100 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> 114 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	110
Şekil 5.70. 20 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	111

Şekil 5.71. 50 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	112
Şekil 5.72. 100 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	113
Şekil 5.73. 20 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	114
Şekil 5.74. 50 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	115
Şekil 5.75. 100 µg/ml nükleik asit varlığında <i>E. faecalis</i> ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri .....	116

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Tryptic Soy Broth (TSB) ve Agar (Merck, Germany) .....	40
Çizelge 4.2. Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi (PBS) .....	41
Çizelge 4.3. Glukoz Çözeltisi (%5) .....	41
Çizelge 4.4. Kristal Viyole Çözeltisi (%1) .....	41
Çizelge 4.5. TE Çözeltisi (0,5 M) .....	41
Çizelge 4.6. EDTA Stok Çözeltisi (0,5 M) .....	42
Çizelge 4.7. Stok TBE Çözeltisi (5X) .....	42
Çizelge 4.8. Glasiyal Asetik Asit Çözeltisi (%33) .....	42
Çizelge 4.9. Metanol Çözeltisi (%95) .....	42
Çizelge 4.10. SDS Çözeltisi (%10) .....	43
Çizelge 4.11. Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol Çözeltisi .....	43
Çizelge 4.12. Sodyum Klorür-EDTA-Tris (SET) Çözeltisi .....	43

## SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Baz çifti
AMP	Ampisilin
ddH <sub>2</sub> O	Çift distile su
dk.	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dsDNA	Çift zincirli DNA
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
<i>E. faecalis</i>	Enterococcus faecalis
<i>E. faecium</i>	Enterococcus faecium
eDNA	Ekstraselüler DNA
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic asit
EPS	Ekstraselüler polimerik bileşen
EtBr	Etidyum bromür
g	gram
gDNA	Genomik DNA
Gfp	Yeşil floresan proteini
<i>H. influenzae</i>	Hemophilus influenzae
KAN	Kanamisin
kb	Kilobaz
kDa	kilo Dalton
log	logaritma
M	molarite

mm	milimetre
ml	mililitre
ng	nanogram
NK	Negatif kontrol
NLX	Nalidiksik asit
nm	nanometre
NucB	Nükleaz B
°C	Santigrat derece
OD	Optik densite
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PK	Pozitif kontrol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
QS	Quorum sensing
RFU	Bağıl floresan birimi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SET	Sodyum Klorür-EDTA-Tris
sn.	Saniye
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
TET	Tetrasiklin
TSB	Tryptic soy broth
U	Unit
UV	Ultraviyole

## 1. GİRİŞ

Dünya üzerindeki canlılığın başlangıcı olan mikroorganizmaların yaşam için sayısız yararı olsa da insanların ve hayvanların ağır enfeksiyonlar geçirmesine neden olan patojen formları da bulunmaktadır. Antonie van Leeuwenhoek'un 1600'lü yıllarda kendi icat ettiği mikroskopuyla mikroorganizmaları keşfetmesinden bugüne, gözle görülemeyen canlılar insanlar tarafından merak konusu olmuştur. Mikrobiyoloji bilimindeki 1880'den 1900'lü yılların başına kadar yapılan araştırmalar, mikroorganizmaları saf olarak elde etme ve onları tanımlama üzerine yoğunlaşmıştı (1). İlk kez Zobell vd. (1943) yayınladıkları bir makalede mikroorganizmaların abiyotik ve biyotik yüzeylere tutunabildiğini, hatta bir besin ortamındaki tutunmuş hücrelerin planktonik hücrelerden daha fazla olabileceğini belirtmişlerdir. Aynı makalede ayrıca, bu tutunmanın ortamdaki besin miktarıyla bağlantılı olabileceğinden ve tutunmayı sağlayan "çimento" benzeri bir yapının varlığından söz edilmiştir (2). Bu çalışmadan önce, bakterilerin sadece planktonik formlarda yaşamlarını devam ettirdiği düşünülmekteydi. Gelişen teknoloji ve bu konuya bilim insanlarının artan ilgisi sayesinde, yaşamlarını planktonik formdan oldukça farklı formlarda sürdüren mikroorganizma topluluklarının tanımlanması mümkün olmuştur.

Mikroorganizmalar kendi ürettikleri hücre dışı polimerik bileşenlerle (EPS) kendilerine bir ortam oluştururlar ve bu ortama gömülü halde yaşayabilirler. Bu şekilde bakterilerin abiyotik veya biyotik yüzeylere, kendi oluşturdukları polimerik bileşenlerle tutunması sonucu oluşturdukları mikrobiyal topluluklara "biyofilm" denir. Hücre dışı polimerik bileşenler sadece mikroorganizmaların biyotik ve abiyotik yüzeylere tutunarak biyofilm yapılarını olgunlaştırmasında değil, aynı zamanda mikroorganizma topluluğunun besin iletiminde, atık boşaltımında ve biyofilm yapılarının ve dolayısı ile mikroorganizmaların çevreden gelen mekanik ve kimyasal streslere karşı korunmasında da etkin rol oynarlar. Çevresel mekanik ve kimyasal stresler; radyasyon, antibiyotikler, metalik katyonlar, dezenfektanlar ve konak immün sistemi elemanları olabilmektedir. Doğal ortamlarda biyofilm yapıları; uygun şartlarda kendisini yenileyebilen ve büyüeyebilen, EPS matriksinde yüksek oranda genetik materyal ve çeşitli polimerler barındıran, farklı nişlere sahip bakteri türlerinin bir arada yaşayabildiği, yüksek organizasyonlu, yaşadığımız şehirler gibi karmaşık, oldukça farklılaşmış, çok kültürlü bir topluluk gibidirler.



Böylesine organize, dayanıklı ve güçlü bir yapı olan biyofilmler; başta insan, hayvan ve çevre sağlığı olmak üzere çok farklı tıbbi ve endüstriyel alanlarda çok ciddi sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle biyofilm oluşturma yeteneğindeki mikroorganizmalarla mücadelede sürekli yeni yollar aranmakta ve bu mücadelede kullanılacak ajanların çevre ve insan sağlığına olan zararının en düşük düzeye indirilmesine çalışılmaktadır (3).

EPS içerisinde polisakkaritler, lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi polimerler bulunur. EPS’de bulunan polimerler ile biyofilm yapısının yüzeye yapışması, devamlılığı ve fiziksel dayanıklılığı sağlanır. EPS içerisindeki her bir polimer kendi biyokimyasal özgüllüğü neticesinde biyofilm yapısı içerisinde farklı görevlere sahiptir. Son yıllarda yapılan araştırmalarla, Gram negatif ve Gram pozitif birçok bakterinin biyofilm matriksinde “hücre dışı DNA (eDNA)” adı verilen bir polimerin varlığı belirlenmiştir (4). Biyofilm yapısındaki eDNA’nın diğer matriks bileşenleri gibi çeşitli fonksiyonel ve yapısal rolleri olduğu düşünülmektedir. eDNA üzerine yapılan çalışmalarda, bu bileşenin; tutunma, mimari destek gibi yapısal fonksiyonlarının yanı sıra, yatay gen transferi, antibiyotik direnci ve konak immünesine karşı savunma gibi avantajlarının da olduğu kanıtlanmıştır (5,6). eDNA’nın biyofilm matriksi içerisindeki öneminin fark edilmesiyle bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

Gram pozitif, aerobik ya da fakültatif anaerobik, kok morfolojisinde, katalaz negatif olan *Enterococcus* cinsi mikroorganizmalar; bağırsakta, erkek ve dişi genital bölgelerinde, diş üzerinde bulunabilmektedir. Fırsatçı patojen olan enterokoklar; sinir sistemi enfeksiyonları, nozokomiyal enfeksiyonlar, katater bağlantılı enfeksiyonlar, ameliyat yara enfeksiyonlarının etkenlerindedir. Enterokoklar yüksek ve düşük sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek basınç içeren ortamlarda yaşayabilme kabiliyetlerine sahip olduklarından, bu bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların kalıcılığı yüksektir (7). Oluşturdukları biyofilm yapısı sayesinde çevresel etmenlerden daha az etkilenen enterokokların, biyofilmlerinde bulunan eDNA’nın yapıya fiziksel ve kimyasal dayanıklılık sağlaması nedeniyle, güncel araştırmalarda biyofilm ile mücadelede eDNA’yı hedef alan yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında, *E. faecalis*’in ürettiği biyofilm yapısında bulunan eDNA’nın miktarının ve rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, literatür verileri ışığında eDNA’nın biyofilm mücadelesinde yeni bir hedef haline gelmesinden dolayı, çalışmamızda farklı inkübasyon

süreleri içerisinde üretilen *E. faecalis* biyofilmlerine uyguladığımız antibiyotikler ve endonükleaz enzimlerinin sebep olduğu eradikasyon düzeyinin tespiti de çalışmamızın bir başka hedefi olarak belirlenmiştir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. *ENTEROCOCCUS* CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Enterokoklar insanların ve hayvanların normal bağırsak florasının bir bileşenidir. Enterokok cinsi hem tekli koklar halinde hem de zincir formunda görülebilen, Gram pozitif, katalaz negatif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerobik bakterilerden oluşur. Enterokoklar, laktik asit bakterileri (LAB) grubuna dahil bir cinstir. 500 milyon yıl önce evrimleştiği tahmin edilen enterokoklar, ilk olarak 1899 yılında Thercelin tarafından bağırsak organizması olarak tanımlanmıştır (8). Sherman ve arkadaşları (1937), streptokok türlerini fekal streptokok (enterokok), süt streptokoku, viridans grubu ve piyojen streptokok olmak üzere dört alt gruba ayırmıştır (9). Biotiplendirme, serotiplendirme ve faj tiplendirme gibi geleneksel yöntemler ile streptokok türlerinden hangilerinin enterokok cinsine ait olduğu araştırılmış (10) ve 1984 yılında DNA hibridizasyon ve 16S rRNA dizilimi de kullanılarak *Streptococcus faecium* ve *Streptococcus faecalis* türlerinin diğer streptokoklardan başka bir cins olarak belirgin derecede farklı olduğu tespit edilmiştir (11). Bu çalışmalar sonucunda, streptokok grubunda bulunan dokuz tür Enterokok grubuna transfer edilmiştir (12).

Enterokok türleri 5-50°C arasındaki sıcaklıklarda yaşayabilirler. Hem *E. faecalis* hem de *E. faecium* 60°C'de 30 dakika süreyle hayatta kalabilme yeteneğindedir. Enterokokların üretilmesinde, %5 koyun kanı eklenmiş Trypticase Soy Broth (TSB) veya Columbia agar kullanılmaktadır. Enterokoklar, geniş bir pH aralığında (4,6-9,9) üreme gösterebilirler ve %40 oranına kadar safra tuzlarını tolere edebilirler. *E. faecalis* %6,5 oranındaki NaCl bulunan ortamlarda çoğalabilir ve pH, tuz, metallere ve kuruma direncine katkıda bulunduğu düşünülen bir katyon homeostazına sahiptir (13).

Enterokok ekolojisi ve epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmalar, *E. faecalis* ve *E. faecium*'un; peynir, balık, sosis, kıyılmış sığır eti ve domuz etinden düzenli olarak izole edildiğini göstermiştir (9,12). Hayvansal kökenli sosisler ve peynirler, enterokok türlerinin kontaminasyonu için en yüksek risk grubunu oluşturan gıdalardır. Birleşik Krallıkta gerçekleştirilen bir çalışmada, kentsel atıklardan ve tarım alanlarında domuz gübresi ile elde edilen mahsullerden alınan örneklerin çok yüksek oranda enterokok türleri içerdiği saptanmıştır. Ancak, hayvansal gübrelerin uygulanmadığı bitkilerde enterokok türlerinin görülme sıklığının, bu oranın çok altında olduğu (%33) belirlenmiştir (14).

Enterokokların neden olduğu önemli klinik enfeksiyonlar; üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, bakteriyel endokardit, divertikülit ve menenjitlerdir. En sık enfeksiyona neden olan türleri: *E. faecalis* (%90-95) ve *E. faecium* (%5-10)'dir. Nadiren de olsa *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* ve *E. raffinosus* gibi türler de bağırsak enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (15). Tıbbi açıdan bakıldığında, bu cinsin önemli bir özelliği, antibiyotik direncinin yüksek seviyede olmasıdır. Birçok enterokok türü penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler gibi  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere ve aminoglikozit grubu birçok antibiyotiğe karşı oldukça dirençli bulunmuştur (16).

Enterokokların en önemli virulans faktörlerinden biri yüzeye yapışmasını sağlayan ekstraselüler yüzey proteindir (Esp). Esp, Shankar ve arkadaşları (17) tarafından Enterokok türlerinde ilk tanımlanan hücre duvarına bağlı proteindir. *esp* geni 5622 bp'den oluşur ve enfeksiyon kaynaklı izolatlarda yüksek sıklıkta bulunmaktadır. Yüzeye yapışma, kolonileşme, mikroorganizmanın immün cevaptan etkilenmemesi gibi fonksiyonlar yanında, antibiyotik direncinde de rol oynadığı düşünülmektedir (12). Esp ayrıca çevresel streslere karşı direnci ve üriner sistemde ökaryotik hücrelere yapışmayı sağlayarak, biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadır (12). Bu konuda yürütülen çalışmalar, *esp* geninin susturulmasının *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma kabiliyetini olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. *esp*-negatif *E. faecalis* suşlarının, *esp* genini plazmit transferi ile aldıktan sonra biyofilm üretebildiği kanıtlanmıştır (18). *E. faecium* izole edilen 28 klinik izolattan 21'inde, *esp* geni için spesifik diziler bulunduğu ve bu özelliğin patojenite ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. *esp* genini taşıyan *E. faecium* suşlarının, bu gene sahip olmayan suşlardan daha yüksek konjugasyon sıklığına sahip olduğu ve aynı zamanda ampisilin, siprofloksasin ve imipenem gibi antibiyotiklere karşı daha yüksek düzeyde direnç gösterdiği saptanmıştır (19).

Enterokoklar genel olarak bağırsak kökenli bakteriler olsa da gıda endüstrisinde birçok fermente gıdanın "starter" ve koruyucu kültürünün bileşeni olarak kullanılabilen, bakteriyosin üretimi özelliği ile patojen mikroorganizmalarda mücadelede rol alabilmekte ve bazı süt ürünlerine çeşitli aromalar kazandırmak amacı ile eklenebilmektedir. Gıda endüstrisinde bu bakterilerin kullanımı, özellikle *E. faecalis*'in yüksek patojenitesi nedeniyle, hala tartışma konusudur. Enterokoklar, gıda tesislerinde bulunan fermantasyon tankları, ürün aktarma boruları ve üretimdeki ham maddelerin depolandığı soğuk alanlar dahil, hemen hemen birçok yüzeyde ve koşulda biyofilm oluşturabilmektedir.

Enterokok türlerinin sınıflandırılmasına ve tanımlanmasına yönelik bir dizi çalışma son yıllarda gerçekleştirilse de (9,10,12), enterokok türlerini diğer LAB türlerinden, özellikle de D grubu antijeni ifade eden streptokoklardan ayırt etmek nispeten zordur. *E. faecium* ve *E. faecalis*'in türler arası tanımlaması yeni nesil genetik analizler sonucunda güvenli bir şekilde yapılabilmektedir (9).

Enterokok türlerinin tanısı ve tiplmesi klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. Çünkü, uzun yıllar insanlarda patojen olmayan mikrofloranın bir parçası olduğu düşünülen bazı enterokokların (8) son zamanlarda en sık görülen nazokomiyal patojenlerden biri olduğu ve yol açtıkları enfeksiyonlarda ölüm oranının %61'e ulaştığı belirlenmiştir (20). Enterokok türlerinin patojenitesini daha iyi anlamak ve mücadele etmek için her türe ait stres direncinin, virulans özelliklerinin ve özellikle antibiyotik dirençliliğinin daha iyi anlaşılması ve bu konuda ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

## 2.2. BİYOFİLMİN TANIMI

Claude E. Zobell, 1943 yılında planktonik formdaki bakteriler üzerinde yaptığı bir araştırma sırasında, besin ortamında bulunan mikroorganizmaların bir kısmının yüzeye tutunmuş halde olduğunu, hatta yüzeye tutunmuş mikroorganizmaların sayıca daha fazla olduğunu belirlemiştir (2). Bu çalışmadan 30 yıl sonra Characklis, endüstriyel su sistemleri üzerinde yaptığı araştırmada, yüzeye sıkıca tutunmuş mikroorganizmaların bir topluluk oluşturduğunu ve bu topluluktaki mikroorganizmaların klora karşı çok güçlü bir direnç gösterdiğini tanımlamıştır (21). Günümüzde biyofilmin en genel tanımı; “mikroorganizmaların kendi ürettikleri EPS aracılığıyla katı yüzeylere geri dönüşümsüz olarak bağlanarak ve planktonik formlardan fizyolojik ve genetik regülasyon özellikleri bakımından farklılaşarak oluşturdukları, çok hücreli benzeri topluluklar”, olarak yapılmaktadır. Biyofilm yapısı içerisinde bulunan mikroorganizmalar EPS sayesinde; antibiyotiklere, mikrobiyal ajanlara, metalik katyonlara, UV ışınlarına ve konak sistem immün yanıtına karşı kendilerini koruyabilmektedirler (22).

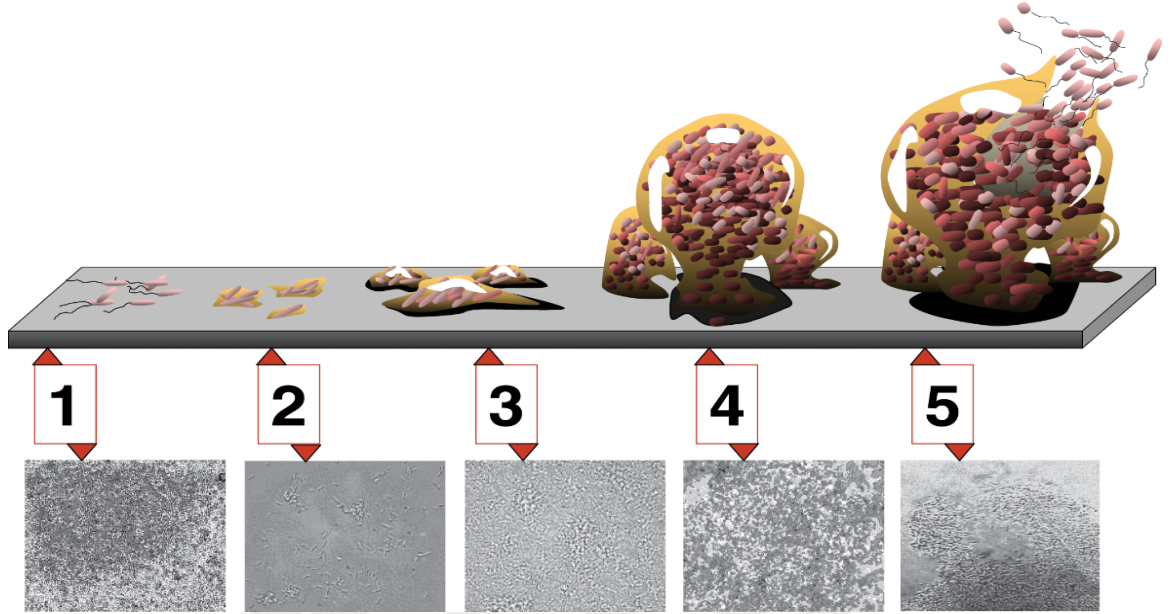
Biyofilm yapıları, yüzeye ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Örneğin; içme suyu sistemlerinde oluşan biyofilmler oldukça karmaşık yapıya sahip olup, filamentöz bakteriler ve temiz su diatomları içerirler. Bu biyofilm yapısı, bulunduğu sistemin korozyonuna sebep olur (23). Bununla birlikte medikal ürünler üzerinde oluşan biyofilmler

ise, bir ya da birden fazla bakteri grubunun EPS ile yüzeye tutunmasıyla oluşur ve çeşitli durumlarda, konak organizma için patojen olabilirler. Günümüzde de uygulanan dezenfeksiyon işlemleri, biyofilm yapıları için işlevsel olmamaktadır. Çünkü uygulanan mevcut yöntemler, çoğunlukla bakterilerin planktonik formları esas alınarak geliştirilmekte, aynı bakterilerin biyofilm yapılarından kaynaklanan davranış farklılıkları dikkate alınmamaktadır. Bu sebeple bu prosedürler genellikle başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (24). Biyofilm yapıları ile mücadelede bu başarısızlıkları önlemek amacıyla son zamanlarda odaklanılan noktalardan biri de kullanılacak mikrobiyal ajanların seçimi ve uygun kullanım konsantrasyonlarının belirlenmesidir.

### **2.3. BİYOFİLMİN OLUŞUM AŞAMALARI**

Mikroorganizmalar normal şartlarda, planktonik form adı verilen serbest halde, herhangi bir yüzeye bağlı olmadan yaşarlar. Planktonik formda yaşayan çoğu mikroorganizma çevresel streslerden kolaylıkla etkilenebilir. Ancak, yaşamsal faaliyetlerini kısıtlayan oksijen ve besin eksikliği, radyasyon ışınları ve sıcaklık değişimleri gibi stres koşullarından kendilerini koruyabilmek ve yaşamlarını devam ettirebilmek amacıyla biyofilm yapısı oluşturma yoluna gidebilirler. Biyofilm yapısının oluşabilmesi için koşullar elverişli olduğunda, bakteriler yüzeylere ve birbirlerine tutunarak biyofilm yapısını oluşturmaya başlarlar (3). Biyofilm yapısının oluşması ve devamlılığı birbirini izleyen dört ana aşamada incelenebilir. Bu aşamalar;

1) Mikrobiyal tutunma, 2) Bakteri hücrelerinin EPS üreterek yüzeye bağlanması, 3) Koloni oluşturma ve biyofilm yapısının olgunlaşması ve 4) Olgun biyofilmdeki hücrelerin göçü (dağılma) basamaklarından oluşmaktadır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Biyofilm oluşum basamakları (25)

1) Mikrobiyal tutunma, 2) Yüzeye bağlanma, 3 ve 4) Koloni oluşturma ve olgunlaşma, 5) Dağılma.

### 2.3.1. MİKROBİYAL TUTUNMA

Biyofilm yapısını oluşturan mikroorganizmaların abiyotik veya biyotik yüzeylerle olan etkileşimleri, geri dönüşümlü tutunma ve geri dönüşümsüz tutunma olarak iki farklı aşamada gerçekleşir.

#### 2.3.1.1. Geri Dönüşümlü Tutunma

Mikroorganizmaların biyotik veya abiyotik yüzeylerle zayıf etkileşimler kurarak oluşturdukları tutunmaya geri dönüşümlü tutunma adı verilir. Hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimleri bu aşamada rol oynar (26). Zayıf etkileşimler ile bakteriler ve yüzey arasında kurulan bağlar çok kolay bozulabilmektedir. Geri dönüşümlü tutunma ile yüzeye bağlanan mikroorganizmaların kalıcı bir yapı kurmaları söz konusu değildir (27).

### **2.3.1.2. Geri Dönüşümsüz Tutunma**

Mikroorganizmalar biyofilm yapısı oluşturmadan, temas ettikleri yüzeye geri dönüşümlü tutunmalar yaparak, yaşamlarını devam ettirebilecekleri besin kaynaklarının varlığını araştırırlar. Yüzeydeki besin miktarı ve çevresel şartlar yaşamlarını devam ettirmeye uygun olduğunda geri dönüşümlü tutunmadaki zayıf etkileşimlerin yerine, iyonik ve kovalent bağlar gibi güçlü bağlarla yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunurlar. Geri dönüşümsüz tutunmalarda yukarıda sözü edilen etkileşimlere ek olarak bakterilerin flagella ve pili gibi hücre yüzey uzantıları da rol oynamaktadır. Ayrıca mikroorganizmaların EPS üretimleri sonucunda da bu aşama güçlendirilir (28).

### **2.3.2. BAKTERİ HÜCRELERİNİN EPS ÜRETEREK YÜZEYE BAĞLANMASI**

Biyofilm içerisinde bulunan mikroorganizmalar, kendi ürettikleri EPS ile hem yüzeye tutunurlar hem de bu EPS içerisinde kalarak çevresel streslerden kendilerini korurlar (29). EPS matriksi içerisinde; polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler ve lipitler bulunmaktadır. EPS, içinde bu dört polimerin farklı biyolojik formları bulunabilir. Biyofilm içerisinde bulunan mikroorganizmalara göre biyofilm yapısının EPS'inde bulunan polimerlerin oranı ve çeşitleri değişiklik gösterebilir (30). Doğada kendi başına oluşabilen ve sürekli yenilenen bu sistem, çok hücreli organizasyonların ilkel bir modeli gibidir. Biyofilmlerdeki hücreler arasında yer alan su kanalları, besinlerin ve atıkların biyofilm yapısı içerisindeki yolculuğu için memeli kan dolaşım sistemi gibi görev yapar. Lize olmuş bakteri hücrelerinden salınmış genetik materyaller yatay gen transferi için kaynak oluştururken, bu hücrelerin atıkları da EPS içerisinde bulunan hücre dışı enzimler aracılığıyla geri dönüştürülür ve biyofilm hücreleri tarafından kullanılabilir (31).

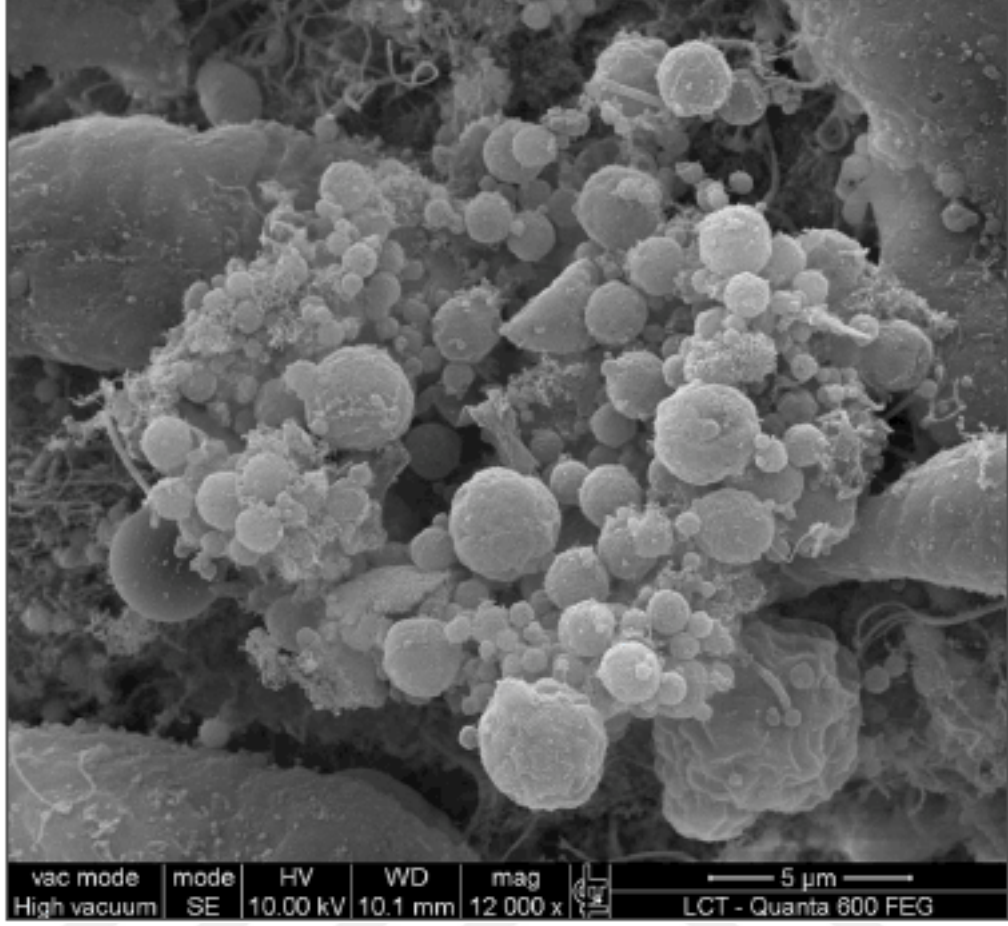
Biyofilm yapısında yapı taşlarından biri olan EPS'nin kendisi de belirli durumlarda yapısında bulunan mikroorganizmalar için besin haline gelebilir. Biyofilm sistemi çevresel faktörlerden korunmak için oluşturulmuş bir yapı olmasına karşın, doğada biyofilmin kendisi de zaman zaman su miktarının azalması sebebiyle kuruma, oksitlenme ve besin kıtlığı gibi çeşitli çevresel streslerle karşı karşıya kalabilmektedir (32).

### **2.3.3. KOLONİ OLUŞUMU VE BİYOFİLM YAPISININ OLGUNLAŞMASI**

Yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş ve EPS üreterek biyofilm yapısının oluşmasını başlatmış mikroorganizmalar, yüzeyde mikrokoloniler oluşturmaya başlarlar. EPS'de



bulunan polimerlerin organizasyonu, biyofilmdeki mikroorganizmaların üremesi ve oluşacak mikrokolonilerin sayısını etkiler. Besinler ve oksijen, EPS içerisindeki kılcal yollarda suda çözülmüş formda dolaşır. Mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetleri sonucunda oluşan atıklar da bu kılcal yollara verilir. EPS içerisindeki organizasyon düzenliyse, mikrokolonilerin ihtiyaç duyduğu besin ve oksijenin bakteri hücrelerine iletimi kolaylıkla yapılır ve bu sayede mikroorganizmaların sayısı giderek artar ve dolayısıyla biyofilm yapısı büyür. EPS içerisinde mikroorganizmaların yaşamaları için gerekli düzen kılcal kanallar aracılığı ile sağlanır (33). Kılcal yollar içerisindeki dolaşım pasif difüzyon ile sağlanırken, dışarıdan besin maddelerinin alımı kolaylaştırılmış difüzyon ile gerçekleştirilir. Ancak difüzyonun belirli limitlerinin olması nedeniyle, olgun biyofilm yapılarında alt katmanlarda besin ve oksijen alışverişi oldukça azdır. Bu durum alt katmanda bulunan bakterilerin metabolizma hızını etkiler. Metabolizma hızının düşmesi hücre dışı polisakkaritlerin üretimini azaltır ve hücreler alt tabakadan üst tabakaya doğru göç etme eğilimi göstermeye başlar. Mikrokolonilerin bu göç eğilimi, biyofilm yapısında mikroskobik mantar formuna benzer yapılar oluşmasına yol açar (34) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Koloni oluşumu ve biyofilmin olgunlaşması (35)

#### 2.3.4. OLGUNLAŞAN BİYOFİLMDEKİ HÜCRELERİN GÖÇÜ (DAĞILMA)

Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar farklı bölgelerde yeniden koloni oluşturabilmek için yapıdan koparak ayrılabilirler. Hücrelerin biyofilmden göçü farklı mekanizmalarla kontrol edilir. Göçlerin sebepleri dış etkenlere bağlı olabileceği gibi, iç enzimatik bozulmalar ve yüzeye bağlanmayı sağlayan proteinlerin yapısında meydana gelen bozulmalara da bağlı olabilir (26). Bu kopmalar biyofilm yapısının sürekli olarak yenilenmesini sağlarken, hücrelerin farklı yüzeylerde yeniden biyofilm yapısı oluşturmasına da yol açacağından, biyofilm mücadelesinde istenmeyen sonuçlara da neden olabilir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Biyofilm yapısından hücrelerin göçü (29)

## 2.4. BİYOFİLM MATRİKSİ VE ELEMANLARI

Biyofilm yapısında mikroorganizmalar yaklaşık %20'lik bir kütleyi oluştururken, biyofilm matriksi yapının toplam ağırlığının %80'ini oluşturur. Biyofilm içerisinde bakteriler EPS ile çevrelenmişlerdir ve bu matriks hücrelere yaşayacakları bir ortam sağlar. Hücre dışı materyallerden oluşan matriks yapısı çoğunlukla mikroorganizmalar tarafından sentezlenir. Hücreler tarafından salgılanan bu matriksin en temel görevi, biyofilm içerisinde bakteri hücrelerinin immobilizasyonunun sağlanması ve hücrelerin birbirine yakınlaştırılmasıdır. EPS içerisinde bulunan polimerleri beş ana başlık altında incelemek mümkündür: 1) Polisakkaritler, 2) Proteinler, 3) Sürfaktanlar ve lipidler, 4) Su, 5) Hücre dışı DNA (eDNA).

### 2.4.1. POLİSAKKARİTLER

Hücre dışı polisakkaritler, biyofilm yapısının oluşumu için oldukça önemlidir. Hücre dışı polisakkaritlerin biyofilmlerdeki öneminin araştırıldığı bir çalışmada; polisakkarit sentezi susturulmuş mutant suşlarda bir yüzeye tutunarak mikro-koloni oluşumu başlasa bile, olgun bir biyofilm yapısının meydana gelmesinin engellendiği tespit edilmiştir (35). Biyofilm matriksinde bulunan hücre dışı polisakkaritler çok çeşitlilik gösterir. Hatta tek bir türün farklı suşlarının oluşturduğu biyofilm yapılarının arasında bile farklılık gösterebilirler (29).

## 2.4.2. PROTEİNLER

Biyofilm matriksinde oldukça fazla miktarda hücre dışına salınmış protein bulunur. Bu proteinlerin bir kısmı hücre dışındaki besinlerin hidrolizinden sorumlu enzimler iken, büyük bir çoğunluğu ise yapısal iskelette görev alan proteinlerdir.

### 2.4.2.1. Enzimler

Biyofilm matriksi içerisinde, çok çeşitli hücre dışı enzimler olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerin substratları; matrikste bulunan polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitler ve benzeri suda çözünebilir polimerler olabildiği gibi, selüloz, kitin ve lipitler gibi suda çözünmeyen polimerler de olabilir. Biyofilm yapısında besinsel kıtlık başladığı zamanlarda, enzimlerin EPS bileşenlerini de parçalayarak biyofilmdeki mikroorganizmalara besin olarak sunduğu saptanmıştır (36). EPS bileşenlerini parçalayan enzimler, matrikste bulunan polimerleri düşük molekül ağırlıklı ürünlere çeviren sindirim sistemi gibi çalışır ve bu ürünlerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmasını sağlar. Matrikste bulunan enzimler ayrıca göç olaylarını da kontrol eder. Çevresel stresler veya açlık gibi nedenlerle yapıdan bakterilerin ayrılması indüklenir ve matrikse salgılanmış enzimler sayesinde hücreler yapıdan koparılır. Hücrelerin kopmasına neden olan enzimlerden biri periodontal patojen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tarafından üretilen N-acetyl- $\beta$ -heksosaminidaz (dspB)'dir. *dspB* mutant hücrelerin oluşturduğu biyofilmlerde bu göç gözlenmemektedir (37).

Biyofilm matriksinde bulunan enzimlerin görevlerini, sadece organik maddelerin hidrolizi ya da hücrelerin yapıdan kopup göç etmesini sağlamakla sınırlandırmak doğru olmaz. Bazı enzimler, özellikle de patojen mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerde, biyofilm yapısına karşı uygulanan antimikrobiyallerin etkisini azaltıp mevcut dezenfektanlara karşı yapının dirençliliğini artırmada rol oynar (38).

### 2.4.2.2. Yapısal Proteinler

Matrikste bulunan, enzim özelliği taşımayan hücre-yüzey ilişkili ve bazıları da hücre dışı karbonhidrat bağlayıcı olan proteinler; yüzey ve EPS arasında bağlantı sağlamasının yanı sıra, biyofilm yapısının polisakkarit-matriks ağının stabilizasyonundan da sorumludur. Yapısal proteinler ardışık tekrar bölgeleri içeren amino asit dizilerine sahiptirler ve biyofilm

yapısının teşkilinin yanı sıra, bakteriyel enfeksiyon süreçlerinde de önemli rollere sahip oldukları belirlenmiştir (29).

### **2.4.3. SÜRFİKTANLAR VE LİPİTLER**

Biyofilm matriksinde bulunan lipitler, biyofilm yapısının yüzeye tutunmasına katkı sağladığı gibi, biyokimyasal yapılarından dolayı antimikrobiyal ajanların etkisini azaltarak yapının korunmasını da sağlar (39).

Bir diğer EPS elemanı olan sürfaktanlar ise hidrofobik bileşiklerdir. *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm matriksinde bir çeşit sürfaktan olan ramnolipidler bulunmaktadır. Ramnolipidlerin biyofilm oluşumunda oldukça önemli görevlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Mikrobiyal tutunma sırasında üst üste sıralanan bakteri hücrelerinin sayısı arttıkça en alt tabakadaki hücrelerin besin, oksijen gibi temel ihtiyaçlara olan erişimleri azalır. Aynı zamanda hücrelerin yığılması alt tabakada bulunan hücrelerin hareketliliğini kısıtlar. Ramnolipidler alt tabakadaki hücrelerin yüzeye olan bağlantılarının kopmadan hareket etmelerine olanak sağlar. Ayrıca alt tabakadaki hücrelerin besin ve oksijen ihtiyaçları için kanallar açar (40).

### **2.4.4. SU**

Marshall ve arkadaşları (41), biyofilm yapısını “katı su” olarak tanımlamışlardır (41). Çünkü, EPS matriksinin yapısında oldukça fazla miktarda su bulunur ve su diğer komponentlere ortam sağlamasının yanı sıra, bakterilerin yaşaması için uygun pH ve nemliliği sağlar, organik ve inorganik maddelerin çözünmesi için bir ortam oluşturur, biyofilm yapısının çevreye göre daha yavaş kurumasına yardım eder ve biyofilm hücrelerine tampon görevi görür.

### **2.4.5. HÜCRE DIŞI DNA (EDNA)**

Bakteri hücreleri biyofilm mikro-kolonilerinde otolize olmaktadır. Bu durum hücrelerin genomik DNA parçalarının biyofilm matriksine dağılmasına neden olur. Matrikse bırakılan bu eDNA parçaları biyofilm yapısı içerisinde diğer bileşenler gibi yapısal ve fonksiyonel görevlere sahip, oldukça önemli bir bileşen haline gelmiştir.

eDNA bakterilerden, quorum-sensing (QS, Yeter Sayı Algılama) mekanizmaları ile salınır. QS mekanizmaları profajların üretimini, hücre lizisinde yer alan proteinlerin salınmasını ve

bu yolla da büyük miktarlarda eDNA'nın salımını kontrol eder (42). eDNA biyofilm matriksinde yer alan polisakkaritlere, proteinlere ve fenazin gibi metabolitlere bağlanabilir ve böylece EPS yapısının yapısal direncini arttırabilir. Biyofilm yapısının stabilizasyonunda önemli bir rol oynamasının yanı sıra, eDNA'nın bakteri hücrelerini fiziksel ve kimyasal değişimlere karşı koruduğu da bilinmektedir (43).

#### **2.4.5.1. eDNA'nın Kökeni**

*P. aeruginosa* biyofilmlerinde eDNA'nın miktar olarak proteinlerden altı kat, karbonhidratlardan on sekiz kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Özetle eDNA EPS yapısında oldukça fazla bulunan bir matriks elemanıdır (44). Bilim insanları uzun bir süre eDNA'nın genomik DNA'dan mı yoksa plazmit DNA'sından mı köken aldığını tartışmıştır. eDNA'nın kaynağı ile ilgili akla gelen bir diğer ihtimal ise, eDNA'nın hücreler tarafından özel olarak sentezlenen bir polimer olduğu yönünde olmuştur. Ancak eDNA'nın genomik DNA (gDNA) ile benzerlik gösterdiği belirlendikten sonra bu olasılık göz ardı edilmiştir (4,45).

Steinberger ve Holden'in çalışmasında (2005) *P. aeruginosa* biyofilmlerinde yapılan "Rastgele Polimorfik DNA Amplifikasyon" (RAPD) denemeleri, eDNA'nın gDNA ile özdeş olduğunu kanıtlar nitelikte olmuştur (4).

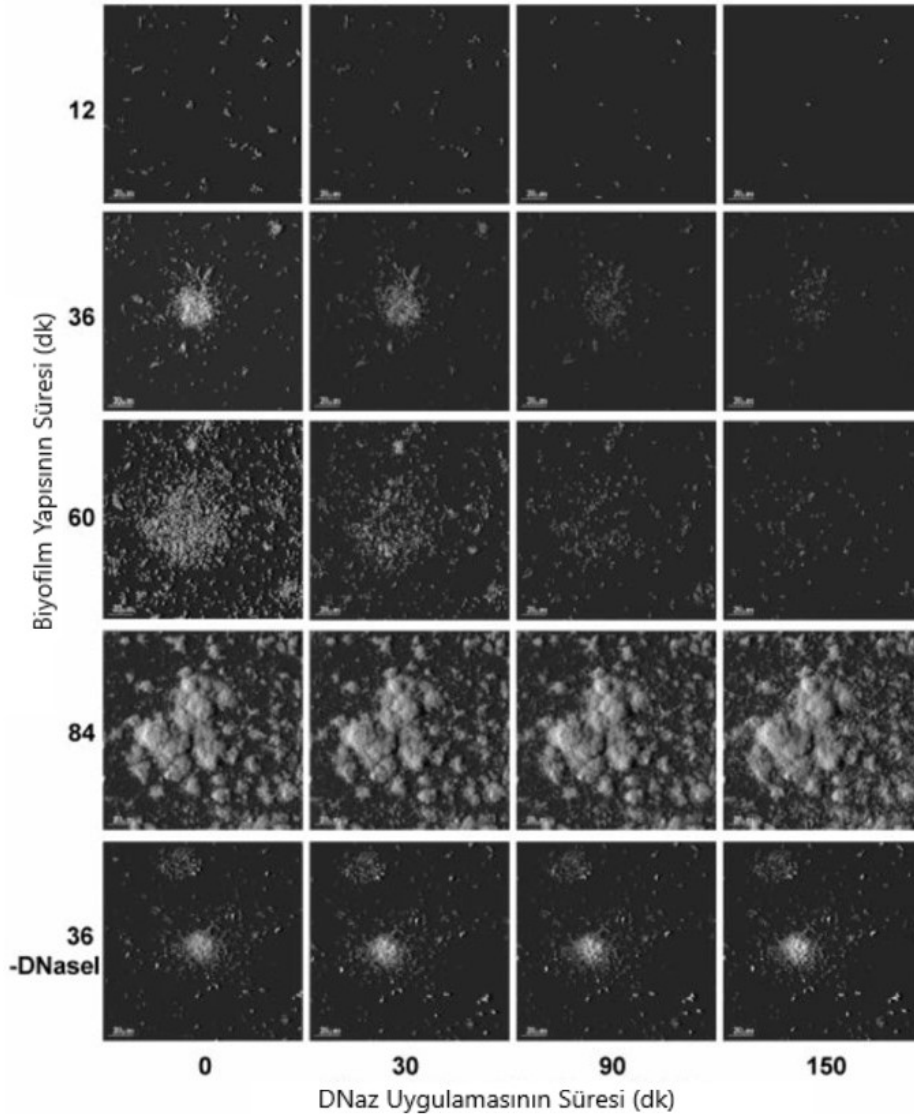
Bir başka araştırma grubu tarafından yine *P. aeruginosa*'da yürütülen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Southern lekeleme esaslı analizleri sonucunda, eDNA ve gDNA arasındaki benzerlik bir kez daha gösterilmiştir (46). *Listeria monocytogens* ile yürütülen çalışmalarda da, incelenen eDNA'nın kromozomal kökenli olduğu kanıtlanmıştır (47).

Özetle, farklı araştırmacılar tarafından, farklı bakteri biyofilmleri ile yürütülen çalışmalar, eDNA'nın gDNA kökenli olduğunu açıkça ortaya koymuştur.

#### **2.4.5.2. eDNA'nın Keşfi**

Hücre dışı DNA'nın biyofilm matriksindeki varlığı, Whitchurch ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir (48). Biyofilm araştırmalarında sıklıkla kullanılan model organizma *P. aeruginosa*'nın biyofilmleri yeşil floresan boya ile boyanmış, ardından üzerine deoksiribonükleaz (DNaz) I eklenmiş ve eklenmemiş örnekler floresan ışık altında karşılaştırılmıştır. DNaz I enziminin uygulanması sonucunda, biyofilm yapısının zayıfladığı ve kırılğan bir hale geldiği gösterilmiştir. Ardından, deoksiribonükleazların biyofilm yapısına olan etkisinin biyofilm oluşumunun hangi aşamasında en yüksek düzeye

ulaştığını belirlemek amacıyla 12, 36, 60 ve 84 saat inkübasyona bırakılan örneklere farklı zamanlarda eklenmiş DNaz I enziminin etkileri incelenmiştir. Sonuçta 12, 36 ve 60 saatlik inkübasyona bırakılmış örneklere belirli aralıklarla eklenmiş DNaz I sayesinde biyofilm yapısı zayıflatılmış ancak 84 saatlik olgun biyofilmde DNaz I uygulamasının neredeyse hiç etki göstermediği belirlenmiştir (Şekil 2.4.). Bu çalışmanın sonucunda, biyofilm yapısındaki eDNA'nın fonksiyonel ve yapısal özellikleri araştırmacılar tarafından merak edilmeye başlanmış ve eDNA bakteriyel biyofilmler için güncel araştırma konularından biri haline gelmiştir.



Şekil 2.4. Biyofilm yapısına DNaz I enziminin etkileri (48)

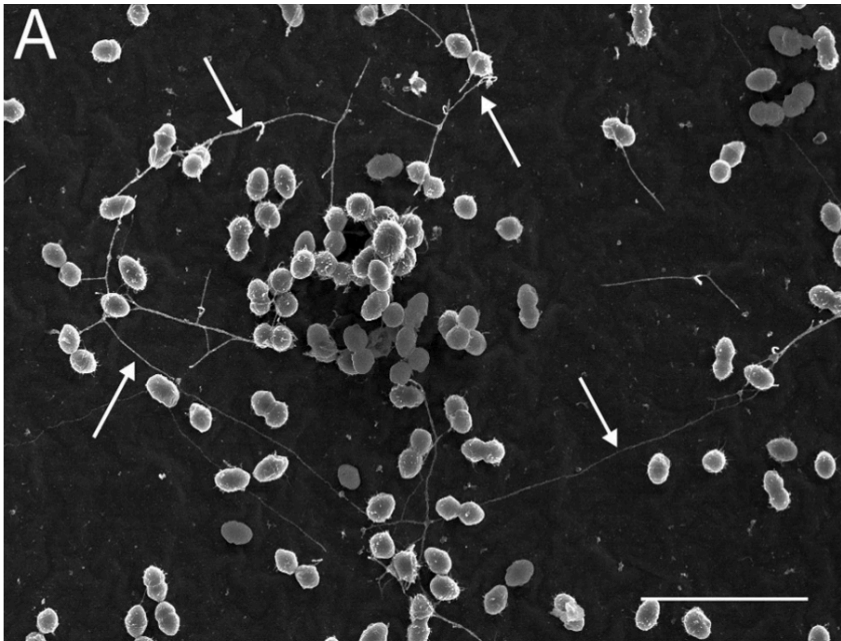
#### 2.4.5.3. *Enterococcus* Cinsi Bakterilerde eDNA Salımı

eDNA salımı; hücre lizisi, quorum sensing sinyalleri ve hücre vezikülleri gibi farklı yollarla gerçekleşebilmektedir. Bu mekanizmaların hangisinin eDNA salımında baskın rol oynadığı

henüz bilinmemektedir. Ayrıca, eDNA salım mekanizmalarının hemen hemen her bakteri türünde farklı olduğu da tespit edilmiştir (49).

Thomas ve arkadaşları (50,51), *E. faecalis*'te GelE (liziz faktörü) ve SprE (GelE bağışıklık faktörü) olarak adlandırılan iki farklı proteaz arasındaki dengenin; hücre duvarının hidrolizini, eDNA'nın serbest bırakılmasını ve biyofilm oluşumunun indüksiyonunu önemli ölçüde etkilediğini belirlemiştir. Bu çalışmada GelE ve SprE proteazlarının salımının artmasıyla eDNA salımının dolaylı olarak arttığı kanıtlanmıştır. Hücre lizisini ve ölümünü kontrol eden spesifik mekanizmalar biyofilm gelişiminde önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca, *E. faecalis* cinsi bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerde, hücre popülasyonunun sadece bir kısmının eDNA ürettiği ve QS-bağımlı mekanizmalara benzer yollarla eDNA salımının gerçekleştiği saptanmıştır. *E. faecalis*'te eDNA salımının otoliz yolu ile düzenlenmesi de alternatif bir mekanizma olarak tanımlanmıştır.

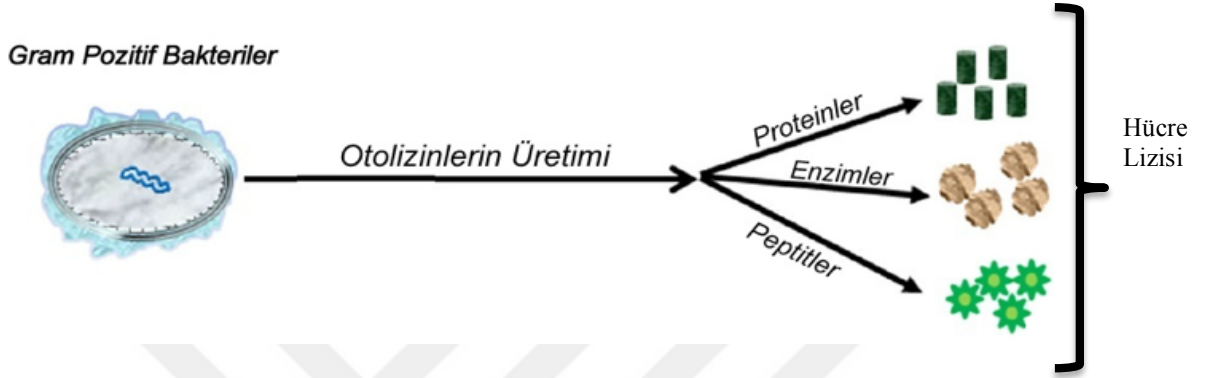
Barnes ve arkadaşları (52), *E. faecalis* OG1RF'nin erken aşama biyofilmleri ile çalışarak, eDNA'nın salımının çok erken aşamalarda gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu bakteride dört saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde hücreler arası uzun filamentöz yapılar tespit edilmiştir. 10-100 nm uzunluğunda olan iplikçiklerin "anti-dsDNA monoklonal antikor-kolloidal altın prob" ile işaretlemesi sayesinde bu iplikçiklerin eDNA olduğunu kanıtlamışlardır (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Biyofilm hücreleri arasındaki filamentöz yapılar (52)



Yapılan mikroskobik incelemelerde filamentöz yapıların yoğunlaştığı bölgelerde lize olmuş hücelere rastlanmamasından ve genç biyofilmlerde hücre lizisinin minimum seviyede olacağı öngörüsünden hareketle, eDNA'nın lizis kaynaklı olmadığını ileri sürmüşlerdir. Bu bulgulara rağmen, literatürde yer alan birçok araştırmada, *Enterococcus* cinsinin de arasında bulunduğu Gram pozitif bakterilerden eDNA salımının, QS-bağımlı otolizinler aracılığıyla hücrelerin lize olması sonucunda gerçekleştiği belirtilmektedir (50,53,54).



Şekil 2.6. Gram pozitif bakterilerde hücre lizisi (54)

Örneğin; AtlE, hücre duvarı yüzeyinde bulunan ve hücre lizisinde görev alan, *atlE* geninden kodlanan bir otolizin faktörüdür. Qin ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan bir çalışmada *atlE* geninin susturulmasıyla, hücre lizisinden kaynaklı eDNA salımında %90 oranında azalmanın meydana geldiği saptanmıştır (53). Tüm bu bulgular, eDNA salım mekanizmasının enterokoklarda halen tartışmalı olduğuna işaret etmektedir.

#### 2.4.5.4. eDNA'nın Yapısal Rolü

Biyofilm yapılarında eDNA'nın varlığının yapısal stabilizasyon sağladığı kabul görmüş bir gerçektir. Daha önce de belirttiğimiz gibi Whitchurch ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan öncü çalışmada, biyofilm yapılarına DNaz I uygulaması yapılmış ve 60 saatlik inkübasyon sonucunda bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm yapısının DNaz I uygulamasıyla parçalandığı belirlenmiştir. 84 saatlik inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm yapılarında ise, DNaz I uygulamasıyla söz konusu parçalanmanın daha az olduğu, biyofilm yapısının enzime daha fazla direnç gösterdiği gözlenmiştir. Bu durum karşısında olgun biyofilm yapılarının eDNA'dan farklı bir polimer aracılığıyla kuvvetlendirilmiş olabileceği ya da DNaz I'i bölgesel olarak inaktive eden proteolitik hücre enzimlerinin bu aşamada üretiminin indükleniyor olabileceği öngörülmüştür (48).

Biyofilm yapısının, canlı hücreleri boyamayan yeşil floresan proteinlerle (Gfp) işaretlenmiş *P. aeruginosa* hücreleri kullanılarak yapılan Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop analizlerinde, eDNA'nın "sap benzeri" denilen bölgede diğer bölgelerden çok yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu belirlenmiştir (55). Sonuç olarak biyofilmde eDNA'nın farklı bölgelerde farklı yoğunluklarda olduğu görülmüş ve yapısal olarak önemi çeşitli yollarla açığa kavuşturulmaya çalışılmış olsa da biyofilm yapısı içerisindeki yapısal görevlerini nasıl gerçekleştirdiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

#### **2.4.5.5. eDNA'nın Fonksiyonel Rolü**

eDNA'nın bakteriyel biyofilm matriksindeki varlığının keşfinden sonra, bu matriks bileşeni hakkında bilinenler günden güne artmış ve fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi birçok araştırmaya konu olmuştur. Bugün matriks içerisinde bulunan eDNA'ların yapısal stabiliteyi arttırmak, hücre ve yüzey arasındaki bağlantıyı sağlamak gibi yapısal rollerinin yanı sıra; yatay gen transferinde, QS mekanizmalarında, antibiyotik dirençliliğinde ve konak immün sistemine karşı dayanıklılık sağlamada rol aldığını bilmekteyiz.

##### **2.4.5.5.1. Yatay Gen Transferinde eDNA'nın Rolü**

Pnömonokok hücrelerinin birbirlerinin virulans özelliklerini arttırmak amacıyla yatay gen transferi yapabildikleri, 1928 yılında ilk kez Griffith (56) tarafından laboratuvar koşullarında belirlenmiştir. Bakteri genomunun önemli bir kısmının başka bakterilerden yatay gen transferi mekanizmalarıyla kazanılan DNA'dan oluştuğu, nükleotit dizi analizleri sonucu belirlenmiştir (57). Bakteriyel biyo-filmler, bakteriyofajlar ve mobil genetik elemanlar aracılığı ile genetik materyal değişimi yapılabilmektedir. Bu genetik materyal aktarımında özellikle biyofilm yapılarında eDNA'nın da rol aldığı belirlenmiştir (58). Yatay gen transferinin doğada değişik habitatlarda yaşayan planktonik formlar yanında biyofilm yapısı içerisindeki sessil formlar arasında da gerçekleşebildiği saptanmıştır. Prokaryotlarda gerçekleşen bu genetik materyal değişimi, ökaryotlardaki seksüel seçilime eşdeğer bir durumdur. Bu seçim sayesinde birçok bakteri patojenitesini arttırabilir, antibiyotik ve ağır metal direnci kazanabilir (59).

Bakteri hücreleri, eDNA'yı kendi hücrelerinin içerisine alabilmek için hücre zarı üzerinde metabolik yollar aracılığı ile porlar oluştururlar. Bu özellik bakteri hücresi tarafından salgılanan kompetent-stimule edici peptit (CSP) tarafından kontrol edilir. *Streptococcus*

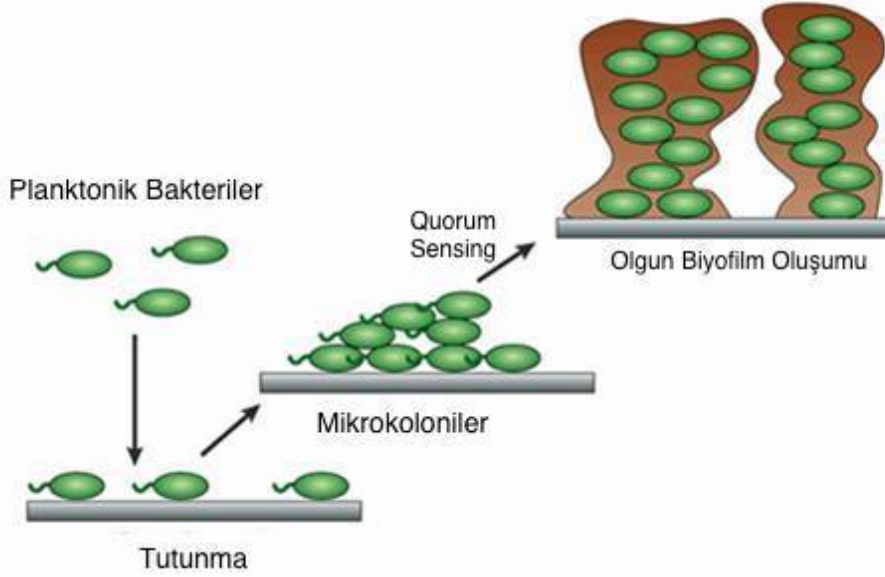
*pneumoniae*'da CSP seviyesi ortamda belli bir eşik seviyesine ulaştığı zaman, bazı bakteri popülasyonları lize olur, ortama DNA salınır ve diğer bakteriler bu DNA'yı hücre içersine alabilirler (60). Kompetent olmayan mutant hücrelerde ise bu durumun tam tersi gerçekleşir. *S. mutans* kültürüne yapılan sentetik CSP ekleme denemesinde bakterilerin kompetent yapımını arttırdığı ve biyofilm gelişiminin hızlandığı görülmüştür (61). Biyofilmdeki bakteri popülasyonu homolog ise, yatay gen transferiyle aktarılmış genetik bilginin popülasyondaki değişime ciddi bir katkıda bulunamayacağı aşıkardır. Ancak Spoering ve Gilmore (59), kardeş hücrelerden alınan homolog DNA'nın rekombinasyonu esnasında nokta mutasyonlarının ortaya çıkabileceğini ve faydalı olan mutasyonların bu yolla birikebileceğini savunmuştur.

Yatay gen transferiyle ortaya çıkmış ve popülasyonda yayılmış antibiyotik direnci, biyofilmlerde eDNA salımının sonuçlarından biridir. Kazanılmış antibiyotik direnci, duyarlı bakteri izolatlarında oluşan mutasyonların ya da direnç genlerinin transferi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Söz konusu mutant suşların sayısı popülasyon içerisinde, doğası gereği, çok düşük seviyededir. Dolayısı ile, direnç genlerinin biyofilm yapılarında yayılması sadece uzun süreli antibiyotik uygulamaları sırasında nadir mutantların pozitif seçilimi ile değil, aynı zamanda mutant hücreler tarafından salınan eDNA ile de sağlanmaktadır. Özetle, biyofilm matriksinde gerçekleşen eDNA salımının, yatay gen transferiyle kazanılmış antibiyotik direncinin ortaya çıkmasında ve yayılmasında doğrudan etkinlik gösteren bir mekanizma olduğu kanıtlanmıştır (62).

#### **2.4.5.5.2. Quorum Sensing Mekanizmalarında eDNA'nın Rolü**

Bakteriler planktonik formda ya da biyofilm yapısı içerisinde üreme ve gelişme özelliklerini kendi kontrol mekanizmalarını kullanarak düzenleyebilirler. Bunları yaparken çevreden gelen uyarıları algılayabilirler, değişimlere adapte olabilirler ve diğer bakteri hücreleriyle haberleşebilirler. Bakterilerin göstermiş olduğu bu uyarı algılama ve haberleşme mekanizmaları, Quorum Sensing denilen bir sistem sayesinde olur (63). Bu QS mekanizmaları spesifik sinyal moleküllerini kullanarak gerçekleştirilir. Yapısal olarak QS sinyal molekülleri düşük molekül ağırlığına sahiptir. Açıl homoserinler (AHLs), furanozil borat diesterler (AI2), cis-doymamış yağ asitleri (DSF ailesi singalleri) ve peptitler bu moleküllerden bazılarıdır (Şekil 2.7.).

QS ile biyofilm gelişimi arasındaki bağlantı düşünüldüğünde, akla gelen ilk soru, biyofilm yapısı içerisinde QS sinyal moleküllerinin hangi basamakta salgılanmaya başladığıdır. Öngörülen ise, sinyal moleküllerinin salgılanmasının ilk adezyon basamağında olamayacağı yönündedir. Çünkü ilk basamakta bakteri hücrelerin büyük bir kısmı ortam içerisinde serbest formda bulunmaktadır. Daha sonraki basamaklarda bakteri hücreleri yüzeye tutunup mikrokoloniler oluşturduğunda popülasyondaki birey sayısı hızlıca artar ve QS sinyallerinin konsantrasyonu, olgunlaştırmayı başlatmak ve biyofilmden hücrelerin göçünü kontrol etmek için yeterli düzeye ulaşır (Şekil 2.7.). Biyofilm içerisindeki atıkların artması ve besinlerin sınırlanması nedeniyle gerçekleşen göçlerde, QS sinyal moleküllerinin hücreleri koordine ettiği pek çok bakteri türünde saptanmıştır (64). QS moleküllerinin biyofilm yapısı üzerindeki etkileri oldukça karmaşık mekanizmalar ve birden fazla gen tarafından kontrol edilmektedir. QS sinyallerinin biyofilm yayılımını nasıl etkilediğini anlamak ve bu doğrultuda genel bir mekanizma önermek oldukça güçtür. Zira bu mekanizmalar bakteri türlerinde farklı yollarla kontrol edilmektedir (65).



Şekil 2.7. Biyofilmden Quorum Sensing sinyallerinin başlangıç aşaması (66)

*P. aeruginosa*'da biyofilm yapısı ve QS ilişkisi ilk kez Davies (1998) tarafından gösterilmiştir (67). Bu çalışmada, Gram negatif bakterilerin QS sistemlerinden olan LasI/LasR sisteminin, bakteriyel tutunma ve biyofilm olgunlaşma aşamalarında etkili olmasa da biyofilm yapısının farklılaşması ve dağılma aşamaları için elzem olduğu saptanmıştır. QS sinyal molekülleri, biyofilm yapısında bulunan bakterilerin otolizinde önemli bir rol oynamaktadır. Bunun bir sonucu olarak matriks içerisindeki eDNA artışı,

EPS'nin sağlamlaşması ve bakteri hücrelerinin yüzeye tutunmalarının kuvvetlenmesi gerçekleşmektedir (46). Ancak aynı sinyal moleküllerinin bakteri hücrelerinin yapıdan kopmalarını sağladığının belirlendiği çalışmalar, yukarıda söz edilen bulgularla, henüz açıklanamamış, çelişkili bir durumun varlığına işaret etmektedir. Dolayısı ile QS sistemlerinin biyofilm yapısındaki rollerinin daha kapsamlı olarak anlaşılabilmesi için, ileri araştırmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

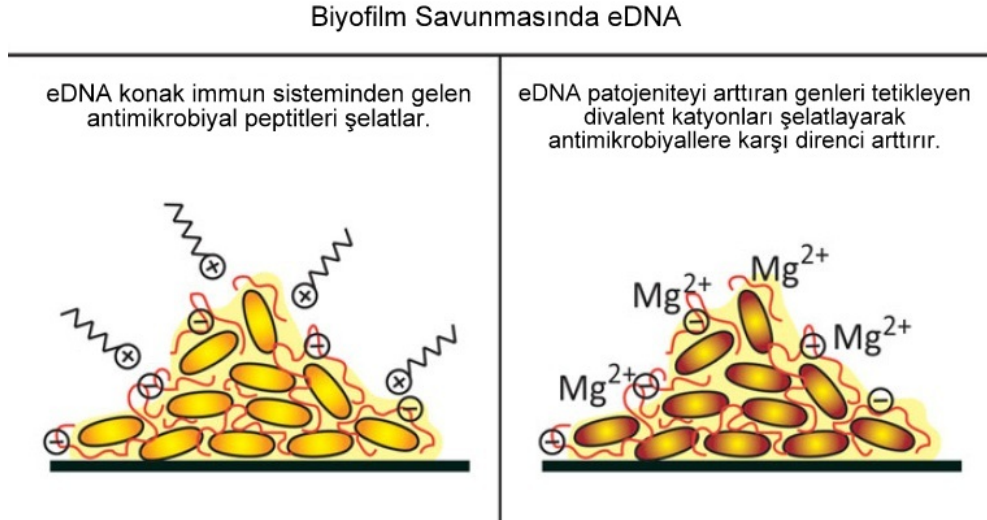
#### **2.4.5.5.3. Antibiyotik Direncinde ve Konak İmmün Sistemine Karşı Savunmada eDNA'nın Rolü**

Planktonik form ile karşılaştırıldığında, biyofilm yapısı içerisinde yaşayan bakterilerin antibiyotiklere karşı çok daha yüksek düzeyde direnç göstermeleri, bu yapıların dezenfektanlar ile eradikasyonlarını zorlaştırmaktadır. Biyofilm yapısındaki bakterilerin sahip olduğu antibiyotik direnci, çoğunlukla eDNA'nın doğrudan görev aldığı genetik mekanizmalar tarafından sağlanmaktadır. Bu dirençlilikte ayrıca biyofilm matriksinin de rol aldığı belirlenmiştir (62).

eDNA'nın, konak immün sistemi tarafından üretilen antimikrobiyal katyonik peptitleri şelatlayarak, biyofilm yapılarını immün sistem etkilerinden koruduğu tespit edilmiştir. Örneğin; solunum yolu ile bulaşan kronik enfeksiyonlara sebep olan *Haemophilus influenzae* patojeninin vücutta oluşturduğu biyofilm yapılarını zayıflatmak amacıyla konak immün sistemi tarafından salgılanan beta-defensin-3 proteini, matriks içerisindeki eDNA tarafından bağlanıp etkisizleştirilmektedir (68). Chiang vd. (2013)'nin elde ettiği yeni bulgular da, eDNA'nın aminoglyositlere karşı da kalkan görevi görerek aynı şekilde yapıyı koruduğunu göstermiştir (5).

eDNA, antibiyotik direnç genlerinin yatay gen aktarımı yolu ile frekansının artmasını sağlayarak, biyofilm yapılarının antimikrobiyal direncine dolaylı olarak da katkı sağlar. eDNA ayrıca  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  gibi metal katyonlara bağlanabilir (Şekil 2.8.). Bu durum, örneğin; *P. aeruginosa*'da  $Mg^{+2}$  iyonunun eksikliğinde hücre-yüzey lipopolisakkaritlerinin modifikasyonunda görevli genleri kodlayan *prm* operonunun çalışmasını tetikler. Bu lipopolisakkaritler hücrenin dış yüzeyini negatif yükler ve bu durum aminoglikozitler gibi katyonik antibiyotikler yanında, konak immün sistemi tarafından üretilen antimikrobiyal peptitlere karşı da hücrenin direncini artırır (69). Aslında, eDNA bakteri hücreleri için hem avantaj hem de dezavantaj sağlar. *In vitro* çalışmalar, çok fazla

eDNA'nın, bakterinin yüzeyindeki magnezyum ve kalsiyum iyonlarının kopmasına neden olarak bakteri hücresi membranlarının zarar görmesine, dolayısı ile hücrelerin lize olmasına yol açtığını göstermiştir (69). Ancak bu durumun *in vivo* koşullarda nasıl olduğu belirsizliğini korumaktadır.



Şekil 2.8. Biyofilm yapısının konak immün sistemine karşı korunmasında eDNA'nın rolü (45)

## 2.5. BIYOFİLM İLE MÜCADELEDE EDNA'NIN KULLANIMI

Biyofilm yapısı oluşurken ya da oluşuktan sonra eDNA'yı zayıflatmak veya yok etmenin biyofilm yapısını zayıflattığı ve stabilizasyonunu bozduğu bilinmektedir. eDNA'yı ortadan kaldırmak matriksi zayıflatarak biyofilmin dağılmasını hızlandırdığı gibi, biyofilm yapılarının antibiyotiklere karşı olan duyarlılığını da arttırmaktadır. eDNA'nın negatif yükü, katyonik antibiyotiklerin biyofilm yapıları ile temasını engellemektedir (70). eDNA'nın biyofilm yapılarından uzaklaştırılması biyofilm yapısını daha hassas, kırılabilir hale sokar ve antibiyotiklere ya da diğer antimikrobiyal ajanlara karşı yapıyı duyarlı hale getirir (71).

Biyofilm ile mücadelede enzimlerin kullanımı günümüzde geçerli bir yöntem olsa da, enzimlerin etkinlik düzeyi biyofilm yapısının durumuna bağlıdır. Genç biyofilmlerde bu uygulama başarılı olabilirken, olgun biyofilmlerde daha az etkilidir. Bu durumun tam olarak neden kaynaklandığı bilinmemekle beraber, araştırmacıların tahminleri diğer hücre dışı matriks polimerlerinin eDNA ile olan bağlantısının, eDNA'yı enzimatik tepkimelere karşı koruduğu yönündedir (52). Bu sebeple biyofilmlerle mücadele ederken yapıdaki tek bir polimerle savaşmak yeterli olmamakta, proteinlere ve polisakkaritlere de

uygulanacak kombine degradasyon uygulamaları, bu mücadeleyi daha verimli hale getirmektedir.

eDNA'nın biyofilm matriksi içerisindeki yapısal ve fonksiyonel görevleri, biyofilm mücadelesinde DNaz uygulamalarının önemini arttırmıştır. DNaz benzeri enzim uygulamalarıyla biyofilm mücadelesi, günümüzde endüstriyel alanlarda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Özellikle atık suların temizlenmesi, içme suyu üretimi ve deniz suyundan tuzun arındırılması gibi biyofilm membranlarının kullanıldığı sistemlerde oluşan biyofilm kirliliğini ortadan kaldırmak ve sistemin ürettiği biyofilm miktarını kontrol altında tutmak için DNaz uygulamaları kullanılmaktadır. Daha önce de bahsedildiği gibi DNaz uygulamasının biyofilm matriksini zayıflatması, devamında uygulanacak olan sterilizasyon işlemlerini kolaylaştırmaktadır (72).

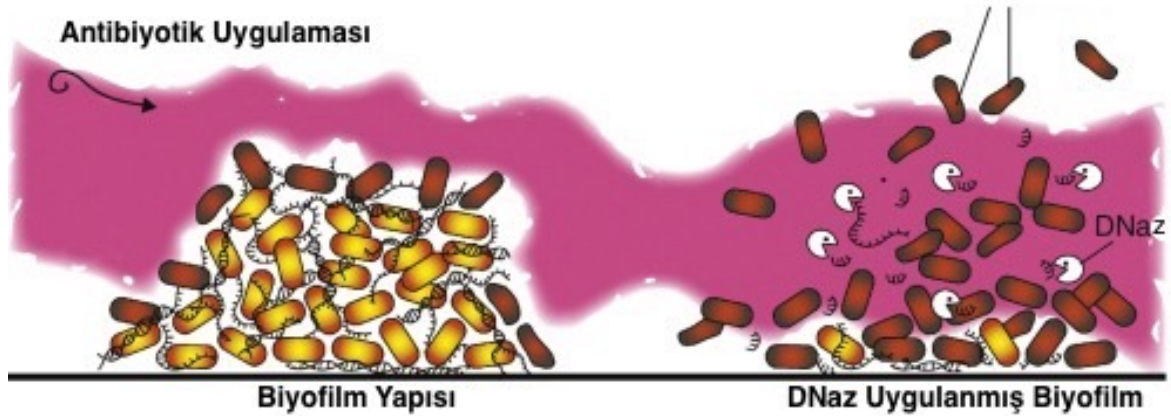
İmplant edilebilir medikal cihazlarda oluşan biyolojik kirlenmelerin başlıca sorumlusu olan biyofilm yapıları, kullanıcılarda ağır enfeksiyonlara yol açmaktadır. Biyofilm yapısının DNaz gibi enzimlerle ortadan kaldırılması potansiyeli bu nedenle oldukça güncel bir konudur. Sadece DNaz'ın uygulandığı tedaviler değil, antibiyotik uygulamalarından önce yapılan DNaz muameleleri de güncel araştırma konularındandır (73). Bu yaklaşımla yapılan başarılı uygulamalardan biri de rekombinant insan DNaz'ı tedavisiyle kistik fibroz hastalarındaki pulmoner biyofilm yapılarının ortadan kaldırılması olmuştur. Hastaların pulmoner enfeksiyonları azalmış ve akciğer fonksiyonları iyileşmiştir (74). Ancak büyük ölçekli uygulamalar günümüz şartlarında maliyet nedeniyle sınırlıdır. Prokaryot hücrelerden DNaz üretimindeki glikozilasyon işlemi, maliyetlerin aşağıya çekilmesini zorlaştırmaktadır. Glikozillenmemiş aktif ürünler de tedavilerde kullanılabilir, ancak glikozilasyon işlemi yapılmaksızın ürünün termal stabilitesi ve tam aktivitesi sağlanamamaktadır (75).

*Serratia marcescens*'den köken alan ve *Escherichia coli*'de eksprese edilen genetik olarak düzenlenmiş ticari bir prokaryotik endonükleaz olan Benzonaz oldukça geniş bir pH ve sıcaklık aralığına sahip olup, bütün DNA ve RNA türlerini degrade edebilmektedir. Benzonaz yirmi yılı aşkın bir süredir piyasada olsa da, üretim ve saflaştırma aşamasındaki zorluklar nedeniyle diğer ticari nükleazlara göre oldukça pahalıdır. Ancak biyofilm ile mücadeledeki etkinliği nedeniyle artan tüketici talebi, endonükleazların uygun maliyetlerle üretimi için yeni yollar aranmasına sebep olmuştur. Bu konuda çeşitli araştırma grupları

çalışmalar yapmakta ve biyofilm ile mücadelede ümit verici sonuçlar elde etmektedirler (31).

### 2.5.1. BİYOFİLM YAPILARININ KONTROLÜNDE DNaz KULLANIMI

Kistik fibrozis hastalığının tedavisinin yanı sıra, DNaz muamelesi ile biyofilm yapısının dağıtılması esasına dayanan uygulamalar; endokardit ve implant-ilişkili enfeksiyonlar başta olmak üzere, biyofilm ilişkili çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır. Dağıtılan (parçalanmış) biyofilm yapısından serbest kalan bakteriler, vücut içerisinde bir başka yerde kolaylıkla kolonize olacağından, biyofilm yapısının dağıtılması her zaman enfeksiyonun tedavisi için yeterli olamamaktadır. Biyofilm yapısının dağıtılması, antibiyotik tedavisi ile desteklenerek, serbest kalan planktonik bakterilerin de öldürülmesi sağlanmalıdır. Biyofilm yapılarının DNaz muamelesi ile enzimatik parçalanmasından; gıda ile temas eden yüzeylerin ve içme suyu üretiminde kullanılan membranların temizlenmesi gibi alanlarda da yararlanılabilir (Şekil 2.9.) (72).



Şekil 2.9. DNaz uygulamasının biyofilm yapısına etkisi (76)

Büyük ölçekli biyoteknolojik uygulamalarda DNaz kullanımı ekonomik açıdan maliyetli olmaktadır (77). Memeli DNaz I'ın translyasyondan sonra glikolize edilmesi zorunluluğu (75), söz konusu nükleazın üretimi için çok daha ucuz olan prokaryotik ifade sistemlerinin kullanımını engellemektedir. Memeli hücrelerinden elde edilen rhDNaz I kistik fibrozis tedavisinde kullanılırken, *in vitro* uygulamalarda ise yaygın olarak sığır pankreasından elde edilen DNaz I tercih edilmektedir.

Hem prokaryotlardan hem de memelilerden elde edilen DNaz enzimleri, biyofilm yapısının dağıtılmasında kullanılabilir. Pek çok prokaryot, ekstraselüler nötrofil tuzaklardan (NETs)



korunmak için ekstraselüler nükleazlar üretirler (78). Nükleazlar ayrıca, diğer prokaryotları hedef almak amacı ile de bakteriler tarafından sentezlenmektedir. *Bacillus licheniformis* bakterisinin, yarışmacı bakterilerin ürettiği biyofilm yapılarını dağıtmak için NucB adında bir nükleaz ürettiği saptanmıştır (79). İzole edilen prokaryotik nükleazların çoğunun biyofilm oluşumunu engellediği ya da oluşan biyofilm yapısını dağıttığı belirlenmiştir. Bunlara *B. licheniformis* tarafından üretilen NucB (80), *Neisseria gonorrhoeae* tarafından üretilen Nuc (5) ve *Staphylococcus aureus* tarafından üretilen Nuc2 (81) örnek verilebilir. Benzer şekilde, nükleaz kodlayan genlerin bozulması halinde, biyofilm oluşumunda artışlar belirlenmiştir (80,82,83).

Tetz vd., (2009) yaptığı çalışmada *E. coli* ATCC 25922, *H. influenzae* VT 450-2006, *Klebsiella pneumoniae* VT 1367, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* VT59 ve *Acinetobacter baumannii* VT126 tarafından üretilen 24 saatlik olgun biyofilm yapıları üzerine DNaz I ve çeşitli antibiyotiklerin birlikte etkilerini araştırmıştır. Denemeler sonucunda, MİK değerlerinin 50 katı antibiyotik uygulamasının, 24 saatlik olgun biyofilm kütlelerini %30'a kadar azalttığı belirlenmiştir. Aynı koşullar altında  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler ve 5  $\mu$ g/ml DNaz I'in 24 saatlik olgun biyofilmlere beraber muamele edilmesi durumunda ise, *E. coli*, *A. baumannii*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* biyofilmlerinin %50-%67 oranında azaldığı saptanmıştır. Gram-pozitif *S. aureus* ve *S. pyogenes* biyofilmleri yalnız antibiyotik muamelesi sonucunda %10-%15 oranında azalırken, 5  $\mu$ g/ml DNaz I ile beraber uygulandığında biyofilm biyokütlesi % 41-46 oranında düşmüştür (84).

Eckhart vd., (2007) tarafından yapılan çalışmada ise *S. aureus* ve *P. aeruginosa* biyofilmleri ile mücadelede DNaz I ve DNaz IL2 enzimlerinin etkileri araştırılmış ve her iki enzimin de yüksek düzeyde antibiyofilm etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir. DNaz IL2 ile 7 saat inkübasyon sonrasında *P. aeruginosa* biyofilm yapısı önemli düzeyde azalmıştır. Ancak her iki enzim ile de 18 saat inkübasyon sonucunda, üretilen biyofilm yapılarında etkin bir azalma görülmemiştir. *S. aureus* biyofilm yapısı açısından değerlendirildiğinde ise, inkübasyon süresinden bağımsız olarak, biyofilm yapısının eradikasyonunda her iki enzimin de etkili olduğu belirlenmiştir (85).

Martins vd., (2012) tarafından yürütülen çalışmada ise, *Candida albicans* tarafından üretilen biyofilm yapıları ile mücadelede DNaz I (130  $\mu$ g/ml) ile çeşitli antibiyotiklerin

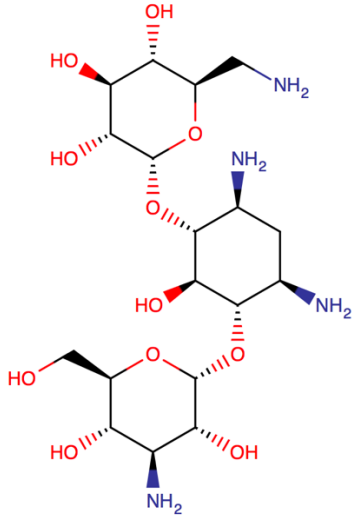
birlikte kullanımı incelenmiştir. *C. albicans* örnekleri DNaz I ile muamele edildikten sonra biyofilm üretim düzeyleri araştırılmış ve canlı hücre düzeyinde 0,5 log<sub>10</sub> azalma belirlenmiştir. *C. albicans*'ın yalnızca amfoterisin B (1 µg/ml) muamelesi ile biyofilm yapılarında canlı hücreler 1 log<sub>10</sub> azalırken, DNaz I ile birlikte uygulanması sonucunda bu oranın 3,51 log<sub>10</sub> düzeyine çıktığı belirlenmiştir. Yüksek düzeyde amfoterisin B (> 2 µg/ml) ve DNaz I uygulaması sonrasında ise canlılık 5 log<sub>10</sub> azalmıştır (86).

DNaz muamelesine alternatif olabilecek bir diğer yol, bakterilerde nükleaz üretimini kontrol eden mekanizmaları hedef almaktır. Buradaki amaç, *B. licheniformis*' de olduğu gibi (79) ekstraselüler nükleaz üretimini stimüle ederek, biyofilm üreticisi pek çok bakteriyi doğal yollardan yıkacak bir mekanizma geliştirmektir. Ancak, ekstraselüler nükleaz üretimi; transformasyon, besin tercihi ve NET'lere karşı koruma gibi pek çok amaca hizmet etmektedir. Bu sistemlerin regülatör yolları birbirinden farklı olduğundan, biyofilm kontrolünde eDNA'yı hedef alan genel bir kontrol stratejisi belirlemek zor olmaktadır. Teorik olarak; birden fazla tür tarafından oluşturulan biyofilm yapılarında, bu türlerden birine karşı nükleaz üretimi dahi, biyofilm yapısının bütünlüğünün bozulmasına neden olacaktır. Ancak, bu şekilde gerçekleştirilebilecek bir biyofilm kontrol mekanizması, henüz aydınlatılamamıştır.

## **2.6. ÇALIŞMADA KULLANILAN ANTİMİKROBİYAL AJANLARIN ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMALARI**

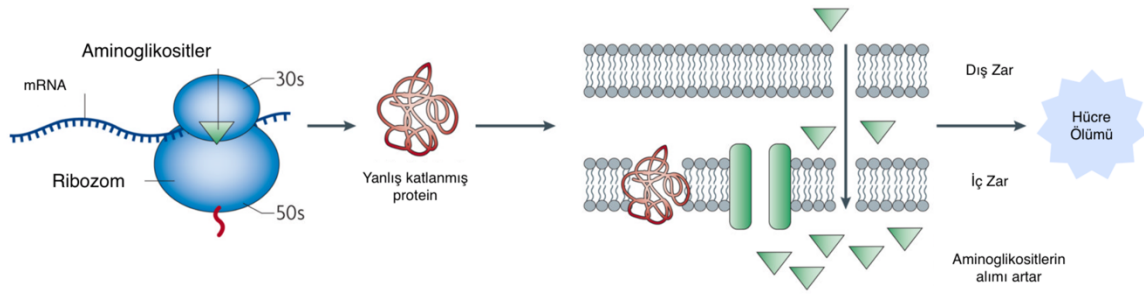
### **2.6.1. KANAMİSİN**

Kanamisin, C<sub>18</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub> formülüne sahip, yaklaşık 484,5 g/mol molekül ağırlığında, aminoglikozit grubu, bakterisidal etki gösteren bir antibiyotiktir. Kanamisin, *Streptomyces kanamyceticus* bakterisinden izole edilmektedir. Kanamisin A adı ile de bilinmektedir ve genellikle kanamisin sülfat tuzu halinde bulunmaktadır (Şekil 2.10.) (87).



Şekil 2.10. Kanamisin antibiyotiğinin kimyasal formülü (87)

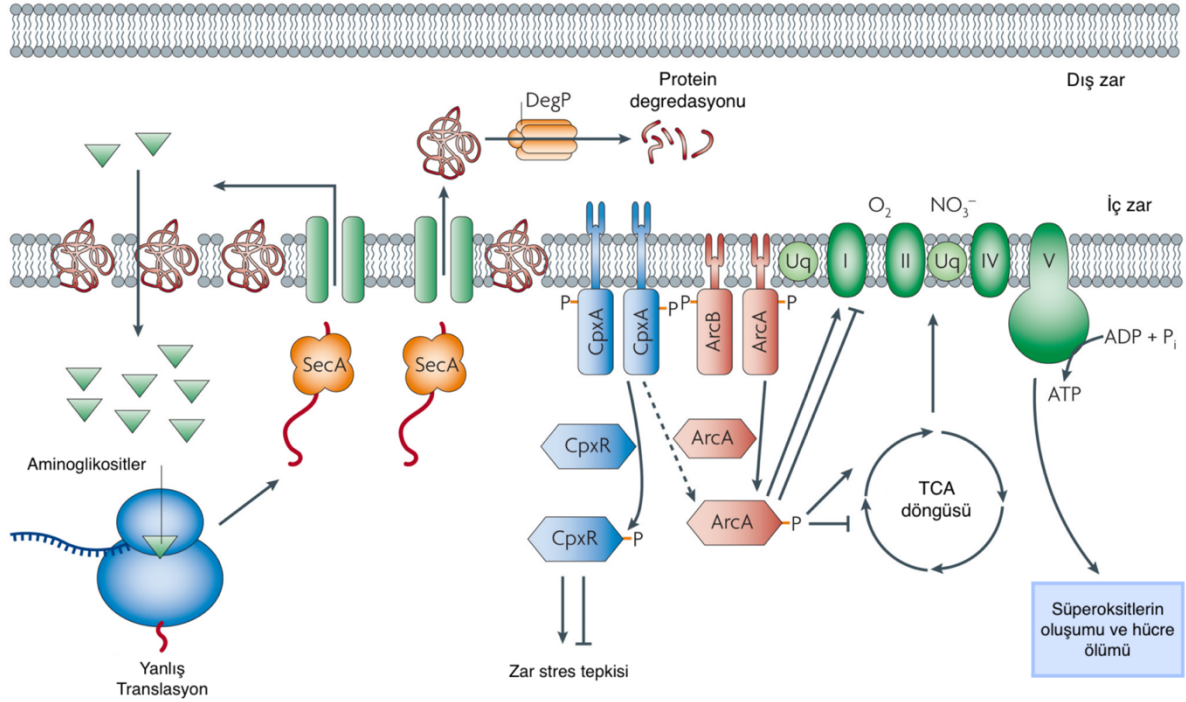
Kanamisin, geri dönüşümsüz olarak 30S ribozomal alt birimine ve 16S rRNA'ya bağlanır. Bu bağlanma, mRNA'nın yanlış okunması, dolayısıyla yanlış amino asitlerin polipeptite sokulmasıyla, işlevsiz veya toksik peptitlerin oluşmasına yol açar. Kanamisin gibi aminoglikozidlerin ribozoma bağlanması, translasyonu durdurmaz. Daha ziyade, aminoglikozidler için spesifik bir fenotip olan ve hücre ölümüne katkıda bulunan bir peptide, uygun olmayan amino asitler eklenerek proteinin yanlış katlanmasına sebep olur (88) (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Aminoglikozitlerin hücre zarına olan etki mekanizması (88)

Kanamisin, yanlış katlanmış translasyona uğramış proteinlerin hücre zarına dahil edilmesi, zarf (Cpx) ve redoks yanıtı (Arc) iki bileşenli sistemleri teşvik eder. Bu sistemlerin faaliyete geçirilmesi, hücresel metabolizma ve membran potansiyelini bozarak ölümcül hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olur (Şekil 2.12.).

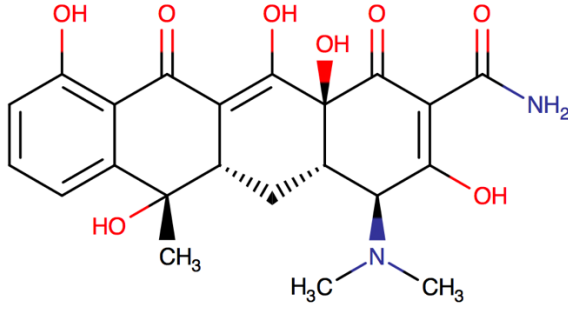
Kanamisin özellikle, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ve *Enterobacter* gibi aerobik, Gram-negatif bakterilerin enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Buna ek olarak, bazı mikobakteriler de kanamisine duyarlıdır. Gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar da kanamisin ile tedavi edilebilir, ancak bu amaçla kullanılan daha güçlü ve konak etkisi daha düşük antibiyotikler tanımlanmış olduğu için bu amaçla kullanımları sınırlı olmaktadır (89).



Şekil 2.12. Aminoglikozitlerin neden olduğu hücre içi süperoksitlerin artışı ve hücre ölüm mekanizması (88)

## 2.6.2. TETRASİKLİN

Tetrasiklin,  $C_{22}H_{24}N_2O_8$  formülüne sahip, yaklaşık 444,4 g/mol molekül ağırlığında, *S. aureofaciens*, *S. rimosus* ve *S. viridofaciens* suşlarından üretilen geniş spektrumlu, bakteriyostatik etki yapan bir antibiyotiktir (90) (Şekil 2.13.).



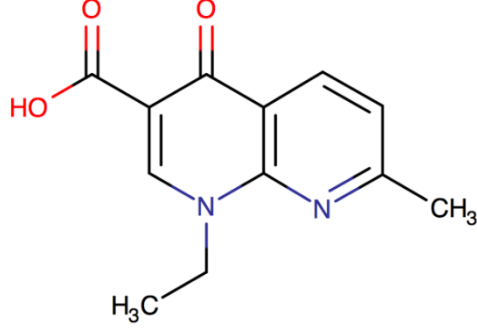
Şekil 2.13. Tetrasiklin antibiyotiginin kimyasal formülü (90)

Tetrasiklinlerin, aminoasil-tRNA'nın bakteriyel ribozomla ilişkisini önleyerek protein sentezini inhibe ettiği bilinmektedir. Bu nedenle, bu moleküllerin duyarlı organizmanın Gram pozitif veya Gram negatif olup olmadığına bağlı olarak, bir veya daha fazla zar sistemi geçmesi gerekir. Tetrasiklinler, magnezyum gibi metallerle pozitif yüklü katyon-tetrasiklin kompleksleri oluşturarak OmpF ve OmpC porin kanalları vasıtasıyla Gram negatif enterik bakterilerin dış zarını geçerler (91,92). Sitoplazmik zar boyunca tetrasiklinlerin alımı, enerji bağımlıdır ve burada pH dengesi çok önemlidir. İç pH ve iki değerlikli metal iyonu konsantrasyonları hücre dışı ortamdaki daha yüksek olduğu için, sitoplazmada tetrasiklin moleküllerinin şelat aktivitesi gösterdiği bilinmektedir (92,93). Bu antibiyotigin bakteriyostatik etkiler göstermesinin sebebi, ribozom ile geri dönüşümlü bağ kurmalarıdır (91).

Tetrasiklin hücre içine girdikten sonra, translasyonu inhibe ederek bakteri gelişimini engelleyen kısa etkili bir antibiyotiktir. 30S ribozomal alt birimine bağlanır ve aminoasil tRNA'nın ribozomun A bölgesine bağlanmasını önler. Ayrıca bir dereceye kadar 50S ribozomal alt birime bağlanır. Buna ek olarak, tetrasiklin katyonlarla bağlanabildiği için, bakterilerin sitoplazmik zarının pH dengesini değiştirerek, hücre zarı yapısının bozulmasına yol açtığı için, hücre içi içeriklerin dışarıya sızmasına da neden olabilir. Tifüs ateşi, Q humması ve Brill-Zinsser hastalığı ve enterik bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavinde kullanılmaktadır. *Borrelia burgdorferi* (Lyme hastalığı) ve tipik (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*) ve atipik organizmaların neden olduğu alt solunum yolu enfeksiyonlarının (*Chlamydomphila pneumoniae*) tedavisinde de tetrasiklin kullanımı yaygındır (91).

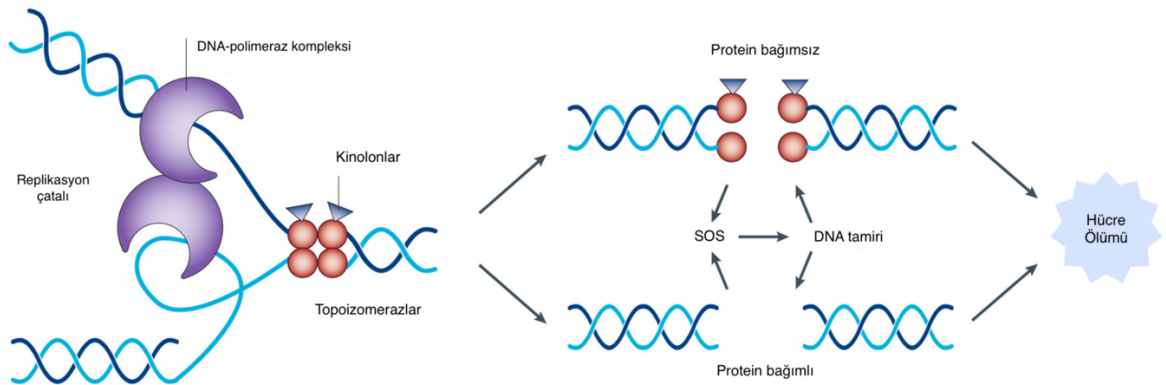
### 2.6.3. NALİDİKSİK ASİT

Nalidiksik asit,  $C_{12}H_{12}N_2O_3$  formülüne sahip, yaklaşık 232 g/mol molekül ağırlığında, sınırlı bir bakterisidal spektrumu olan sentetik bir kinolondur (94) (Şekil 2.14.).



Şekil 2.14. Nalidiksik asit antibiyotiğinin kimyasal formülü (94)

Nalidiksik asit, klorokin (kinin) sentezinin bir yan ürünü olarak keşfedilmiş ve üriner sistem enfeksiyonlarını tedavi etmek için 1960'lı yıllarda kullanılmıştır. Nalidiksik asit ve diğer birinci jenerasyon kinolonlar (oksolinik asit) yüksek toksisite içermeleri nedeniyle nadiren kullanılırlar (88). Bu antibiyotik, bakteriyel DNA giraz A (topoizomeraz) alt biriminin bir inhibitörüdür ve aktif metaboliti olan hidrosinalidiksit asit, DNA'ya bağlanır. Bu durum DNA'dan RNA sentezlenmesine engel olur ve DNA'nın ifade sürecini bozar (94). Topoizomeraz enzimleri; DNA sentezi ve tamiri, transkripsiyon, mRNA sentezi ve hücre bölünmesi için gereklidir. Dolayısıyla ile, DNA topoizomeraz komplekslerini hedefleyen kinolon molekülleri bu reaksiyonların gerçekleşmesini inhibe eder. Hücre içinde bu reaksiyonların bozulması hücreyi ölüme götürür (88) (Şekil 2.15.).

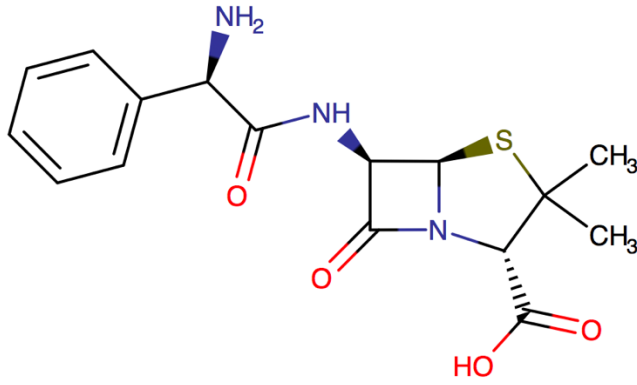


Şekil 2.15. Nalidiksik asidin etki mekanizması (88)

Nalidiksik asit, Enterobakter türleri, *E. coli*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* ve *Providencia rettgeri* gibi Gram negatif bakterilere karşı belirgin antibakteriyel etkiye sahiptir. *Pseudomonas* türleri ise genellikle bu antibiyotiğe karşı dirençlidir (94).

#### 2.6.4. AMPİSİLİN

Ampisilin,  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  formülüne sahip, yaklaşık 350 g/mol molekül ağırlığında, geniş spektrumlu bir antibiyotik olarak işlev gören penisilin, yarı sentetik bir türevidir (95) (Şekil 2.16.).



Şekil 2.16. Ampisilin antibiyotiğinin kimyasal formülü (95)

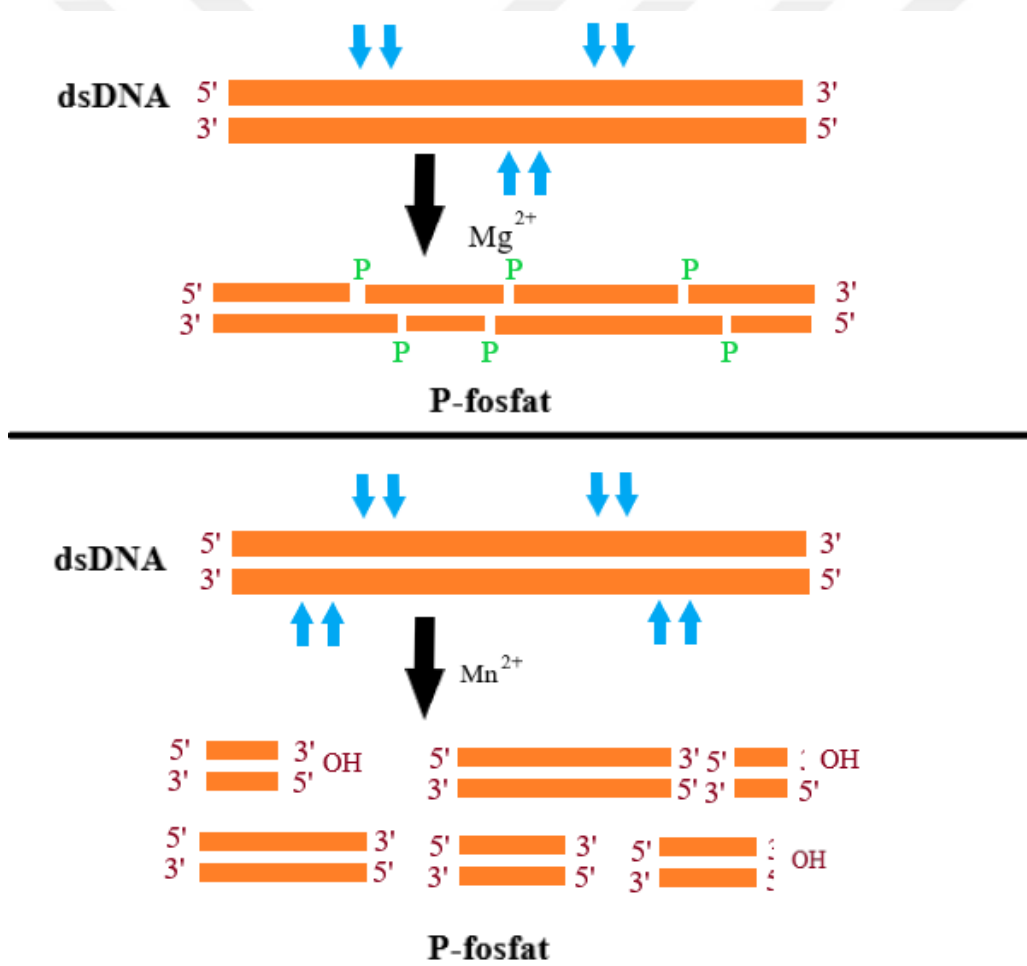
Ampisilin, genelde Gram pozitif organizmaların sebep olduğu bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir beta-laktam grubu antibiyotiktir. "Ampisilin" ismi çeşitli penisilin varyantlarına, ya da penisilinlerden türetilen antibiyotik grubuna atıf amaçlı kullanılmaktadır. Ampisilin, Gram-pozitif ve Gram-negatif aerobik ve anaerobik bakterilere karşı *in vitro* aktiviteye sahiptir (96).

*E. coli*, Enterokoklar, *Shigella*, *Salmonella typhosa* ve diğer *Salmonella* serotiplerinde, nonpenisilinaz üreten *H. influenzae* enfeksiyonları yanında stafilokoklar ve streptokoklarla ilişkili enfeksiyonların tedavisinde de kullanılmaktadır. Ampisilin bakterisidal aktivitesi, hücre duvarı sentezinin inhibisyonundan kaynaklanır. Bu antibiyotik, penisilin bağlayan proteinlerine tutunarak bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder ve hücre lizisine yol açar (97).

## 2.6.5. DEOKSİRİBONÜKLEAZ I (DNAZ I)

DNaz I, insan geni *DNASE1* tarafından kodlanan, 29,1 kDa moleküler ağırlığa sahip bir endonükleazdır (98). DNaz I, DNA'yı bir pirimidin nükleotidine komşu olan fosfodiester bağlarından parçalayan enzimdir. Bu enzim, tek sarmallı DNA, çift sarmallı DNA ve kromatin üzerinde etki göstermektedir (20).

DNaz I enzimi, DNA'nın kıvrılma açılarını algılayabilir ve DNA dizisindeki pirimidinlerin 5' bölgesindeki fosfat bağlarına etki ederek onları kırar (99). DNaz I enziminin etkililiği çeşitli iki değerlikli katyonlara bağlıdır.  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  bulunan ortamda DNaz I enziminin tek sarmallı DNA üzerinde;  $Mn^{2+}$  bulunan ortamda ise çift sarmallı DNA'lar üzerinde daha fazla etki gösterdiği bilinmektedir (100) (Şekil 2.17.).



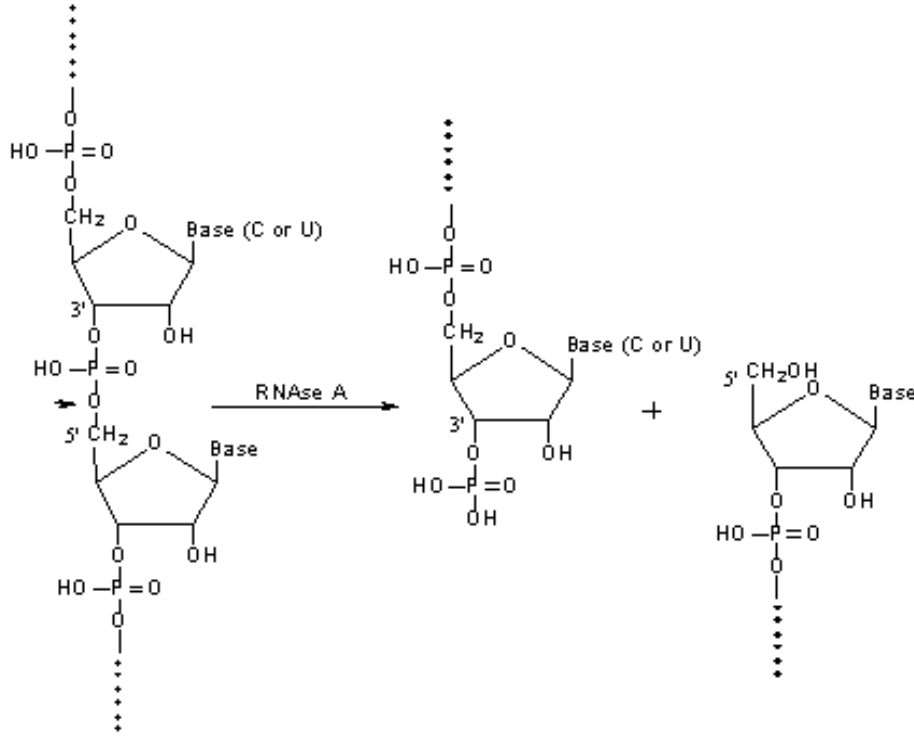
Şekil 2.17. Deoksiribonükleaz I enziminin etki mekanizması (101)



DNaz I, hücre iskelet proteini olan aktine bağlanabilir. Bu etkileşimin fonksiyonu belirsizdir. Bununla birlikte, aktin-bağlı DNaz I enzimatik olarak aktif olmadığından, DNaz-aktin kompleksi, genetik bilginin hasar görmesini önleyen bir DNaz I depolama biçimi olabilir (20). *DNaz I* geni mutasyonları ve enzim ürününü inaktive eden faktörler, bir otoimmün hastalık olan sistemik lupus eritematosus (SLE) ile ilişkilendirilmiştir (102,103). Bu proteinin rekombinant formu, balgamdaki eDNA'yı hidrolize ederek ve balgamın viskozitesini düşürerek kistik fibroz semptomlarından birini tedavi etmek için kullanılır (104).

#### **2.6.6. RNAZ A**

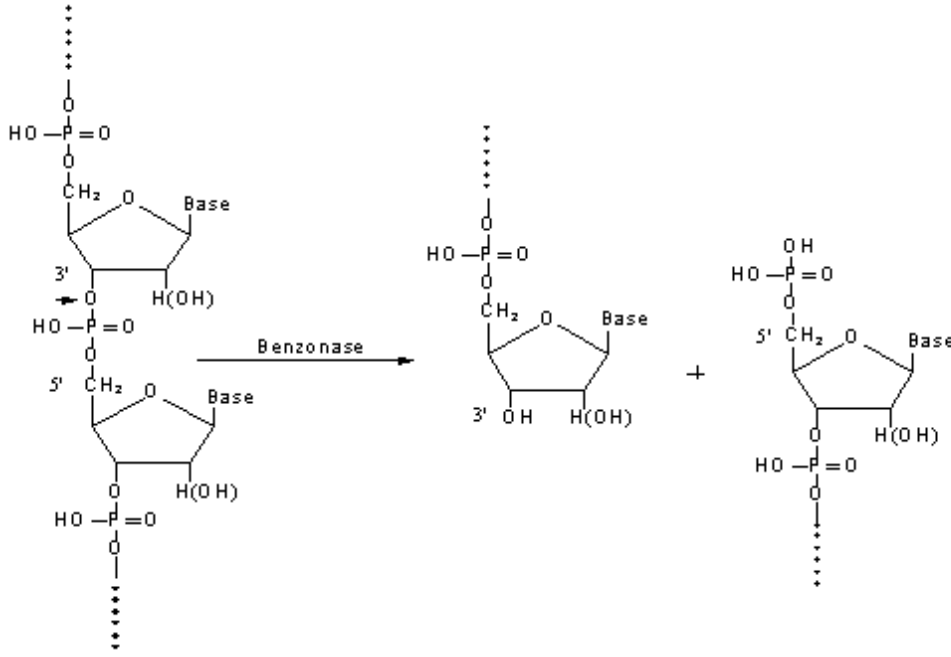
Ribonükleaz olarak adlandırılan RNaz enzimi, RNA'yı küçük parçalara ayırarak degrade eden bir enzimdir. Ribonükleaz enzimleri, ekzoribonükleazlar ve endoribonükleazlar olarak sınıflandırılmaktadır (105). RNaz A 13,7 kDa moleküler ağırlığında, olgun hali 124 amino aside sahip, sığır pankreasından elde edilen bir enzimdir. RNaz A'nın amino asit diziliminde triptofan hariç diğer 19 amino asit bulunmaktadır (106). RNaz A, spesifik olarak 2' ve 3'-siklik fosfat ara maddeleri ile 3'-fosfomonükleotidlerin ve 3'-fosfooligonükleotidlerin endonükleolitik degradasyonunu yapar. Bu degradasyon işleminin iki aşamalı olduğu düşünülmektedir; ilk aşamada 3', 5'-fosfodiester bağı kesilir ve 2', 3'-siklik fosfodiester ara ürünü üretilir, ikinci aşamada ise siklik fosfodiester 3'-monofosfat grubuna hidroliz edilir. (107, 108) (Şekil 2.18.). RNaz A enzimi; DNA izolasyonu sırasında RNA'nın giderimi başta olmak üzere, RNA dizi analizi, RNA haritalama ve genomik DNA izolasyonu gibi birçok süreçte kullanılmaktadır.



Şekil 2.18. Ribonükleaz A enziminin etki mekanizması (108)

### 2.6.7. BENZONAZ

*Serratia* türlerinin, kültür ortamında biriken bir takım hidrolitik enzimler ürettiği saptanmıştır. Bu bakteriler, diğer Gram negatif bakterilerin aksine, salgı proteinlerini ilk aşamada ortama salgılamaktan ziyade, öncelikle periplazmik boşluğa taşımaktadır. Bu tür periplazmik proteinler, özellikle hücreler yüksek yoğunluklara ulaştığında, kültür ortamına sızma eğilimi gösterirler. Benzonaz olarak isimlendirilen hidrolitik enzim de bu şekilde keşfedilmiştir (109). Bu enzim ilk kez, *S. marcescens*'dan izole edilmiştir (110). Ticari üretiminde, *E. coli* K12 suşunun pNUC1 plazmidini içeren W3110 varyantı kullanılmaktadır. Yapısal olarak özdeş 245 aminoasitin dimeri olan bu endonükleaz, DNA ve RNA'nın her biçimini (tek sarmallı, çift sarmallı, doğrusal ve dairesel) parçalayabilir (111) (Şekil 2.19.).

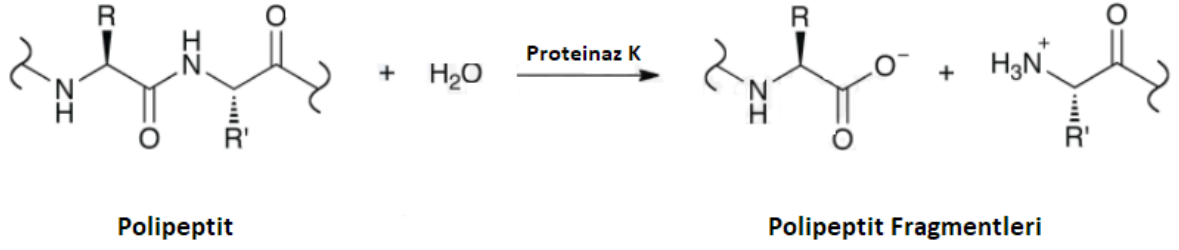


Şekil 2.19. Benzonaz enziminin etki mekanizması (112)

Benzonaz enzimi DNA molekülü üzerinde GC oranı yüksek bölgelerde, daha yüksek aktivite gösterirken, adenince zengin bölgelerde nispeten daha az etki gösterir (113). Benzonaz ile nükleik asitlerin bozunması için gerekli optimum sıcaklık 37°C ve optimum pH değeri 8.0 - 9.2 aralığındadır (114).

### 2.6.8. PROTEİNAZ K

Geniş spektrumlu substrat özgüllüğü içeren proteinaz K enzimi, ilk kez, keratin üzerinde büyüeyebilen bir mantar olan *Engyodontium album*'den izole edilmiştir. Proteinaz K, keratin de dahil birçok proteini degrade edebilir. Kalsiyum iyonları enzim aktivitesini etkilemese de enzim stabilitesine katkıda bulunur. Proteinaz K'nın ilginç bir özelliği, aktivitesini sodyum dodesil sülfat (SDS, %0,5-1) veya üre (1-4 M üre) varlığında korumasıdır. Protein degradasyonu için optimum sıcaklığı 37°C'dir (115) (Şekil 2.20.).



Şekil 2.20. Proteinaz K enziminin etki mekanizması (115)

Proteinaz K peptid bağlarının parçalanmasının yanı sıra, peptit amid hidrolizini de katalizler. Moleküler ağırlığı 28,9 kDa olan enzim, diizopropil florofosfat (DFP) veya fenil metan sülfonil florür (PMSF) tarafından inaktive edilir. Sitrat ve EDTA gibi şelatlayıcı ajanlar, enzim etkinliği üzerinde hiçbir etkiye sahip değildir (43). Proteinaz K enzimi; mitokondri izolasyonunda, membranlarda enzim lokalizasyonunun belirlenmesinde, in situ hibridizasyon için nükleazların parçalanmasında, lizozim ve RNaz A gibi katyonik proteinlere bağlı endotoksinlerin uzaklaştırılmasında ve mikroorganizmalardan, memeli kültürlerinden (116) ya da bitkilerden izole edilen DNA veya RNA preparatlarından gelen nükleazlar gibi istenmeyen proteinlerin sindirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (117).

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Gram-pozitif fırsatçı *E. faecalis* patojeni; ortopedik implantlar, üreteral stentler, kataterler ve kalp kapakçıkları gibi implant araçları üzerinde inatçı biyofilm yapıları oluşturarak nozokomiyal enfeksiyonlara öncülük etmektedir. Enterokoklar konvansiyonel antibiyotiklere karşı giderek artan bir direnç sergilemektedir. Epidemiyolojik analizler, antibiyotik direnç genlerinin farklı bakteri cinsleri arasında aktarım için önemli bir rezervuar olduğunu kanıtlamaktadır.

Biyofilm yapısında bulunan bakteriler, başta antibiyotik tedavilerine verdikleri yanıt olmak üzere, pek çok açıdan planktonik formlarına göre birçok farklılığa sahiptirler. Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler, antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç gösterirler. Biyofilmi oluşturan karmaşık ekstraselüler polimerik matriks yapısı, öncelikle antibiyotiklerin bakterilere ulaşmasını engeller. Biyofilm yapısında bulunan bakteriler ayrıca yavaş büyüme ve az besin varlığında hayatta kalma gibi zorlu koşullara karşı da dirençlidirler. Antibiyotikler daha aktif hücre proseslerini hedef aldığından, biyofilm yapısındaki bakterinin fizyolojisindeki değişiklikler antibiyotiklere karşı daha dirençli olmalarını sağlar. Bugüne kadar, biyofilm yapılarının yok edilmesinde kullanılacak etkin bir bileşen tanımlanmamıştır.

Yapılan pek çok araştırma sonucunda dışarıdan biyofilm ortamına ilave edilen deoksiribonükleazların yeni oluşan genç biyofilm yapılarını inhibe ettiği ve biyofilm bakterilerinin biyosit muamelesi ile öldürülmesini kolaylaştırdığı belirlenmiştir. eDNA'nın uzaklaştırılması matriksi zayıflatmakta ve biyofilm yapısını tam olarak dağıtmaya da yapının antibiyotiklere karşı duyarlılığını arttırmaktadır. eDNA'yı degrade etmek suretiyle biyofilm yapısını zayıflatmaya alternatif bir diğer strateji, eDNA ile biyofilm matriksindeki ya da hücre yüzeyindeki diğer moleküllerin etkileşimini bozmaktır. DNaz ile antibiyotiklerin ve biyositlerin birlikte kullanımı, hem sağlık alanında biyofilm enfeksiyonları ile mücadelede daha etkili çözümlerin geliştirilmesine öncülük edecek ve hem de gıda işletmeleri gibi alanlarda biyofilm yapılarının temizlenmesinde, çevre dostu bir yol sağlayacaktır.

Çalışmamızın temel amacı, klinik ve gıda kökenli iki farklı enterokokal izolat kullanılarak biyofilm yapıları ile mücadelede kullanılan antibiyotiklerin kullanım konsantrasyonlarını azaltmaya yarayacak yeni bir yolun araştırılmasıdır. Böylelikle, özellikle enfeksiyon

hastalıkları ile mücadelede önemli bir sorun haline gelen kontrolsüz antibiyotik direncinin önüne geçmeye katkıda bulunmak amaçlanmıştır. Bu doğrultuda tasarladığımız çalışmamızda, fırsatçı bir patojen olan *E. faecalis*'in ürettiği biyofilm yapısında eDNA miktarının ve rolünün belirlenmesi çalışmalarının yanı sıra, literatürde ilk defa bu organizmaların biyofilm yapılarının eradikasyonunda DNaz I enziminden daha yüksek aktiviteye sahip Benzonaz enzimi etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca yine literatürde ilk defa çeşitli nükleazlar ile *E. faecalis* biyofilm yapısının zayıflatılmasını takiben, konvansiyonel antibiyotikleri uygulamak suretiyle biyofilm ile mücadelede yeni yolların belirlenmesi hedeflenmiş ve bu yönde denemeler gerçekleştirilmiştir.



## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

#### 4.1.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BAKTERİLER VE GELİŞME KOŞULLARI

Araştırmamızda kullandığımız, gıda kökenli *E. faecalis* 74 kodlu ve klinik kökenli *E. faecalis* 114 kodlu ile 2 adet *E. faecalis* kontrol suşu (*E. faecalis* ATCC 29212 ve *E. faecalis* ATCC OG1RF) Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı bünyesindeki kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Stok kültürler, -80°C’de %15 gliserol ilave edilen Tryptic Soy Broth (TSB) sıvı besin ortamında saklanmıştır. Çalışma süresince kullanılan kültürler, stok solüsyonlarından alınarak 1/10 oranında TSB sıvı besin ortamına inoküle edilmiş ve statik koşullarda 37°C’de 1 gece geliştirildikten sonra denemeye alınmıştır.

Planktonik formdaki *E. faecalis* örnekleri TSB (Trypticase Soy Broth) ortamında geliştirilirken, biyofilm üretimi çalışmalarında gelişme ortamına %1 oranında Glukoz ilave edilmiştir.

#### 4.1.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLER

Çizelge 4.1. Tryptic Soy Broth (TSB) ve Agar (Merck, Germany)

İçerik	Miktar
Pepton (Kazein’den)	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 yine dH<sub>2</sub>O ile 1000 ml’ye tamamlanır. Besiyerinin pH’sı 7,3 ± 0,02’ye ayarlanıp kullanıma hazır hale getirmek amacıyla otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilir. Su banyosunda 50°C’ye kadar soğutulup steril çalışma kabini içerisinde Petri plakalarına dökülür.

Soğumaya bırakılan Petri plakaları daha sonra steril koşullarda paketlenip 4°C’de muhafaza edilir.

Çizelge 4.2. Fosfatla Tamponlanmış Tuz Çözeltisi (PBS)

İçerik	Miktar
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 distile su ile 1000 ml’ye tamamlanarak çözüldükten sonra, 121°C’ de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilir.

Çizelge 4.3. Glukoz Çözeltisi (%5)

İçerik	Miktar
Glukoz	5 g

100 ml distile su eklenip iyice çözünmesi sağlandıktan sonra, 121°C’ de 15 dakika süre ile otoklavda sterilize edilir.

Çizelge 4.4. Kristal Viyole Çözeltisi (%1)

İçerik	Miktar
Kristal Viyole	1 g

Boya 100 ml distile su içerisinde çözülür. Hazırlanan boya herhangi bir sterilizasyon işlemi uygulanmadan kullanılır.

Çizelge 4.5. TE Çözeltisi (0,5 M)

İçerik	Miktar
Tris/HCl	1,21 g
EDTA	0,37 g



1000 ml distile su eklenip iyice çözünmesi sağlanır ve pH'sı  $7,3 \pm 0,02$ 'ye ayarlanıp otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir.

Çizelge 4.6. EDTA Stok Çözeltisi (0,5 M)

İçerik	Miktar
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	186,12 g

1000 ml distile su eklenip iyice çözünmesi sağlanır ve pH'sı  $7,3 \pm 0,02$ 'ye ayarlanıp otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir.

Çizelge 4.7. Stok TBE Çözeltisi (5X)

İçerik	Miktar
Tris-base	54 g
Borik asit	27,5 g
0.5 M EDTA Stok	20 ml

Ortam içerikleri üzerine 1000 ml distile su eklenip iyice çözünmesi sağlanır ve pH'sı  $7,3 \pm 0,02$ 'ye ayarlanıp otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir.

Çizelge 4.8. Glasiyal Asetik Asit Çözeltisi (%33)

İçerik	Miktar
Glasiyal asetik asit	33 ml

67 ml suya 33 ml asit eklenir ve iyice karıştırılır.

Çizelge 4.9. Metanol Çözeltisi (%95)

İçerik	Miktar
Metanol	95 ml

Ölçülen hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Çizelge 4.10. SDS Çözeltisi (%10)

İçerik	Miktar
Sodyum dodecil sülfat	10 g

80 ml su ile iyice çözünmesi sağlanır ve ardından çözelti 100 ml'ye tamamlanır.

Çizelge 4.11. Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol Çözeltisi

İçerik	Miktar
Fenol	25 ml
Kloroform	24 ml
İzoamil alkol	1 ml

Çizelge 4.12. Sodyum Klorür-EDTA-Tris (SET) Çözeltisi

İçerik	Miktar
NaCl	5,84 g
Tris base	1,21 g
EDTA	0,29 g

İçerikler 1000 ml distile su içerisinde çözülür ve pH'sı  $8,0 \pm 0,02$ 'ye ayarlanıp otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika sterilize edilir.

### 4.1.3. ÇALIŞMADA KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER VE ENZİMLER

#### 4.1.3.1. Kanamisin

Kanamisin (Sigma-Aldrich) stok çözeltisi 1000X konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 0,5 g kanamisin 10 ml distile suda çözdürüldükten sonra,  $0,22\mu\text{m}$  por çapındaki membran filtreden geçirilmiş ve önceden sterilize edilmiş mikrofuj tüplerine dağıtılmıştır. Stok çözelti  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Antibiyotik, test ortamında  $30\ \mu\text{g/ml}$  konsantrasyonunda kullanılmıştır.

#### **4.1.3.2. Tetrasiklin**

Tetrasiklin (Sigma-Aldrich) stok çözeltisi 1000X konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 40 mg tetrasiklin 8 ml (%95) etanol içerisinde çözündürüldükten sonra, 0,22µm por çapındaki membran filtreden geçirilmiş ve önceden sterilize edilmiş mikrofuj tüplerine dağıtılmıştır. Stok çözelti -20°C'de saklanmıştır. Tetrasiklin antibiyotiği çalışmalar ve saklama aşamalarında ışıktan korunmuştur. Antibiyotik, test ortamında 30 µg/ml konsantrasyonunda kullanılmıştır.

#### **4.1.3.3. Ampisilin**

Ampisilin (Sigma-Aldrich) stok çözeltisi 1000X konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 0,4 g ampisilin 8 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra, 0,22µm por çapındaki membran filtreden geçirilmiş ve önceden sterilize edilmiş mikrofuj tüplerine dağıtılmıştır. Stok çözeltisi -20°C'de saklanmıştır. Antibiyotik, test ortamında 10 µg/ml konsantrasyonunda kullanılmıştır.

#### **4.1.3.4. Nalidiksik asit**

Nalidiksik asit (Sigma-Aldrich) stok çözeltisi 1000X konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 0,30 g nalidiksik asit 10 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra, 0,22µm por çapındaki membran filtreden geçirilmiş ve önceden sterilize edilmiş mikrofuj tüplerine dağıtılmıştır. Stok çözelti -20°C'de saklanmıştır. Antibiyotik, test ortamında 30 µg/ml konsantrasyonunda kullanılmıştır.

#### **4.1.3.5. Proteinaz K**

Proteinaz K enzimi (Sigma-Aldrich) 1000X konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 0,10 g proteinaz K, 10 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra, 0,22µm por çapındaki filtreden geçirilmiş ve önceden sterilize edilmiş mikrofuj tüplerine dağıtılmıştır. Stok çözelti -20°C'de saklanmıştır.

#### 4.1.3.6. RNaz A

RNaz A enzimi (Sigma-Aldrich) 1000X konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 0,10 g RNaz A, 10 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra, 0,22µm por çapındaki filtreden geçirilmiş ve önceden sterilize edilmiş mikrofüj tüplerine dağıtılmıştır. Antibiyotik stok çözelti -20°C’de saklanmıştır.

#### 4.1.3.7. DNaz I

DNaz I enzimi (Sigma-Aldrich) ticari olarak sağlanan 1000 U/ml konsantrasyonundan dilüe edilerek, test ortamlarında 100 U/ml olacak şekilde kullanılmıştır.

#### 4.1.3.8. Benzonaz®

Benzonaz® enzimi (Sigma-Aldrich) ticari olarak sağlanan 250 U/µl konsantrasyonundan dilüe edilerek, test ortamlarında 2 U/µl olacak şekilde kullanılmıştır.

## 4.2. YÖNTEM

### 4.2.1. PLANKTONİK HÜCRELERİN EDNA ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ

Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri 400 ml uygun besi ortamlarında ve optimum üreme koşullarında 24 saat süresince geliştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler çöktürülmüş ve süpernatantta bulunan eDNA miktarı ölçülmüştür. Bu işlem kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Steril 1,5 ml’lik mikrofüj tüplerine alınan aktif kültürlerle santrifüj uygulaması ile hücreler çöktürülmüş ve üst sıvı steril bir mikrofüj tüpüne aktarılıp, 50 µl fenol/kloroform/izoamil alkol ile karıştırılmıştır. Hassas bir şekilde karışması sağlandıktan sonra 10 dk. 12000 rpm’de santrifüj işlemi uygulanmış ve 700 µl üst sıvı, 70 µl NaCl (2,5 M) ve 1400 µl etanol (%96) karıştırılarak -20°C’ de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün, santrifüj uygulaması (4°C, 12000 rpm, 25 dk.) ile DNA çöktürülmüş ve vakumlu santrifüj cihazında (Thermo Fisher Scientific, DNA SpeedVac System) 43°C’ de 3 dk. süresince kurutulmuştur. Kurutulan çökelti 100 µl TE tamponu içerisinde çözülmüştür.

Çalışmamızda izole edilen bütün eDNA örnek konsantrasyonları Quant-iT PicoGreen® dsDNA reaktifi ile ölçülmüştür. Bu amaçla örnekler taze hazırlanmış solüsyon ile karıştırılmış (1 µl PicoGreen boyası 199 µl TE tampon içerisinde dilüe edilmiştir) ve DNA örneği ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra eDNA konsantrasyonu spektrofotometrede

ölçülmüştür. Farklı zaman aralıklarında üretilen eDNA miktarının optimal tayini için, *E. faecalis* örnekleri ile 2 paralel 3 tekrar olacak şekilde çalışılmıştır (118).

Planktonik hücreler tarafından üretilen eDNA örnekleri üzerine çeşitli enzimlerin etkilerinin araştırılması çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacı ile planktonik hücrelerin ürettiği eDNA, fenol:kloroform çöktürmesi yöntemi ile izole edilmiştir. Kısaca; uygun besi ortamları kullanılarak 37°C’ de bir gece geliştirilen kültürler çöktürüldükten sonra (12000 rpm, 15 dk.) üst faza kloroform/izoamil alkol ve fenol/kloroform/izoamil alkol ilaveleri yapılarak her ilave sonrası santrifüj basamakları gerçekleştirilmiştir. Ardından, izopropanol ilave edilen tüpler beyaz çökelti oluşuncaya kadar karıştırılmış ve 20 dakika süresince -20°C’de inkübe edilmiştir. 12000 rpm’de 5 dk. santrifüj işlemi takiben üst sıvı uzaklaştırılmış ve %70’lik etanolden 350 µl ilave edilerek 12000 rpm’de 5 dk. santrifüj işlemi uygulanmıştır. Üst sıvı dikkatli bir şekilde ortamdan uzaklaştırılmış ve hücre dışı DNA olması muhtemel örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Son aşamada DNA çökeltisi 100 µl TE tampon içerisinde çözülmüş ve çalışılana kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir (119).

#### **4.2.2. PLANKTONİK HÜCRELERDEN GENOMİK DNA İZOLASYONU**

Aktif bakteri kültürlerinden, uygun gelişme ortamlarına %1 oranında inokülasyon yapılmış ve 37°C’ de statik koşullarda bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre bitiminde örnekler 15 ml’lik falkon tüplere alınarak 6000 rpm’de 20 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı dökülmüş ve çökelti 500µl TE tampon içerisinde pipetleme yapılmak suretiyle iyice çözülerek, 14000 rpm’de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Üst sıvı döküldükten sonra, çökelti 500µl SET tampon içerisinde çözülmüş ve üzerine 50µl lizozim eklenerek 37°C’ de 30 dakika su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Hücre süspansiyonu iki mikrosantrifüj tüpüne bölünerek her tüpe ayrı ayrı 200µl TE tamponu ve 30µl SDS (%20) eklenmiştir. Bu aşamada elde birkaç kez nazikçe alt-üst edilen süspansiyona, 100µl 5M NaCl eklenmiş ve hemen karıştırılmıştır. Ardından tüplerin içindeki süspansiyon miktarı ile eşit hacimde (~500µl) fenol eklenerek emülsiyon oluşana kadar iyice karıştırılmıştır. Ortam 12000 rpm’ de +4°C’ de 15 dk. santrifüj edilmiş ve fazların ayrılması sağlanmıştır. Üst faz steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra, her bir tüpe eşit hacimde (~500µl) kloroform/izoamil alkol eklenerek nazikçe karıştırılmış ve 12000 rpm’ de 15 dk. +4°C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan üst faz toplanmış ve 2 katı kadar hacimde soğuk etanol (%96) eklenerek yeniden 14000 rpm’ de +4°C’ de 15 dk.

santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra etanol dökülmüş, oda sıcaklığında kurutulan çökelti 100 µl TE tamponda çözülmüştür. İzole edilen genomik DNA'ların kontrolü %1 oranında agaroz içeren jeller kullanılarak gerçekleştirilen elektroforez basamağının ardından, jellerin EtBr ile boyaması ve UV ışık altında görüntülenmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir (120).

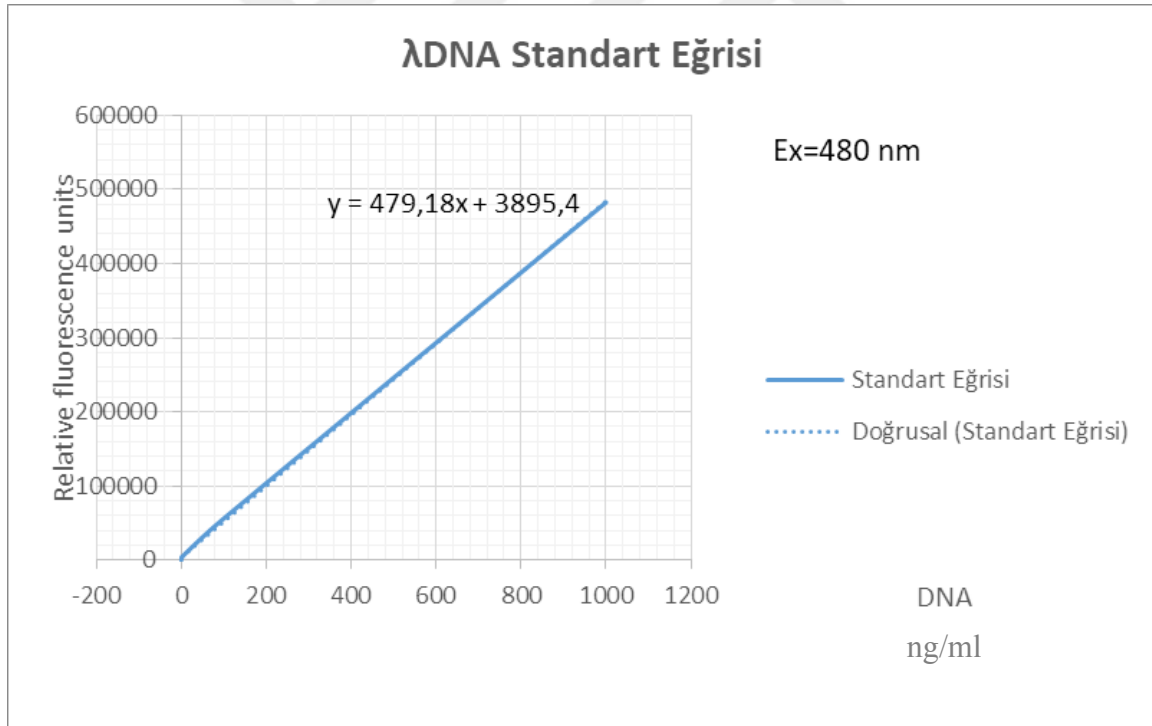
#### **4.2.3. BAKTERİLERİN BİYOFİLM ÜRETİM DÜZEYLERİNİN VE BİYOFİLM YAPISINDA BULUNAN EDNA MİKTARININ BELİRLENMESİ**

*E. faecalis* suşları tarafından üretilen biyofilm ve eDNA miktarının tayini, 96-kuyulu polistiren plakalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (118). Bir gece boyunca uygun besiyerinde geliştirilen kültürlerden, bakteri son konsantrasyonu OD<sub>595</sub>= 0,07 ABS olacak şekilde TSB besiyerinde dilüsyonlar hazırlanmış ve ardından bu ortamlar, biyofilm oluşumu için inkübasyona tabi tutulmuştur. Üretilen biyofilm ve eDNA miktarlarının belirlenmesi amacı ile 4, 12 ve 24. saatlerde spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Çalışılan 96 kuyulu plaka düzenlenmesi her örnek ve her zaman dilimi için 3 tekrar olacak şekilde ayarlanmış ve eDNA ölçümleri için 3, biyofilm ölçümleri için ise 5 kuyu ayrılmıştır. Bu amaçla hem biyofilm hem de üretilen eDNA miktarının hesaplanması çalışmalarında, ilk olarak kuyulardaki süpernatant uzaklaştırılmış, biyofilm yapısı PBS ile yıkanmış ve biyofilm ölçümünde kullanılan kuyular 1 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Ortamda bulunan eDNA'nın hesaplanması amacı ile kuyulara 100 µl TE tampon ve ardından 100 µl taze hazırlanmış PicoGreen solüsyonu aktarılmış ve pipetlemek suretiyle karıştırılmıştır. Floresan ışığa okunmadan önce (Wallace Victor 3, 1420 Multicolor, PerkinElmer) PicoGreen solüsyonu içeren kuyular karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 3-5 dk. inkübe edilmiştir. Her çalışma için standart eğri oluşturmak amacı ile Lambda (λ) DNA kullanılmıştır. Standart eğri grafiği oluşturulurken kit ürünü olan 100 µg/ml lambda DNA yine kit ürünü olan TE tampon ile 2 µg/ml'ye seyreltildikten sonra, standart eğri oluşturmak için Çizelge 4.13'de belirtilen konsantrasyonlara seyreltilmiştir.

Çizelge 4.13. Standart eğri grafiği oluşturmak amacıyla kullanılan λDNA dilüsyonları

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

Her bir konsantrasyon 3 paralel 3 tekrar olacak şekilde λDNA 1:1 oranında PicoGreen solüsyonu ile belirtilen biçimde muamele edilerek PerkinElmer cihazı ile ölçülmüş, RFU değerleri elde edilmiş, standart eğri grafiği oluşturulmuş ve izole edilen eDNA konsantrasyonları aşağıdaki grafik kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. İzole edilen eDNA konsantrasyonlarının belirlenmesinde referans alınan λDNA standart eğri grafiği

Biyofilm miktarının ölçülmesinde ise kristal viyole boyamasından yararlanılmıştır (121). Kuyulardaki üst sıvının uzaklaştırılmasının ardından, tutunmayan veya zayıf tutunan hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile kuyular iki defa 200 µl PBS ile yıkanmış ve biyofilm

yapısı 60°C’de 1 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyularda bulunan biyofilm yapılarının fikse edilmesi amacı ile kuyulara 200 µl metanol (%95) ilave edilerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Fiksasyon aşamasının ardından kuyulara 200 µl kristal viyole çözeltisi eklenerek 15 dk. boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde kuyular 3 defa 300 µl steril su ile yıkanmış ve kuyularda kalan kristal viyole boyası 200 µl glasiyel asetik asit (%33) ile muamele edildikten sonra, optik yoğunlukları (OD<sub>595</sub> nm) ölçülmüştür. Biyofilm üretim özellikleri her suş için yapılan ölçümler sonucunda elde edilen OD değerlerine göre tanımlanmıştır: OD<sub>595</sub><0.120 biyofilm üretmeyen, 0.120<OD<sub>595</sub><0.240 zayıf biyofilm üreticisi, OD<sub>595</sub>>0.240 ise güçlü biyofilm üreticisi olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm üretim düzeylerinin belirlenme çalışmaları 3 paralel 2 tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

#### **4.2.4. BİYOFİLM YAPILARI ÜZERİNE ANTİBİYOTİKLERİN, BENZONAZ’IN VE DNaz I ENZİMİNİN ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Çalışmada kullanılan *E. faecalis* örneklerinin oluşturduğu biyofilm yapılarına antibiyotiklerin ve enzimlerin etkilerinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen bu çalışmada, suşların biyofilm üretimi daha önce açıklandığı şekilde 96 kuyulu polistiren plakalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan antibiyotikler ve enzimler kuyulara eklenirken son hacim 200 µl olacak şekilde hesaplamalar yapılmıştır. Negatif kontrol kuyuları ise sadece steril PBS ile muamele edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde, PBS ortamının ajan ve enzimlerin biyofilm yapıları üzerine etkilerinin araştırılması için uygun bir çözücü olmadığı belirlenmiştir. Ardından aynı denemeler steril ddH<sub>2</sub>O ile denendiğinde de benzer sonuçlarla karşılaşılmış ve tüm ajanların uygun besiyeri içerisinde dilüe edilerek biyofilm yapılarına muamele edilmesine karar verilmiştir. Kontrol kuyuları ise yalnızca steril besiyeri ile muamele edilmiştir. Biyofilm denemeleri için *E. faecalis* örnekleri 37°C’ de 4, 12 ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde mikropipet yardımı ile kuyulardaki üst sıvı dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Tutunmayan bakterilerin uzaklaştırılması amacı ile her kuyunun steril besiyeri ile yıkanmasının ardından, kuyulara 200 µl uygun antibiyotik, DNaz I, Benzonaz ya da antibiyotik+DNaz I, antibiyotik+Benzonaz solüsyonları ilave edilerek 37°C’ de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun bitiminde, kuyularda bulunan solüsyonlar mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve kuyu içeriği 200 µl besiyeri içerisinde çözüldükten sonra, PBS içerisinde seri dilüsyonları yapılarak uygun besi ortamlarına 10’ar µl damlatılmıştır. 37°C’de 18 saat inkübasyonun ardından oluşan koloniler sayılmak



suretiyle CFU (kob=koloni oluşturma birimi) hesaplamaları yapılmıştır. Her bir deneme en az 3 paralel ve iki tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak değerlendirme yapılmıştır. Bu çalışmada hiçbir ajan ile muamele edilmemiş biyofilm yapısından gerçekleştirilen CFU hesaplamaları kontrol olarak kullanılmıştır.

Temel prensipte bu yöntem, 96 kuyulu plakalarda geliştirdiğimiz biyofilmlerin inkubasyonundan sonra, sadece yüzeye tutunmuş hücreleri elde etmek amacıyla, kuyular 1X PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kuyulara 200 µl steril 1X PBS eklenmiş ve bakteri hücreleri kazınmıştır. Biyofilm yapısı kuyulardan kazındıktan sonra n çalışmalarda belirlenmiş oranda seri dilüsyonları yapılmaktadır. Seri dilüsyonlardan sonra örnekler damlatma yöntemiyle katı besi yerleri üzerine damlatılmıştır. Inkubasyondan sonra gelişen hücrelerin bekletmeden sayımı yapılmıştır.

Kullandığımız yöntemde ardışık iki dilüsyondan yapılan ekim sonuçlarından hareketle ve ağırlıklı aritmetik ortalama ile örnekteki koloni sayısı hesaplanmaktadır. Bu hesaplamada kullanılan formül;

$N = C / [V (n_1 + 0,1 X n_2) X d]$  şekindedir ve 3-300 arasındaki koloni sayımları dikkate alınmaktadır.

Bu formüldeki öğelerin anlamları şu şekildedir;

N: Damlatılan örnekteki mikroorganizma sayısı

C: Sayımı yapılan tüm agar plakalarındaki toplam koloni sayısı

V: Damlatılan rneğin hacmi

n<sub>1</sub>: İlk dilüsyondan yapılan sayımlarda sayım yapılan agar plakaları adedi

n<sub>2</sub>: İkinci dilüsyondan yapılan sayımlarda sayım yapılan agar plakaların adedi

d: Sayımın yapıldığı ardışık 2 seyreltiden daha konsantre olanın seyreltme oranıdır (122).

#### **4.2.5. BİYOFİLM YAPISINDAN EDNA’NIN İZOLASYONU**

*E. faecalis* rnekleri tarafından üretilen biyofilm yapısındaki eDNA’nın izole edilmesi ve miktarının hesaplanması amacı ile, bakteri örneklerinin biyofilm üretimleri 35-mm çaplı Petri plakalarında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bakteri örnekleri uygun besi ortamı ve inkubasyon sıcaklıklarında bir gece geliştirildikten sonra, 35-mm çapındaki Petri plakalarına

7.5 CFU/ml bakteri olacak şekilde inoküle edilmiş ve 37°C’ de 4, 12 ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde üst sıvı ortamdan uzaklaştırılmış, biyofilm yapısı 3 defa steril PBS ile nazikçe yıkanmıştır. Petri plağı içerisinde bulunan biyofilm yapısı, 500 µl PBS içerisinde pipet yardımıyla çözüldükten sonra, içerisinde üç adet steril cam boncuk bulunan steril cam tüplere aktarılarak manyetik karıştırma uygulaması ile bakteri hücrelerinin gömülü oldukları hücre dışı matriksten ayrılması ve matriks yapısının parçalanarak eDNA’ların ortama salınması sağlanmıştır. Bu süspansiyon 45 µm por çaplı membran filtreden geçirilerek bakteri hücrelerinin uzaklaştırılması sağlandıktan sonra, daha önce Maniatis vd., (1982) tarafından uygulanan fenol:kloroform çöktürmesi ile eDNA izolasyonu “Planktonik hücrelerden eDNA izolasyonu” kısmında açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir (123). İzole edilen eDNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmeye çalışılmış, izolasyonun başarısı PicoGreen ölçümü ile doğrulanmıştır.

#### **4.2.6. İZOLE EDİLEN NÜKLEİK ASİTLERİN DNaz I, RNaz, BENZONAZ VE PROTEİNAZ K İLE MUAMELESİ**

Fenol:kloroform uygulaması ile çöktürülen nükleik asitler; DNaz I (son konsantrasyonu 100 U/ml), RNaz A (son konsantrasyonu 20 µg/ml), Proteinaz K (son konsantrasyonu 20 µg/ml) ve Benzonaz ile muamele edilmiştir. Benzonaz böyle bir çalışmada ilk defa deneneceği için son konsantrasyon miktarı ön denemelerimiz sonucunda belirlenmiştir. Bu amaçla nükleik asitler son konsantrasyonu 1U/µl ve 2 U/µl Benzonaz ile muamele edilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, 2 U/µl konsantrasyonunda enzim uygulamasının 1 U/µl konsantrasyonunda enzim uygulamasına göre daha etkili olduğu saptanmıştır. Bu sebeple çalışmamıza 2 U/µl konsantrasyonunda Benzonaz kullanılarak devam edilmiştir. Söz konusu enzimler ile muamele edilmeden önce, farklı konsantrasyonlardaki DNA örneklerinin enzimlere karşı vereceği yanıtı gözlemek amacıyla, izole edilen nükleik asitler 20, 50, 100 µg/ml olacak şekilde dilüe edilmiştir. Enzim uygulamasının, enzim uygulanmış ve enzim uygulanmamış nükleik asitler ile karşılaştırılması %0,7 oranında agaroz içeren jelde gerçekleştirilmiştir. Ancak izole edilen nükleik asitlerin agaroz jel sistemlerinde görüntülenmesi denemeleri defalarca tekrarlanmış ve ne yazık ki çok azında sonuç elde edilmiştir. Literatür incelendiğinde araştırmacıların neredeyse tamamının PicoGreen ölçümü ile nükleik asit miktarının tayini şeklinde söz konusu denemeyi gerçekleştirdiği belirlenmiş (118,124–126) ve bu nedenle bizim çalışmamızda da enzim muamelelerinin nükleik asitlere etkisi Bölüm 4.2.1.’de açıkladığımız şekilde PicoGreen ölçümleri ile tanımlanmıştır.

#### **4.2.7. ENZİM MUAMELESİNE TABİ TUTULAN NÜKLEİK ASİTLERİN BİYOFİLM YAPISINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Bir önceki basamakta 20, 50 ve 100 µg/ml olarak dilüe edilmiş ve enzim uygulanmış nükleik asitler, biyofilm oluşumunun  $t_0$  anında biyofilm yapısına eklenmiştir. Bu çalışma şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Bir gecelik aktif *E. faecalis* örneklerinden Bölüm 4.2.3'te açıklandığımız şekilde biyofilm denemeleri kurulmuştur. Bu denemede çeşitli enzimler uygulanmış nükleik asitlerin biyofilm denemelerini gerçekleştirdiğimiz 96 kuyulu mikrotitre plakalarına eklenmesi ise önceden yapılan denemeler sonucunda belirlediğimiz 10 µl hacminde gerçekleştirilmiştir. Biyofilm yapılarının oluşumu için, 37°C'de 24 ve 48 saat süresince inkübasyon işlemi yapılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde daha önce belirttiğimiz şekilde, tutunmayan bakteriler yıkama ile uzaklaştırılıp kristal viyole boyası ile boyanmış ve spektrofotometrik ölçümler (OD<sub>595</sub> nm) yapılarak enzimlerle muamele edilmiş nükleik asitlerin biyofilm üretimi üzerine etkileri belirlenmiştir (84).

#### **4.2.8. İSTATİSTİKİ ANALİZLER**

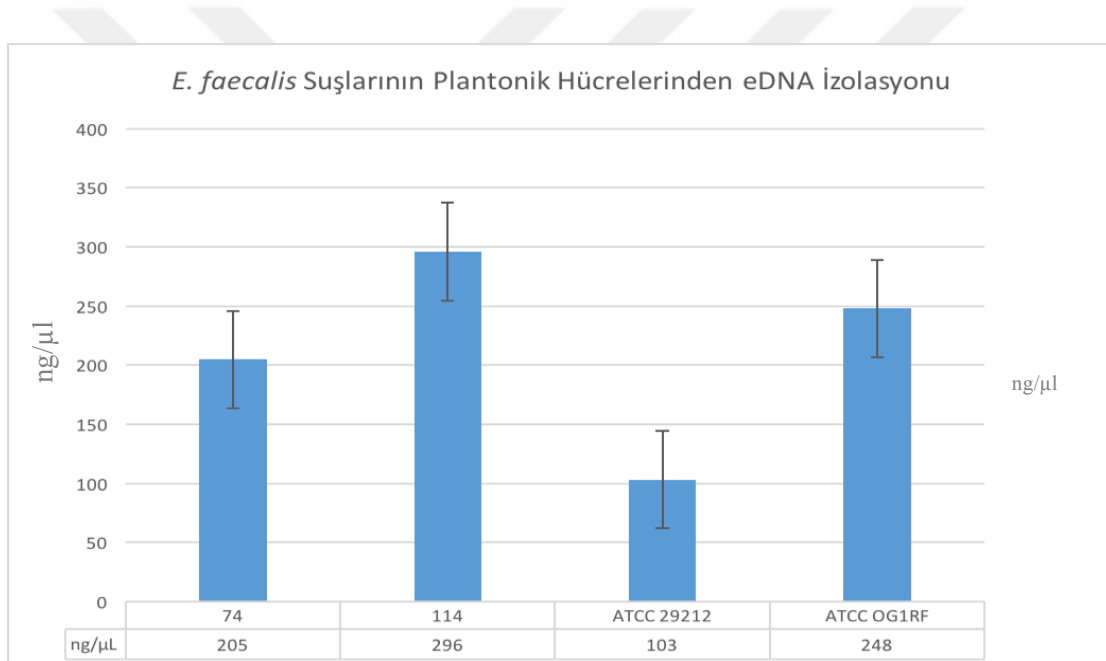
İstatistiki analizlerde, kendi deney şemamızı oluşturmamıza ve farklı grupların birbiriyle karşılaştırılmasını modelleyebilmemize olanak sağlaması nedeniyle, R İstatistik yazılımından yararlanılmıştır (127).

Çalışmamızda yer alan bağımsız değişkenler çok sayıda grup içerdiğinden, deneyler sonucunda elde edilen verilerin doğruluğu Varyans analizi (ANOVA) testiyle incelenmiştir. Anlamlı bulunan gruplar arasındaki değerlendirmeler Tukey'in Doğruluk Önemi Testi'ne göre yapılmıştır.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. PLANKTONİK HÜCRELERİN EDNA ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışmada biyofilm yapısına katılmayan planktonik hücrelerin ortama saldığı hücre dışı DNA'ların (eDNA) miktarlarının hesaplanması; Lambda DNA dilüsyonları ile oluşturulan standart eğri grafiklerine, PicoGreen işaretlemesiyle elde edilen RFU değerlerinin uygulanması suretiyle gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonucunda, *E. faecalis* izolatlarından zayıf üretici olduğunu bilinen ATCC 29212 suşundan diğer Enterekok izolatlarına göre daha az, maksimum biyofilm üretimi yapan klinik kökenli *E. faecalis* 114 suşundan ise daha fazla miktarda eDNA izole edildiği belirlenmiştir (Şekil 5.1.).

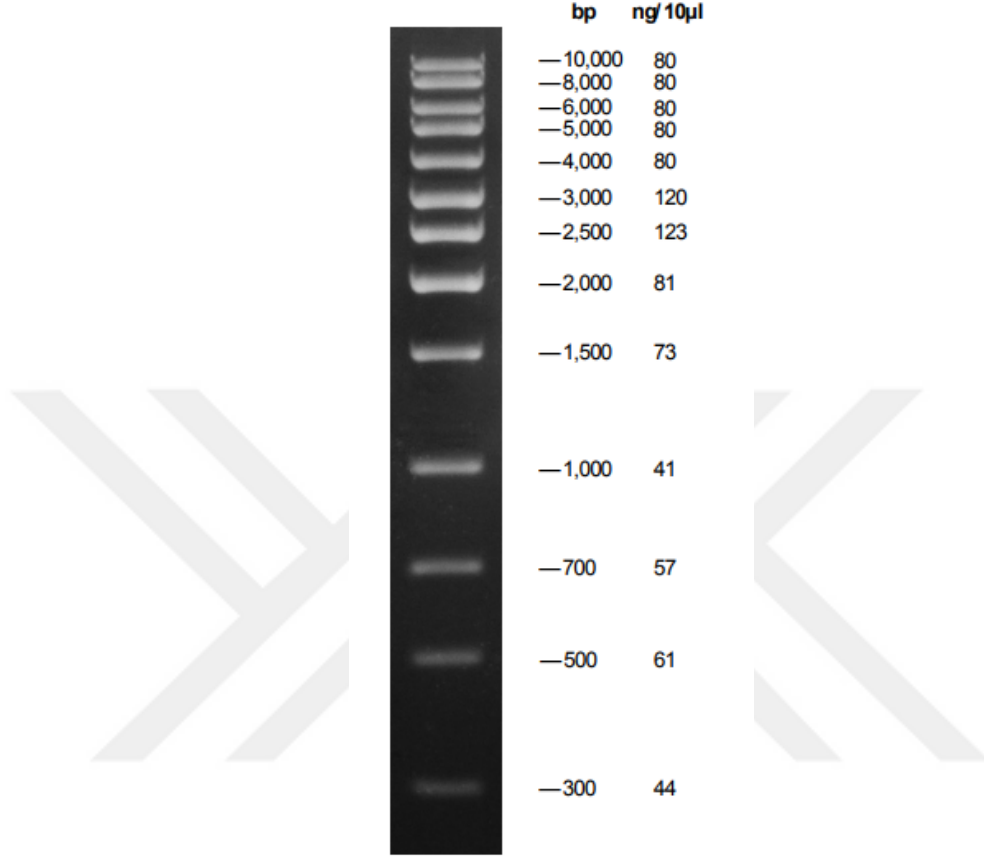


Şekil 5.1. *E. faecalis* suşlarının planktonik formlarının ürettiği eDNA miktarları

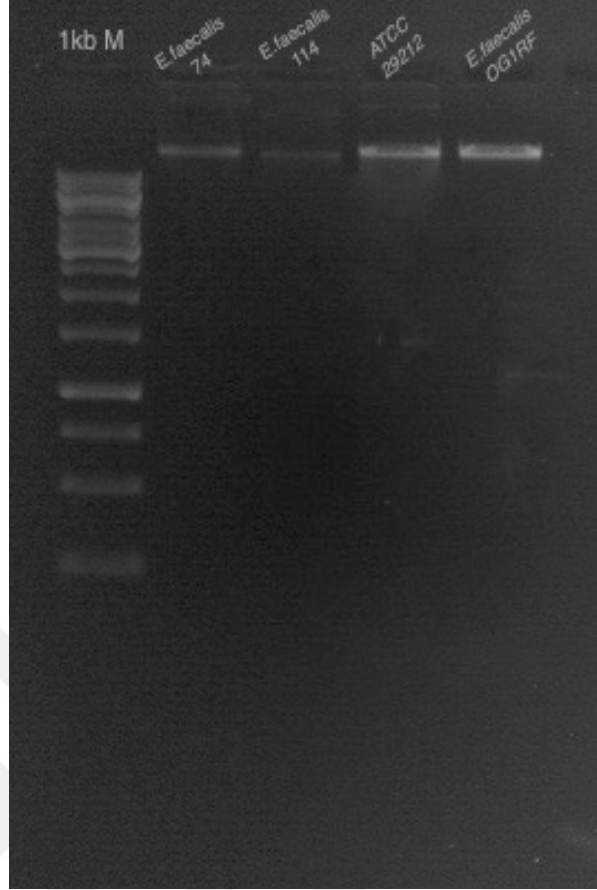
### 5.2. PLANKTONİK HÜCRELERDEN GDNA İZOLASYONU

Safılaştırılan nükleik asitlerin kontrolü, TBE çözeltisi ile hazırlanan %1' lik agaroz jelde, 100 V sabit elektrik akımında 1 saat süreyle örneklerin elektroforez işlemeine tabi tutulması sureti ile yapılmıştır. Elektroforez işleme sonrasında DNA bantları, 0,2 μg/ml etidyum bromid (Sigma Chem. Co. USA) içeren tampon içerisinde 30 dakika boyanmıştır. Boyama işleme bitiminde jeller, 366 nm dalga boyunda ultraviyole (UV) ışıkta incelenmiş ve Syngene GeneGenius Gel Imaging System kullanılarak fotoğrafları alınmıştır. Moleküler büyüklük

tespiti, 1 kb moleküler DNA standartı (Solis BioDyne, Estonia) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.2.). *E. faecalis* suşlarından başarılı bir şekilde genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildiği, agaroz jellerin görüntülenmesi sonucu belirlenmiştir (Şekil 5.3.).



Şekil 5.2. 1 kb marker için referans alınan bant büyüklükleri (128)



Şekil 5.3. *E. faecalis* suşlarının genomik DNA'larının agaroz jel görüntüsü

### 5.3. BİYOFİLM ÜRETİMİNİN VE BİYOFİLM YAPISINDA BULUNAN EDNA MİKTARININ BELİRLENMESİ

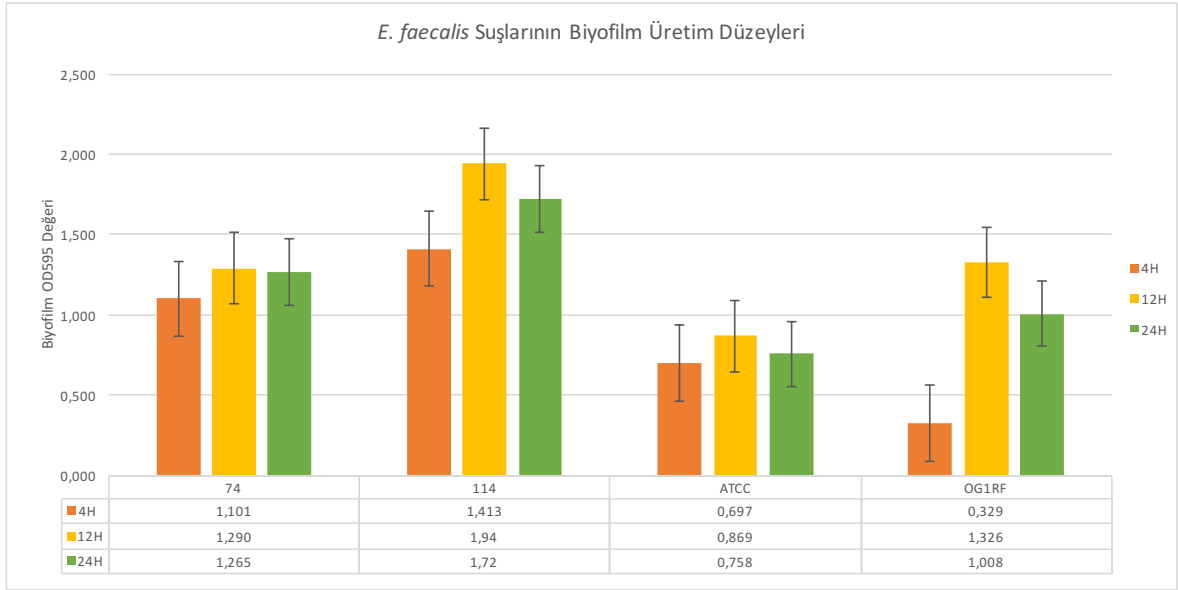
#### 5.3.1. BİYOFİLM ÜRETİM MİKTARININ BELİRLENMESİ

Enterokok suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde ürettikleri biyofilm düzeylerinin belirlenmesinde OD değerleri esas alınarak izolatlar “üretici olmayan, zayıf üretici ve güçlü biyofilm üreticisi” şeklinde gruplandırılmıştır.  $OD_{595} < 0.120$  biyofilm üretmeyen,  $0.120 < OD_{595} < 0.240$  zayıf biyofilm üreticisi,  $OD_{595} > 0.240$  ise güçlü biyofilm üreticisi bakteri örnekleri olarak değerlendirilmiştir (129).

Elde ettiğimiz değerler yorumlandığında, çalışmamızda kullanılan tüm Enterokok suşların biyofilm üretim özelliklerinin zamana bağlı olarak değişim gösterdiği ve inkübasyon süresine bağlı olarak en önemli farklanmanın kontrol suşu *E. faecalis* ATCC OG1RF suşunda ortaya çıktığı saptanmıştır (Şekil 5.4.).

*E. faecalis* ATCC OG1RF suşu 4 saat inkübasyon süresi sonrasında  $OD_{595} = 0.329$  düzeyinde biyofilm üretirken, inkübasyon süresi 24 saate uzatıldığında, biyofilm üretimi  $OD_{595} = 1.008$  düzeyine yükselmiş, yani zayıf düzeyde biyofilm üreticisiyken yüksek düzeyde biyofilm üreticisi haline gelmiştir.

Denemede kullanılan enterokok suşları birbiri ile kıyaslandığında ise, klinik kökenli *E. faecalis* 114 suşunun biyofilm üretim miktarının test edilen diğer Enterokok suşlarının üçünden de daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.4.).



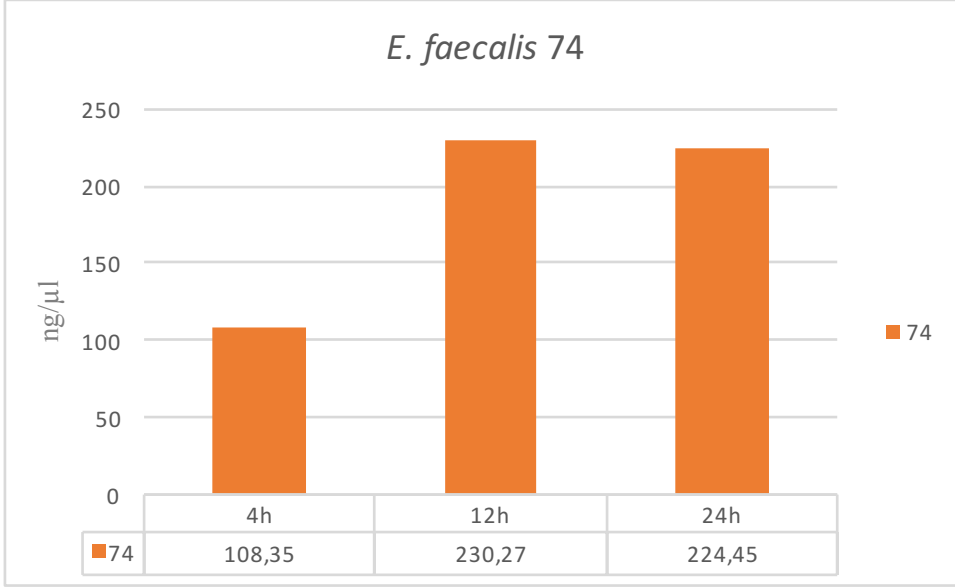
Şekil 5.4. *E. faecalis* suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde oluşturdukları biyofilm miktarlarının spektrofotometrik ölçüm sonuçları

### 5.3.2. BİYOFİLM YAPILARINDAKİ EDNA MİKTARININ BELİRLENMESİ

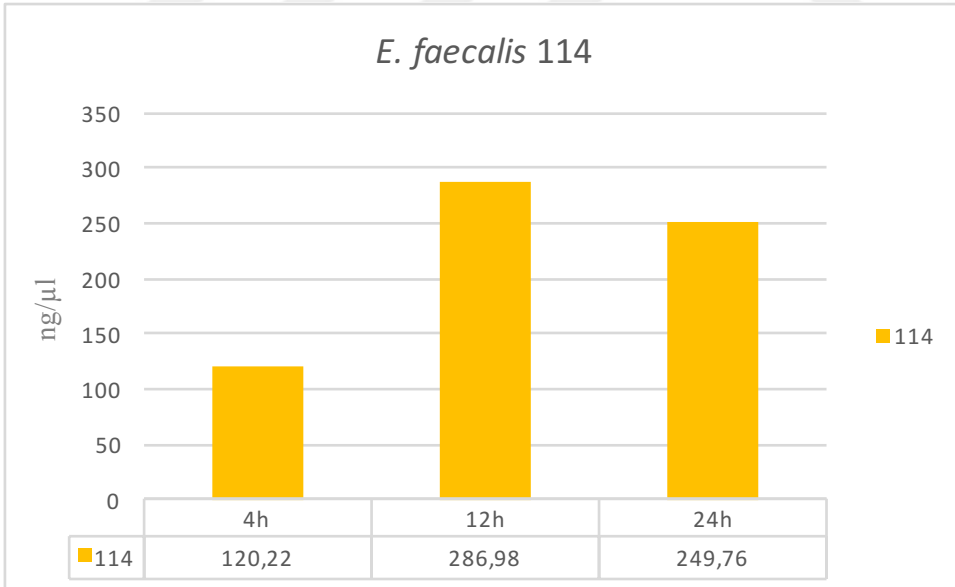
Farklı inkübasyon sürelerinde 96 kuyulu mikrotitre plakalarında geliştirilen biyofilm yapısında bulunan eDNA miktarının belirlenmesi için; 4, 12 ve 24 saat inkübasyon sonucu oluşan biyofilmler PicoGreen floresan işaretleme yöntemiyle boyanarak, eDNA miktarları ölçülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda, *E. faecalis* suşlarının oluşturduğu biyofilmlerdeki eDNA düzeylerinin hem miktar açısından hem de optimum eDNA salım zamanı açısından farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Enterokok suşları kendi aralarında kıyaslandığında, her suş için maksimum düzeyde eDNA izolasyonunun gerçekleştirildiği zaman dilimi farklılık göstermiştir. İncelenen dört örnek

arasında en yüksek eDNA miktarı, 114 kodlu suşun 12 saatlik biyofilm yapısında tespit edilmiştir (Şekil 5.5- 5.8.).

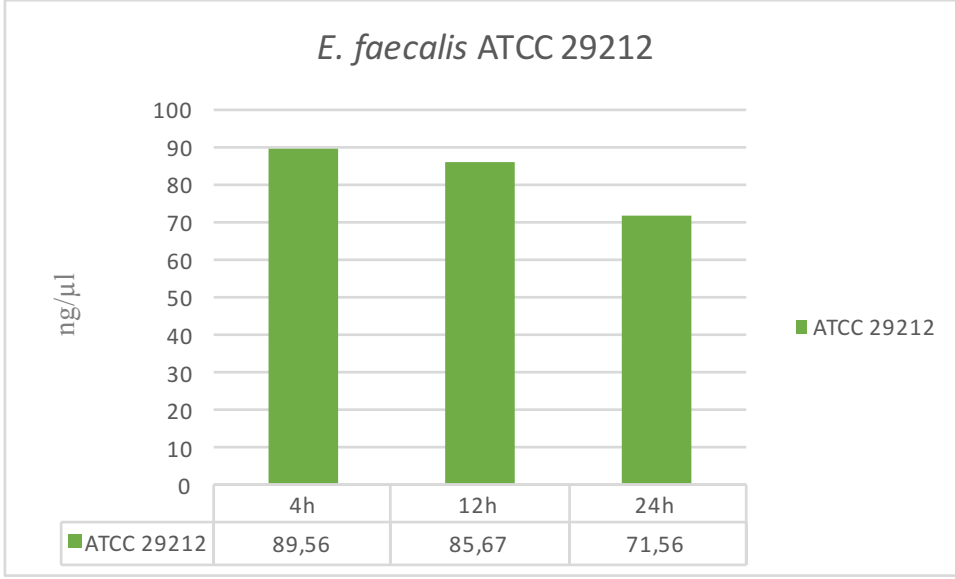


Şekil 5.5. *E. faecalis* 74 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapısındaki eDNA miktarları

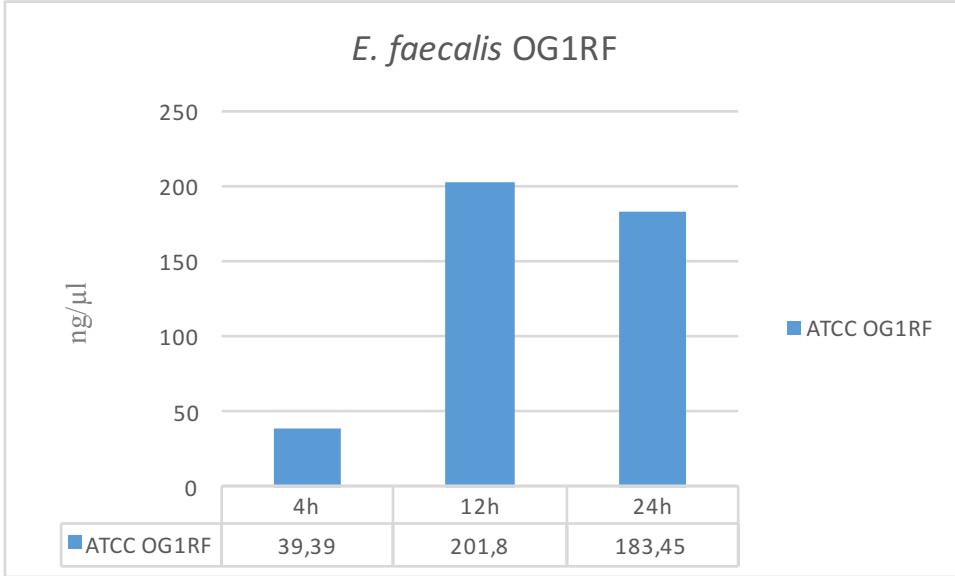


Şekil 5.6. *E. faecalis* 114 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapısındaki eDNA miktarları





Şekil 5.7. *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapısındaki eDNA miktarları



Şekil 5.8. *E. faecalis* OG1RF suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapısındaki eDNA miktarları

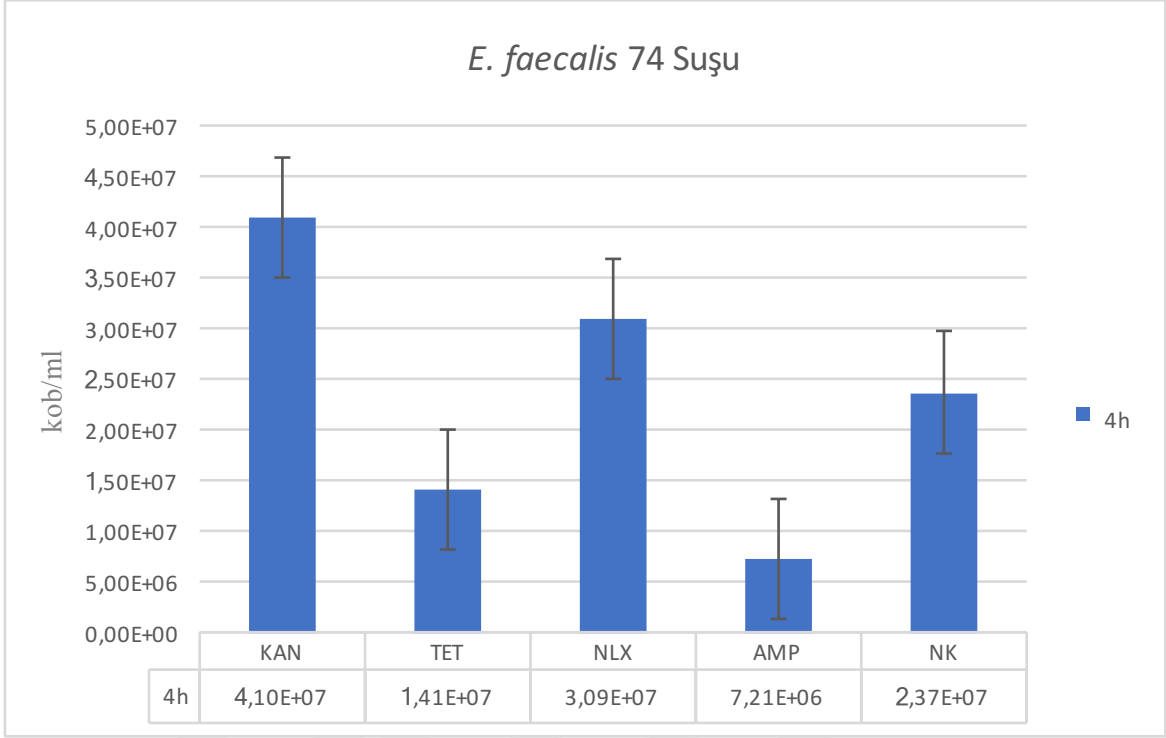
## **5.4. BİYOFİLM YAPILARI ÜZERİNE ANTİBİYOTİKLERİN, BENZONAZ VE DNAZ I ENZİMLERİNİN VE BU ENZİMLERİN ANTİBİYOTİKLERLE OLUŞTURULAN KOMBİNASYONLARININ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

### **5.4.1. BİYOFİLM YAPILARI ÜZERİNE ANTİBİYOTİKLERİN ETKİSİ**

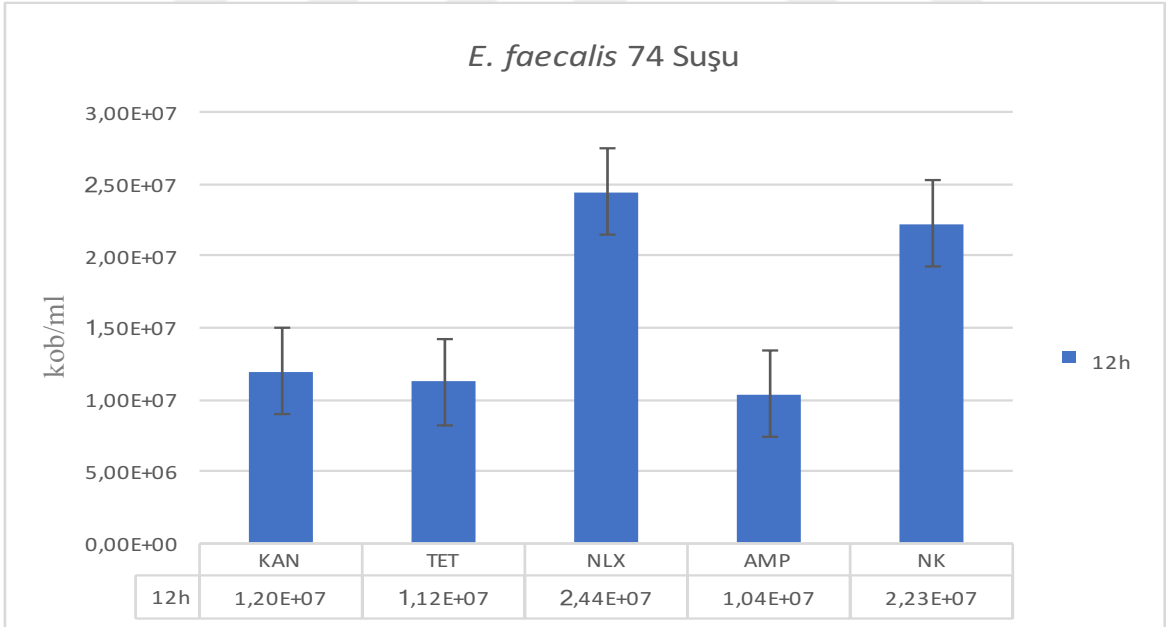
Bu çalışmada, *E. faecalis* örnekleri 4, 12 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda oluşturdukları biyofilm yapıları üzerinde geleneksel antibiyotiklerin (kanamisin, tetrasiklin, nalidiksik asit ve ampisilin) etkileri araştırılmıştır.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, 74 kodlu *E. faecalis* suşunun 4 ve 24 saatlik biyofilmleri üzerine en yüksek düzeyde etkiye sahip olan antibiyotik ampisilin olarak belirlenmiştir. Tetrasiklinin de olgun biyofilm yapısına ampisiline yakın bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Kanamisin ve nalidiksik asit ise test edilen suşun biyofilm yapılarında eradikasyona sebep olmamış, aksine, özellikle kanamisin biyofilm yapısının gelişimini teşvik etmiştir (Şekil 5.9.-Şekil 5.11.).

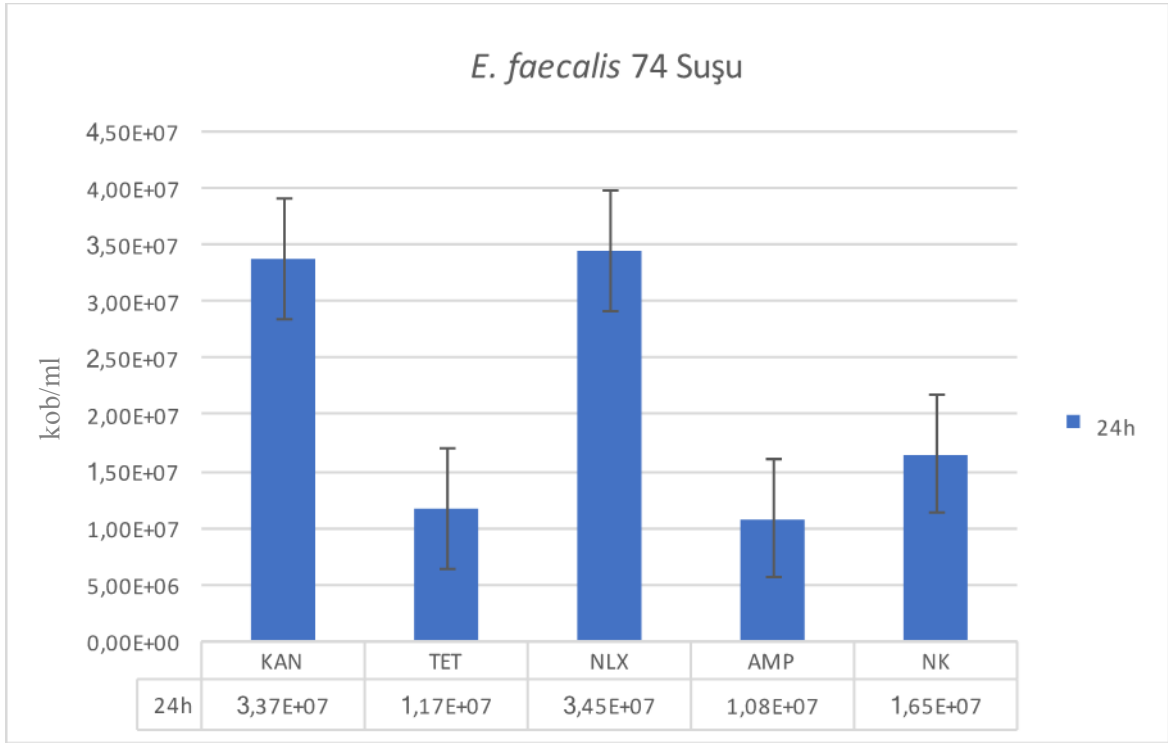
74 kodlu suşun 12 saatlik biyofilm yapısı üzerine en etkili antibiyotik yine ampisilin olurken, nalidiksik asitin biyofilm üzerine eradikasyon etkisinin olmamasının yanı sıra, az da olsa biyofilm gelişimine olumlu katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Kanamisin ve tetrasiklin antibiyotikleri de biyofilm yapısı üzerinde eradikasyon etkisi göstermemiştir (Şekil 5.10.).



Şekil 5.9. *E. faecalis* 74 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri



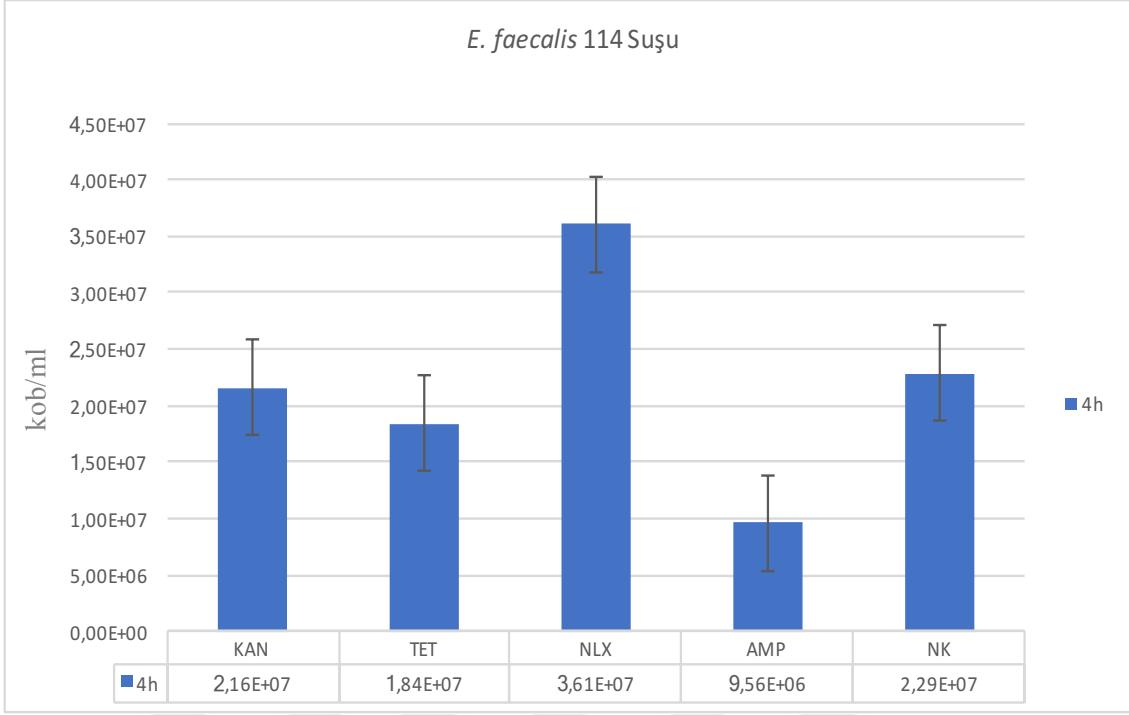
Şekil 5.10. *E. faecalis* 74 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri



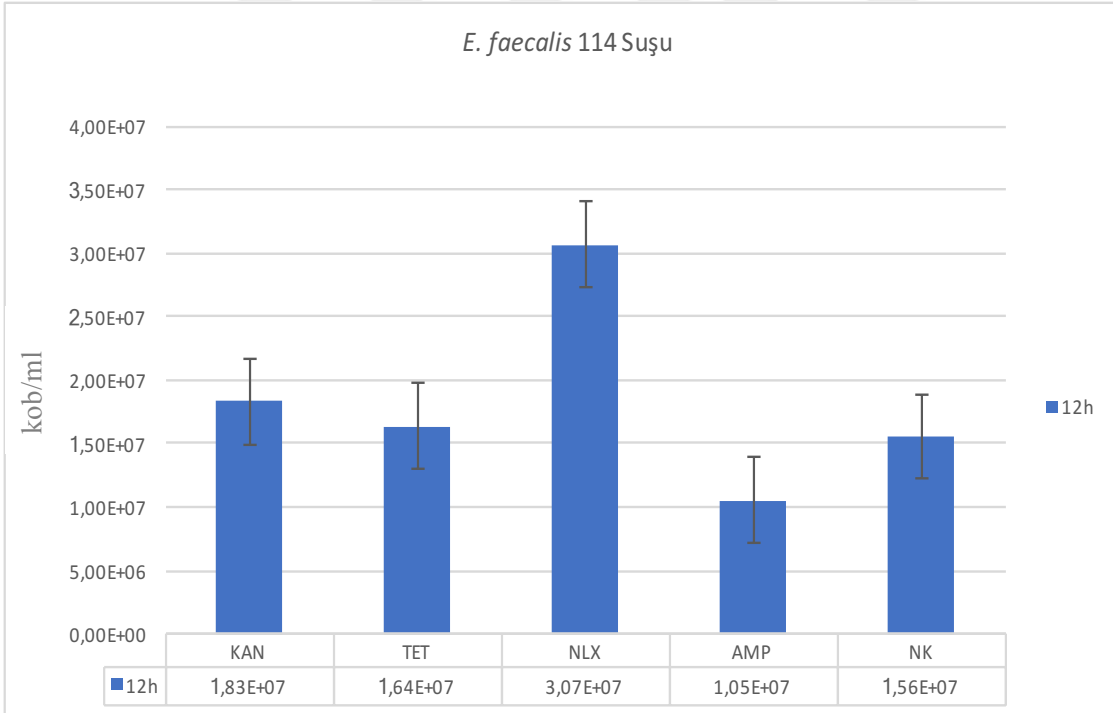
Şekil 5.11. *E. faecalis* 74 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri

*E. faecalis* 74 suşunun biyofilm yapıları üzerine test edilen dört antibiyotiğin etkisini, tüm inkübasyon sürelerini göz önünde bulundurarak özetleyecek olursak, en etkili antibiyotik ilk sırada ampisilin, ikinci sırada tetrasiklin olmuştur. Kanamisin ve nalidiksik asit ise bu suşun biyofilm yapıları ile mücadelede etkin ajanlar olmadığı tespit edilmiştir.

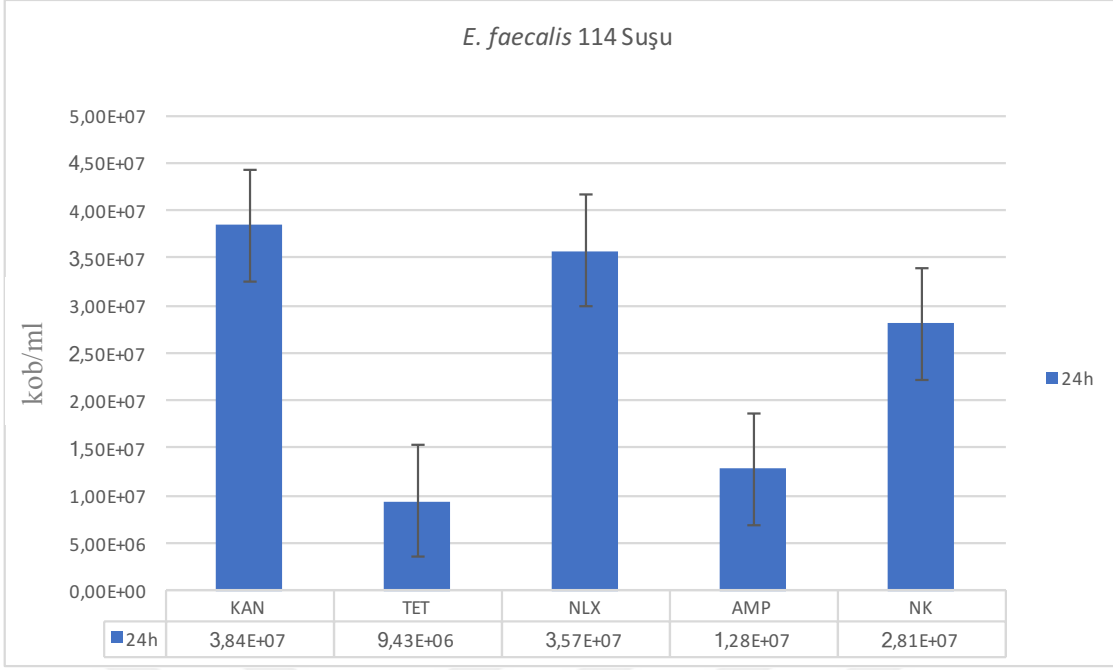
114 kodlu *E. faecalis* suşunu 4 ve 12 saatlik biyofilmlerinde antibiyotiklerin eradikasyon etkileri incelendiğinde, en etkili antibiyotiğin bu suşta da yine ampisilin olduğu görülmüştür. Her iki farklı inkübasyon süresi sonunda oluşan biyofilm yapısı üzerinde kanamisinin neredeyse hiçbir değişikliğe neden olmadığı, nalidiksik asit antibiyotiğinin ise biyofilm miktarını arttırdığı belirlenmiştir. 24 saatlik biyofilmin üzerine yapılan antibiyotik uygulamalarında ise en etkili antibiyotikler tetrasiklin ve ampisilin olurken, kanamisin ve nalidiksik asidin biyofilm gelişimini arttırdığı, ancak bu artışın istatistiki açıdan anlamlı olmadığı saptanmıştır (Şekil 5.12.-5.14.).



Şekil 5.12. *E. faecalis* 114 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri

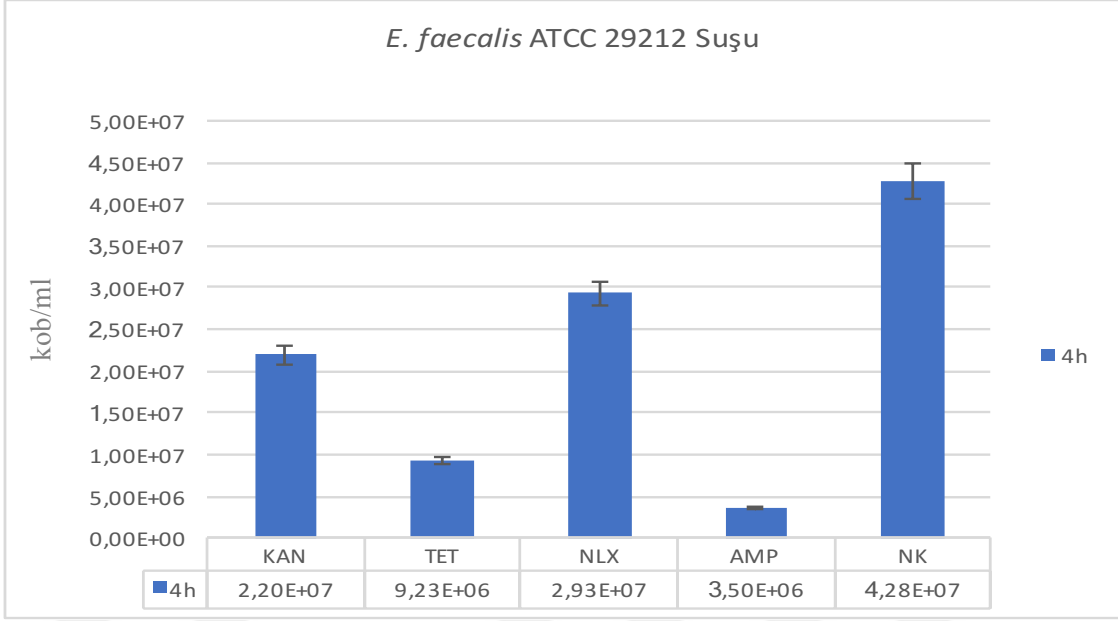


Şekil 5.13. *E. faecalis* 114 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri



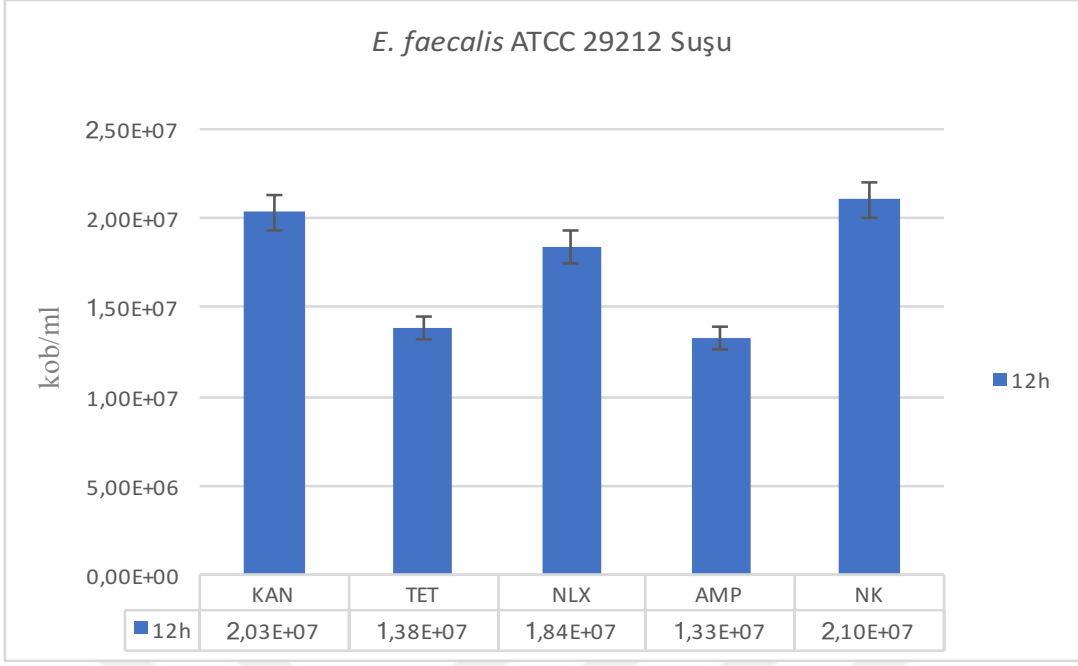
Şekil 5.14. *E. faecalis* 114 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri

ATCC 29212 kodlu kontrol grubu *E. faecalis* suşunun 4 ve 24 saatlik biyofilmlerinde uygulanan antibiyotiklerin eradikasyon etkileri incelendiğinde, en etkili antibiyotik, test edilen diğer suşlarda olduğu gibi yine ampisilin olmuştur. Diğer yandan 24 saatlik biyofilmde nalidiksik asit uygulaması ile biyofilm gelişiminin teşvik edildiği, biyokütle artışının tanımlanması suretiyle tespit edilmiştir (Şekil 5.15.- Şekil 5.17.).

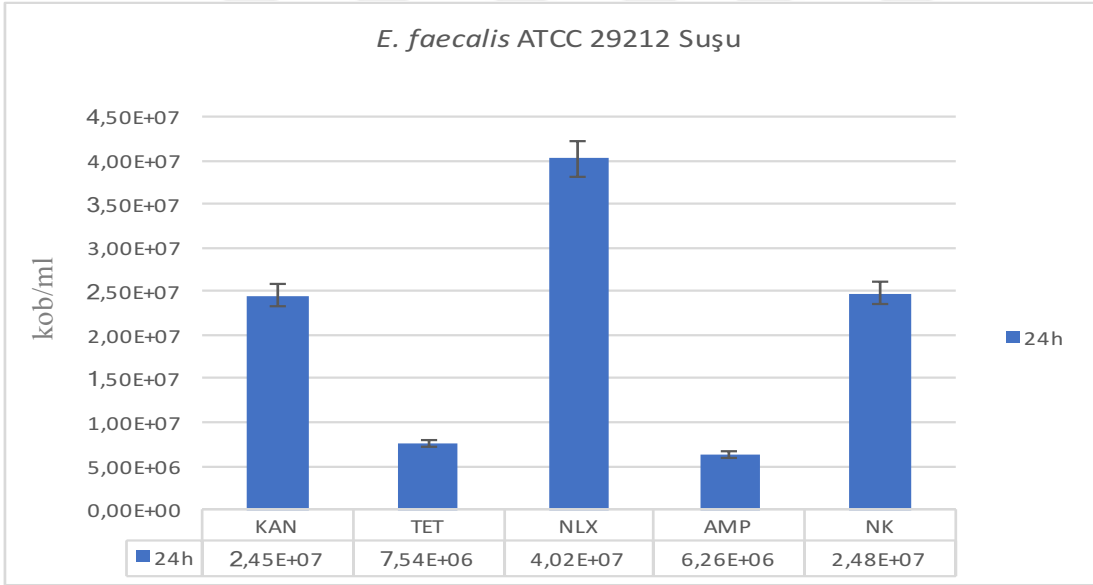


Şekil 5.15. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri

*E. faecalis* ATCC 29212 kodlu suşunun 12 saat inkübasyon sonunda ürettiği biyofilm yapısı üzerine eradikasyon etkisi gösteren iki antibiyotik, diğer enterokok örneklerinde olduğu gibi sırasıyla ampisilin ve tetrasiklin olarak belirlense de bu suştaki etki düzeyleri daha öncekilere oranla çok düşük olarak saptanmıştır. 12 saatlik biyofilm yapısının, nalidiksik asit ve kanamisin antibiyotikleri uygulandığında yine düşük oranda da olsa inhibe edildiği belirlenmiştir (Şekil 5.16.).



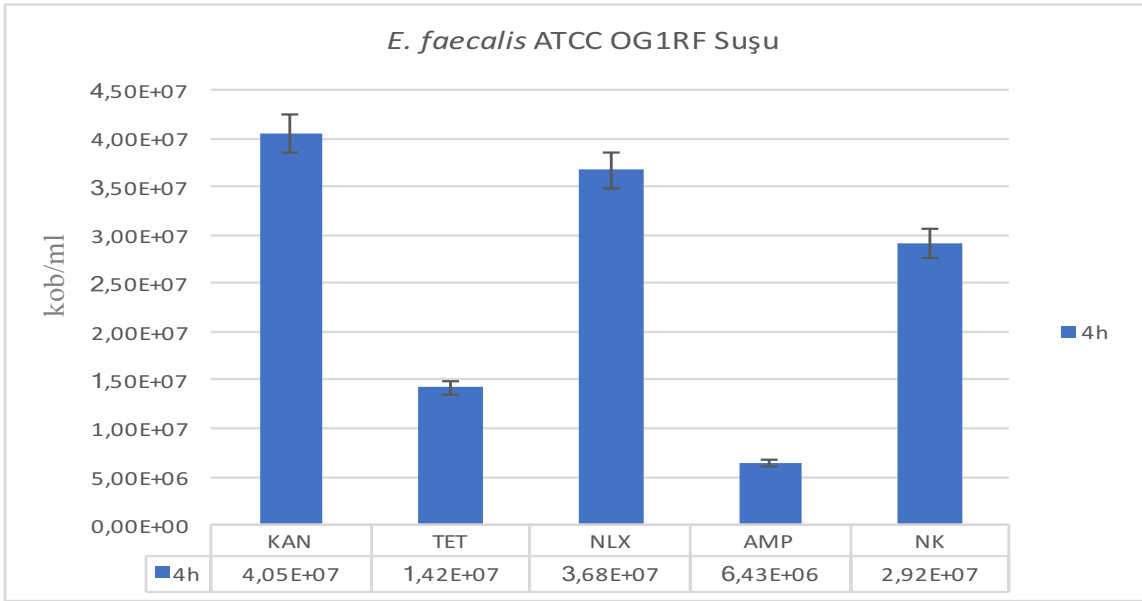
Şekil 5.16. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri



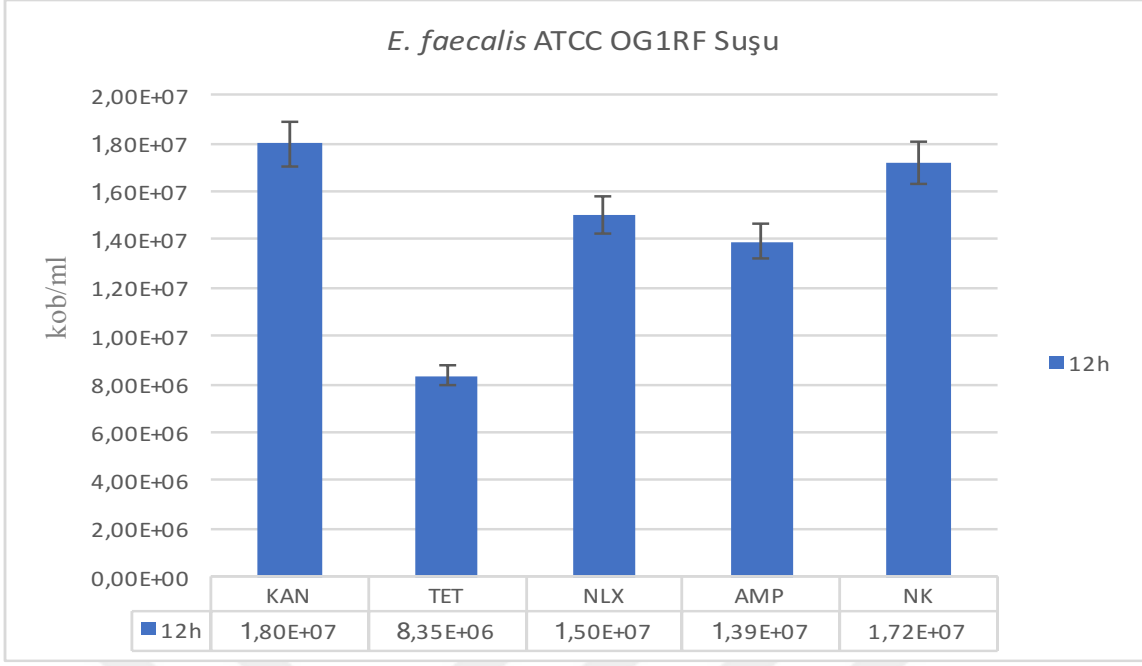
Şekil 5.17. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri



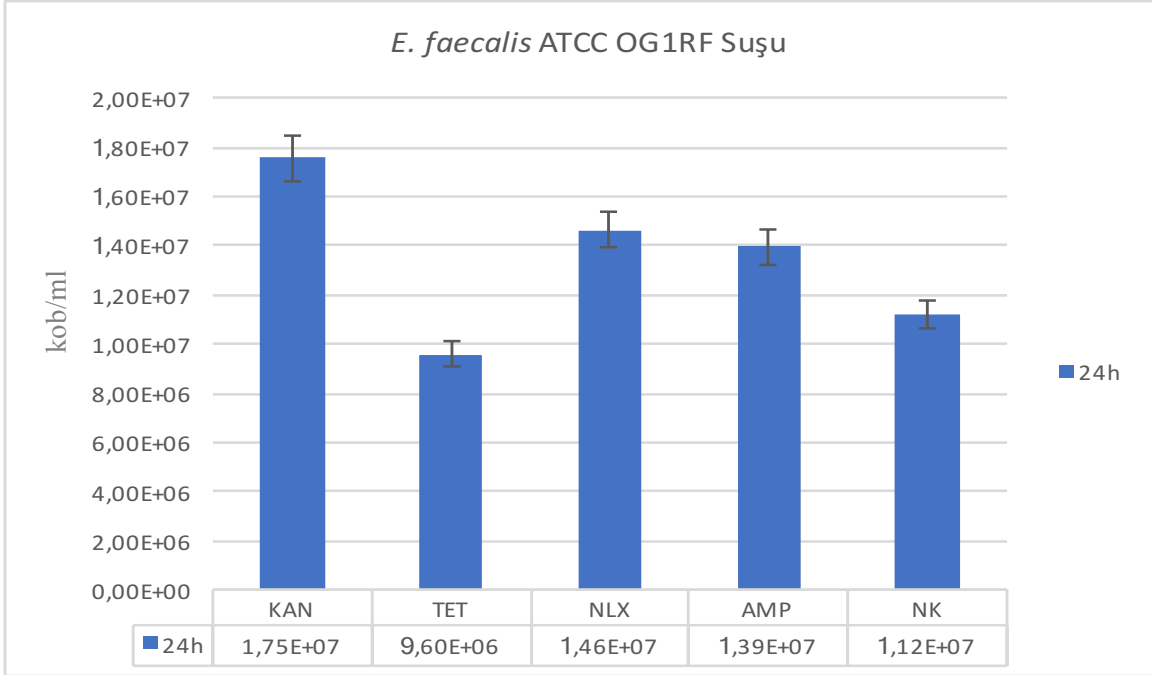
OG1RF kodlu kontrol grubu *E. faecalis* suşunun 4 saatlik biyofilmine uygulanan antibiyotiklerin eradikasyon etkileri incelendiğinde, en etkili antibiyotik yine ampisilin olarak belirlenmiştir. Ancak 4 saatlik biyofilm üzerine kanamisin ve nalidiksik asit antibiyotiklerinin biyofilm miktarını arttırdığı gözlenmiştir. Aynı şekilde 12 saatlik biyofilme kanamisin, 24 saatlik biyofilmlerde ise kanamisin, nalidiksik asit antibiyotikleri ve daha önceki sonuçlarımızdan farklı olarak, ampisilin antibiyotiği biyofilm miktarını arttırmıştır (Şekil 5.18.- Şekil 5.20.).



Şekil 5.18. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri



Şekil 5.19. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri

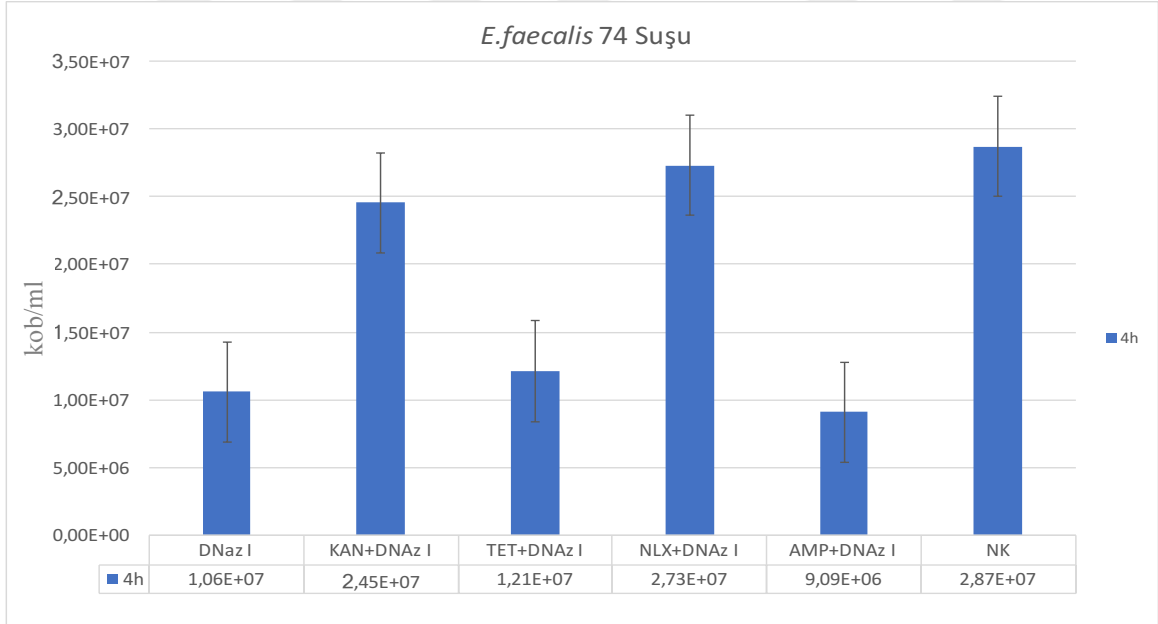


Şekil 5.20. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine antibiyotiklerin etkileri

#### 5.4.2. BİYOFİLM YAPILARI ÜZERİNE BENZONAZ VE DNaz ENZİMLERİNİN VE BU ENZİMLERİN ANTİBİYOTİKLERLE OLUŞTURULAN KOMBİNASYONLARININ ETKİSİ

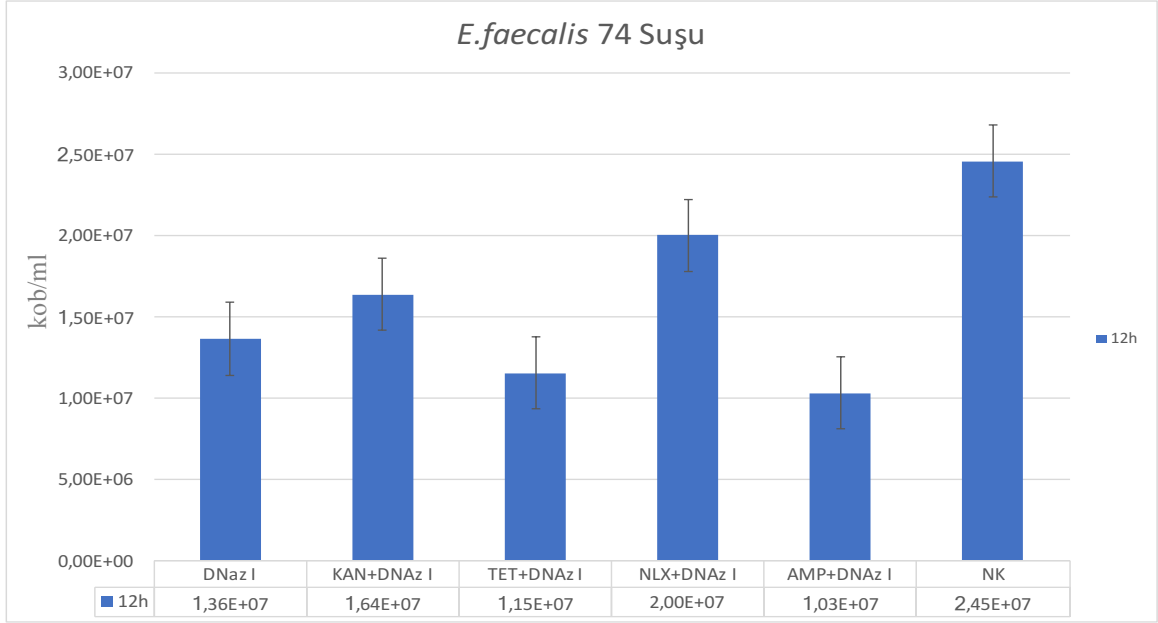
Bu çalışmada, *E. faecalis* suşlarının 4, 12 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda oluşturdukları biyofilm yapılarındaki canlı hücreler üzerine; DNaz I ve Benzonaz enzimleri ile beraber geleneksel antibiyotiklerin (kanamisin, tetrasiklin, nalidiksik asit ve ampisilin) etkisi araştırılmıştır.

*E. faecalis* 74 suşunun 4 saatlik biyofilm yapısı üzerine uygulanan enzim-antibiyotik kombinasyonlarının eradikasyon etkileri incelendiğinde; en etkin eradikasyon etkisinin DNaz I+ampisilin kombinasyonunda gerçekleştiği belirlenmiştir. Tek başına DNaz I uygulaması ve DNaz I+tetrasiklin kombinasyonu da yine eradikasyon etkisine sahip olmakla birlikte, daha düşük düzeydedir. Nalidiksik asit ve kanamisin DNaz I enzimi ile birlikte uygulanması sonucunda ise istatistikî açıdan önemli eradikasyon etkileri gözlenmemiştir (Şekil 5.21.).



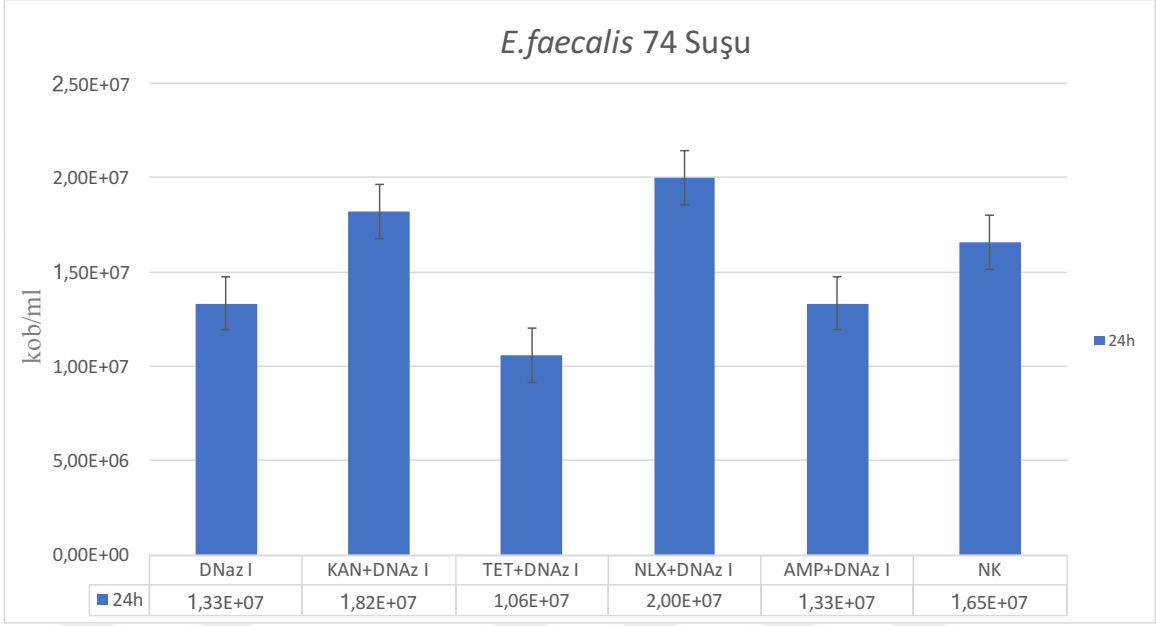
Şekil 5.21. *E. faecalis* 74 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

74 kodlu *E. faecalis* suşunun 12 saatlik biyofilminde en etkili eradikasyon DNaz I+ampisilin, daha sonra DNaz I+tetrasiklin kombinasyonunda gözlenmiştir. Nalidiksik asit ve kanamisin antibiyotikleri ile yapılan enzim-antibiyotik kombinasyonları da eradikasyona sebep olurken, etkileri DNaz I+ampisilin kombinasyonuna göre daha düşük bulunmuştur (Şekil 5.22.).



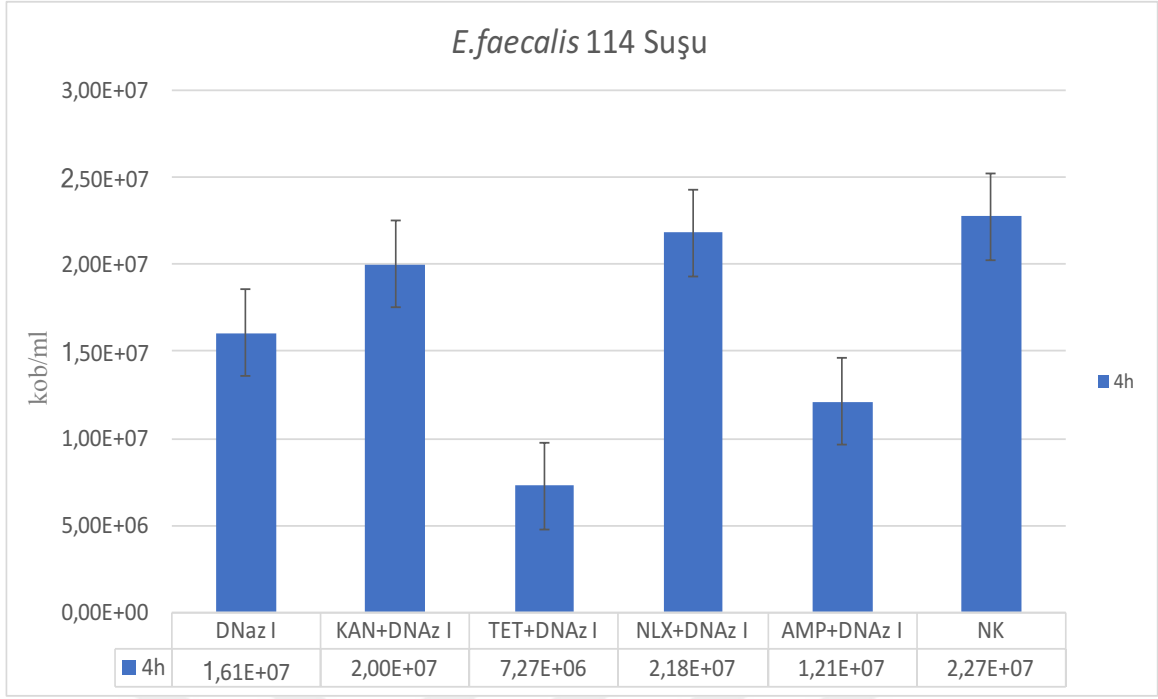
Şekil 5.22. *E. faecalis* 74 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* 74 suşunun 24 saatlik biyofilminde en etkili eradikasyon DNaz I+tetrasiklin antibiyotiği kombinasyonunda tespit edilmiştir. DNaz I+kanamisin ve DNaz I+nalidiksik asit kombinasyonlarının ise biyofilm biyokütlesini arttırdığı belirlenmiştir. Son olarak; sadece DNaz I ve DNaz I+ampisilin kombinasyonu, düşük oranda eradikasyona sebep olmuştur (Şekil 5.23.).



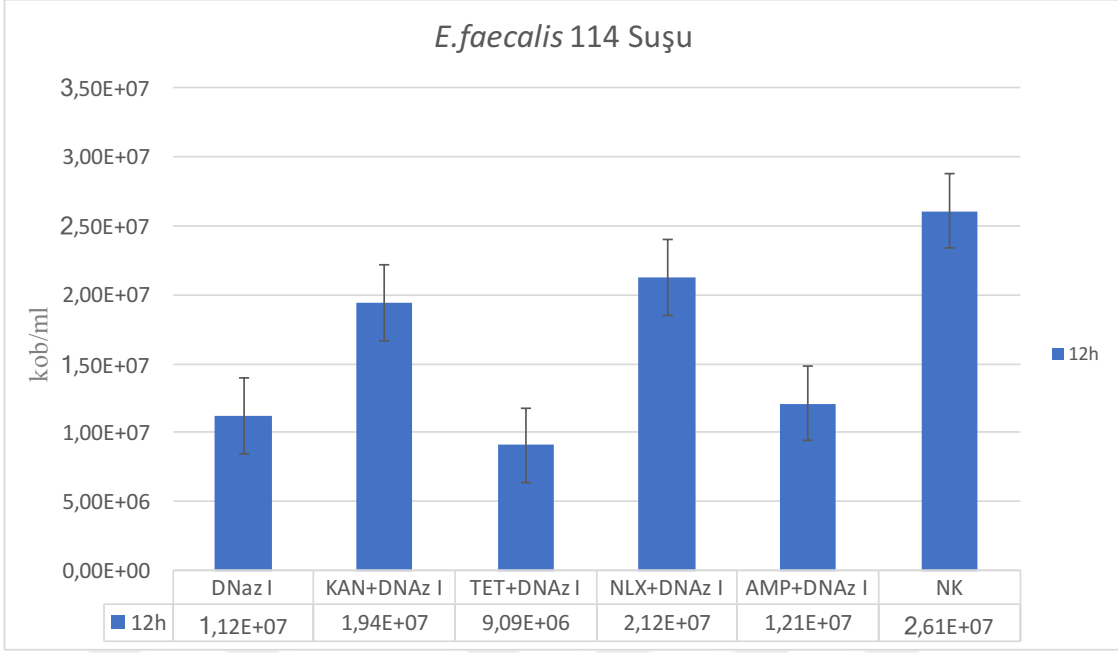
Şekil 5.23. *E. faecalis* 74 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* 114 suşunun 4 saatlik biyofilminde en etkili eradikasyon yine DNaz I+tetrasiklin antibiyotiği kombinasyonunda görülmüştür. DNaz I+ampisilin kombinasyonunda da bu düzeyde olmamakla birlikte, etkin bir eradikasyonun gerçekleştiği saptanmıştır. DNaz I ve DNaz I+kanamisin kombinasyonu, olgun biyofilm yapısının bozulmasına düşük düzeyde katkı sağlamıştır. DNaz I+nalidiksik asit antibiyotik kombinasyonunun ise 24 saatlik biyofilm yapısının bozulmasına neredeyse hiç katkı sağlamadığı belirlenmiştir (Şekil 5.24.).

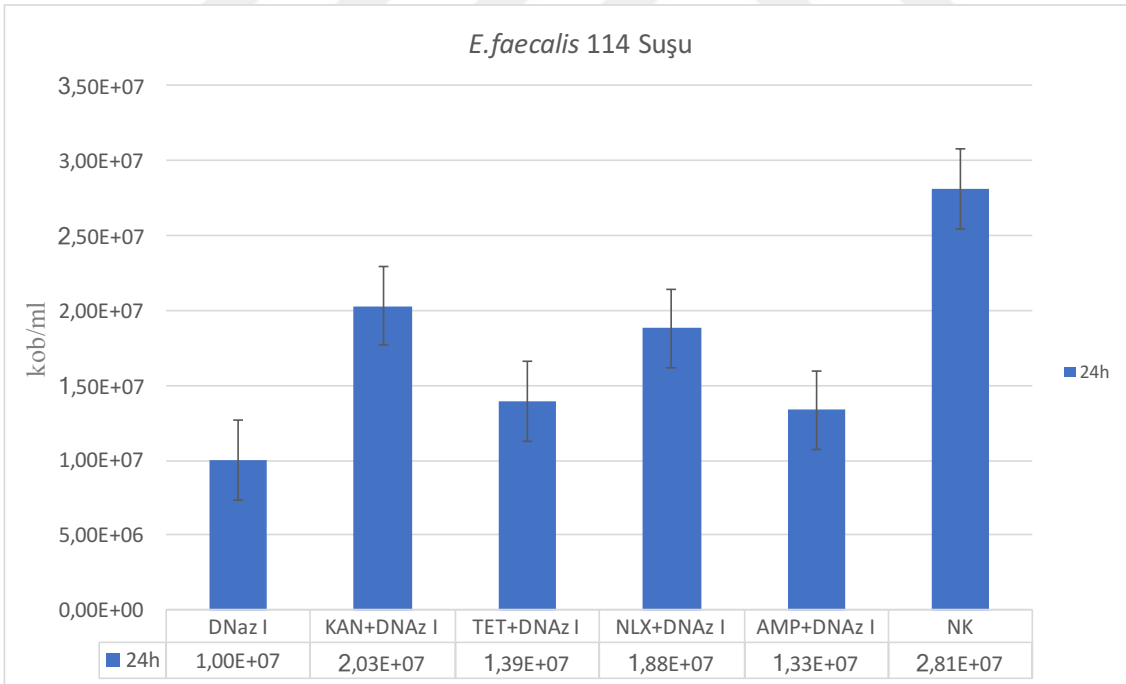


Şekil 5.24. *E. faecalis* 114 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* 114 suşunun 12 ve 24 saatlik biyofilmi üzerine en etkili kombinasyon yine DNaz I+tetrasiklin olarak tanımlanmıştır. Bu inkübasyon sürelerinde DNaz I enzimi de tek başına önemli ölçüde eradikasyona sebep olmaktadır. DNaz I+kanamisin ve DNaz I+nalidiksik asit kombinasyonları iki farklı inkübasyon süresinde de benzer sonuçlar vermiştir. Genel olarak bakıldığında; 12 ve 24 saatlik inkübasyonlarda uygulanan bütün enzim ve antibiyotik kombinasyonlarının eradikasyona sebep olduğunu ve biyofilm yapısını önemli ölçüde bozduğunu söylemek mümkündür (Şekil 5.25.- Şekil 5.26.)

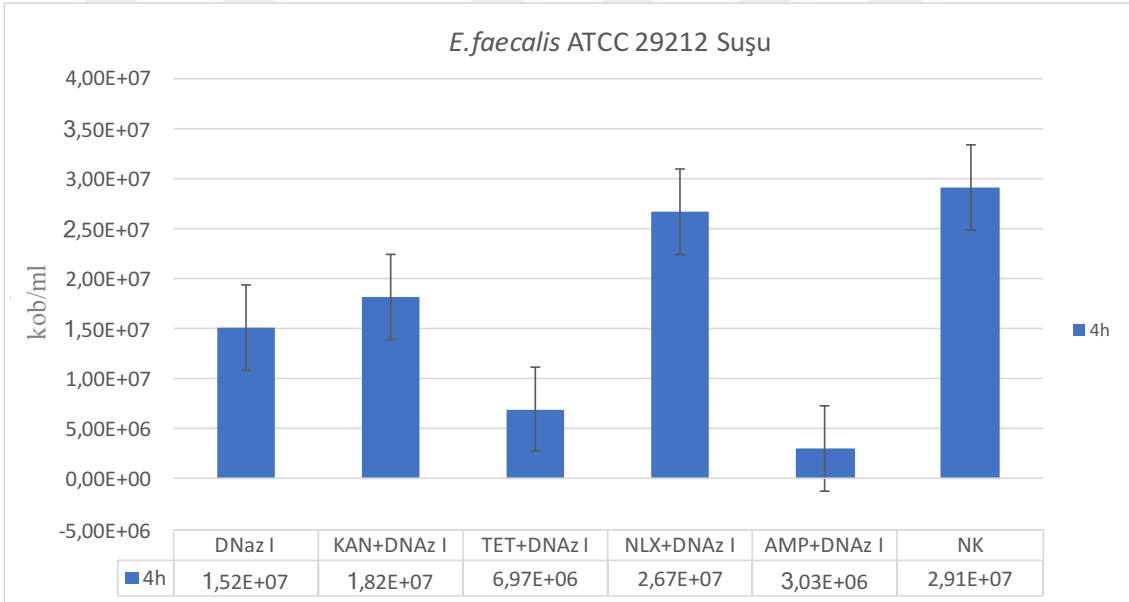


Şekil 5.25. *E. faecalis* 114 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi



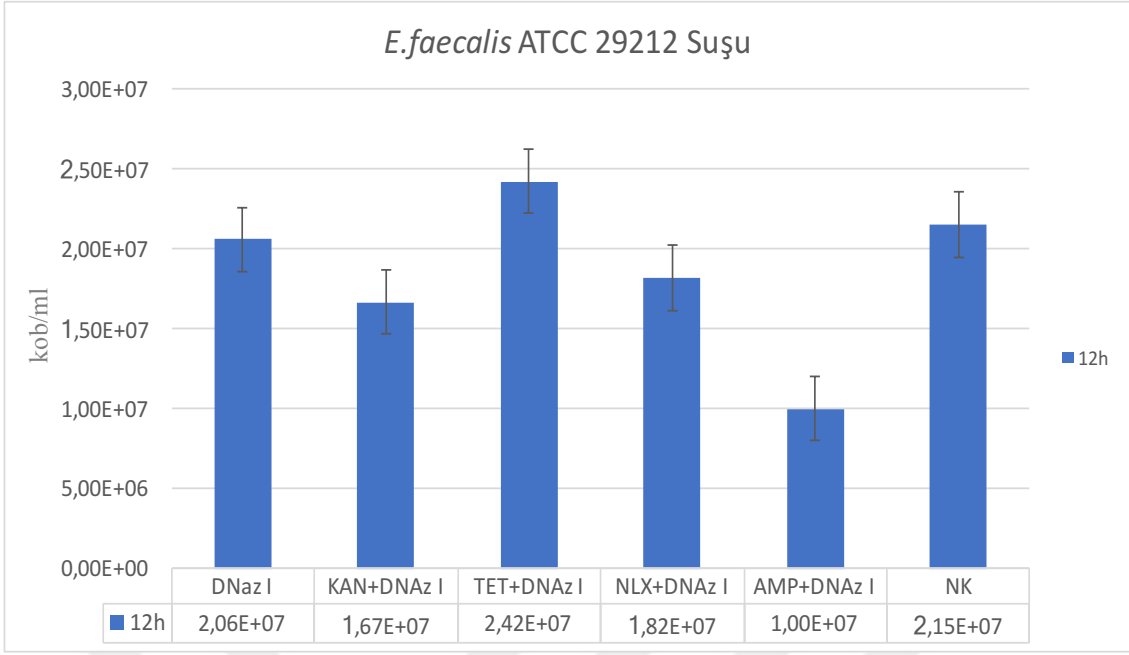
Şekil 5.26. *E. faecalis* 114 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* ATCC 29212 suşunun 4 ve 24 saatlik biyofilmlerinde DNaz I+tetrasiklin ile DNaz I+ampisilin en yüksek düzeyde eradikasyona sebep olan kombinasyonlar olarak tanımlanmıştır. 4, 12 ve 24 saatlik biyofilm yapılarına uygulanmış DNaz I+nalidiksik asit kombinasyonunun eradikasyonda önemli bir farklılığa sebep olmadığı görülürken, 12 saatlik biyofilimde, diğer inkübasyon sürelerindeki sonuçların aksine, DNaz I+tetrasiklin kombinasyonu biyofilm yapısını teşvik ettiği saptanmıştır. Diğer yandan, bu suşun 12 saatlik biyofilmlerine karşı DNaz I enziminin etkili olmadığı belirlenmiştir. Genel bir değerlendirme yaptığımızda 3 farklı inkübasyon süresinde de DNaz I+kanamisin kombinasyonunun eradikasyona sebep olduğunu söylemek doğru olacaktır (Şekil 5.27.- Şekil 5.29.).

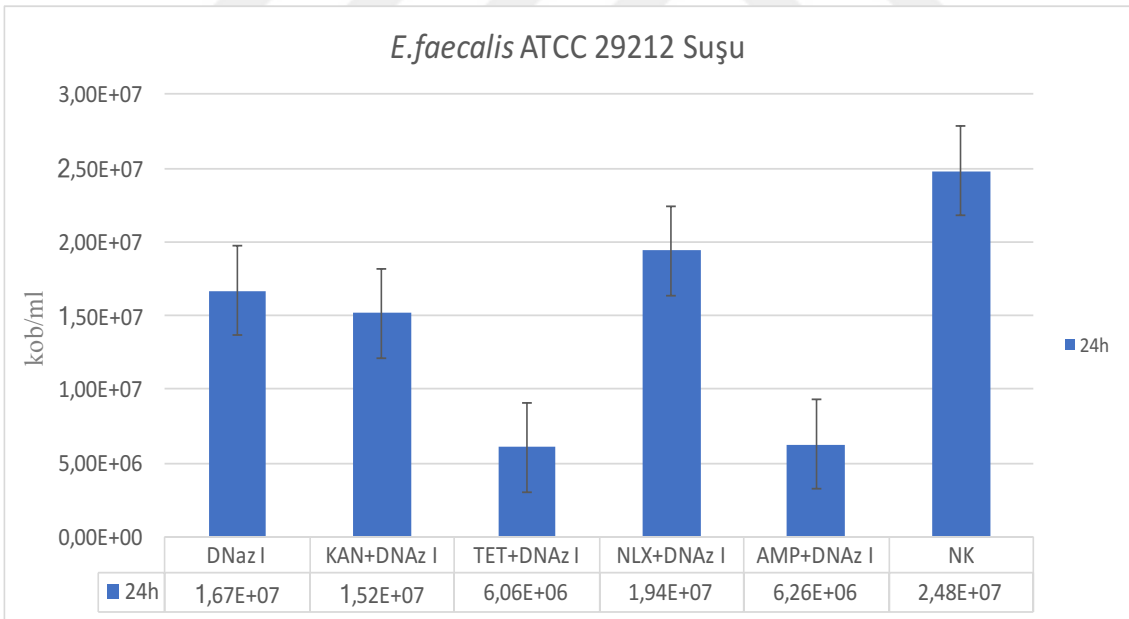


Şekil 5.27. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi



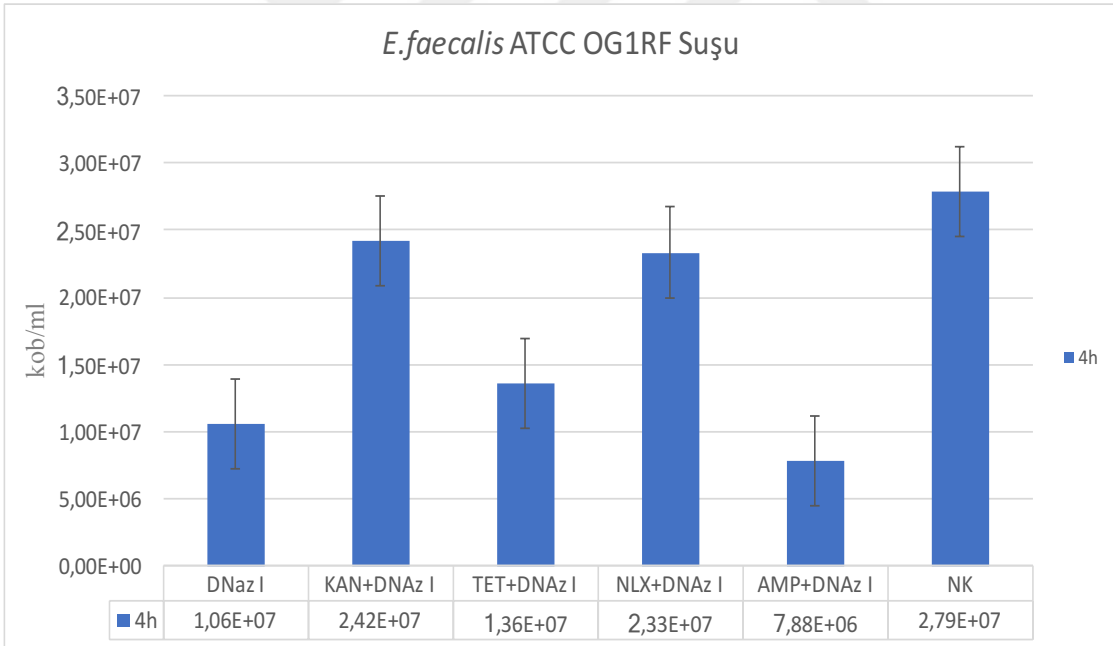


Şekil 5.28. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

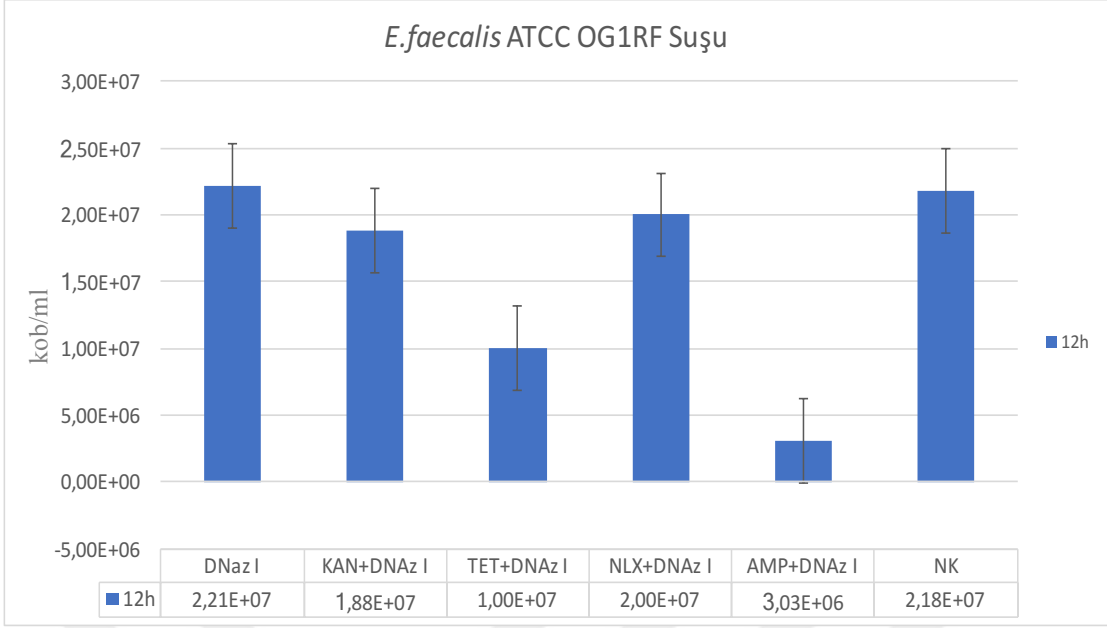


Şekil 5.29. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

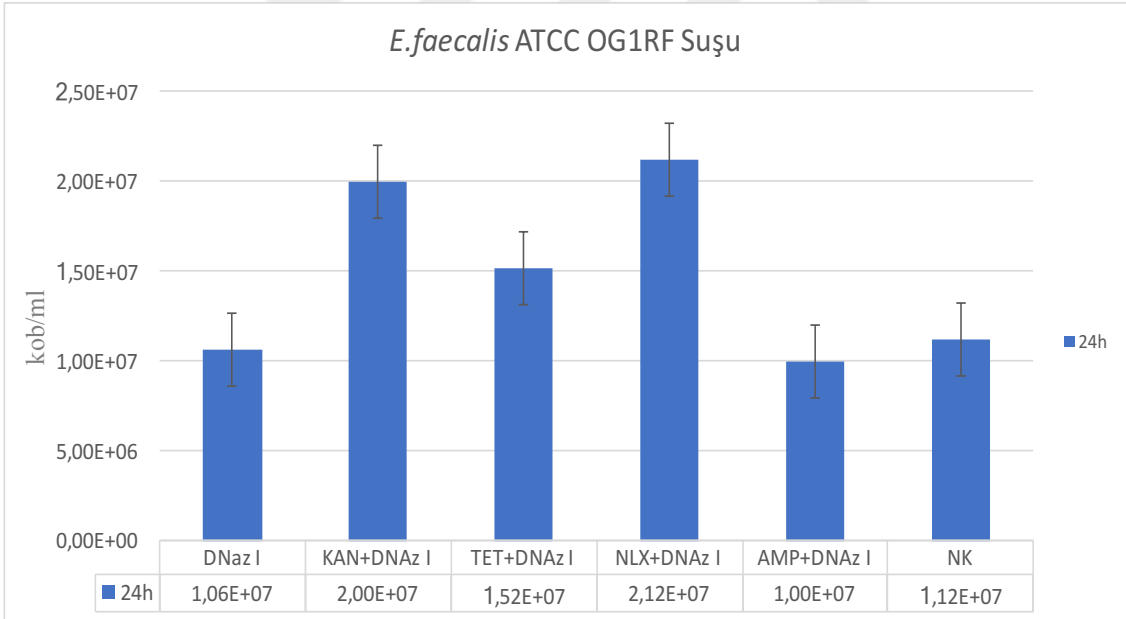
*E. faecalis* ATCC OG1RF suşunun 4 ve 12 saatlik biyofilmlerine karşı en güçlü eradikasyona sebep olan antibiyotik enzim kombinasyonu, DNaz I+ampisilin olarak tanımlanmıştır. 4 saatlik biyofilm yapısı üzerine ajanların etkileri incelendiğinde DNaz I enziminin de biyofilm yapısını oldukça yüksek düzeyde eradikasyona uğrattığı, 12 saatlik biyofilmlerinde ise biyofilm miktarlarını az da olsa arttırdığı görülmüştür. 4 ve 12 saatlik biyofilmlerde kanamisin ve nalidiksik asit antibiyotikleriyle yapılan DNaz I kombinasyonlarının ise önemli ölçüde eradikasyona sebep olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 5.30.-Şekil 5.31.). Her iki inkübasyon süresi için de DNaz I+tetrasiklin antibiyotik kombinasyonu, biyofilm yapısında önemli ölçüde eradikasyona sebep olmuştur. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşunun 24 saatlik biyofilmine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkileri incelendiğinde, ampisilin ile kombinasyonu dışında bütün kombinasyonların neredeyse hiç eradikasyona sebep olmadığı, hatta biyofilm yapısını teşvik ettiği görülmektedir. DNaz I ise tek başına muamele edildiğinde biyofilm yapısını az miktarda degrade etmiştir (Şekil 5.32.).



Şekil 5.30. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

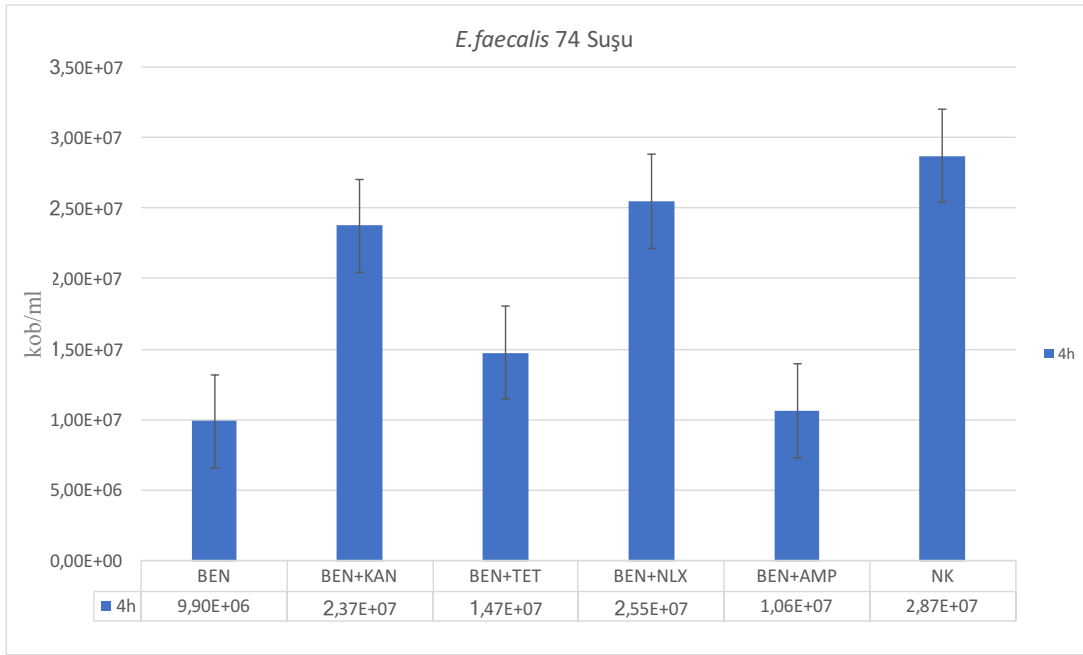


Şekil 5.31. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi



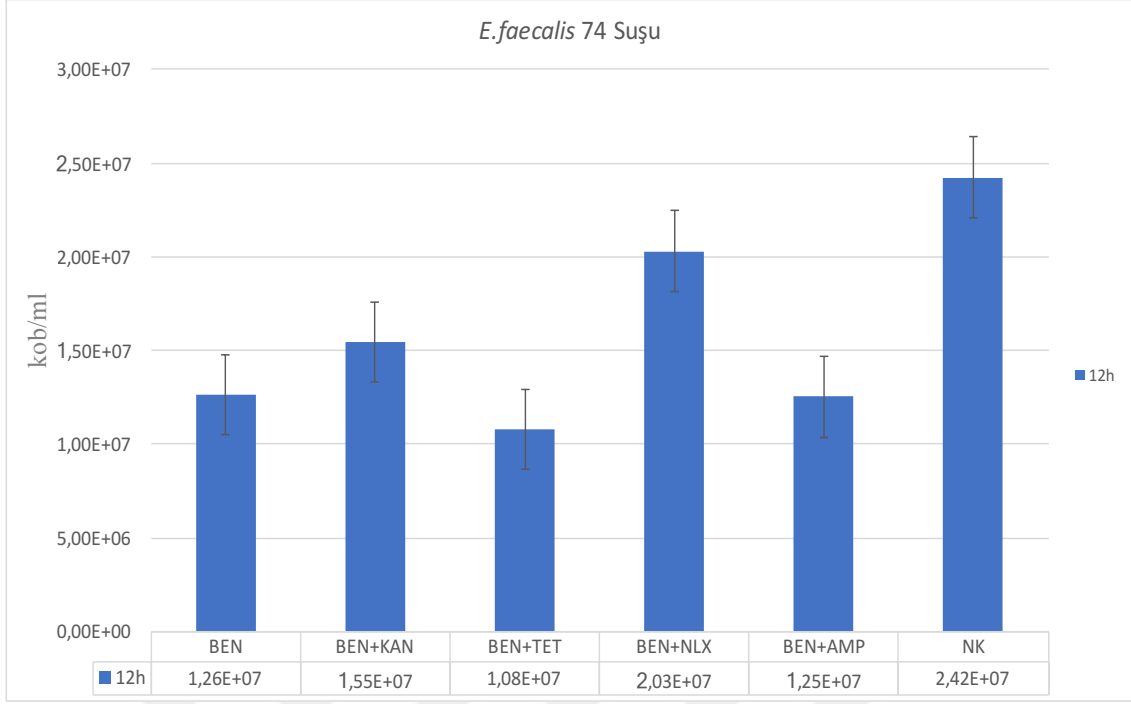
Şekil 5.32. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesi üzerine DNaz I+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* 74 kodlu suşunun üç farklı inkübasyon süresinde; Benzonaz+tetrasiklin ve Benzonaz+ampisilin kombinasyonlarının, biyofilm yapısını diğer kombinasyonlara göre daha fazla oranda eradike ettiği belirlenmiştir. 4 saatlik biyofilmlerde Benzonaz enzimi oldukça yüksek eradikasyon etkinliği gösterirken, Benzonaz+kanamisin ve Benzonaz+nalidiksik asit kombinasyonlarında eradikasyonun oldukça düşük düzeylerde gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 5.33.).



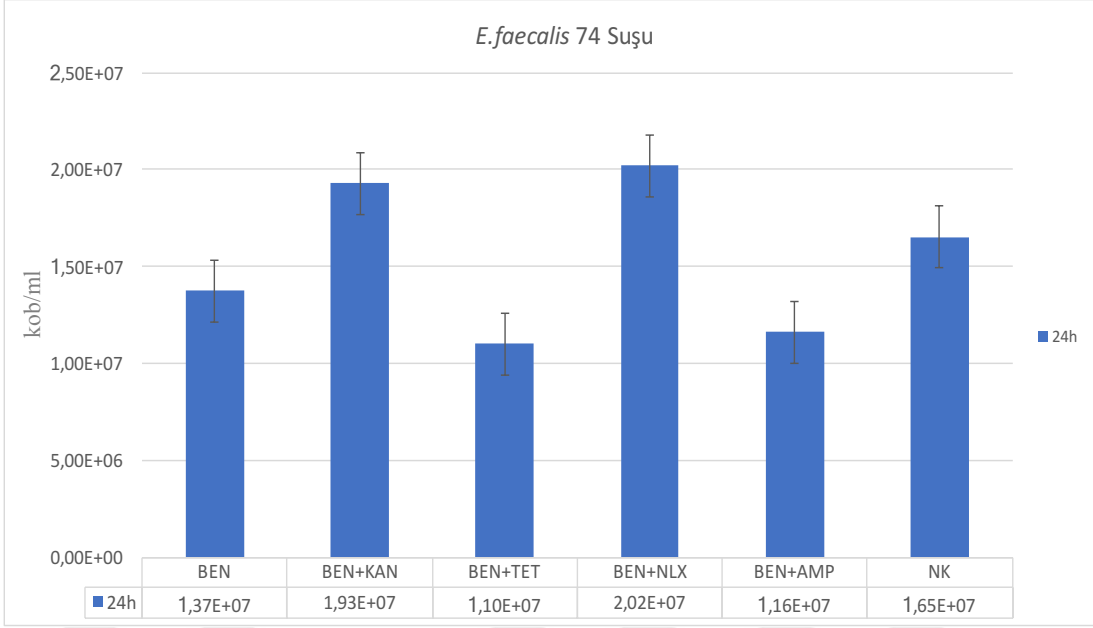
Şekil 5.33. *E. faecalis* 74 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* 74 kodlu suşunun 12 saatlik biyofilmine en fazla eradikasyon etkisi Benzonaz+tetrasiklin kombinasyonu için tanımlanmıştır. Benzonaz, Benzonaz+kanamisin ve Benzonaz+ampisilin kombinasyonları da biyofilm miktarlarında azalma tespit edilmiştir. Benzonaz+nalidiksik asit kombinasyonunun 12 saatlik biyofilmlere etkisinin ise diğer kombinasyonlara kıyasla daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 5.34.).



Şekil 5.34. *E. faecalis* 74 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* 74 kodlu suşunun 24 saatlik biyofilmine en fazla eradikasyon etkisi Benzonaz+tetrasiklin kombinasyonunun kullanımı sonucu belirlenmiştir. Benzonaz ve Benzonaz+ampisilin kombinasyonu da biyofilm degradasyonuna neden olmaktadır. Benzonaz+kanamisin ve Benzonaz+nalidiksik asit antibiyotiklerinin kombinasyonları ise biyofilm yapısındaki canlı hücre sayısında artışa neden olmuştur. Bu sonuçlar her iki kombinasyonun da olgun biyofilm gelişimini teşvik ettiğine işaret etmektedir (Şekil 5.35.).

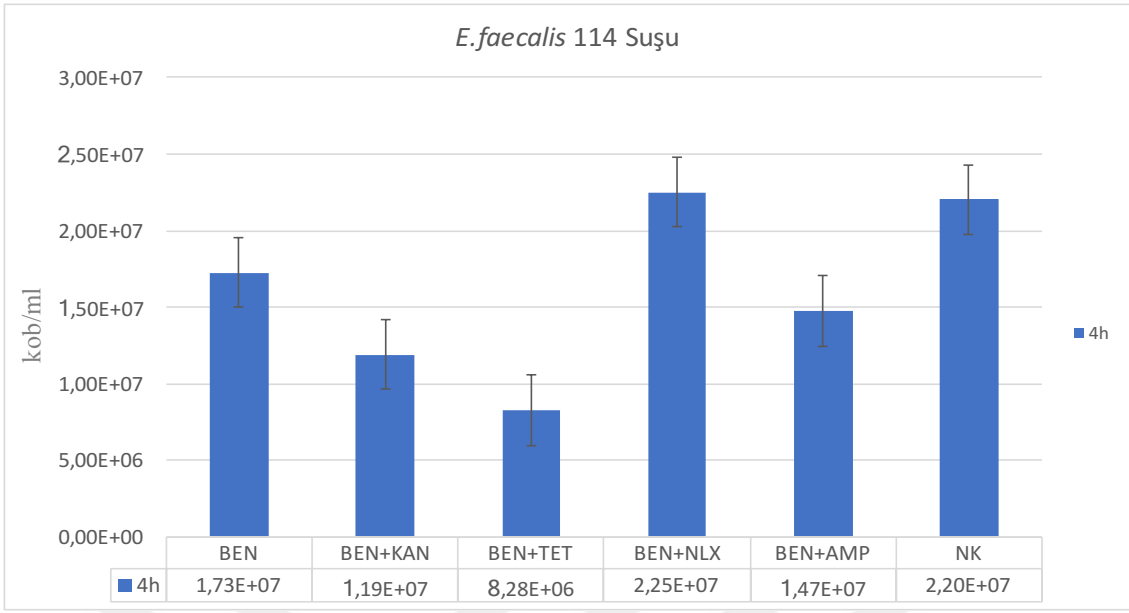


Şekil 5.35. *E. faecalis* 74 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzocaine+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

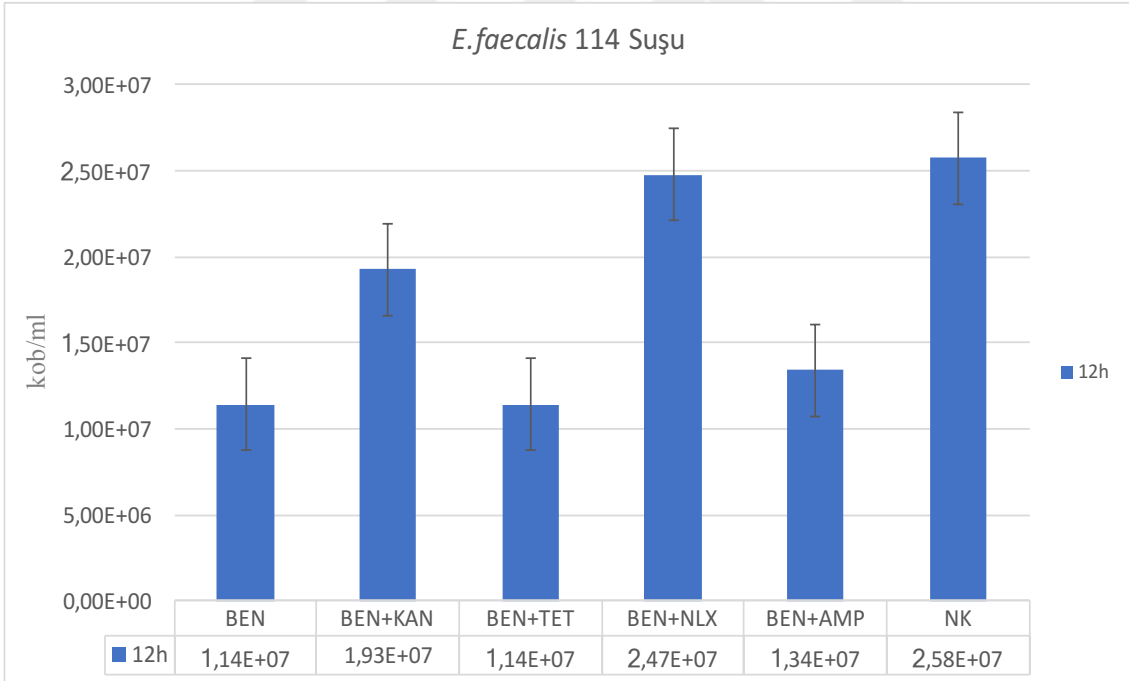
*E. faecalis* 114 suşunun 4 saatlik biyofilmine en etkili kombinasyon Benzocaine+tetrasiklin olarak tespit edilmiştir. Benzocaine+nalidiksik asit antibiyotik kombinasyonu biyofilm miktarı üzerinde neredeyse hiçbir değişikliğe neden olmamıştır. Benzocaine, Benzocaine+kanamisin ve Benzocaine+ampisilin kombinasyonları ise hiçbir ajan uygulanmamış biyofilm yapısıyla kıyaslandığında, olgun biyofilm eradikasyonu açısından oldukça etkili bulunmuştur (Şekil 5.36.).

*E. faecalis* 114 suşunun 12 saatlik biyofilmlerine en etkili ajanın tek başına uygulanan Benzocaine olduğu belirlenmiştir. Benzocaine+tetrasiklin ve Benzocaine+ampisilin kombinasyonları da biyofilmin eradikasyonunda oldukça etkili olmuştur. 12 saatlik inkübasyon süresi sonunda oluşan biyofilm yapısına Benzocaine+kanamisin ve Benzocaine+nalidiksik asit kombinasyonunun eradikasyon etkisinin ise oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.37.).

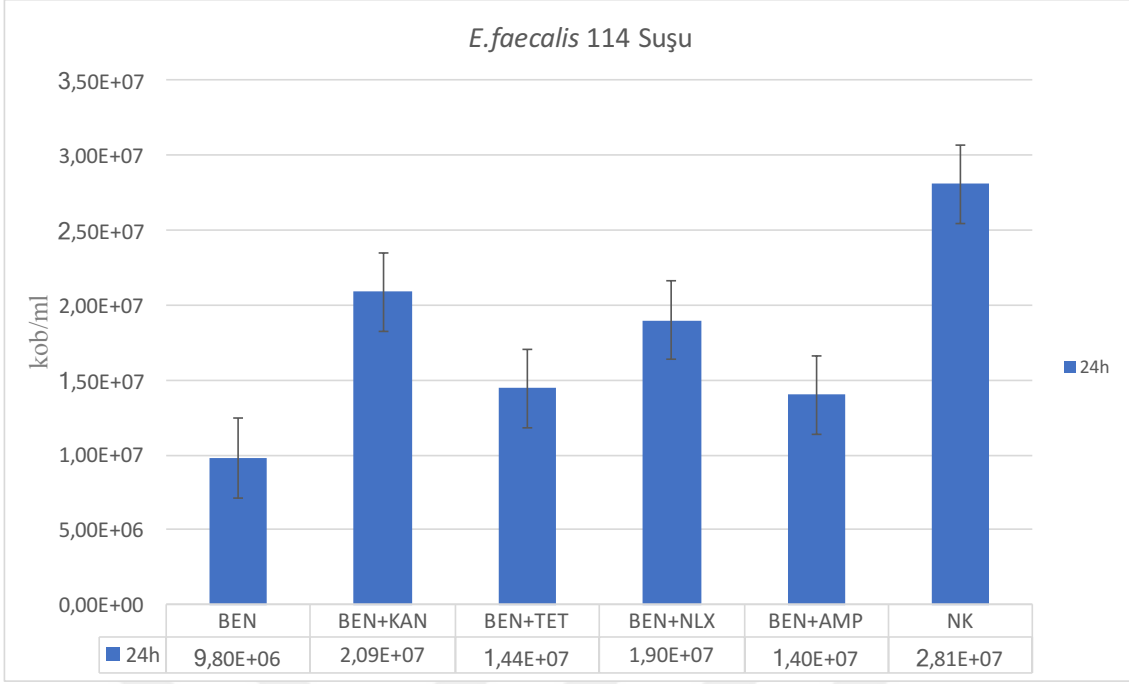
24 saatlik biyofilm yapısına da yine Benzocaine enzimi tek başına oldukça etkili eradikasyon sağlamıştır. Sonuç olarak bu suşta, farklı inkübasyon sürelerinde oluşturulan tüm biyofilm yapılarına karşı Benzocaine+antibiyotik kombinasyonlarının biyofilm yapısındaki canlı hücreler üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.38.).



Şekil 5.36. *E. faecalis* 114 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzoyl peroxide+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi



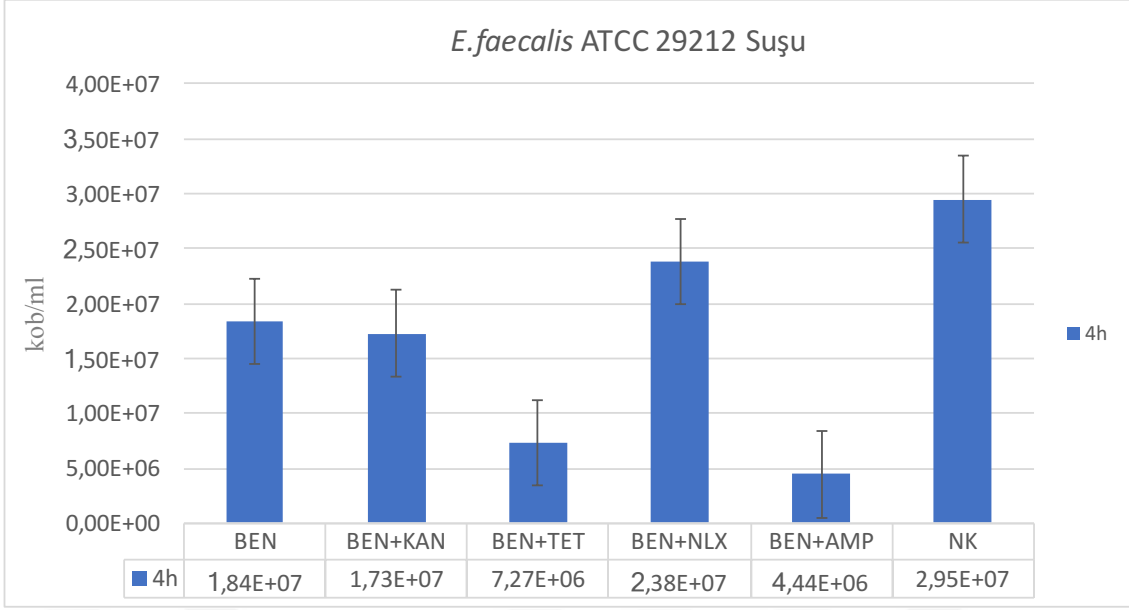
Şekil 5.37. *E. faecalis* 114 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzoyl peroxide+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi



Şekil 5.38. *E. faecalis* 74 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzocaine+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

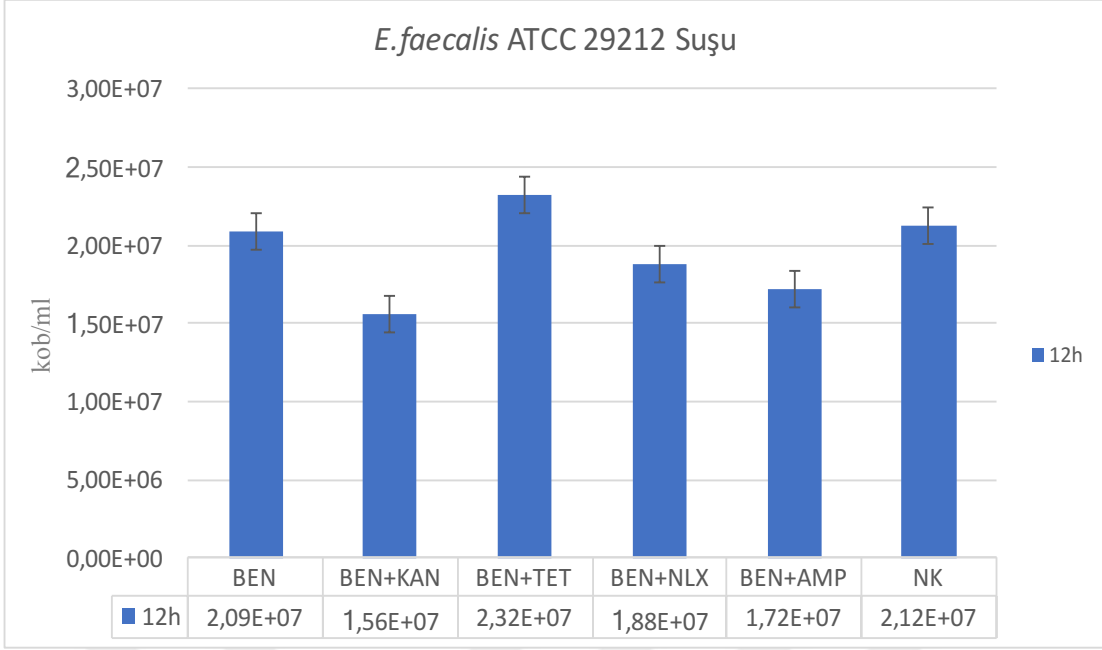
*E. faecalis* ATCC 29212 kontrol suşunun 4 ve 24 saatlik biyofilmlerine karşı, en etkili enzim+antibiyotik kombinasyonu, Benzocaine+ampisilin kombinasyonu olarak tanımlanmıştır. Bu iki inkübasyon süresinde Benzocaine+tetrasiklin kombinasyonu da biyofilm yapısını oldukça fazla eradikasyona uğratmıştır. Benzocaine, Benzocaine+kanamisin ve Benzocaine+nalidiksik asit kombinasyonları da kontrol grubuna kıyasla bir eradikasyon etkisi gösterse de bu etki diğer kombinasyonların etkisinden daha düşük düzeyde gerçekleşmiştir (Şekil 5.39.-Şekil 5.41.).



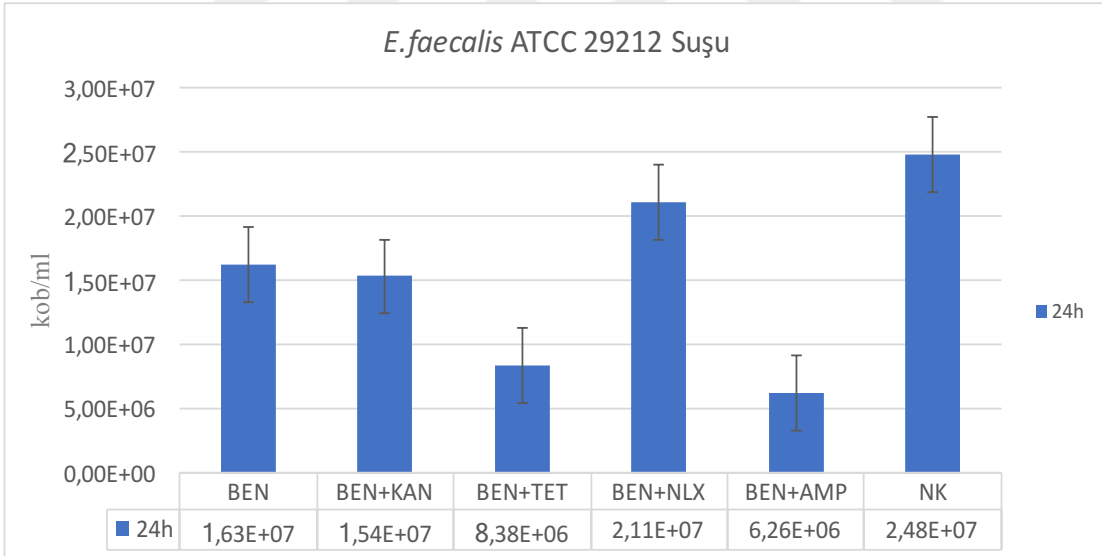


Şekil 5.39. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzoylserin+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* ATCC 29212 suşunun 12 saatlik biyofilm yapısında Benzoylserin enziminin tek başına hiçbir etkisi gözlenmezken, en etkin eradikasyon Benzoylserin+kanamisin kombinasyonu ile sağlanmıştır. Benzoylserin+nalidiksik asit ve Benzoylserin+ampisilinin de olgun biyofilm yapısının parçalanmasında etkili kombinasyonlar olduğu görülmüştür. Benzoylserin+tetrasiklin kombinasyonu ise biyofilm miktarını az da olsa arttırmıştır (Şekil 5.40.).

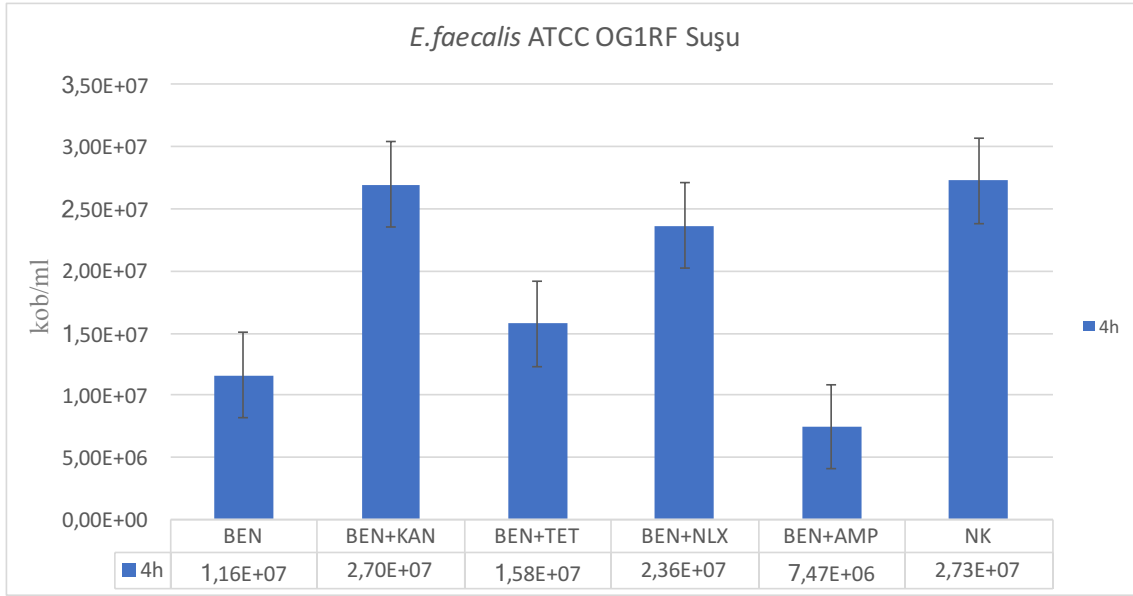


Şekil 5.40. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzocaine+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi



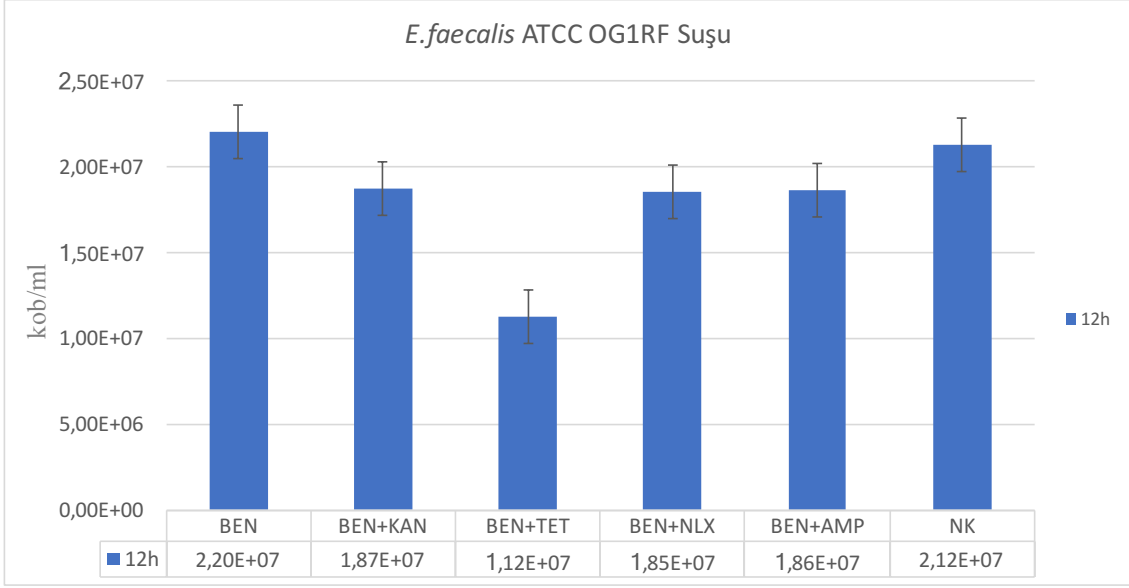
Şekil 5.41. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzocaine+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* ATCC OG1RF suşunun 4 saat inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm yapısına karşı en etkin kombinasyon Benzonaz+ampisilin olarak tanımlanmıştır. 4 saatlik biyofilmler üzerine ajanların eradikasyon etkileri incelendiğinde; Benzonaz ve Benzonaz+tetrasiklin antibiyotik kombinasyonunun biyofilm yapısını etkin bir şekilde eradike ettiği saptanmıştır. Nalidiksik asit ve kanamisin antibiyotikleriyle yapılan enzim kombinasyonları uygulaması ise biyofilm yapısındaki canlı hücre sayısında önemli ölçüde bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 5.42.).



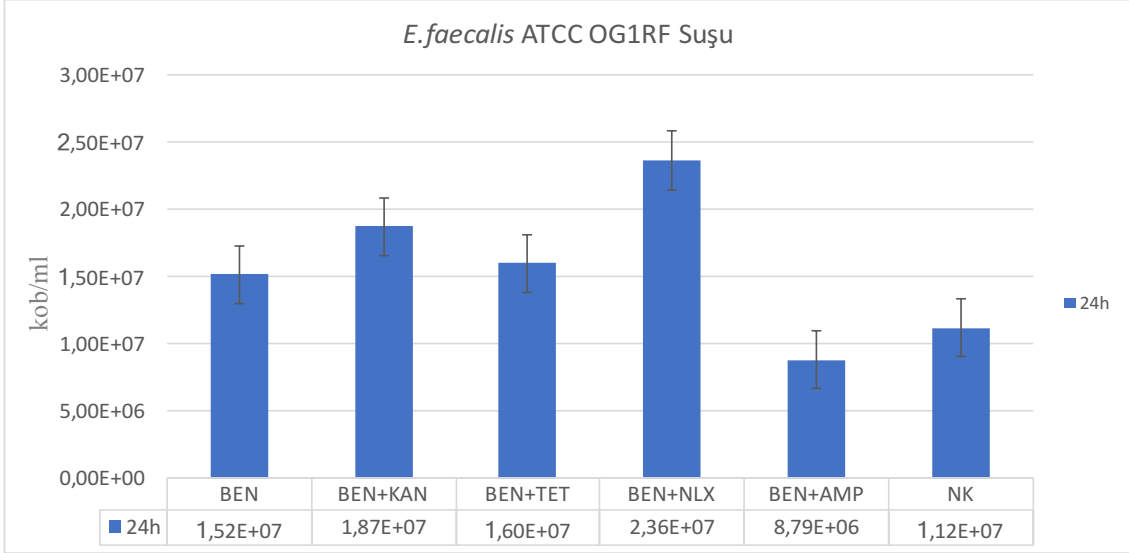
Şekil 5.42. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından 4 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* ATCC OG1RF suşunun 12 saatlik biyofilmlerine karşı Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarından en etkili olanı, Benzonaz+tetrasiklin kombinasyonu olarak tespit edilmiştir. Sadece Benzonaz uygulaması yapılmış örneklerin biyofilm yapısındaki canlı hücre sayısında artış olduğu, yani söz konusu enzimin bu sürede olgun biyofilm yapısını teşvik ettiği saptanmıştır. Benzonaz+kanamisin, Benzonaz+nalidiksik asit ve Benzonaz+ampisilin uygulanmış örneklerin biyofilm yapısındaki canlı hücre sayısı, hiçbir enzim ve antibiyotik kombinasyonunun uygulanmadığı örneklere göre azalmıştır. Bu da söz konusu kombinasyonların da belirli bir oranda eradikasyon etkisine sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 5.43.).



Şekil 5.43. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından 12 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzonaz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

*E. faecalis* ATCC OG1RF suşunun 24 saatlik biyofilmlerine uygulanmış olan Benzonaz+ampisilin kombinasyonu dışında hiçbir kombinasyon, biyofilm yapısındaki canlı hücre sayısında azalmaya neden olmamıştır. Aksine diğer Benzonaz+antibiyotik kombinasyonları biyofilm yapısındaki canlı hücre sayısını arttırmıştır. Bu durum 24 saat inkübasyon süresinde olgun biyofilmlerin enzimlere ve enzim+ antibiyotik uygulamalarına karşı dirençli hale geçtiğine işaret etmektedir (Şekil 5.44.).

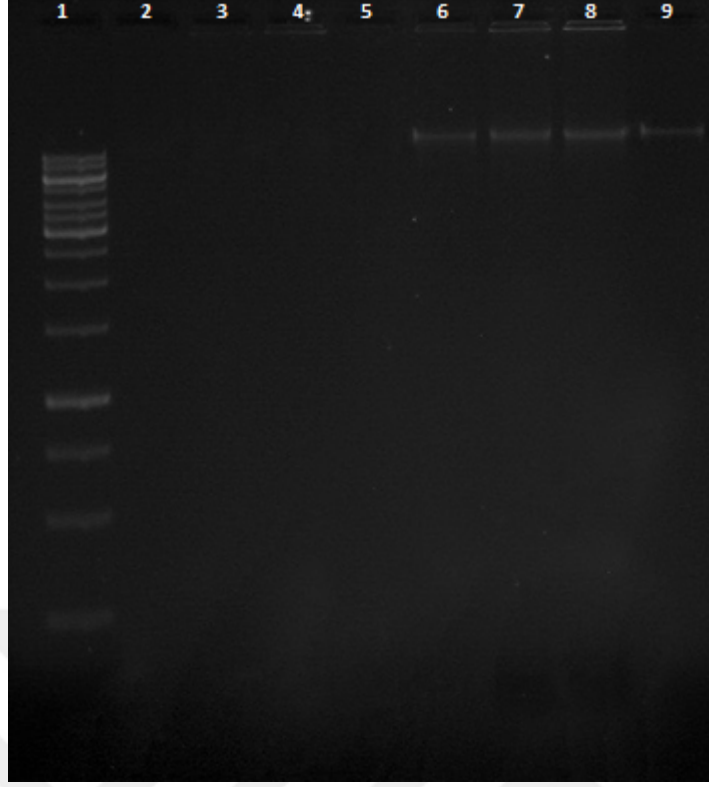


Şekil 5.44. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından 24 saat inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm biyokütlesine Benzoz+antibiyotik kombinasyonlarının etkisi

## 5.5. BİYOFİLM YAPISINDAN EDNA'NIN İZOLASYONU

### 5.5.1. BİYOFİLM YAPISINDAN İZOLE EDİLEN EDNA VE GDNA'NIN AGARUZ JELDE GÖRÜNTÜLENMESİ

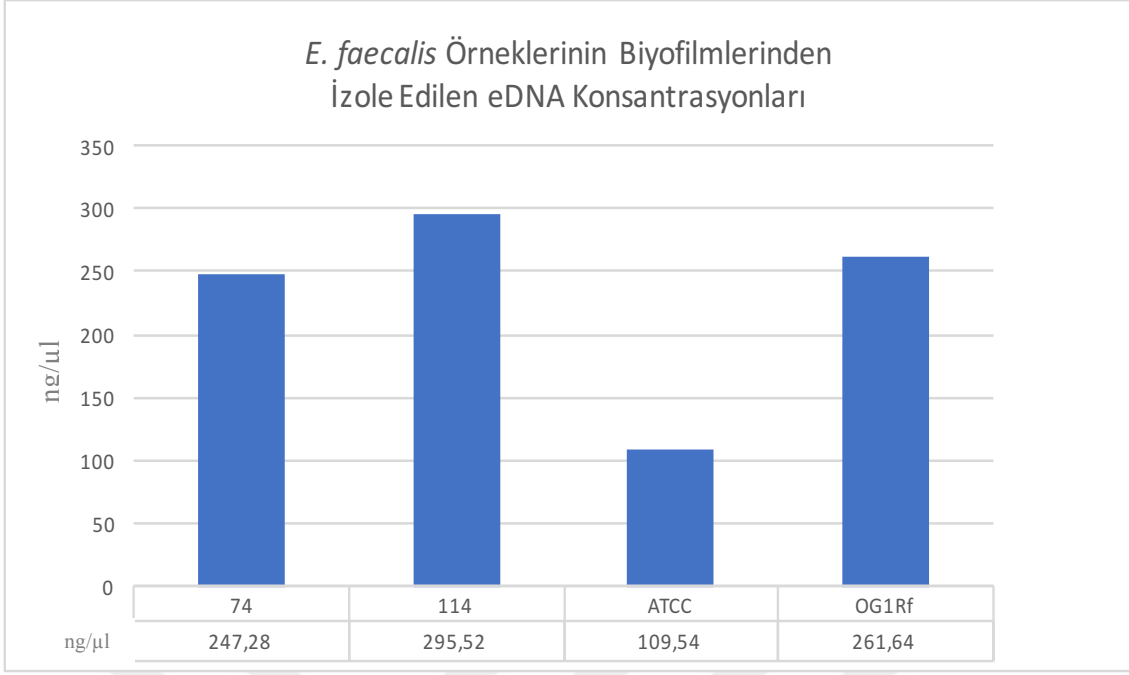
Enterokok örneklerinden gDNA ve eDNA izolasyonu işlemleri de sırasıyla Bölüm 4.2.2 ve 4.2.3'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Enterokok örneklerimizden izole edilen DNA'lar %0,7'lik agaroz jelde 100 V akımda koşturulan jeller, EtBr boyamasının ardından UV ışık altında görüntülenmiştir. Ancak, defalarca farklı koşullarda da denenmesine karşın eDNA örnekleri için agaroz jel görüntüsü elde edilememiştir (Şekil 5.45.).



Şekil 5.45. Enterokok suşlarına ait gDNA'nın agaroz jel görüntüsü.

(1. kuyu; Marker, 2-5. kuyular; eDNA, 6-9. kuyular; gDNA örnekleri)

Agaroz jelde eDNA görüntülenmesi bugüne kadar çok az araştırmacı tarafından gerçekleştirilebilmiştir (46,130,131). Enterokok suşlarımızda eDNA'yı jelde görüntüleyememizin, literatür incelendiğinde doğal olduğu görülmektedir. Shields ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2013), eDNA konsantrasyonunun, agaroz jelde bant varlığı ya da yokluğu ile ilişkili olmadığı vurgulanmıştır (119). Bu durumda eDNA'nın belirlenmesi için başka bir yöntem izlenmiştir. İzole edilen eDNA PicoGreen ile boyanmış ve spektrofotometrik ölçümler sonucu miktar tayini yapılarak izolasyonlarımızın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği kanıtlanmıştır (Şekil 5.46.). Böylece, agaroz jel elektroforezi ile yalnızca izolasyonlarını doğrulayabileceğimiz genetik materyallerin, bu yöntemle ayrıca konsantrasyonları da hesaplanabilmiştir. Bu sonuçlara göre 24 saatlik biyofilmlerden izole edilen eDNA örneklerinin miktarlarına bakıldığında en yüksek eDNA üretiminin 114 kodlu suшта gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu suşu sırasıyla OG1RF, 74 ve ATCC 29212 kodlu suşlar izlemiştir.

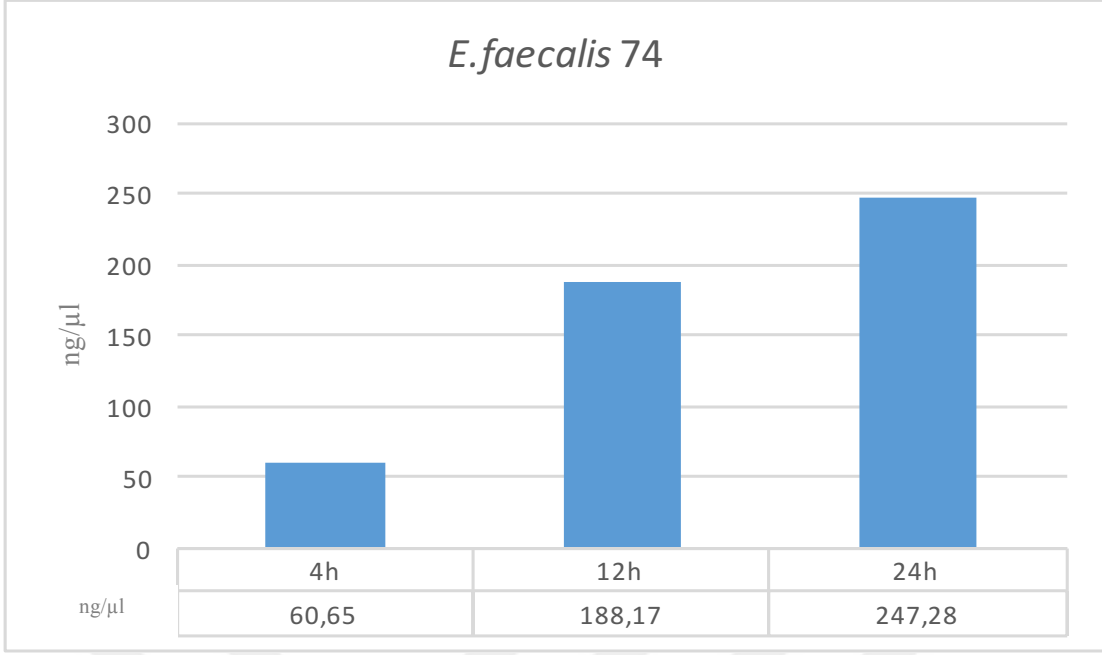


Şekil 5.46. *E. faecalis* suşlarının 24 saatlik biyofilm yapısından izole edilen eDNA'ların PicoGreen ölçüm değerleri

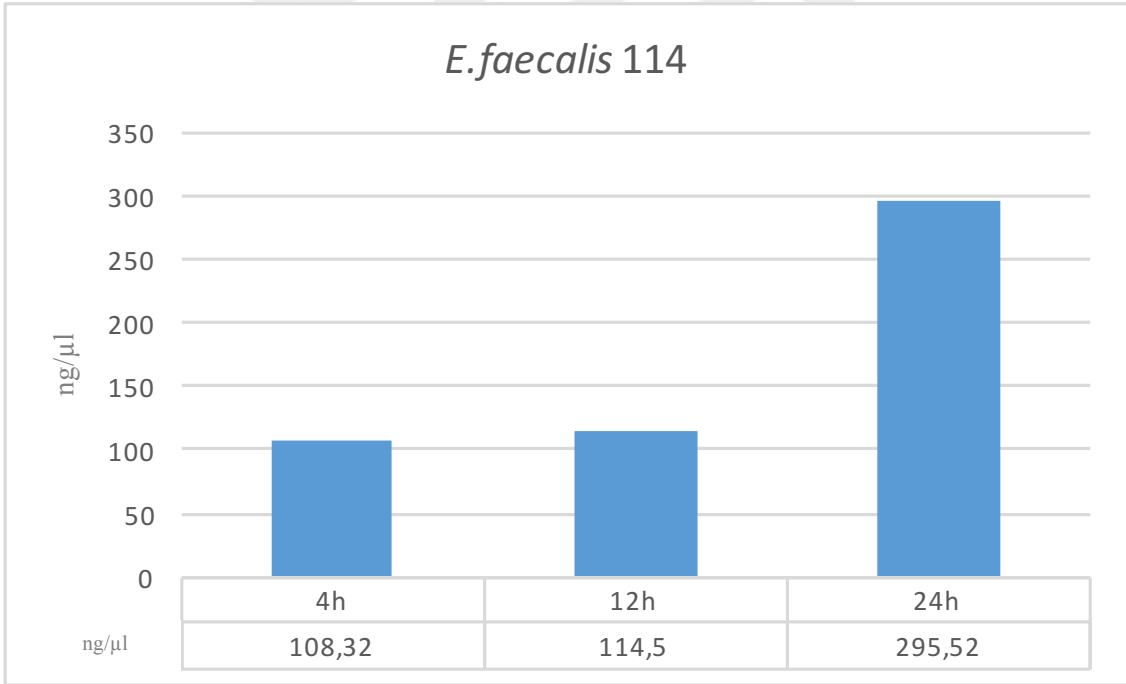
### 5.5.2. FARKLI OLGUNLAŞMA DÜZEYLERİNDEKİ BİYOFİLM YAPILARINDAN İZOLE EDİLEN EDNA'NIN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Bu çalışmada, *E. faecalis* suşları tarafından 4, 12 ve 24 saat süreyle 35 mm'lik Petri plakalarında geliştirilen biyofilmlerinden fenol:kloroform yöntemiyle izole edilen eDNA'lar PicoGreen ile işaretlenerek ölçülmüş ve elde edilen RFU değerleri ile standart eğri grafiği kullanılarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Enterokok suşları kendi aralarında kıyaslandığında, 4 ve 24 saat inkübasyon sonrasında en fazla eDNA üretimi 114 kodlu suшта gerçekleşirken, 12 saatlik inkübasyon sonrasında en fazla eDNA üretiminin *E. faecalis* 74 kodlu suшта meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 5.47.- Şekil 5.50.).

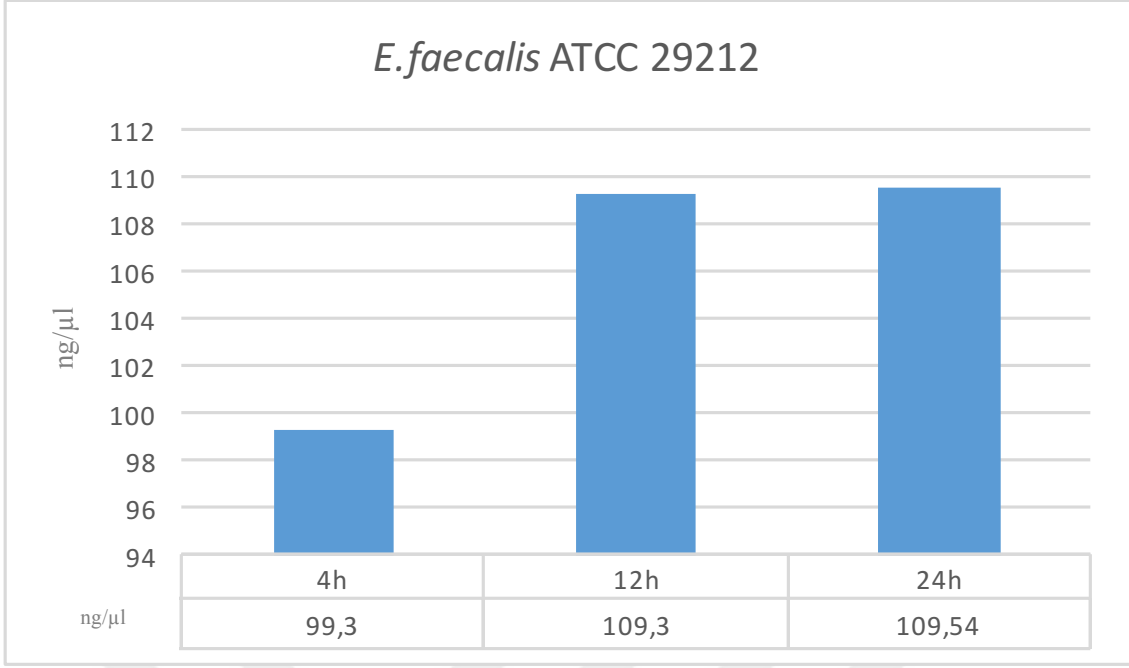


Şekil 5.47. *E. faecalis* 74 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları

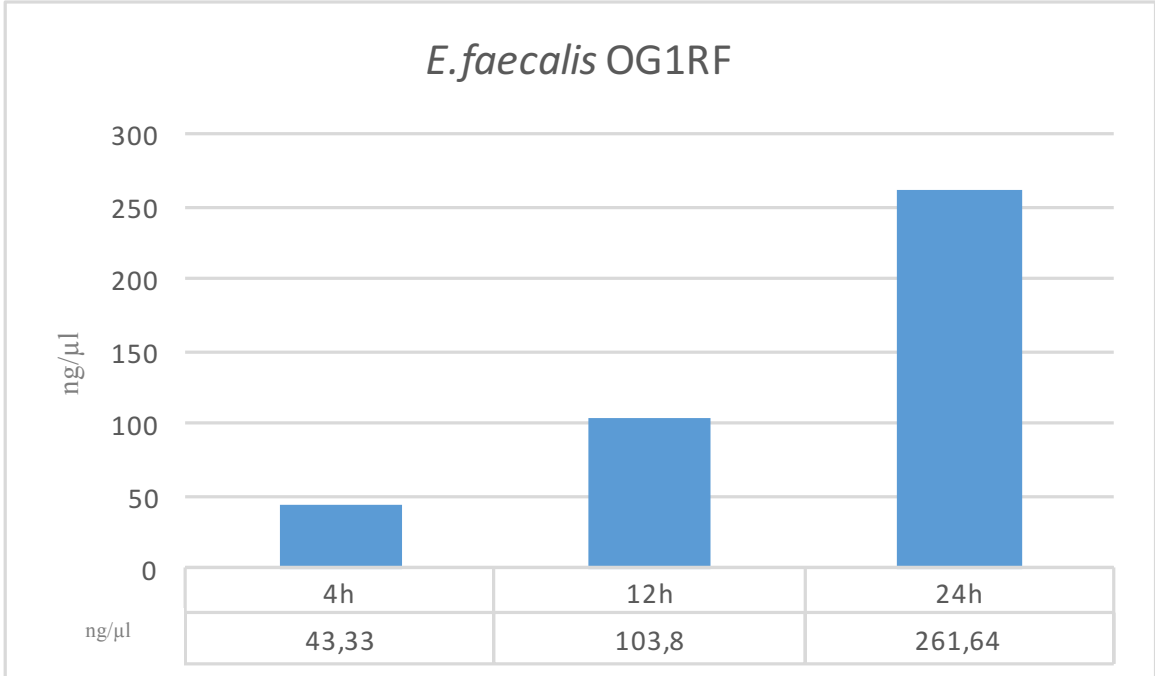


Şekil 5.48. *E. faecalis* 114 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları





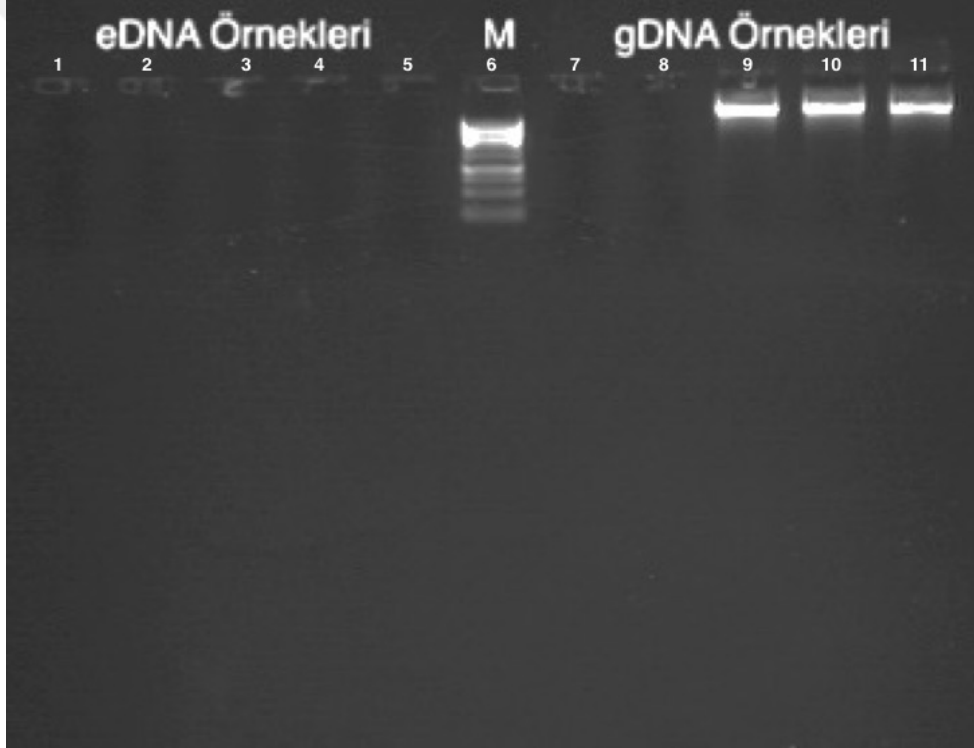
Şekil 5.49. *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları



Şekil 5.50. *E. faecalis* ATCC OG1RF suşunun farklı inkübasyon sürelerinde oluşturduğu biyofilm yapılarından izole edilen eDNA'ların miktarları

## 5.6. İZOLE EDİLEN NÜKLEİK ASİTLERİN DNaz I, RNaz A, BENZONAZ VE PROTEİNAZ K İLE MUAMELESİ

Bu çalışmada, *E. faecalis* suşlarından fenol:kloroform yöntemiyle izole edilen nükleik asitler (eDNA ve gDNA) enzim uygulanmadan önce 20, 50 ve 100µg/ml konsantrasyonlarına dilüe edilmiştir. Nükleik asitler, enzimlerle (100 U/ml DNaz I, 20 µg/ml RNaz A, 20 µg/ml Proteinaz K ve 2 U/µl Benzonaz) muamele edilmiş ve enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için enzim muamele edilmiş örnekler 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde enzim ile muamele edilmiş ve hiçbir enzim uygulaması yapılmamış örnekler %0,7 oranında agaroz içeren jellere yüklenmiş ve EtBr boyamasının ardından jeller UV ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 5.51.).



Şekil 5.51. *E. faecalis* 74 suşundan izole edilen nükleik asitlerinin, enzim muamelesi sonrası agaroz jel görüntüsü

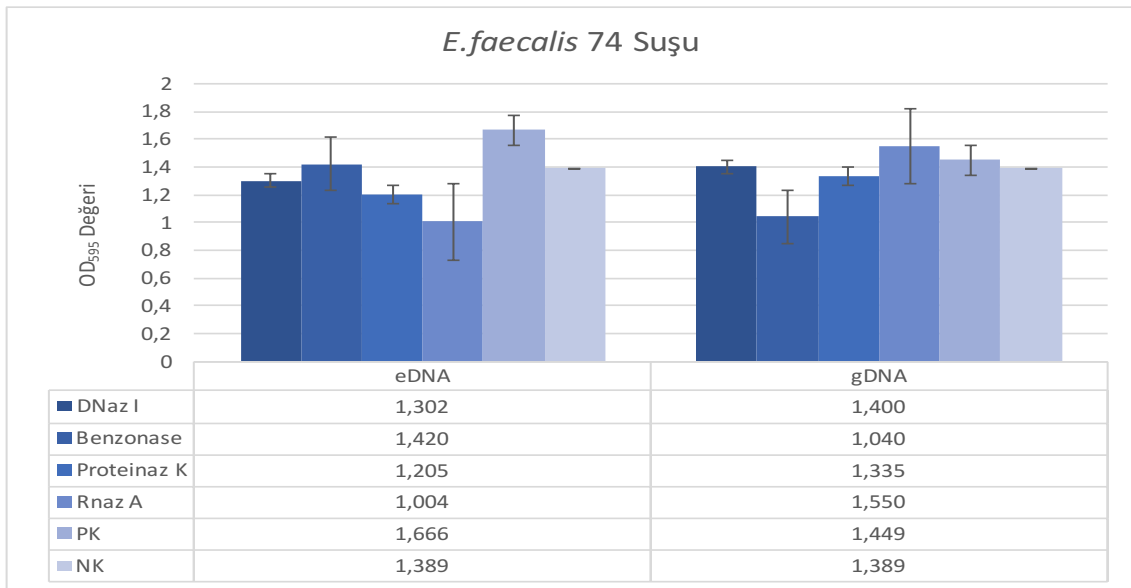
(1-5. kuyular: sırasıyla DNaz I, Benzonaz, Proteinaz K, RNaz A uygulanmış ve hiçbir enzim uygulanmamış eDNA örnekleri; 6. kuyu: 1kb marker; 7-11. Kuyular: sırasıyla DNaz I, Benzonaz, Proteinaz K, RNaz A uygulanmış ve hiçbir enzim uygulanmamış gDNA örnekleri)

İzole edilen eDNA ve gDNA örneklerine enzim muamelesi gerçekleştirdikten sonra, bu örneklerin biyofilm yapılarına etkileri bir sonraki çalışmada araştırılmıştır. Bu adımda çeşitli enzimlerle muamele edilmiş ve hiçbir enzim uygulamasına tabi tutulmamış nükleik asitlerin etkisini kıyaslıyor olmamız, enzimlerin eDNA'lar üzerine etkisini görmemizi sağlamıştır.

### **5.7. ENZİM MUAMELESİNE TABİ TUTULAN NÜKLEİK ASİTLERİN BİYOFİLM YAPISINA ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

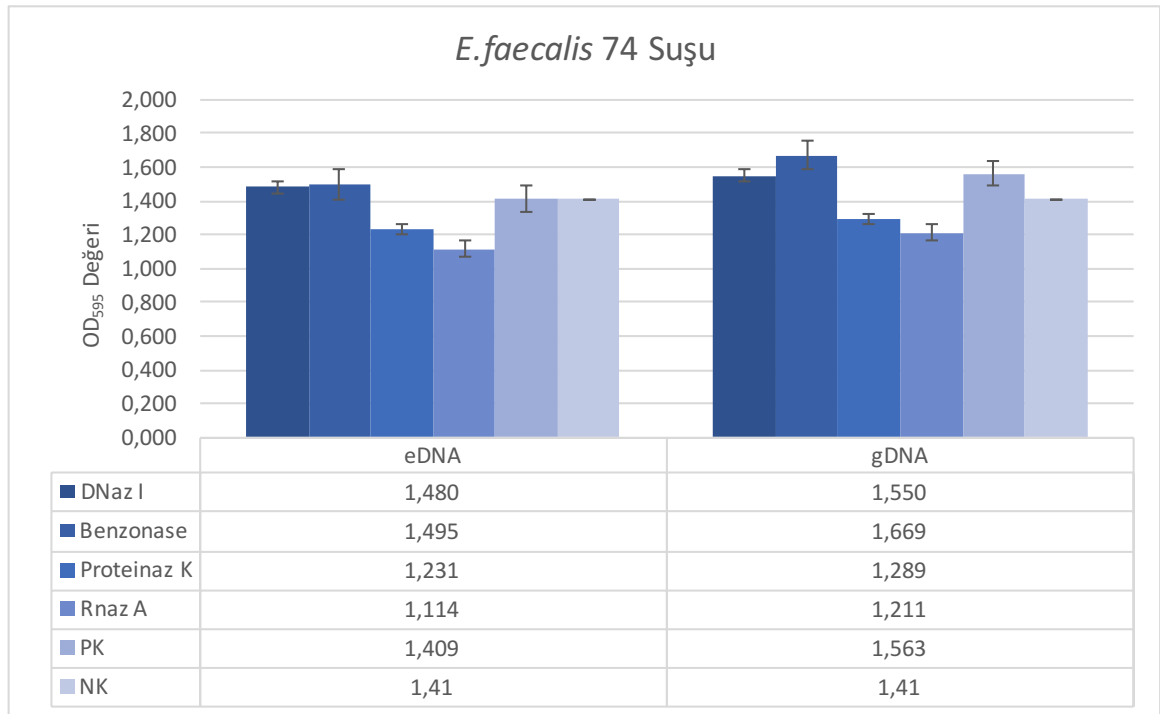
Bu denemelerde, bir önceki basamakta çeşitli enzimler ile muamele edilmiş farklı konsantrasyonlardaki nükleik asitlerin 24 ve 48 saatlik biyofilm yapılarına karşı etkileri belirlenmiştir. Her bakteri örneği için optimum koşullarda, 96 kuyulu polistiren plakalar kullanılarak 24 ve 48 saatlik biyofilm yapıları oluşturulmuştur. Enzim muamele edilmiş nükleik asitlerin biyofilm oluşumuna etkisinin belirlenmesi amacı ile iki farklı kontrol grubu oluşturulmuş ve bu gruplardan alınan spektrofotometrik ölçümler ile karşılaştırmalar yapılmıştır. İlk kontrol grubumuz Pozitif Kontrol (PK) grubumuzdur ve izolasyondan sonra enzim uygulanmamış nükleik asitlerin varlığında oluşan biyofilm yapısını ifade etmektedir. Diğer kontrol grubumuz ise Negatif Kontrol (NK) grubudur ve dışarıdan nükleik asit ilavesi yapılmaksızın oluşan biyofilm yapılarını ifade etmektedir. Enzim uygulamasından sonra elde edilen biyofilm miktarlarındaki değişimin absorbans ( $OD_{595}$ ) değerleri One Way ANOVA testine tabi tutulmuştur. Absorbans miktarları, farklı suşlara, çeşitli enzimler uygulanmış nükleik asitlere ve inkübasyona süresine göre karşılıklı kıyaslamalar yapılmış ve ANOVA testinde anlamlı bulunan sonuçlara “Tukey Doğruluk Önem Testi” analizi yapılmıştır ve inkübasyona süresi + bakteri + nükleik asitler interaksyonuna göre bu etkileşimlerin her biri % 0,1 ( $p < 0.001$ ) oranında anlamlı bulunmuştur.

*E. faecalis* 74 suşunun 20 µg/ml eDNA varlığında oluşan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, enzim uygulanmamış 20 µg/ml'lık eDNA varlığında oluşan biyofilm miktarının kontrol gruba kıyasla yaklaşık 0,3 birim fazla olduğu belirlenmiştir. Proteinaz K ve RNaz A enzimleri uygulanmış eDNA örnekleri biyofilm oluşumunu azaltırken, DNaz I ve Benzonaz uygulanan örneklerin biyofilm yapısına önemli ölçüde etki göstermediği tespit edilmiştir. gDNA örnekleri incelendiğinde sadece Benzonaz uygulanmış gDNA'nın biyofilm yapısını önemli ölçüde azalttığı, pozitif kontrol örnekleri ve RNaz A uygulanmış gDNA'ların eklemesinin ise biyofilm biyokütlesini az miktarda arttırdığı saptanmıştır (Şekil 5.52.).



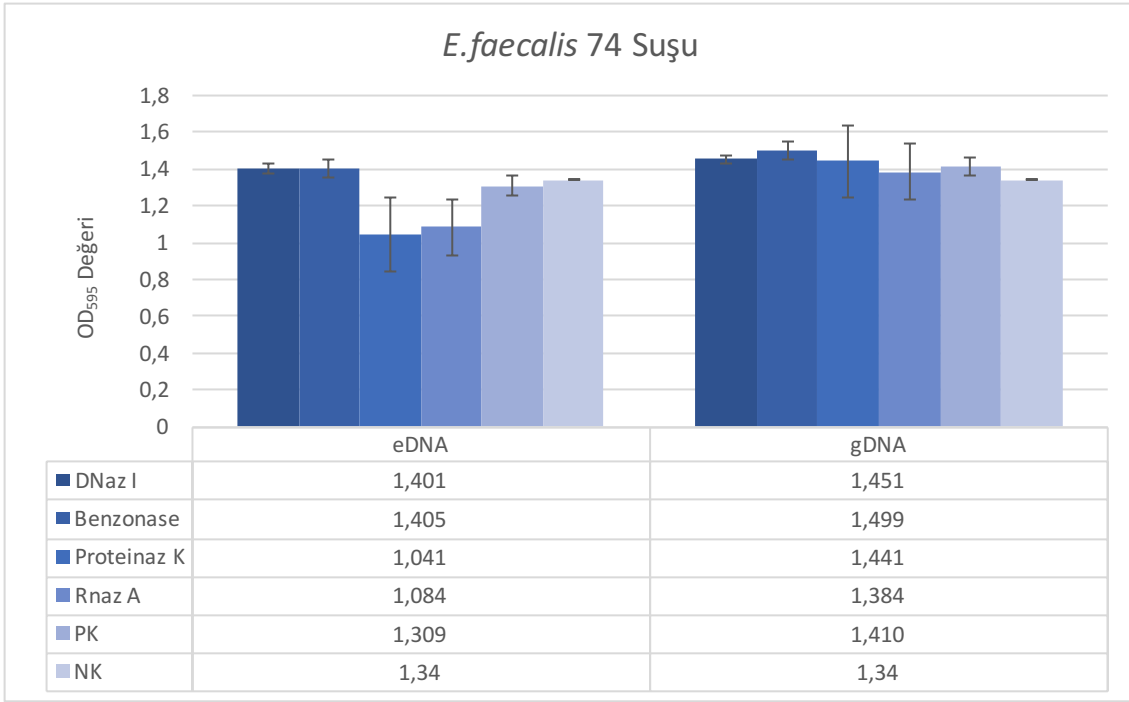
Şekil 5.52. 20 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 74 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* 74 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme; enzim uygulanan ve başlangıç konsantrasyonu 50 µg/ml olan eDNA ve gDNA'nın etkileri araştırıldığında; Proteinaz K ve RNaz A enzimleri uygulanmış eDNA ve gDNA örnekleri biyofilm biyokütlesini azalttığı, DNaz I ve Benzonaz uygulanmış eDNA ve gDNA örneklerinin biyofilm miktarını çok düşük düzeyde arttırdığı belirlenmiştir. Enzim uygulanmamış 50 µg/ml eDNA muamelesi, biyofilm oluşumu üzerine herhangi bir etki göstermezken, enzim uygulanmamış 50 µg/ml gDNA örneği varlığında oluşan biyofilm miktarında 0,15 birim bir artış gerçekleşmiştir (Şekil 5.53.).



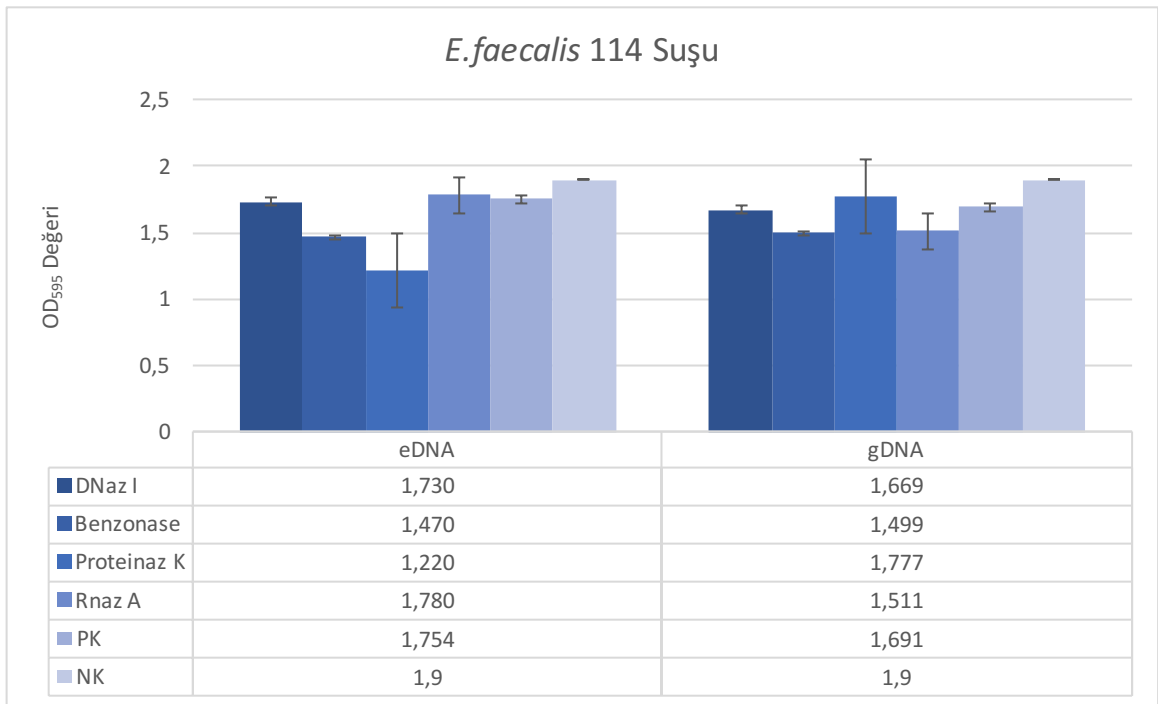
Şekil 5.53. 50 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 74 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* 74 suşu tarafından 100 µg/ml eDNA varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde; Proteinaz K ve RNaz A enzimleri uygulanan nükleik asitlerin biyofilm miktarında yaklaşık ~0,3 birim azalmaya, DNaz I ve Benzonaz enzimi uygulanmış nükleik asitlerin ise çok düşük oranda (~0,1 birim) artmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Enzim uygulanmış gDNA örnekleri ve enzim uygulanmamış pozitif kontrol örneğinin ise, test edilen tüm koşullarda biyofilm biyokütlesini ~0,1 birim düzeyinde arttırdığı saptanmıştır (Şekil 5.54.).



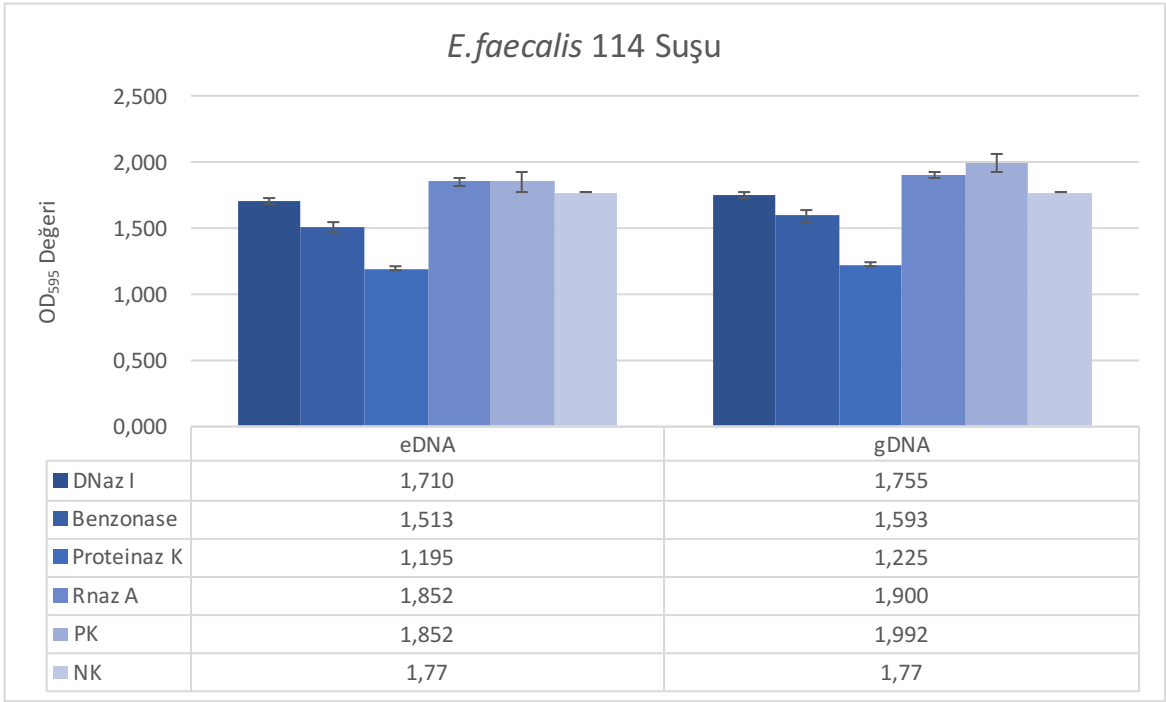
Şekil 5.54. 100 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 74 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* 114 suşu tarafından 20 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapısı incelendiğinde, Benzonaz ve Proteinaz K uygulanmış eDNA örneklerinin biyofilm biyokütlesinde ciddi bir azalmaya (sırasıyla ~0,4 birim ve ~0,7 birim) yol açtığı saptanmıştır. Ancak Proteinaz K uygulanmış gDNA örnekleri, eDNA örneklerinin aksine, biyofilm biyokütlesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Enzim uygulanmış ve uygulanmamış 20 µg/ml gDNA varlığında *E. faecalis* 114 suşu tarafından oluşturulan biyofilm yapılarının karşılaştırılması sonucunda; biyofilm biyokütlesinde en etkin düşmeye yol açan gDNA'nın, Benzonaz ile muamele edilmiş örnek olduğu ve NK'ya kıyasla biyofilm yoğunluğunda ~0,4 birim azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.55).



Şekil 5.55. 20 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 114 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

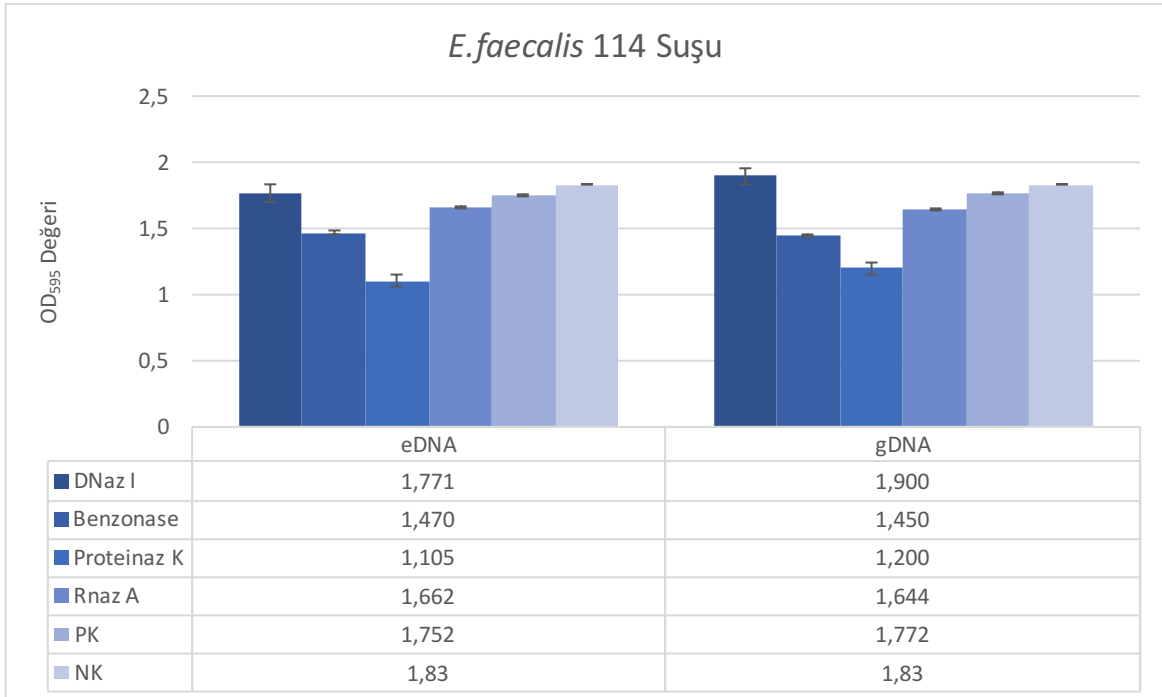
*E. faecalis* 114 suşu tarafından 50 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, Proteinaz K uygulanmış eDNA ve gDNA'nın biyofilm biyokütlesini ~0,5 birim azalttığı belirlenmiştir. DNaz I uygulanmış nükleik asitlerin her ikisinin de (eDNA ve gDNA) biyofilm biyokütlesinde bir değişime neden olmadığı, Benzonaz enzimi uygulanan örneklerin ise ~0,2 birim azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir. RNaz A enzimi ile muamele edilen eDNA ve gDNA de, aynı şekilde ~0,2 birimlik bir azalmaya yol açmıştır (Şekil 5.56.).



Şekil 5.56. 50 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 114 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

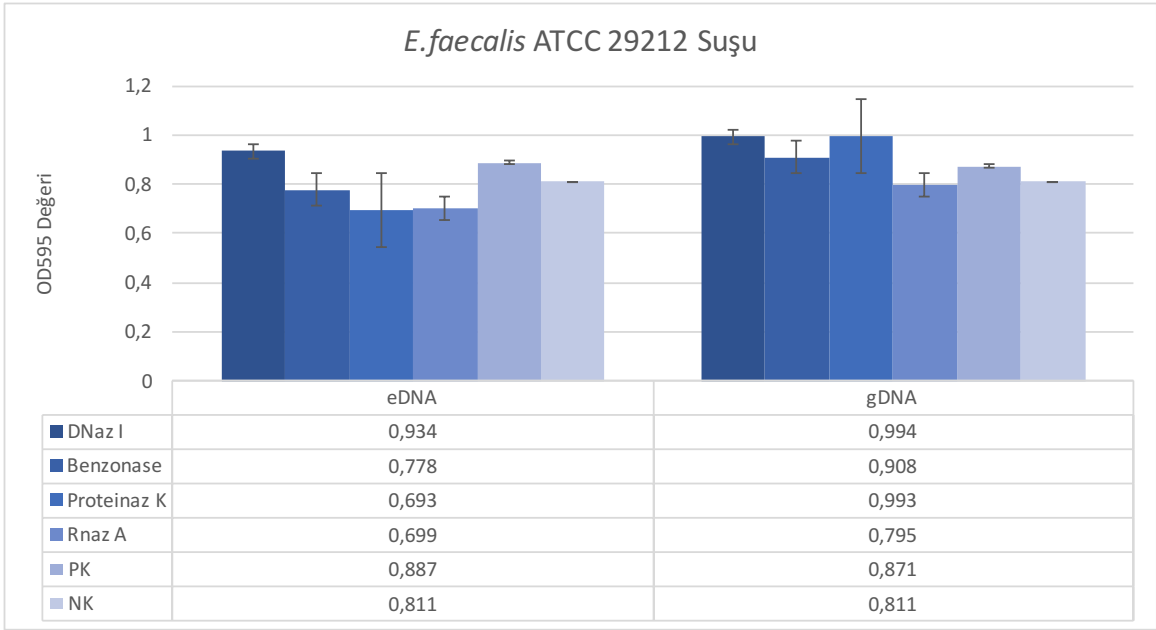


*E. faecalis* 114 suşu tarafından 100 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde; DNaz I uygulanmış nükleik asitlerin biyofilm miktarını neredeyse hiç değiştirmedeği, Benzonaz ve Proteinaz K ile muamele edilmiş her iki nükleik asit örneğinin ise biyofilm yoğunluğunda ~0,2 birimlik bir azalmaya yol açtığı saptanmıştır. Biyofilm biyokütlesindeki en önemli azalma, Proteinaz K ile muamele edilmiş nükleik asitler varlığında geliştirilen biyofilm yapısında meydana gelmiştir. Söz konusu azalma NK ile kıyaslandığında, eDNA varlığında ~0,7 birim, gDNA için ~0,6 birim olarak gerçekleşmiştir (Şekil 5.57.).



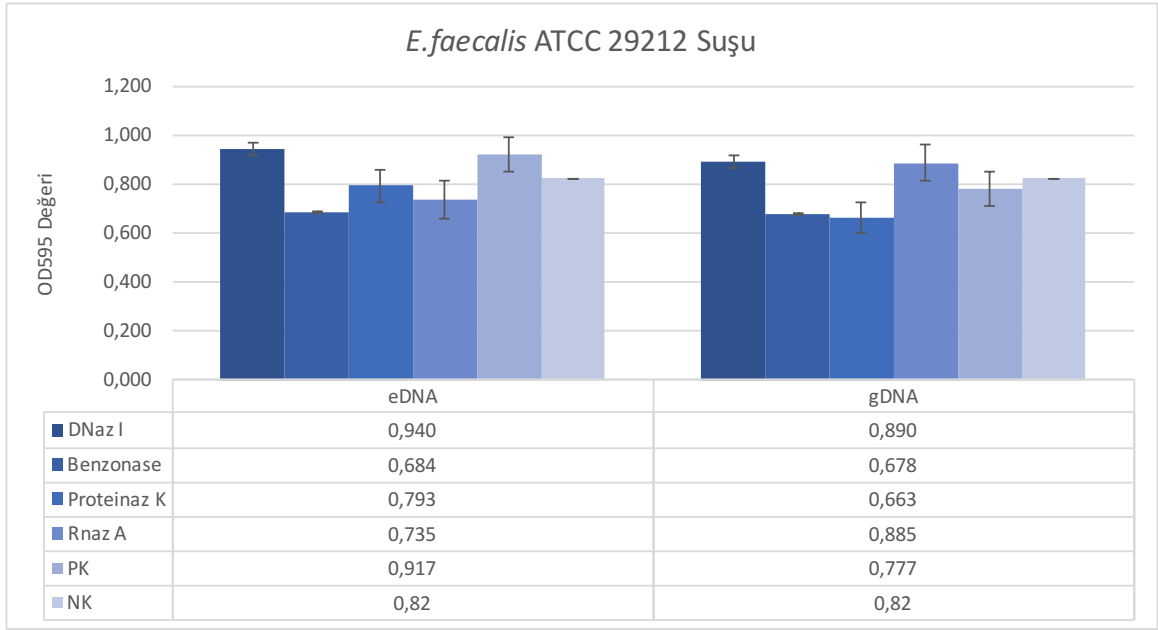
Şekil 5.57. 100 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 114 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* ATCC 29212 kodlu suşu tarafından 20 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde; DNaz I enzimi muamele edilmiş eDNA varlığında oluşan biyofilm yapısının yoğunluğunun ~1.2 birim arttığı, Benzonaz, Proteinaz K ve RNaz A uygulanmış eDNA örneklerinin ise biyofilm yoğunluğunu ~0,1 birim azalttığı belirlenmiştir. gDNA örneklerinde ise, RNaz A uygulamasının biyofilm yoğunluğunda hiçbir farklanmaya neden olmadığı; DNaz I, Benzonaz, Proteinaz K ve pozitif kontrol örneklerinin ise biyofilm biyokütlesini 0,1 birim arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 5.58.).



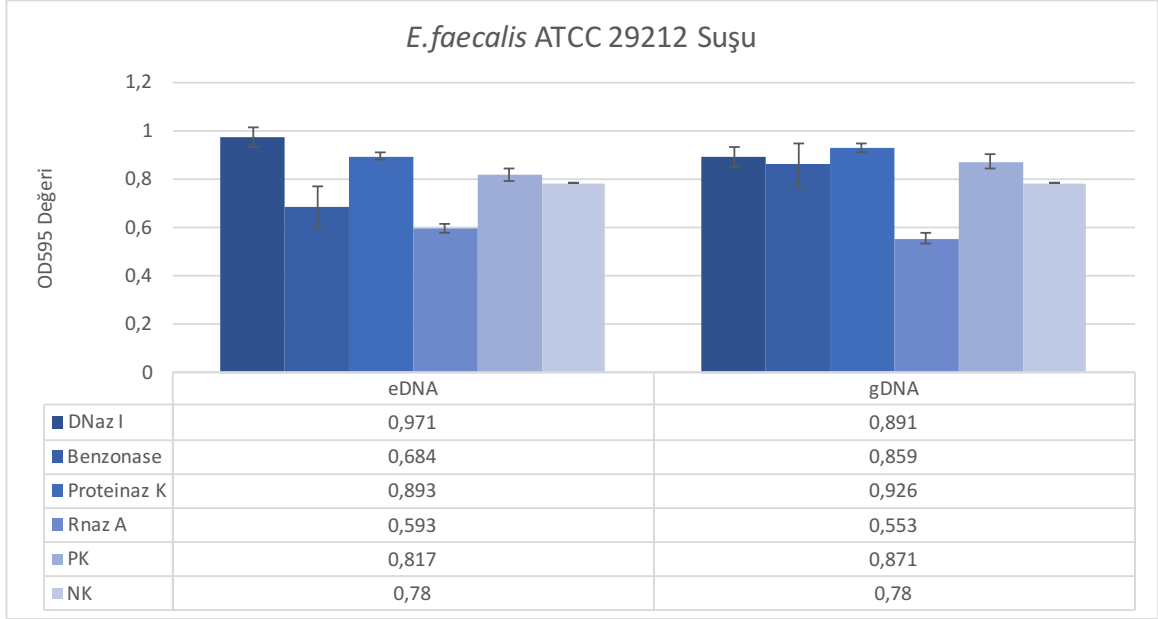
Şekil 5.58. 20 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* ATCC 29212 kodlu suşu tarafından 50 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapılarında, DNaz I enzimi uygulanan ve pozitif kontrol olan örneklerin biyofilm yoğunluğunu ~0,1 birim arttırdığı saptanmıştır. Benzonaz, Proteinaz K ve RNaz A enzimleri uygulanmış eDNA örnekleri ise, biyofilm yoğunluğunu düşük oranlarda azaltmıştır. gDNA örneklerine uygulanmış Benzonaz ve Proteinaz K enzimleri ile pozitif kontrol örnekleri biyofilm biyokütlesini ~0,15 birim azaltırken, DNaz I ve RNaz A enzimi uygulanmış örnekler, biyofilm yoğunluğunda bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 5.59.).



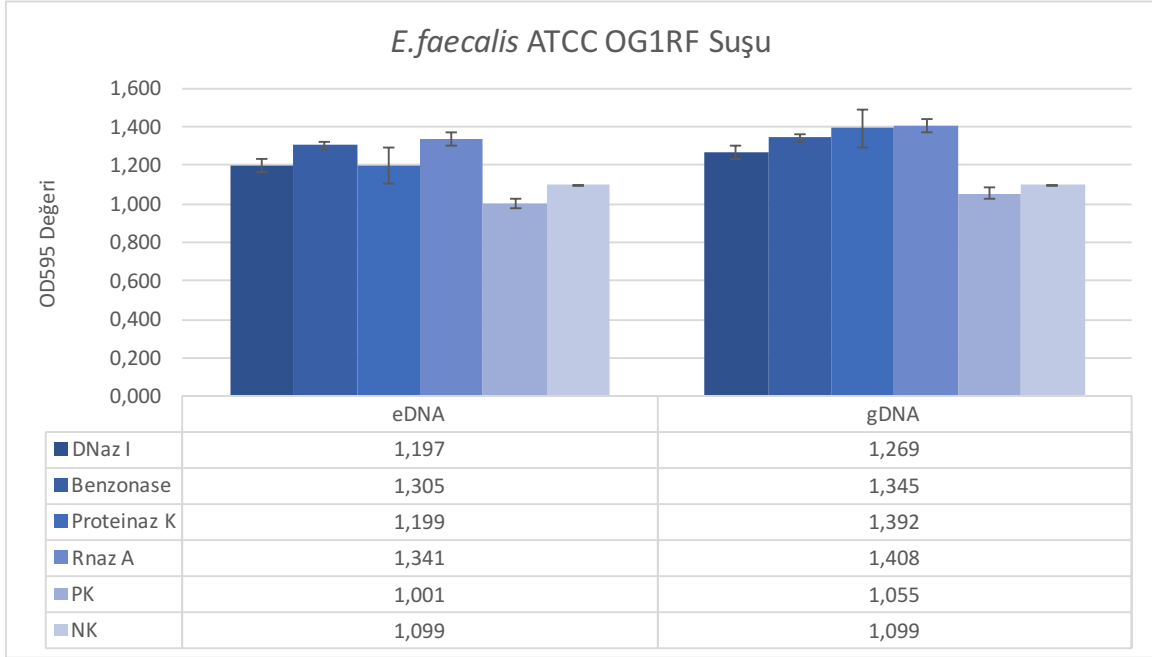
Şekil 5.59. 50 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* ATCC 29212 kodlu suşu tarafından 100 mg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapılarında, DNaz I uygulanmış eDNA varlığında oluşan biyofilm yoğunluğunun NK'ya kıyasla ~0,2 birim fazla olduğu belirlenmiştir. RNaz A enzimi uygulanmış her iki nükleik asit, biyofilm yoğunluğunu ~0,2 birim azaltmıştır. Benzonaz enzimi uygulanmış eDNA örnekleri biyofilm yoğunluğunu ~0,1 birim azaltırken, gDNA örnekleri biyofilm miktarında  $\leq 0,1$  birim artış sağlamıştır (Şekil 5.60.).



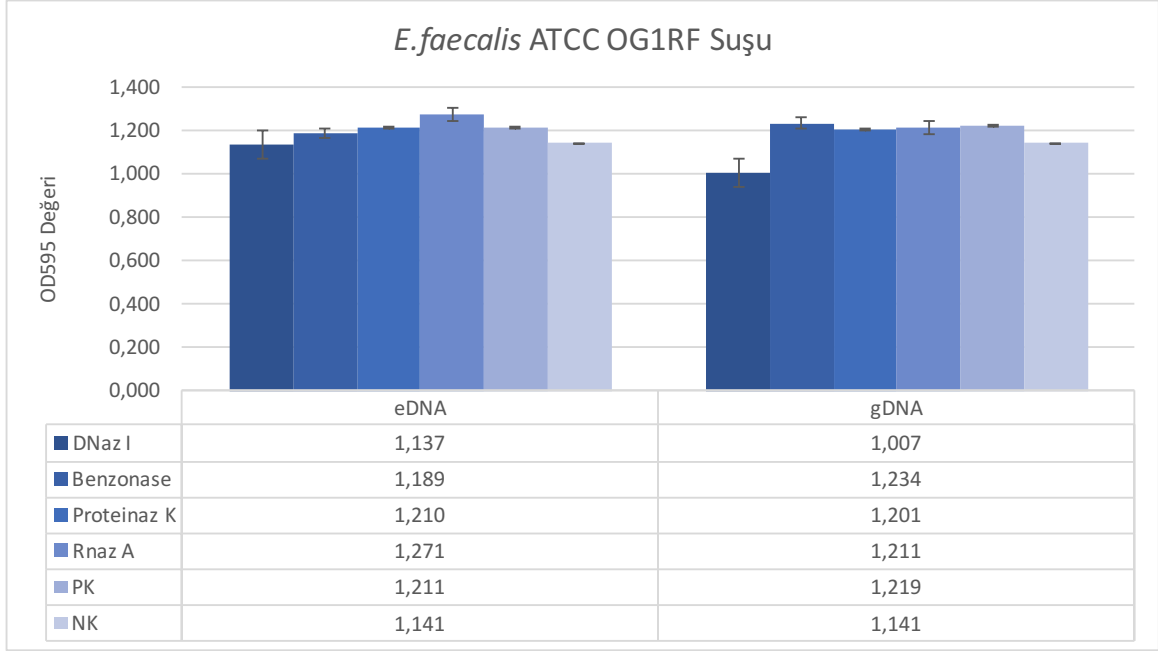
Şekil 5.60. 100 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* ATCC OG1RF kodlu suşu tarafından 20 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yapılarında, enzim uygulanmış bütün nükleik asitlerin biyofilm miktarlarını değişen oranlarda arttırdığı tespit edilmiştir. Enzim uygulanmamış pozitif kontrol örneklerinde ise her iki nükleik asit için de biyofilm yoğunluğunda bir farklanma olmadığını söylemek mümkündür (Şekil 5.61.).



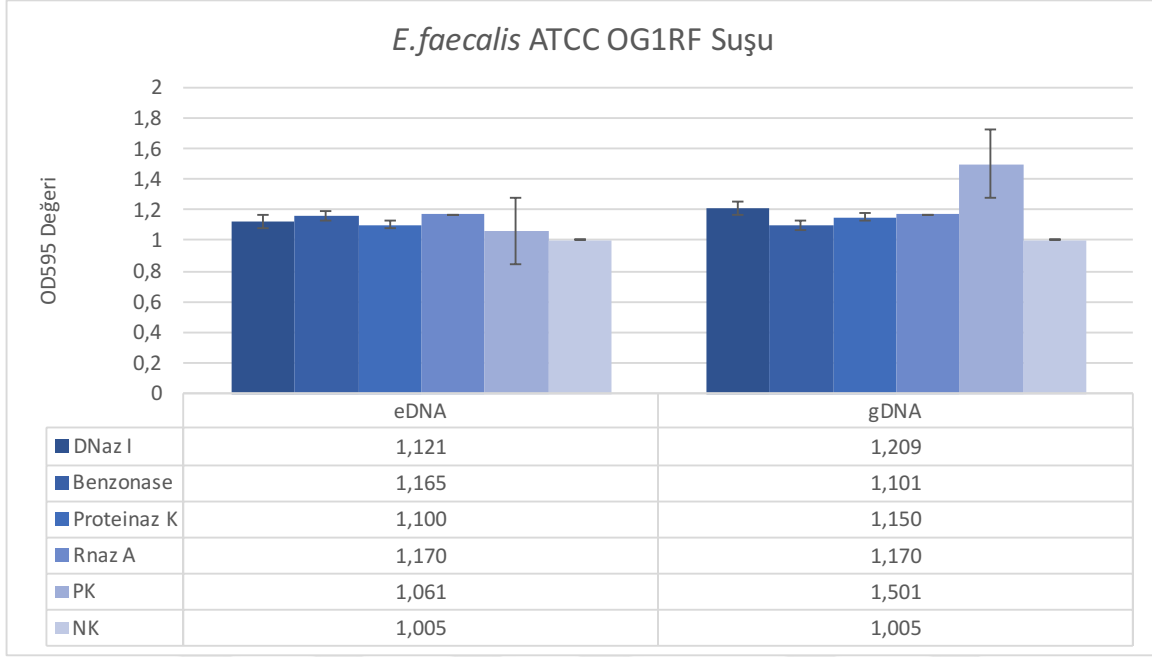
Şekil 5.61. 20 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* ATCC OG1RF kodlu suşu tarafından 50 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm yoğunluklarına bakıldığında, pozitif kontrol örnekleri dahil, enzim uygulanmış bütün nükleik asitlerin biyofilm miktarlarını düşük düzeylerde (~0,1) arttırdığı tespit edilmiştir. gDNA için de; DNaz I uygulanmış örnekler biyofilm yoğunluğunda ~0,1 birimlik bir azalmaya, diğer örneklerin ise ~0,1 birimlik bir artışa neden olduğu saptanmıştır (Şekil 5.62.).



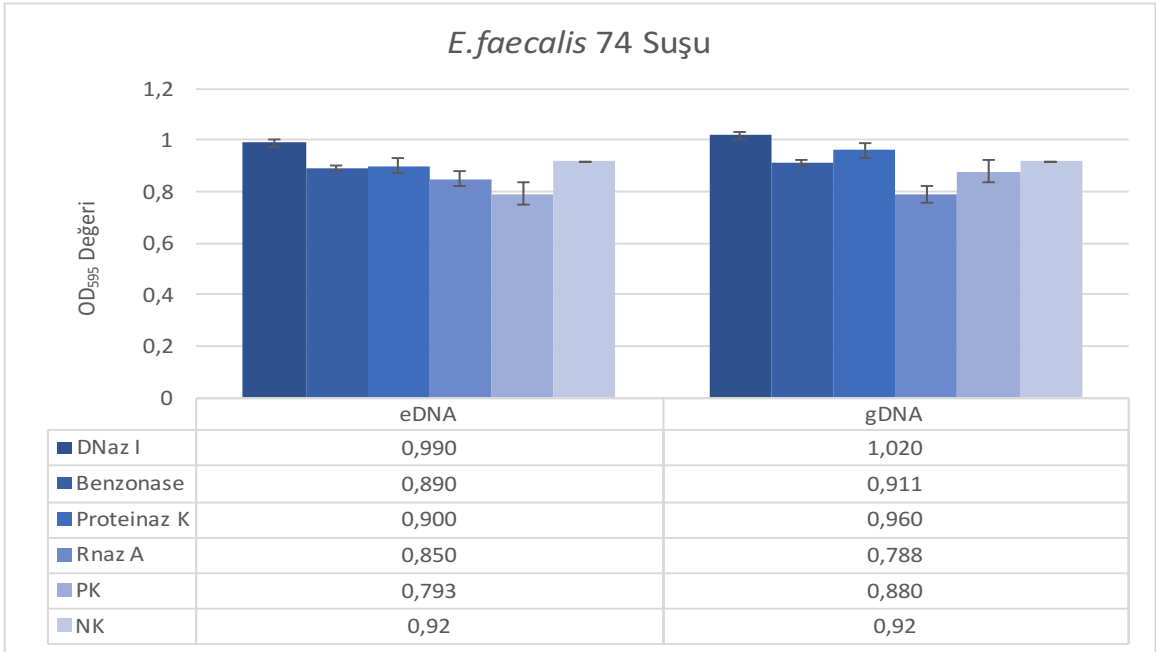
Şekil 5.62. 50 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* ATCC OG1RF kodlu suşu tarafından 100 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 24 saatlik biyofilm değerleri incelendiğinde; gDNA pozitif kontrol örneğinin biyofilm yoğunluğunun, NK'ya kıyasla, ~0,5 birim daha fazla olduğu, eDNA için ise, bütün uygulamaların biyofilm yoğunluğunu ~0,1 birim arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 5.63.).



Şekil 5.63. 100 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 24 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

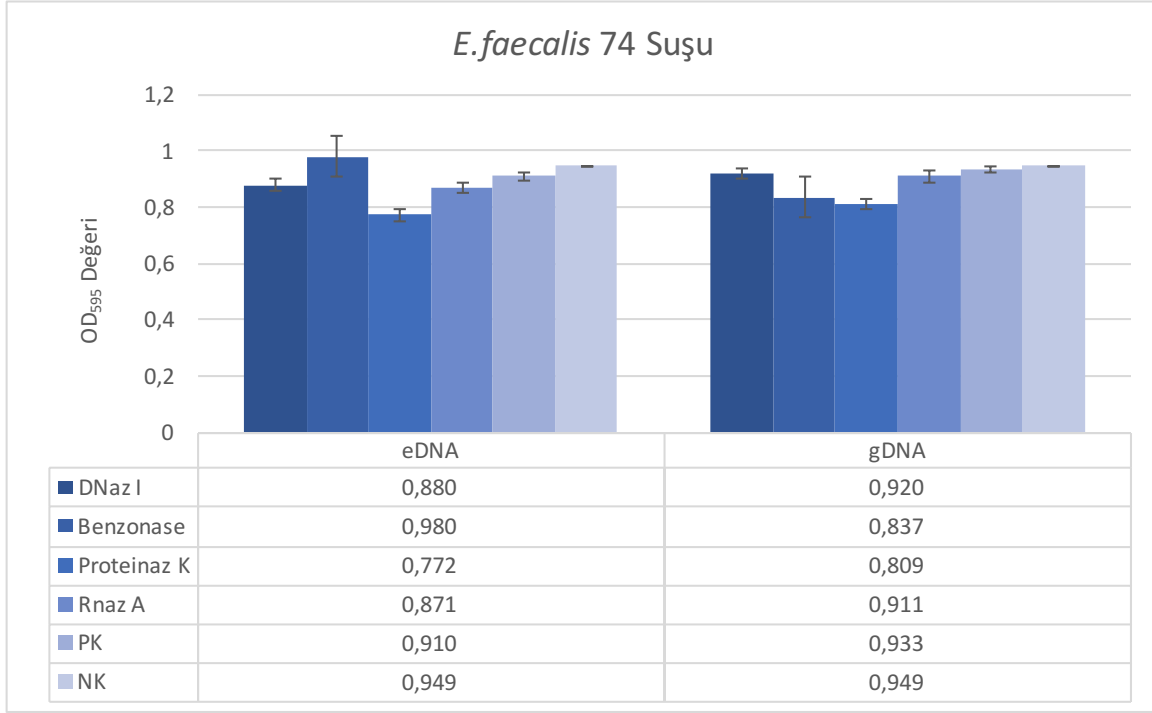
*E. faecalis* 74 suşu tarafından 20 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yoğunlukları karşılaştırıldığında; RNaz A ile muamele edilmiş eDNA'nın biyofilm yoğunluğunda ~0,1 birim azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde enzim uygulanmamış eDNA'nın da biyofilm oluşumunu olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. RNaz A uygulanmış her iki nükleik asit örneğinin biyofilm miktarlarını ~0,1 birim azalttığı, DNaz I varlığında oluşan biyofilm yoğunluğunun NK'ya kıyasla ~0,1 birim fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.64.).



Şekil 5.64. 20 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 74 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

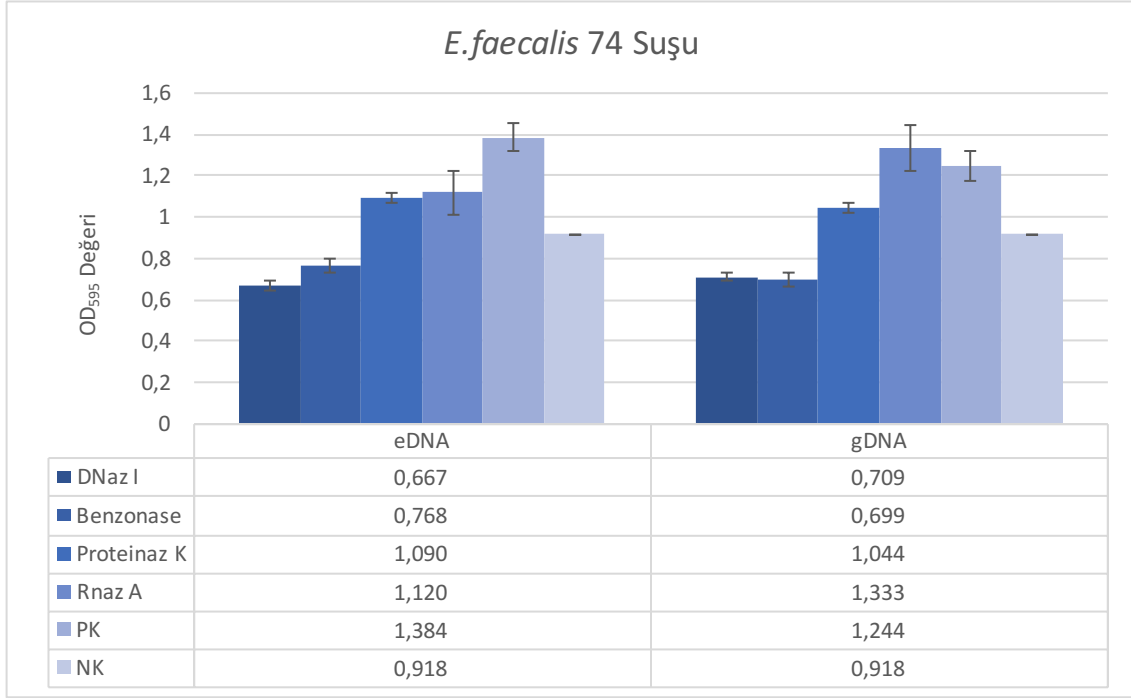


*E. faecalis* 74 kodlu suşu tarafından 50 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm biyokütlesi karşılaştırıldığında; sadece proteinaz K ile muamele edilmiş eDNA örneğinin NK'ya kıyasla ~0,2 birim kadar azaltmaya neden olduğu belirlenmiştir. Benzonaz ile muamele edilmiş gDNA örnekleri de biyofilm biyokütlesini, kontrol gruba göre ~0,1 birim azaltmıştır (Şekil 5.65.).



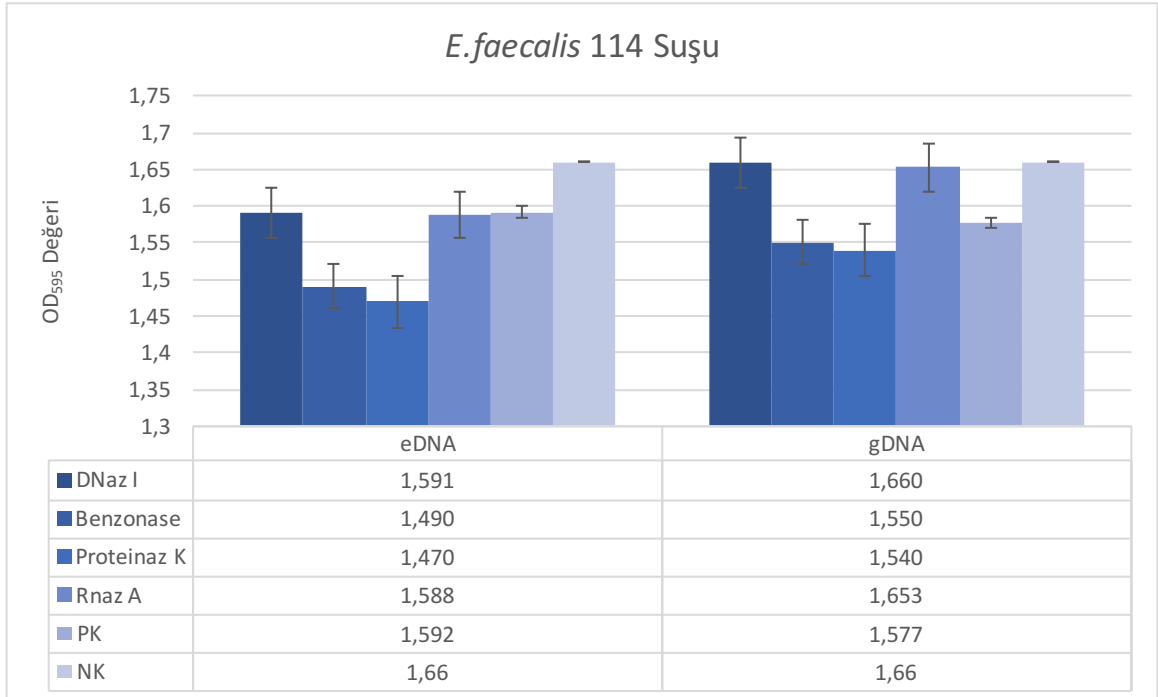
Şekil 5.65. 50 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 74 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* 74 suşu tarafından 100 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapısı incelendiğinde, her iki nükleik asit örneği için de DNaz I ve Benzonaz enzimi uygulamasının biyofilm yoğunluğunu azalttığı belirlenmiştir. Her iki nükleik asit ile yapılan denemeler sonucunda Proteinaz K, RNaz A ve pozitif kontrol örnekleri ise, biyofilm yoğunluğunu değişen oranlarda arttırdığı saptanmıştır (Şekil 5.66.).



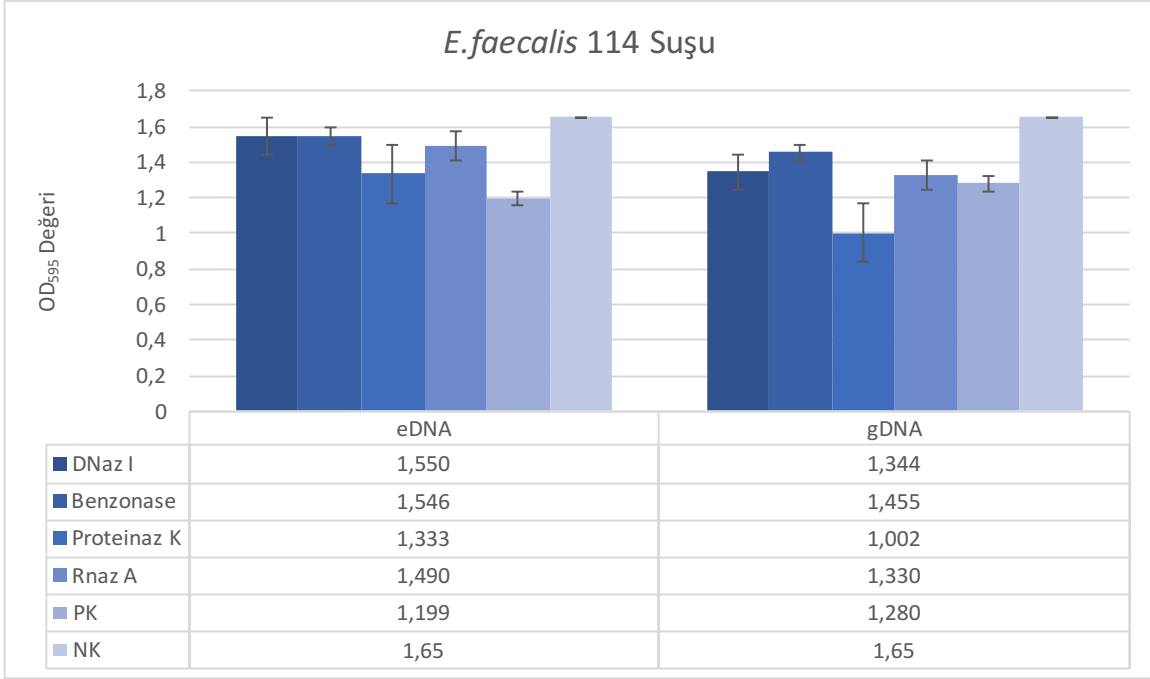
Şekil 5.66. 100 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 74 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* 114 suşu tarafından 20 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, en fazla inhibisyon etkisi Proteinaz K ile muamele edilmiş nükleik asitlerde gözlenmiştir (~0,2). Bütün enzim uygulanmış eDNA örnekleri ve pozitif kontrol örnekleri biyofilm miktarını değişen oranlarda azaltmıştır. gDNA örneklerinin varlığında ise Benzonaz, Proteinaz K ve pozitif kontrol uygulamaları sonucu biyofilm biyokütlesinde farklı oranlarda inhibisyon meydana gelmiştir . DNaz I ve RNaz A uygulanmış gDNA'ların uygulanması ise, biyofilm yapısında bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 5.67.).



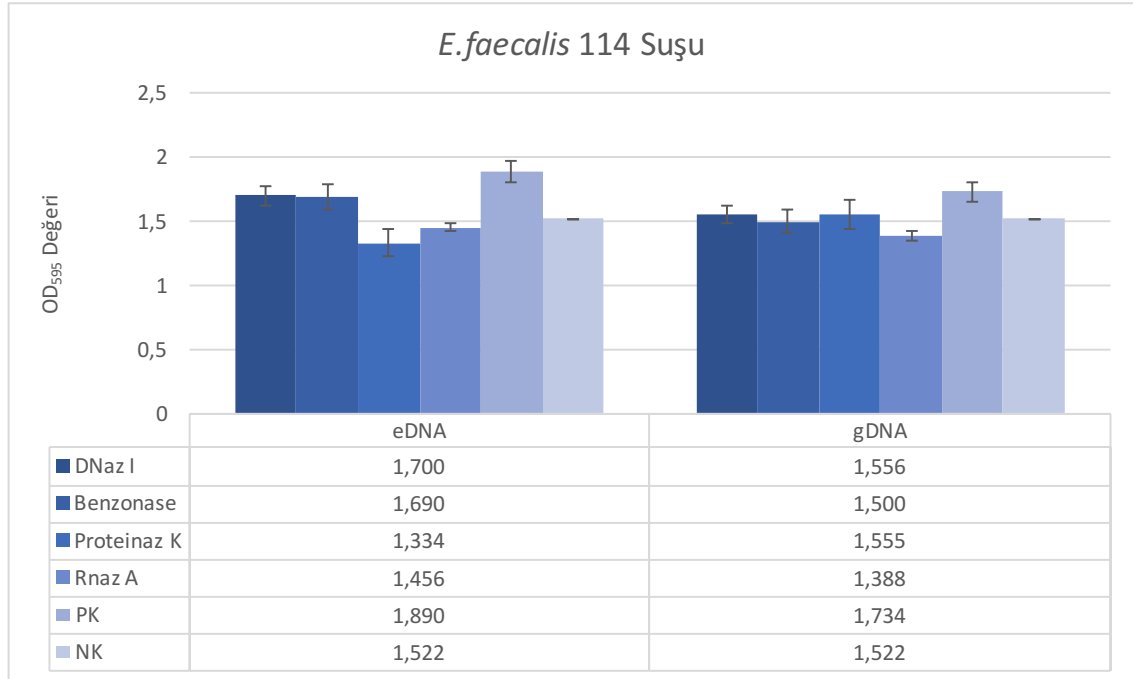
Şekil 5.67. 20 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 114 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* 114 kodlu suşu tarafından 50 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, pozitif kontrol örneklerinin biyofilm miktarlarını eDNA için ~0,45 birim, gDNA için ise ~0,4 birim azalttığı tespit edilmiştir. Her iki nükleik asit örneğinde de en fazla degradasyon Proteinaz K ile muamele edilmiş nükleik asitlerin eklenmesinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. (Şekil 5.68.).



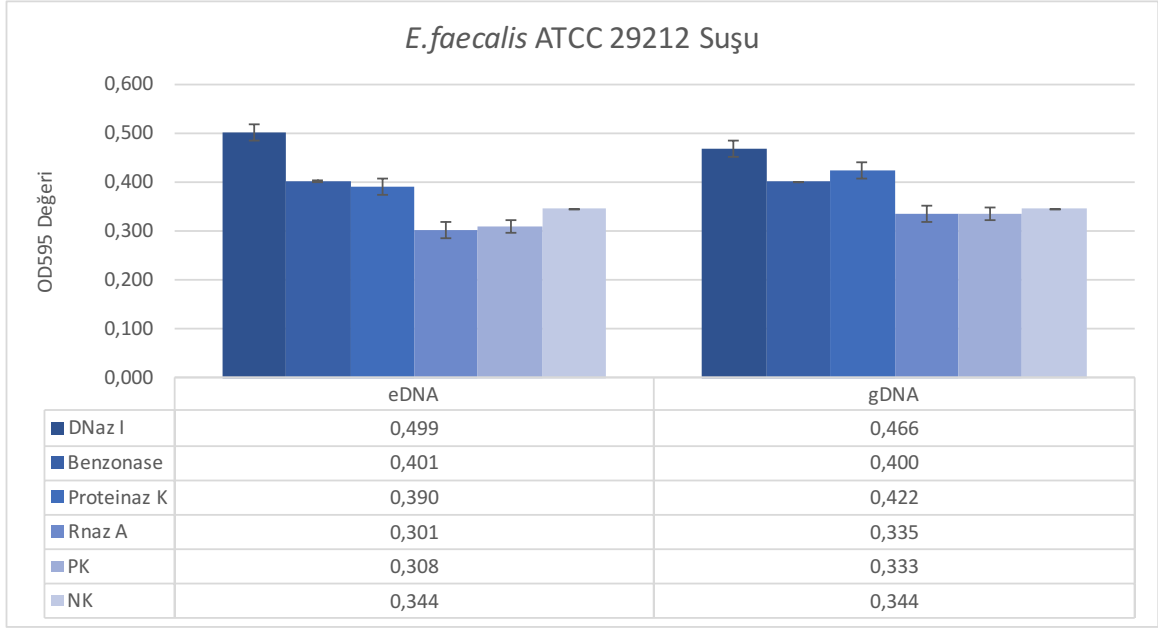
Şekil 5.68. 50 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 114 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* 114 suşu tarafından 100 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yoğunlukları karşılaştırıldığında; DNaz I, Benzonaz ve pozitif kontrol örneklerinin varlığında oluşan biyofilm yoğunluğunun NK'ya kıyasla daha fazla olduğu, bunun yanında Proteinaz K ve RNaz A uygulanmış eDNA'ların biyofilm miktarlarını ~0,1-0,2 birim azalttığı belirlenmiştir. gDNA için ise, RNaz A uygulanmış örnekler biyofilm miktarlarını azaltırken, pozitif kontrol örneğinin biyofilm miktarını arttırdığı belirlenmiştir. Diğer enzim uygulanmış gDNA örneklerinin biyofilm biyokütlesinde belirgin bir farklanmaya neden olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 5.69.).



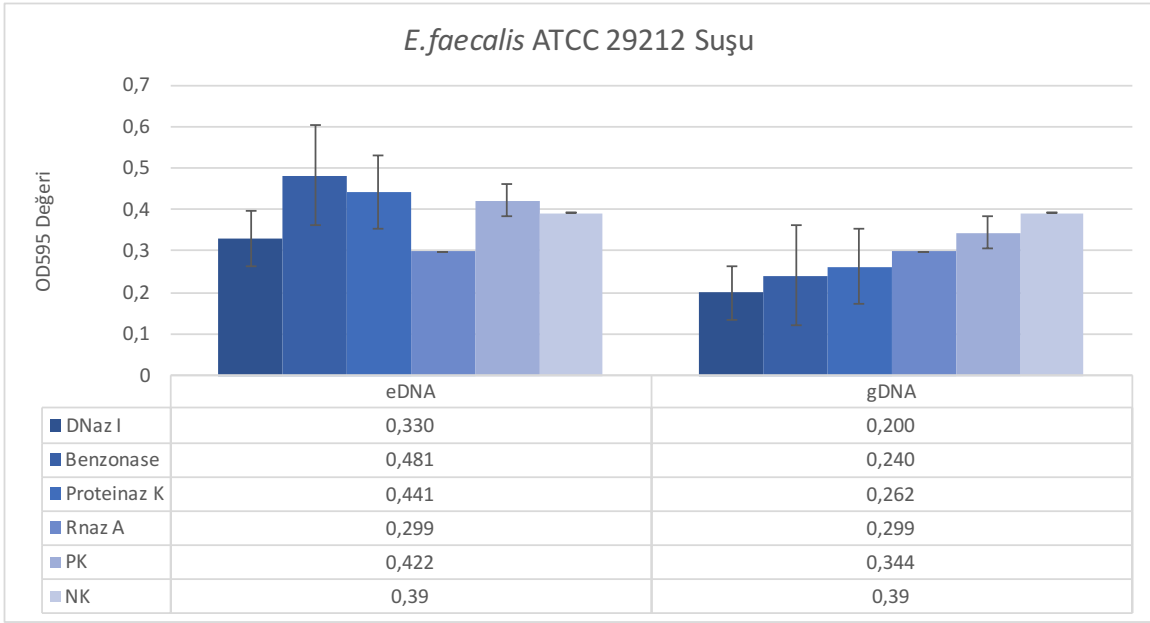
Şekil 5.69. 100 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* 114 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 20 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I, Benzonaz ve Proteinaz K uygulanmış örneklerin biyofilm yoğunluğunda artışa neden olduğu saptanmıştır. Her iki nükleik asit için de sadece RNaz A uygulanmış örneklerin ve enzim muamele edilmemiş nükleik asitlerin varlığında biyofilm biyokütlesinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 5.70.).



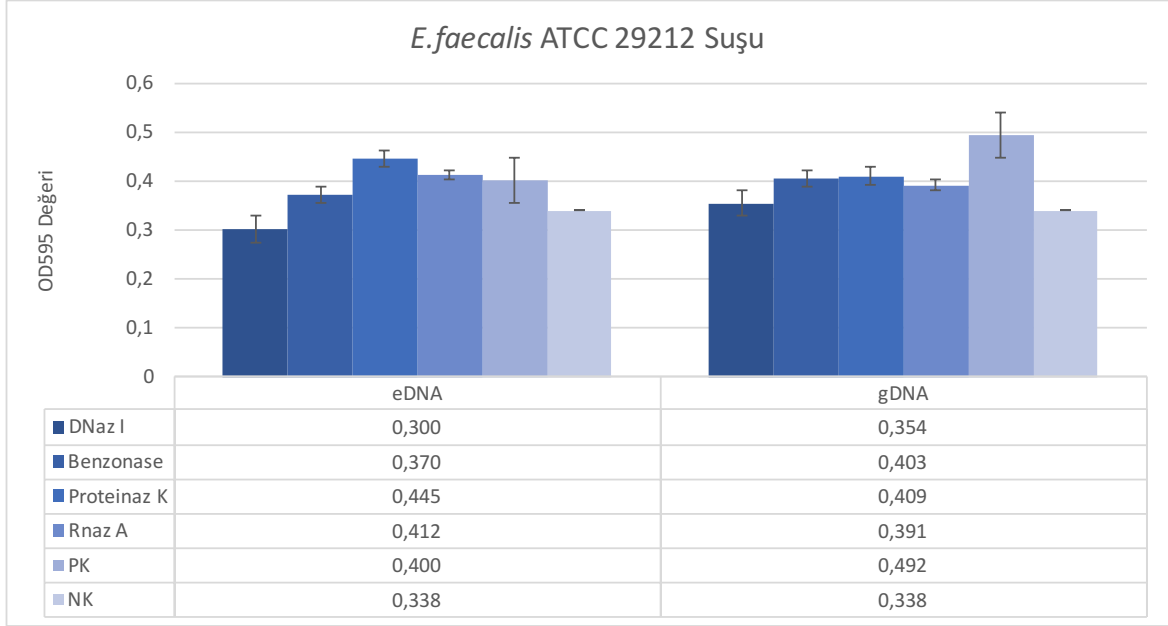
Şekil 5.70. 20 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 50 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, RNaz A uygulanmış eDNA varlığında biyofilm biyokütlesinde ~0,1 birim azalma olduğu; Benzonaz, Proteinaz K ve pozitif kontrol örneklerinin ise biyofilm yoğunluğunu ≤0,1 birim arttırdığı belirlenmiştir. Enzim uygulanmış tüm gDNA örneklerinde ve pozitif kontrol örneklerinde biyofilm miktarlarında farklı düzeylerde azalma belirlenmiştir. Biyofilm biyokütlesinde en belirgin azalmanın ise DNaz I uygulanmış örneklerde (~0,2 birim) gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 5.71.).



Şekil 5.71. 50 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

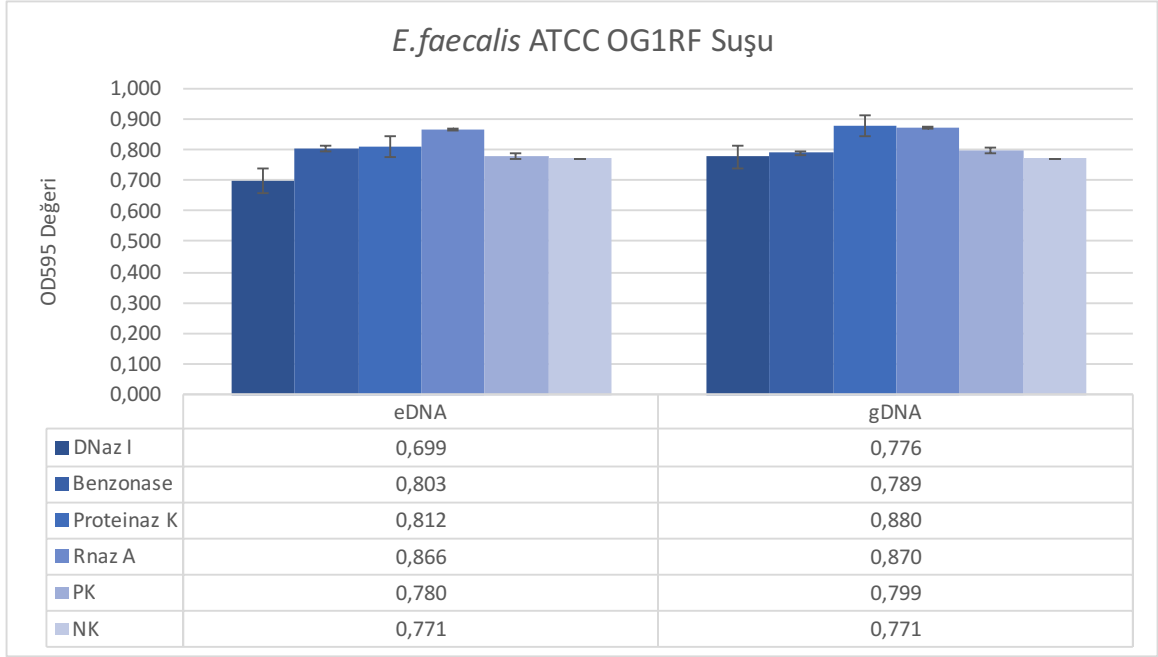
*E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından 100 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, yalnız Proteinaz K uygulanmış eDNA'nın biyofilm yoğunluğunu ~0,1 birim arttırdığı saptanmıştır. gDNA örneklerinde ise, DNaz I enzimi dışında uygulanmış tüm gDNA örneklerinin ve enzim uygulanmamış gDNA pozitif kontrol örneğinin biyofilm biyokütlesinde farklı oranlarda artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.72.).



Şekil 5.72. 100 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC 29212 suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

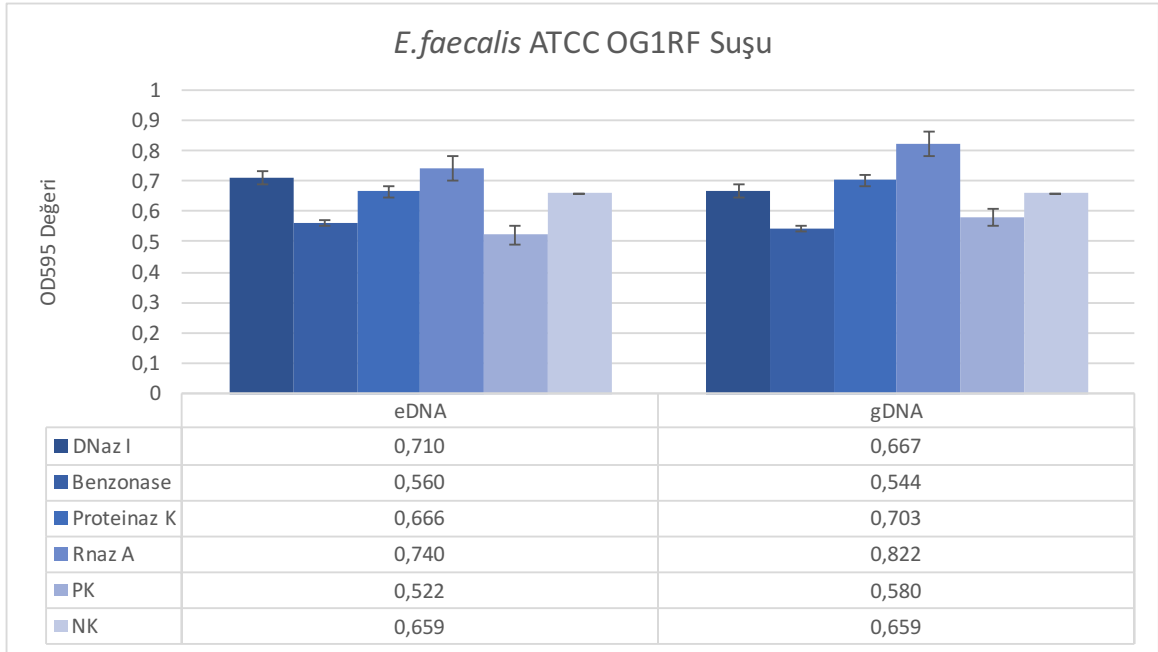


*E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından 20 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, RNaz A uygulanmış eDNA örneğinin biyofilm miktarlarını 0,1 birim arttırdığı belirlenmiştir. gDNA örneklerinde ise en yüksek düzeyde farklanma yaklaşık ~0,1 birim artış ile proteinaz K uygulanmış örneklerde tanımlanmıştır (Şekil 5.73.).



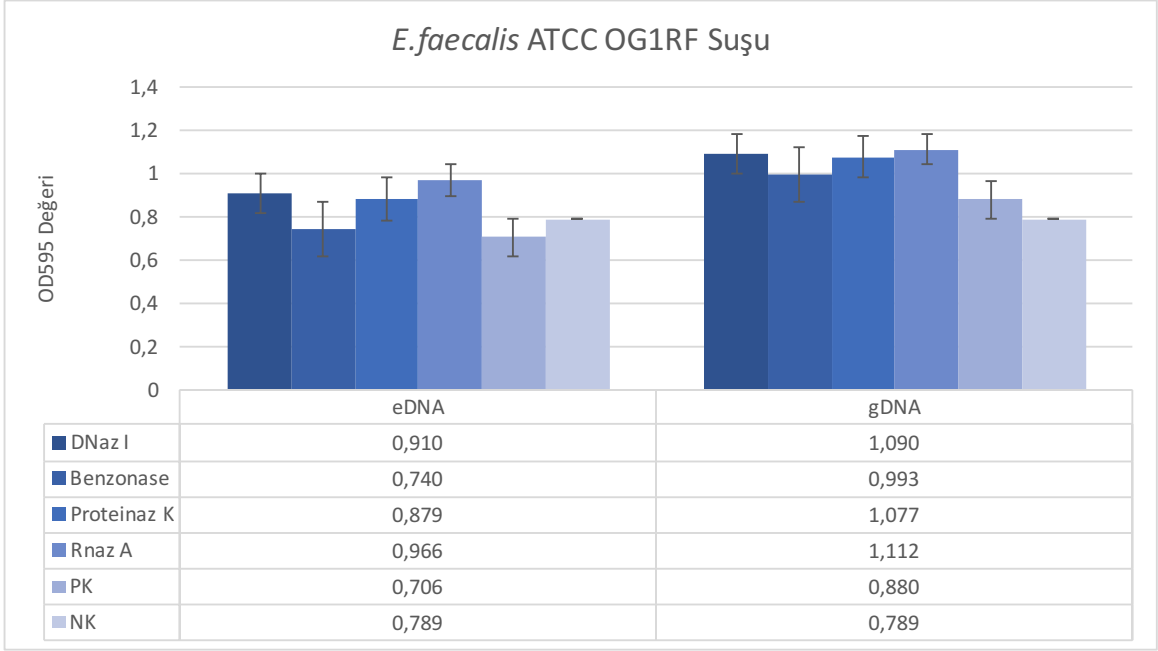
Şekil 5.73. 20 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* ATCC OG1RF kodlu suşu tarafından 50 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde, DNaz I ve RNaz A uygulanmış örneklerin biyofilm yoğunluğunu  $\leq 0,1$  oranında arttırdığı, Benzonaz ve pozitif kontrol örneklerinin eklendiği uygulamaların ise biyofilm biyokütlesinde azalmaya ( $\sim 0,1$ ) neden olduğu belirlenmiştir. gDNA örneklerinde ise, en belirgin farklanma RNaz A varlığında oluşan biyofilm yoğunluğunda gerçekleşmiş ve uygulama sonucunda biyofilm biyokütlesinde  $\sim 1,7$  oranında artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.74.).



Şekil 5.74. 50 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

*E. faecalis* ATCC OG1RF kodlu suşu tarafından 100 µg/ml nükleik asit varlığında oluşturulan 48 saatlik biyofilm yapıları incelendiğinde; DNaz I, Proteinaz K ve RNaz A enzimi uygulanmış eDNA örneklerinin biyofilm miktarını değişen oranlarda arttırdığı, Benzonaz ve pozitif kontrol örneklerinin ise azalttığı belirlenmiştir. DNaz I, Benzonaz, Proteinaz K, RNaz A ve pozitif kontrol gDNA örneklerinin uygulanmasının ise, biyofilm miktarlarının arttırdığı saptanmıştır (Şekil 5.75.).



Şekil 5.75. 100 µg/ml nükleik asit varlığında *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan 48 saatlik biyofilme enzim ile muamele edilmiş ve enzim muamelesi yapılmamış nükleik asitlerin etkileri

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırmada, dünyada en tehlikeli nitelikte nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan Gram pozitif fırsatçı enterokokların dominant üyesi *E. faecalis*'e (132) ait 4 suşta (74, 114, ATCC 29212 ve ATCC OG1RF) biyofilm oluşumu üzerine eDNA'nın (hücre dışı DNA) rolünün belirlenmesi ve bu yolla söz konusu hastalık etmenlerinin kalıcılığının kontrolünde etkin stratejilerin geliştirilmesine esas teşkil edecek bilgi birikiminin sağlanması amaçlanmıştır. Ayrıca antibiyotik ve farklı enzimlerin tek tek ve kombine kullanımlarının bu patojenlerin oluşturduğu biyofilmler üzerine etkinlikleri tanımlanarak, özellikle abiyotik yüzeylerdeki kontaminasyonlardan korunmada kullanım potansiyeli taşıyan ajanların belirlenmesi hedeflenmiştir.

*E. faecalis* suşlarında (74, 114, ATCC 29212 ve ATCC OG1RF) planktonik formların sıvı besiyerinde ürettiği (ortama saldıgı) eDNA, izole edilerek genomik DNA örnekleri ile karşılaştırılmak suretiyle doğrulanmış ve yapılan PicoGreen ölçümleri sonucunda planktonik formlarının kültür ortamlarında eDNA salımının gerçekleştiği belirlenmiştir.

Enterokoklar için planktonik formlarında eDNA salımına ait ilk verileri teşkil eden bulgularımızda eDNA miktarının çok yüksek düzeyde tespit edilmesi, eDNA'nın bu bakterilerin planktonik formları için de fonksiyonel bir rolü olduğuna işaret etmektedir. Nitekim *P. aureginosa* planktonik kültürleri ile yürütülen bir çalışmada (46) planktonik formlarda eDNA salımının geç logaritmik fazda başladığı ve durma fazında maksimuma ulaştığı belirlenmiştir. Araştırmacılar daha sonra, bu suşun yeter sayı algılama regülasyon sistemleri (quorum-sensing, QS) bozulmuş bir mutantında eDNA salımının gerçekleşmediğini saptamıştır. Bu bulgudan hareketle araştırmacılar, eDNA'nın planktonik kültürlerde popülasyon sinyallerine bağlı olarak fonksiyonel olduğu yorumunu yapmıştır. Bu durum *Rhodovulum*, *Streptococcus*, *Reinheimera* türlerinde de örneklenmiştir (133–135). Ayrıca planktonik bakteri formları ile yürütülen bir diğer çalışmada (118), bir önceki çalışmadan farklı olarak, *Pseudomonas* ile birlikte *Reinheimera*, *Microbacterium* ve *Serratia* türlerinin planktonik kültürlerinde eDNA salımının erken ekponansiyel üreme fazında başladığı ve geç logaritmik üreme fazında maksimuma ulaştığı belirlenmiştir. Tüm bu veriler, çalışmamızda planktonik formlarla yürütülen eDNA salımı bulguları ile paralellik göstermekte ve eDNA'nın biyofilm yapısallığı ve fonksiyonelliği üzerindeki etkinliğinin yanında, planktonik (bağımsız) yaşam biçimlerindeki fonksiyonlarının belirlenmesinin de

prokaryotik hücre biyolojisinin ve üreme fazlarının regülasyonunun detaylı bir şekilde anlaşılması açısından önem taşıdığına işaret etmektedir.

Çalışmamızın temel amacı eDNA'nın *Enterococcus* biyofilmlerinin üretimindeki rolünü belirlemek olduğundan, bu aşamadan sonra, çalışılan suşlarda biyofilm üretim düzeylerinin ve eDNA salımının, optimum biyofilm üretim sıcaklığında (37°C), zamana bağlı (4, 12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde) değişimi incelenmiştir. Bu denemeler sonucunda en yüksek biyofilm üretimi 12 saatte gerçekleşmiştir. eDNA'nın yüksek düzeyde salımı da, *E. faecalis* ATCC 29212 suşu hariç, diğer tüm suşlarda maksimum biyofilm üretim zamanı ile aynı bulunmuştur. *E. faecalis* ATCC 29212 suşunda maksimum eDNA salımı 4. saat sonunda gerçekleşmiştir. Ancak 12 saat sonundaki ölçümler ile 4. saat sonunda gerçekleştirilen ölçümler arasında sadece 5 ng/μl bir fark bulunmaktadır. Değişik çalışmalarda eDNA salımının, biyofilm oluşumunun ilk aşamasından itibaren arttığı ve eDNA'nın biyofilm matriksinde birikiminin; adhezyonda, bakteriyel agregasyonun stabilitesinde, dış etkilere karşı korunmada, hareketliliğin regülasyonunda, besinsel gereksinimlerin karşılanmasında ve genetik aktarımda rol oynadığı belirlenmiştir (48,69,136–139). Biyofilm oluşumunda eDNA salımı dikkate alındığında *Enterococcus* suşları için elde ettiğimiz veriler bu literatür verileri ile paralellik göstermektedir. Ancak denemelerde kullanılan *E. faecalis* 74 suşu hariç, diğer 3 suşta, planktonik formlarından salınan eDNA miktarı, aynı bakterilerin aynı inkübasyon zamanında biyofilm yapılarından salınan eDNA miktarından daha fazladır. *E. faecalis* 74 suşunda ise biyofilm yapılarında salınan eDNA miktarı 230 ng/μl iken, planktonik hücrelerde 205 ng/μl olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, eDNA'nın söz konusu suşlarda sadece biyofilm oluşumunda değil, planktonik hücrelerin kesikli kültürlerinde değişik üreme fazları arasındaki adaptasyonda da rol aldığının işaretleridir. Özellikle, kesikli bakteri kültürlerinde yer alan planktonik formların hücre yüzeyi ile ilişkili fiber yapılar halinde eDNA'nın belirlenmiş oluşu, bu tespiti destekleyen en önemli bulgudur (137).

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

Biyofilm yapıları üzerinde antibiyotiklerin tek tek etkilerinin incelendiği çalışmalarda; kanamisin antibiyotiğinin biyofilm oluşumuna olumlu katkıda bulunduğu ve bir eradikasyon

ajanı olarak kullanılamayacağı açıkça görülmüştür. *P. aeruginosa* biyofilmleri ile yürütülen çalışmalarda, kanamisin de dahil olduğu aminoglikozit grubu antibiyotiklerin, biyofilm biyokütlesinin artışı üzerinde pozitif bir etkiye sahip olduğu saptanmış ve bu durumun doğrudan ya da dolaylı olarak bu antibiyotiklerin c-di-GMP inaktivasyonunu gerçekleştirmesi sonucu meydana geldiği öne sürülmüştür (140). Kinolon grubundan bir antibiyotik olan nalidiksik asit genel olarak Gram negatif bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlara karşı kullanılmaktadır. Enterokok biyofilmlerine karşı önemli bir etki göstermemesi bu açıdan bakıldığında doğal bir durumdur. Tetrasiklin ve ampisilin ise eradikasyon gücü bakımından oldukça zayıf olmakla birlikte, düşük oranlarda da olsa biyofilm üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Enterokokların; başta amiloglikozit ve beta laktam grup antibiyotikler olmak üzere, farklı gruplara karşın yüksek düzeyde doğal direnç içermeleri ve biyofilm formlarının ayrıca antibiyotik penetrasyonunu engelleme yetenekleri nedeniyle, bu bakterilerin biyofilm yapılarının giderilmesinde antibiyotiklerin kullanımını engelleyen ana unsurdur (141–143).

*E. faecalis*'in çalışmamızda kullanılan dört farklı suşunda DNaz I ve Benzonaz'ın antibiyotiklerle birlikte kombine edilerek kullanımı, antibiyotiklerin genel etkinlik biçiminde (biyofilmi azaltan ya da artıran etki) önemli bir değişime yol açmamıştır. Antibiyotiklerin tek tek kullanımlarında olduğu gibi, ampisilin ve tetrasiklin, kombine kullanımda da en yüksek biyofilm inhibisyon etkinliğini göstermiştir. Ancak bu etkinlikler bile söz konusu bakterilerin eradikasyonunda bu kombinasyonların kullanımı için önerilebilir bir potansiyel göstermemektedir. Benzonaz ve DNaz I enzimlerinin biyofilm üzerine kombine etkilerinin bu suşlarda beklenenden düşük oluşu, Barnes ve arkadaşlarının (2012) bulguları ile açıklanabilir. Araştırmacılar, çalışmamızda da kullanılan *E. faecalis* OG1RF suşu ile yürüttükleri çalışmada, biyofilm içerisinde bulunan eDNA'nın bazı bölgelerinin mukoz özellikte bir zarla kaplı olduğunu, tam olarak bilinmemekle beraber polisakkarit kökenli olduğu tahmin edilen bu koruyucu zarın eDNA'yı çevresel şartlardan koruduğunu ileri sürmüşlerdir (52). Bu bulgular DNA parçalayıcı enzimlerin biyofilm yapısındaki eDNA üzerinde ve dolayısı ile biyofilmin bozulmasında neden önemli bir etkinliğe sahip olmadığını izah etmede önemli kanıtlardır.

Çalışmamızın son aşamasında; araştırmada kullanılan enterokok suşlarının biyofilm üretim özellikleri üzerine eDNA'nın rolünün tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle agaroz jel elektroforezinde *E. faecalis* biyofilmlerinden salınan eDNA'nın

belirlenememesinden dolayı, öncelikle PicoGreen yöntemi ile eDNA üretimlerinin doğrulanması gerçekleştirilmiştir. Biyofilm oluşumu süresince eDNA'nın üretildiğinin belirlenmesinin ardından, fenol-kloroform yöntemi ile izole edilen eDNA örneklerinin biyofilm yapılarında zamana bağlı miktarsal tayinleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler tüm suşlarda en yüksek düzeyde eDNA üretiminin, 24 saat sonunda gerçekleştiğini göstermiştir. Bu aşamadan sonra 20, 50 ve 100 ng/μl eDNA ve gDNA ilave edilmiş ortamlarda 12, 24 ve 48 saat süresince geliştirilen biyofilmlerin miktarsal tayinleri yapılarak, her iki tip DNA'nın etkinliği ve bunun yanında söz konusu DNA'ların ilave edildiği ortamlara proteinaz K, RNaz A, DNaz I ve Benzonaz ilave edilerek, bu ajanların kombine etkileri tanımlanmıştır. Çalışma sonuçları; eDNA'nın ve gDNA'nın enterokok biyofilmleri üzerinde, suştan suşa ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişen bir etkinlik içerdiğini göstermiştir. Örneğin; eDNA ve 20 ng ve 50 ng eDNA ve gDNA uygulamalarında *E. faecalis* 74 suşunda biyofilm oluşumunu teşvik ederken, bu ajanlar 48 saatte üretilen biyofilm düzeyinde azalmaya yol açmıştır. Yine enzim etkinlikleri de zamana bağlı bir değişim göstermiştir. eDNA ve gDNA miktarları bu suшта 100 ng düzeyine çıkarıldığında ise, söz konusu DNA örneklerinin ve enzimlerin etkinliği bu sonuçlara zıt bir eğilim göstermiştir. Benzer durumlar diğer üç enterokok suşunda da saptanmıştır. Buradan hareketle eDNA ve gDNA'nın enterokoklarda suştan suşa ve inkübasyon zamanına bağlı olarak biyofilm oluşumunu teşvik edebileceği gibi, belirli düzeylerde inhibe edebileceğini de söylemek mümkündür. eDNA ve gDNA'nın farklı enzimlerle kombine edildiği sonuçlar da bu bulgularla paralellik göstermektedir. RNaz A, DNaz I, proteinaz K ve Benzonaz enzimlerinin biyofilm üretimi üzerine etkinlikleri de suştan suşa ve zamana bağlı olarak biyofilm kütesinin artışına, azalmasına ya da stabil kalmasına neden olmuştur. Tüm bu sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde eDNA, gDNA ve biyofilm matriksinde yer alan bileşenlere (RNA, DNA ve proteinler) etkili enzimlerin, *E. faecalis* biyofilmlerinin inhibisyonunda, suş ve inkübasyon zamanı parametrelerine bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden, bu cinsin biyofilm yapısı ile mücadelede kullanım olanağını ortadan kaldırmaktadır. Yine bu çalışmalarda eDNA ile gDNA arasında biyofilm üretimi üzerindeki etkinlikleri bakımından spesifik bir farklılık belirlenmemiştir. Özetle bu çalışmada kullandığımız kontrol suşlar evrensel suşlar olmasına rağmen, bizim bulgularımız; enterokoklarda eDNA'nın biyofilm oluşumunun teşvik edilmesinde kritik bir rol üstlendiği yönündeki literatür verilerini (51,52,144) ve bu doğrultuda oluşturulan genel kanıyı desteklememektedir.

Elde edilen bulgular ışığında Enterokok biyofilmlerinde eDNA ya da gDNA varlığının biyofilm üretiminin teşviki ya da inhibisyonu üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadığı, tanımlanan inhibisyon ya da aktivasyon etkilerini enzim denemelerinin desteklememesi nedeniyle, net bir şekilde belirlenmiştir. Bu suşlarda ayrıca antibiyotiklerin de biyofilm yapılarına karşı bir savaşım ajanı olarak kullanılamayacağı saptanmıştır. Bu nedenle enterokok biyofilmleriyle savaşta bir alternatif olarak gıda düzeyli biyositlerin dikkate alınması ve bu biyositler üzerinde araştırmalar yapılması önerilebilir.

Çalışmamızdan elde edilen ve evrensel literatüre katkı niteliği taşıyan veriler, *E. faecalis* planktonik formlarında eDNA salımının, biyofilm formlarından daha yüksek miktarda gerçekleştiğinin ve eDNA'nın bu bakterilerde biyofilm yapıları için elzem olmadığı yönündeki bulgularımızdır. Bu yeni bulgular, enterokok biyofilmlerinin yapısallığı ve fonksiyonelliğine yeni bir bakış ve araştırma ufku kazandıracaktır. Diğer yandan enterokokların planktonik formlarında eDNA'nın, biyofilm formlarından daha yüksek düzeyde salındığının belirlenmesi eDNA çalışmalarının, bu bakterilerde bugüne kadar yapılanın aksine, planktonik formlar üzerinde yoğunlaşmasına yol açacaktır.



## 7. KAYNAKLAR

- 1 . American Society for Microbiology. Significant Events in Microbiology 1861-1999. 2015. <https://www.asm.org/index.php/71-membership/archives/7852-significant-events-in-microbiology-since-1861#Year1861> (accessed 1 Nov 2017).
- 2 . Zobell CE. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* 1943;**46**:39–56.
- 3 . Davey ME, O’toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;**64**:847–67. doi:10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000
- 4 . Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:5404–10. doi:10.1128/AEM.71.9.5404-5410.2005
- 5 . Chiang WC, Nilsson M, Jensen PØ, *et al.* Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;**57**:2352–61. doi:10.1128/AAC.00001-13
- 6 . Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, *et al.* Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci* 2010;**107**:14407–12. doi:10.1073/pnas.0911032107
- 7 . Dunny GM, Hancock LE, Shankar N. Enterococcal Biofilm Structure and Role in Colonization and Disease. *Enterococci From Commensals to Lead Causes Drug Resist Infect* 2014;:1–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649508>
- 8 . Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol* 1999;**47**:1–24. doi:10.1016/S0168-1605(03)00175-2
- 9 . Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int J Food Microbiol* 2003;**88**:123–31. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00175-2)
- 10 . SAEEDI B, HÄLLGREN A, JONASSON JON, *et al.* Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. *APMIS* 2002;**110**:869–74. doi:10.1034/j.1600-0463.2002.1101205.x
- 11 . 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**:31–4. doi:10.1099/00207713-34-1-31
- 12 . Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, *et al.* The role and

- application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006;**106**:1–24. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>
- 13 . de Perio MA, Yarnold PR, Warren J, *et al.* Risk Factors and Outcomes Associated With Non– Enterococcus faecalis, Non– Enterococcus faecium Enterococcal Bacteremia • . *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;**27**:28–33. doi:10.1086/500000
  - 14 . Kühn I, Iversen A, Burman LG, *et al.* Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment - a European study. *Int J Food Microbiol* 2003;**88**:133–45. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00176-4)
  - 15 . Gilmore MS, Clewell DB. *The enterococci-Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press; 1 edition 2002.
  - 16 . Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology* 2009;**155**:1749–57. doi:10.1099/mic.0.026385-0
  - 17 . Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, *et al.* Infection-Derived Enterococcus faecalis Strains Are Enriched in esp, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infect Immun* 1999;**67**:193–200.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96296/>
  - 18 . Latasa C, Solano C, Penadés JR, *et al.* Biofilm-associated proteins. *C R Biol* 2006;**329**:849–57. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.07.008>
  - 19 . Mannu L, Paba A, Daga E, *et al.* Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between Enterococcus faecium strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol* 2003;**88**:291–304. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00191-0)
  - 20 . Teixeira N, Santos S, Marujo P, *et al.* The incongruent gelatinase genotype and phenotype in Enterococcus faecalis are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. *Microbiology* 2012;**158**:519–28. doi:10.1099/mic.0.055574-0
  - 21 . Characklis WG. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res.* 1973;**7**:1249–58. doi:10.1016/0043-1354(73)90002-X
  - 22 . Høiby N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathog. Dis.* 2014;**70**. doi:10.1111/2049-632X.12165
  - 23 . Fields B, Brown E, Donlan R, *et al.* Monochloramine Disinfection of Biofilm-Associated Legionella pneumophila in a Potable Water Model System. In: Cianciotto NP, Hacker J, Lück PC, *et al.*, eds. *Legionella*. American Society of Microbiology 2002. 406–10. doi:10.1128/9781555817985.ch82

- 24 . Ceri H, Olson ME, Stremick C, *et al.* The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol* 1999;**37**:1771–6.
- 25 . Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol* 2007;**5**:2458–61. doi:10.1371/journal.pbio.0050307
- 26 . Grasso D, Smets BF, Strevett KA, *et al.* Impact of physiological state on surface thermodynamics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Sci Technol* 1996;**30**:3604–8. doi:10.1021/es960332x
- 27 . Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J. Hosp. Infect.* 2006;**64**:313–25. doi:10.1016/j.jhin.2006.06.028
- 28 . Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002;**8**:881–90. doi:10.3201/eid0809.020063
- 29 . Flemming H, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**:623–33. doi:10.1038/nrmicro2415
- 30 . Flemming H-C. EPS—Then and Now. 2016;:1–18. doi:10.3390/microorganisms4040041
- 31 . Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol* 2015;**41**:341–52. doi:10.3109/1040841X.2013.841639
- 32 . Lejeune P. Contamination of abiotic surfaces: What a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol.* 2003;**11**:179–84. doi:10.1016/S0966-842X(03)00047-7
- 33 . Poulsen LV. Microbial Biofilm in Food Processing. 1999;**32**:321–6.
- 34 . Klausen M, Heydorn A, Ragas P, *et al.* Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 2003;**48**:1511–24.
- 35 . Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 2000;**182**:3593–6.
- 36 . Zhang X, Bishop PL. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* 2003;**50**:63–9.
- 37 . Kaplan JB, Velliyagounder K, Ragunath C, *et al.* Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

- and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* 2004;**186**:8213–20.  
doi:10.1128/JB.186.24.8213-8220.2004
- 38 . Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;**45**:999–1007. doi:10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001
  - 39 . Conrad A, Kontro M, Keinänen MM, *et al.* Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* 2003;**38**:1093–105. doi:10.1007/s11745-006-1165-y
  - 40 . Davey ME, Caiazza NC, O’Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 2003;**185**:1027–36.
  - 41 . Marshall KC, Stout R, Mitchell R. Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *J Gen Microbiol* 1971;**68**:337–48.  
doi:10.1099/00221287-68-3-337
  - 42 . De Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 2009;**11**:279–88. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x
  - 43 . Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* 2008;**4**. doi:10.1371/journal.ppat.1000213
  - 44 . Matsukawa M, Greenberg EP. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 2004;**186**:4449–56.  
doi:10.1128/JB.186.14.4449-4456.2004
  - 45 . Okshevsky M, Regina VR, Meyer RL. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2015;**33**:73–80. doi:10.1016/j.copbio.2014.12.002
  - 46 . Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, *et al.* A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 2006;**59**:1114–28.  
doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x
  - 47 . Harmsen M, Lappann M, Kn??chel S, *et al.* Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2010;**76**:2271–9. doi:10.1128/AEM.02361-09
  - 48 . Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, *et al.* Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002;**295**:1487.  
doi:10.1126/science.295.5559.1487
  - 49 . Ibáñez de Aldecoa AL, Zafra O, González-Pastor JE. Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Front*

- Microbiol* 2017;**8**:1–19. doi:10.3389/fmicb.2017.01390
- 50 . Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, *et al.* Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *J Bacteriol* 2008;**190**:5690–8. doi:10.1128/JB.00314-08
- 51 . Thomas VC, Hiromasa Y, Harms N, Thurlow L, Tomich J HL. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 2009;**100**:130–4. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06703.x.
- 52 . Barnes AMT, Ballering KS, Leibman RS, *et al.* *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. *MBio* 2012;**3**:e00193-12. doi:10.1128/mBio.00193-12
- 53 . Qin Z, Ou Y, Yang L, *et al.* Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 2007;**153**:2083–92. doi:10.1099/mic.0.2007/006031-0
- 54 . Das T, Sehar S, Manefield M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ Microbiol Rep* 2013;**5**:778–86. doi:10.1111/1758-2229.12085
- 55 . Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, *et al.* Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. doi:10.1128/AAC.01650-15
- 56 . Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 1928;**27**:113–59.
- 57 . Nakamura Y, Itoh T, Matsuda H, *et al.* Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nat Genet* 2004;**36**:760–6. doi:10.1038/ng1381
- 58 . Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *NatRevMicrobiol* 2005;**3**:711–21. doi:10.1038/nrmicro1234
- 59 . Spoering AL, Gilmore MS. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2006;**9**:133–7. doi:10.1016/j.mib.2006.02.004
- 60 . Steinmoen H, Knutsen E, Håvarstein LS. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:7681–6. doi:10.1073/pnas.112464599
- 61 . Petersen FC, Pecharki D, Scheie AA. Biofilm mode of growth of *Streptococcus*

- intermedius favored by a competence-stimulating signaling peptide. *J Bacteriol* 2004;**186**:6327–31. doi:10.1128/JB.186.18.6327-6331.2004
- 62 . Sykes R. The 2009 Garrod Lecture: The evolution of antimicrobial resistance: A Darwinian perspective. *J Antimicrob Chemother* 2010;**65**:1842–52. doi:10.1093/jac/dkq217
- 63 . Ng W-L, Bassler BL. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu Rev Genet* 2009;**43**:197–222. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134304
- 64 . Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 2003;**50**:101–14. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x
- 65 . Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 2014;**18**:96–104. doi:10.1016/j.mib.2014.02.008
- 66 . Wolska KI, Grudniak AM, Rudnicka Z, *et al.* Genetic control of bacterial biofilms. *J. Appl. Genet.* 2016;**57**:225–38. doi:10.1007/s13353-015-0309-2
- 67 . Davies DG. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science (80- )* 1998;**280**:295–8. doi:10.1126/science.280.5361.295
- 68 . Jones EA, McGillivray G, Bakaletz LO. Extracellular DNA within a nontypeable haemophilus influenzae-induced biofilm binds human beta defensin-3 and reduces its antimicrobial activity. *J Innate Immun* 2013;**5**:24–38. doi:10.1159/000339961
- 69 . Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog* Published Online First: 2008. doi:10.1371/journal.ppat.1000213
- 70 . Cavaliere R, Ball JL, Turnbull L, *et al.* The biofilm matrix destabilizers, EDTA and DNaseI, enhance the susceptibility of nontypeable *Hemophilus influenzae* biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. *Microbiologyopen* 2014;**3**:557–67. doi:10.1002/mbo3.187
- 71 . Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, *et al.* Low levels of  $\beta$ -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *MBio* 2012;**3**:e00198-12. doi:10.1128/mBio.00198-12
- 72 . Xiong Y, Liu Y. Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;**86**:825–37. doi:10.1007/s00253-010-2463-0
- 73 . Kaplan JB. Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *Int J Artif Organs* 2009;**32**:545–54.

- 74 . Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, *et al.* Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme®) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr* 2006;**95**:1070–4. doi:10.1080/08035250600752466
- 75 . FUJIHARA J, YASUDA T, KUNITO T, *et al.* Two N-Linked Glycosylation Sites (Asn18 and Asn106) Are Both Required for Full Enzymatic Activity, Thermal Stability, and Resistance to Proteolysis in Mammalian Deoxyribonuclease I. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;**72**:3197–205. doi:10.1271/bbb.80376
- 76 . Okshevsky M, Regina VR, Meyer RL. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Curr Opin Biotechnol* 2015;**33**:73–80. doi:https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.002
- 77 . Demain AL, Vaishnav P. Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms. *Compr Biotechnol Second Ed* 2011;**3**:333–45. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00542-0
- 78 . Berends ETM, Horswill AR, Haste NM, *et al.* Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun* 2010;**2**:576–86. doi:10.1159/000319909
- 79 . Nijland R, Hall MJ, Burgess JG, *et al.* Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase. *PLoS One* 2010;**5**:e15668. doi:10.1371/journal.pone.0015668
- 80 . Steichen CT, Cho C, Shao JQ, *et al.* The *Neisseria gonorrhoeae* Biofilm Matrix Contains DNA, and an Endogenous Nuclease Controls Its Incorporation. *Infect Immun* 2011;**79**:1504–11. doi:10.1128/IAI.01162-10
- 81 . Kiedrowski MR, Crosby HA, Hernandez FJ, *et al.* *Staphylococcus aureus* Nuc2 Is a Functional, Surface-Attached Extracellular Nuclease. *PLoS One* 2014;**9**:e95574. doi:10.1371/journal.pone.0095574
- 82 . Seper A, Fengler VHI, Roier S, *et al.* Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* 2011;**82**:1015–37. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07867.x
- 83 . Zielinska AK, Beenken KE, Mrak LN, *et al.* sarA-mediated repression of protease production plays a key role in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* USA300 isolates. *Mol Microbiol* 2012;**86**:1183–96. doi:10.1111/mmi.12048
- 84 . Tetz G V., Artemenko NK, Tetz V V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;**53**:1204–9. doi:10.1128/AAC.00471-08

- 85 . Eckhart L, Fischer H, Barken KB, *et al.* DNase1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Br J Dermatol* 2007;**156**:1342–5. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07886.x
- 86 . Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, *et al.* Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. *Mycoses* 2012;**55**:80–5. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x
- 87 . National Center for Biotechnology Information. kanamycin - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6032> (accessed 4 Nov 2017).
- 88 . Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010;**8**:423–35. doi:10.1038/nrmicro2333
- 89 . Umezawa H. Kanamycin: Its Discovery. *Ann N Y Acad Sci* 1958;**76**:20–6. doi:10.1111/j.1749-6632.1958.tb54688.x
- 90 . National Center for Biotechnology Information. Tetracycline - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675776> (accessed 4 Nov 2017).
- 91 . Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001;**65**:232–260. doi:10.1128/MMBR.65.2.232
- 92 . Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol* 1996;**165**:359–69. doi:10.1007/s002030050339
- 93 . Nikaido H, Thanassi DG. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: Tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;**37**:1393–9. doi:10.1128/AAC.37.7.1393
- 94 . National Center for Biotechnology Information. Nalidixic Acid - PubChem. 2017.<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4421#section=Top>
- 95 . National Center for Biotechnology Information. Ampicillin - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6249#section=Top> (accessed 4 Nov 2017).
- 96 . Lawrence K, Anthony M. The Effects of Ampicillin on the Growth of *Escherichia coli*. 2013;:27695.
- 97 . Adnan S, Paterson DL, Lipman J, *et al.* Ampicillin/sulbactam: Its potential use in treating infections in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents* 2013;**42**:384–9. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.07.012



- 98 . NCBI. DNASE1 deoxyribonuclease 1 [ Homo sapiens (human) ].  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1773> (accessed 27 Jan 2018).
- 99 . Dickerson RE, Drew HR. Structure of a B-DNA dodecamer. II. Influence of base sequence on helix structure. *J Mol Biol* 1981;**149**:761–86. doi:10.1016/0022-2836(81)90357-0
- 100 . Campbell VW, Jackson DA. The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. The initial reaction products produced from covalently closed circular DNA. *J Biol Chem* 1980;**255**:3726–35.
- 101 . Deoxyribonuclease I. Worthingt. Enzym. Man. <http://www.worthington-biochem.com/dnase/default.html>
- 102 . Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, *et al.* Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:9813–8. doi:10.1073/pnas.0909927107
- 103 . Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, *et al.* Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2001;**28**:313.<http://dx.doi.org/10.1038/91070>
- 104 . Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, *et al.* Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;**87**:9188–92.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55129/>
- 105 . Beintema JJ, van der Laan JM. Comparison of the structure of turtle pancreatic ribonuclease with those of mammalian ribonucleases. *FEBS Lett* 1986;**194**:338–46. doi:10.1016/0014-5793(86)80113-2
- 106 . Raines RT, Peptide BP, Isomerization B. Ribonuclease A. 1998;**2665**.
- 107 . Volkin, Elliot; Cohn W. On the Structure of Ribonucleic Acids. 1953.
- 108 . Marshall GR, Feng JA, Kuster DJ. Back to the future: Ribonuclease A. *Biopolym - Pept Sci Sect* 2008;**90**:259–77. doi:10.1002/bip.20845
- 109 . Pharma B, Application F, Data P. Production In Escherichia Coli Of Extracellular Serratia Spp. Hydrolases. 1992.
- 110 . Quintiliani R GR. An Extracellular Nuclease from Serratia marcescens. *Jama* 1969;**208**:2055–99. doi:10.1001/jama.1969.03160110027006
- 111 . Ball TK, Wasmuth CR, Braunagel SC, *et al.* Expression of Serratia marcescens extracellular proteins requires recA. *J Bacteriol* 1990;**172**:342–9. doi:10.1128/JB.172.1.342-349.1990

- 112 . Enzyme Explorer - Learning Center: Nucleases for DNA and RNA Digestion | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/nucleases.html>
- 113 . Friedhoff P, Kolmes B, Gimadutdinov O, *et al.* Analysis of the mechanism of the Serratia nuclease using site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 1996;**24**:2632–9. doi:10.1093/nar/24.14.2632
- 114 . Millipore EMD. Benzonase endonuclease. 2013;:23.[http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Benzonase-Nuclease-Purity-gt-900/0,EMD\\_BIO-70746?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.tr%2F#anchor\\_TI](http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/Benzonase-Nuclease-Purity-gt-900/0,EMD_BIO-70746?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.tr%2F#anchor_TI)
- 115 . Analytical Enzymes - Proteinase K | Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/proteinase-k.html>
- 116 . Kasche, V.; Zöllner, R; Amnéus, H; Näslund L. A Two-step Procedure for Quantitative Isolation of Pure Double-strand DNA from Animal Tissues and Cell Cultures. *Prep Biochem* 1981;**11**:233.
- 117 . Petsch D, Deckwer WD, Anspach FB. Proteinase K digestion of proteins improves detection of bacterial endotoxins by the Limulus amoebocyte lysate assay: application for endotoxin removal from cationic proteins. *Anal Biochem* 1998;**259**:42–7. doi:10.1006/abio.1998.2655
- 118 . Tang L, Schramm A, Neu TR, *et al.* Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. *FEMS Microbiol Ecol* 2013;**86**:394–403. doi:10.1111/1574-6941.12168
- 119 . Shields RC, Mokhtar N, Ford M, *et al.* Efficacy of a Marine Bacterial Nuclease against Biofilm Forming Microorganisms Isolated from Chronic Rhinosinusitis. *PLoS One* 2013;**8**:e55339. doi:10.1371/journal.pone.0055339
- 120 . Wilson K. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 2001. doi:10.1002/0471142727.mb0204s56
- 121 . O’Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol Microbiol* 1998;**28**:449–61. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
- 122 . Halkman AK, Ayhan K. *Mikroorganizma Sayımı*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. 2000.

- 123 . Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory press. 1982.
- 124 . Oostendorp C, Meyer S, Sobrio M, *et al*. Evaluation of cultured human dermal- and dermo-epidermal substitutes focusing on extracellular matrix components: Comparison of protein and RNA analysis. *Burns* 2017;**43**:520–30. doi:10.1016/j.burns.2016.10.002
- 125 . Welsh S, Peakman T, Sheard S, *et al*. Comparison of DNA quantification methodology used in the DNA extraction protocol for the UK Biobank cohort. *BMC Genomics* 2017;**18**:26. doi:10.1186/s12864-016-3391-x
- 126 . Jeffery U, Ruterbories L, Hanel R, *et al*. Cell-Free DNA and DNase Activity in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *J Vet Intern Med* 2017;**31**:1441–50. doi:10.1111/jvim.14808
- 127 . Ihaka R. R: Past and Future History. *Proc 30th Symp Interface* 1998;:392–396.<http://cran.r-project.org/doc/html/interface98-paper/paper.html>
- 128 . Solis BioDyne Data Sheet. *1 kb DNA Ladder* 2009;:25–7.
- 129 . Extremina CI, Costa L, Aguiar AI, *et al*. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J Microbiol Methods* 2011;**84**:167–73. doi:10.1016/j.mimet.2010.11.007
- 130 . Wu J, Xi C. Enzymatic method for extracting extracellular DNA in biofilm matrix. *Cold Spring Harb Protoc* 2010;**2010**:pdb.prot5456. doi:10.1128/AEM.00400-09
- 131 . Kreth J, Vu H, Zhang Y, *et al*. Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. *J Bacteriol* 2009;**191**:6281–91. doi:10.1128/JB.00906-09
- 132 . Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 2012;**10**:266–78. doi:10.1038/nrmicro2761
- 133 . Dominiak DM, Nielsen JL, Nielsen PH. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. *Environ Microbiol* 2011;**13**:710–21. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02375.x
- 134 . Petersen FC, Tao L, Scheie AA. DNA binding-uptake system: A link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J Bacteriol* 2005;**187**:4392–400. doi:10.1128/JB.187.13.4392-4400.2005
- 135 . Suzuki H, Daimon M, Awano T, *et al*. Characterization of extracellular DNA production and flocculation of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum sulfidophilum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;**84**:349–56. doi:10.1007/s00253-

009-2031-7

- 136 . Bakkali M. Could DNA uptake be a side effect of bacterial adhesion and twitching motility? *Arch Microbiol* 2013;**195**:279–89. doi:10.1007/s00203-013-0870-1
- 137 . Sena-Vélez M, Redondo C, Graham JH, *et al.* Presence of extracellular DNA during biofilm formation by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains with different host range. *PLoS One* 2016;**11**:e0156695. doi:10.1371/journal.pone.0156695
- 138 . Vilain S, Pretorius JM, Theron J, *et al.* DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2009;**75**:2861–8. doi:10.1128/AEM.01317-08
- 139 . Zhao X, Zhao F, Wang J, *et al.* Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv* 2017;**7**:36670–83. doi:10.1039/C7RA02497E
- 140 . Hoffman LR, D’Argenio DA, MacCoss MJ, *et al.* Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005;**436**:1171–5. doi:10.1038/Nature03912
- 141 . Bhardwaj SB, Mehta M, Sood S, *et al.* Biofilm formation by drug resistant enterococci isolates obtained from chronic periodontitis patients. *J Clin Diagnostic Res* 2017;**11**:DC01-DC03. doi:10.7860/JCDR/2017/24472.9152
- 142 . Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MRC, *et al.* Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the clones? *Front. Microbiol.* 2016;**7**:788. doi:10.3389/fmicb.2016.00788
- 143 . Sieńko A, Wiczorek P, Majewski P, *et al.* Comparison of antibiotic resistance and virulence between biofilm-producing and non-producing clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Acta Biochim Pol* 2015;**62**:859–66. doi:10.18388/abp.2015\_1147
- 144 . Paganelli FL, Willems RJL, Jansen P, *et al.* *Enterococcus faecium* biofilm formation: identification of major autolysin AtlAEfm, associated Acm surface localization, and AtlAEfm-independent extracellular DNA Release. *MBio* 2013;**4**:e00154. doi:10.1128/mBio.00154-13

## 8. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Burak GÜNEŞ

**Doğum Yeri:** İzmir

**Doğum Tarihi:** 19.01.1993

**Medeni Hali:** Bekar

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

### **Eğitim Durumu:**

**Lise:** Suphi Koyuncuoğlu Lisesi, İzmir

**Lisans:** Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2011-2015)

### **İş Tecrübesi:**

**Kurumu:** ATQ Biyoteknoloji, Ankara

TÜRKÖK Kemik İliği Donör Bankası

**Görevi:** Biyolog, Veri Analisti

**Yılları:** 2017-

## 9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

### KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

#### Uluslararası Kongrede Sunulan Sözlü Bildiri

GÜNEŞ, B., ÇELİK, E. Ç., ŞANLIBABA, P., UYMAZ, B., AKÇELİK, M., and AKÇELİK, N., The Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies. 15-17 May, 2017, Nevşehir/Türkiye, 15-17 Mayıs 2017, (Sözlü Bildiri).



INTERNATIONAL CONFERENCE ON  
AGRICULTURE, FOREST, FOOD  
SCIENCES AND TECHNOLOGIES

15-17 May 2017

**ICAFOF**

— Cappadocia/Turkey —



**ABSTRACT PROCEEDING BOOK OF  
ICAFOF CONFERENCE**

**Editors**

**Asst. Prof. Dr. M. Cüneyt BAĞDATLI  
Asst. Prof. Dr. Erkan KALIPCI**

**Cappadocia- Nevşehir/Turkey – 2017**

## The Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation

Burak GÜNEŞ<sup>1</sup>, Çiğdem Elif ÇELİK<sup>2</sup>, Pınar ŞANLIBABA<sup>3</sup>, Başar UYMAZ<sup>4</sup>,  
Mustafa AKÇELİK<sup>2</sup>, Nefise AKÇELİK<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara/Turkey

<sup>2</sup> Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology, Ankara/Turkey

<sup>3</sup> Ankara University, Ankara University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Ankara, Turkey

<sup>4</sup> Çanakkale Onsekiz Mart University, Bayramiç Vocational School, Food Technology

\*Corresponding Author: nakcelik@ankara.edu.tr

### Abstract

Biofilm structures of microorganisms formed by attaching to a surface or substrate are the most resistant microbial life form known today. Thanks to this structure, which is built by almost every bacterium to protect itself from environmental factors, bacteria protect themselves against externally applied disinfectants, antibiotics and radiation. In biofilm formation, there are many polymers released by the bacteria outside the cell. One of these polymers is extracellular DNA (eDNA). eDNA not only usually occur from genomic DNA fragments of the bacteria which have been lysed, but it can also occur outside of the cell during horizontal gene transfer. As a nucleic acid, DNA provides the flow of genetic information with other cells in the matrix, and attach the cells to each other and those cells to surface in the biofilm. In addition, its biochemical structure can increase the biofilm resistance to antimicrobial agents applied. Today, the importance of extracellular DNA in the biofilm structure is known. Now, as we know the structural and functional roles of eDNA in the biofilm structure; it has become a new target to fight against biofilms. In many studies in the literature, degradation of biofilms is aimed by destroying the structure of DNA thanks to the endonucleases applied by targeting eDNA. Promising results have been obtained in recent studies and many research groups continue their research on extracellular DNA.

**Keywords:** Biofilm, Extracellular DNA, Endonucleases