

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

PEYNİR VE KAN KÖKENLİ *Enterococcus faecalis* SUŞLARININ BİYOFİLM
ÜRETİMİNİN ENGELLENMESİ VE ERADİKASYONUNDA NİSİN
BAKTERİYOSİNİNİN KULLANIM OLANAKLARININ BELİRLENMESİ

İrem ABAY

Danışman Öğretim Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Aralık

2016

ETİK BEYAN

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

İrem ABAY

İmzası



ONAY

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK danışmanlığında İrem ABAY tarafından hazırlanan bu çalışma 8/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Faruk BOZOĞLU

İmza: 

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi (Gıda Mühendisliği)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN

İmza: 

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Üye: Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK (Danışman)

İmza: 

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Peynir ve Kan Kökenli *Enterococcus faecalis* Suşlarının Biyofilm Üretiminin Engellenmesi ve Olgun Biyofilmlerin Eradikasyonunda Nisin Bakteriyosininin Kullanım Olanaklarının Belirlenmesi

İrem ABAY

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Patojen bakterilerin oluşturduğu biyofilm yapıları, aktif mikroorganizmaların en dirençli formlarıdır. *Enterococcus faecalis*, dünya genelinde nazokomiyal enfeksiyonların önemli kaynağı olup, sebep oldukları enfeksiyonların temel nedeni ise biyofilm oluşturmalarıdır. Nisinin, *E. faecalis* biyofilmlerinin oluşumunun engellenmesi ve eradikasyonunda kullanım olanağının araştırıldığı bu çalışmada, peynir ve kan kökenli toplam 4 adet *E. faecalis* suşu kullanılmıştır. MİK değerleri göz önüne alındığında, kullanılan ajanların çok düşük konsantrasyonlarda dahi *E. faecalis* suşlarının gelişimini engellediği görülmüştür. Denenen nisin bakteriyosinleri arasında, suşlar üzerinde en etkili olanı ticari nisin olarak bulunmuştur. Zaman-Ölüm denemesinde nisinin suşlar üzerindeki en etkin değeri 6h inkübasyon sonucu elde edilmiş olup, suşlar üzerinde en etkili dezenfektanlar CHX ve EDTA olarak saptanmıştır. MBEC çalışmasında ise en etkili ajan NaOCl olarak saptanmıştır. Biyofilm yapıları üzerinde nisinin etkisinin çok düşük olduğu gözlenmiştir. Sinerjetik etki çalışmalarında, bazı suşlar üzerinde nisin ve CHX birbirine antagonist etki göstermiş olup, genel olarak suşların inhibisyonunda ajanların birbirine pozitif katkıda buldukları gözlenmiştir. SEM analizinde ise, nisin ve EDTA, biyofilmlerin eradikasyonunda en etkili ajan kombinasyonu olarak bulunmuştur.

2016, 116 sayfa

Anahtar kelimeler: *Enterococcus faecalis*, biyofilm, nisin, antimikrobiyal ajan, eradikasyon

ABSTRACT

Master Thesis

Determination of The Potential Usage of Bacteriocin Nisin To Inhibit Biofilm Formation and Eradication of Mature Biofilms of *Enterococcus faecalis* Strains Originated From Cheese and Blood Samples

İrem ABAY

Ankara University Biotechnology Institute

Assist. Prof. Nefise AKÇELİK

Biofilm structures are the most resistant form of active microorganisms against sanitation, disinfection and sterilization processes. *Enterococcus faecalis* is an important global cause of nosocomial infections. Many nosocomial infections results from the ability of this bacterium to form biofilm. In this study, the antimicrobial activity of nisin bacteriocin alone or in combination with CHX, NaOCl and EDTA against planktonic and biofilm cultures of four strains of *Enterococcus faecalis* originated from cheese and blood samples. According to the MIC values minimum concentrations of antimicrobials were effective against the bacterial cells. In the Time-Kill study, nisin was effective against cells only after 6h of incubation time. In the Checkerboard assay, a positive additive effect was found between nisin, EDTA and NaOCl, but against some strains of *E. faecalis*, there was an antagonistic effect between nisin and CHX. In MBEC assay, NaOCl and EDTA were the most effective irrigants against *E. faecalis* biofilms. Scanning electron microscopy showed that, the damage to *E. faecalis* biofilm with the combined nisin and EDTA treatment was the most effective among all of the different combined antimicrobial treatments. There is no any research in the literature on the potential usage of nisin to inhibit biofilm formation and mature biofilm eradication of *E. faecalis*. Thus, the project is original both scientifically and technologically and also has widespread common potential.

2016, 116 pages

Keywords: *Enterococcus faecalis*, biofilm, nisin, antimicrobial agent, eradication

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince büyük desteğini gördüğüm sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e, değerli yönlendirmeleri ve katkıları için sayın hocam Mustafa AKÇELİK'e,

Laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma; Neslihan YÜKSEL, Burak GÜNEŞ, Çiğdem Elif ÇELİK, Sinem UĞUR'a ve tüm Prokaryot Genetiği Laboratuvarına,

Tezimin istatistiksel analizlerinde yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Farzad NOFOUZİ'ye,

Değerli Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'ndaki tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Hiçbir zaman yanımdan ayrılmayan, aldığım her karara saygı göstererek tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi yanımda duran canım annem ve babam Hacer ABAY ve Şükrü ABAY'a ve kardeşim Elif ABAY'a, tüm kalbiyle bana varlığını hissettiren, zor günlerimde güzel günler biriktirdiğim ve beraber daha nice güzel anılar biriktireceğim canım Cihan CELKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 114Z668 kodlu proje ile desteklenmiştir. Desteğinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. ENTEROCOCCUS CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ	4
2.2. ENTEROKOKLARDA PATOJENİTE VE VİRÜLANS	6
2.2.1. HASTANE PATOJENİ OLARAK ENTEROKOKLAR.....	6
2.2.2. GIDA PATOJENİ OLARAK ENTEROKOKLAR.....	7
2.2.3. ENTEROKOKLARDA BULUNAN VİRÜLANS FAKTÖRLER.....	8
2.3. BİYOFİLMİN TANIMI VE TARİHÇESİ	12
2.4. BİYOFİLM OLUŞUM BASAMAKLARI	13
2.4.1. YÜZEY ÜZERİNDE İNCE TABAKANIN OLUŞUMU.....	14
2.4.2. MİKROORGANİZMALARIN YÜZEYE TUTUNMASI.....	15
2.4.3. KOLONİ GELİŞİMİ VE OLGUN BİYOFİLM OLUŞUMU.....	15
2.4.4. HÜCRELERİN BİYOFİLM YAPISINDAN KOPARAK DAĞILMASI.....	16
2.5. ENTEROKOKAL BİYOFİMLER	16

2.5.1. YÜZEYE TUTUNMADA ROL OYNAYAN FAKTÖRLER.....	17
2.5.2. KONAK CANLININ BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİN BASKILANMASINDA ROL OYNAYAN FAKTÖRLER.....	18
2.5.3. SALGILANAN FAKTÖRLER	19
2.5.4. GLİKOLİPİTLER	19
2.5.5. HÜCRE DUVARI POLİSAKKARİTLERİ VE KAPSÜL	20
2.6. BAKTERİYOSİNLER	20
2.6.1. BAKTERİYOSİNLERİN BİYOLOJİSİ.....	21
2.6.2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN SENTEZLENEN BAKTERİYOSİNLER.....	22
2.6.2.1. Nisin bakteriyosini	24
2.6.2.1.1. Nisin bakteriyosininin yapısal özellikleri	25
2.6.2.1.2. Nisin bakteriyosininin sentez mekanizması.....	27
2.6.2.1.3. Nisin bakteriyosininin aktivite mekanizması.....	28
2.6.2.1.4. Nisin bakteriyosininin kullanım alanları.....	30
2.7. BİYOFİLM İLE MÜCADELEDE YAYGIN OLARAK KULLANILAN ANTİMİKROBİYALLER 31	
2.7.1. Klorheksidin dişlukonat (CHX).....	31
2.7.2. Sodyum hipoklorit (NaOCl).....	33
2.7.3. Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA).....	35
<u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u>	<u>37</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>39</u>
4.1. MATERYAL	39
4.1.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BAKTERİLER VE GELİŞME KOŞULLARI.....	39
4.1.2. BESİYERLERİ	40
4.1.3. DEZENFEKTANLAR VE ÇÖZELTİLER	42

4.1.3.1. Dezenfektanlar	42
4.2. YÖNTEM	44
4.2.1. ENTEROCOCCUS SUŞLARININ BİYOFİLM ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI... 44	
4.2.2. <i>L. LACTIS</i> LL27 VE <i>L. LACTIS</i> LAC339 SUŞLARININ BAKTERİYOSİN ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN KUYU DİFÜZYON YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI..... 44	
4.2.3. MİNİMUM İNHİBİSYON KONSANTRASYONU (MİK) VE MİNİMUM BAKTERİSİDAL KONSANTRASYONUNUN (MBC) BELİRLENMESİ..... 45	
4.2.4. ZAMAN – ÖLÜM (TIME-KILL) DENEMESİ	47
4.2.5. ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN MİNİMAL BİYOFİLM ERADİKASYON KONSANTRASYONLARININ (MBEC) BELİRLENMESİ..... 47	
4.2.6. SİNERJETİK ETKİ (CHECKERBOARD) DENEMESİ..... 48	
4.2.7. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU GÖRÜNTÜLEMESİ İLE NİSİN VE DEZENFEKTANLARIN BİYOFİLM YAPILARINA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ	49
4.2.8. İSTATİSTİKİ ANALİZLER..... 51	
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>52</u>
5.1. SUŞLARIN BİYOFİLM ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	52
5.2. <i>L. LACTIS</i> LL27 VE <i>L. LACTIS</i> LAC339 SUŞLARININ BAKTERİYOSİN ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN KUYU DİFÜZYON YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI	53
5.3. MİNİMUM İNHİBİSYON KONSANTRASYONLARININ (MİK) VE MİNİMUM BAKTERİSİDAL KONSANTRASYONLARININ (MBC) BELİRLENMESİ	54
5.4. ZAMAN – ÖLÜM (TIME-KILL) DENEMESİ	61
5.5. ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN MİNİMAL BİYOFİLM ERADİKASYON KONSANTRASYONUNUN (MBEC) BELİRLENMESİ.....	68
5.6. SİNERJETİK ETKİ (CHECKERBOARD) DENEMESİ	82
5.7. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) GÖRÜNTÜLENMESİ İLE NİSİN VE DEZENFEKTANLARIN BİYOFİLM YAPILARINA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ	87

<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>91</u>
<u>7. KAYNAKLAR</u>	<u>102</u>
<u>8. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>115</u>
<u>9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR</u>	<u>116</u>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Enterococcus</i> 'un taramalı elektron mikroskop görüntüsü (13)	5
Şekil 2.2. Biyofilm oluşum aşamaları (42)	14
Şekil 2.3. Nisin varyantları (82)	26
Şekil 2.4. Nisin biyosentezinde yer alan genlerin organizasyonu (73)	27
Şekil 2.5. Nisinin posttranslasyonel modifikasyonları (86)	28
Şekil 2.6. Nisin ve Lipid II molekülünün etkileşimi (87)	30
Şekil 2.7. Nisinin hücre zarında por oluşturması (87).....	30
Şekil 4.1. MBC hesaplanmasında kullanılan mikrodilüsyon metodu (105).....	46
Şekil 5.1. <i>E. faecalis</i> suşlarının biyofilm üretim düzeyleri	53
Şekil 5.2. Suşların bakteriyosin üretim özelliklerinin kuyu difüzyon testi ile araştırılması; K: kontrol olarak kuyulara damlatılan PBS'yi ifade etmektedir.....	54
Şekil 5.3. CHX'in <i>E. faecalis</i> izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri	56
Şekil 5.4. EDTA'nın <i>E. faecalis</i> izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri	56
Şekil 5.5. NaOCl'nin <i>E. faecalis</i> izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri.....	57
Şekil 5.6. Ticari nisinin (Nisaplin) <i>E. faecalis</i> izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri	57
Şekil 5.7. <i>L.lactis</i> LL27 tarafından üretilen nisin bakteriyosininin <i>E. faecalis</i> izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri	58
Şekil 5.8. <i>L. lactis</i> LAC339 tarafından üretilen nisin bakteriyosininin <i>E. faecalis</i> izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri	58

Şekil 5.9. Kullanılan dezenfektanların 73 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması.....	62
Şekil 5.10. Kullanılan dezenfektanların 74 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması.....	62
Şekil 5.11. Kullanılan dezenfektanların 79 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması.....	63
Şekil 5.12. Kullanılan dezenfektanların 114 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması	63
Şekil 5.13. Kullanılan dezenfektanların <i>E. faecalis</i> OG1RF kontrol suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması	64
Şekil 5.14. Kullanılan dezenfektanların <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 kontrol suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması	64
Şekil 5.15. 73 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki değerleri	70
Şekil 5.16. 74 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki değerleri	71
Şekil 5.17. 79 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki değerleri	72
Şekil 5.18. 114 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki değerleri	73

Şekil 5.19. OG1RF <i>E. faecalis</i> kontrol suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki değerleri	74
Şekil 5.20. ATCC 29212 <i>E. faecalis</i> kontrol suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki değerleri.	75
Şekil 5.21. 73 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu için hazırlanan Nisin+CHX sinerjetik etki çalışması plak düzeni.....	83
Şekil 5.22. 73 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu için hazırlanan Nisin+NaOCl sinerjetik etki çalışması plak düzeni.....	84
Şekil 5.23. 73 kodlu <i>E. faecalis</i> suşu için hazırlanan Nisin+EDTA sinerjetik etki çalışması plak düzeni.....	85
Şekil 5.24. <i>E. faecalis</i> OG1RF kontrol suşu tarafından oluşturulan biyofilm yapısının SEM görüntüsü	88
Şekil 5.25. <i>E. faecalis</i> OG1RF kontrol suşunun oluşturduğu biyofilm yapısının Nisin (2000 IU/mL) ile muamelesi sonucu elde edilen SEM görüntüsü.....	88
Şekil 5.26. <i>E. faecalis</i> OG1RF kontrol suşunun oluşturduğu biyofilm yapısının Nisin (2000 IU/mL)+CHX (%0.0002) ile muamelesi sonucu elde edilen SEM görüntüsü.....	89
Şekil 5.27. <i>E. faecalis</i> OG1RF kontrol suşunun oluşturduğu biyofilm yapısının Nisin (2000 IU/mL)+NaOCl (%0.5) ile muamelesi sonucu elde edilen SEM görüntüsü.....	89
Şekil 5.28. <i>E. faecalis</i> OG1RF kontrol suşunun oluşturduğu biyofilm yapısının Nisin (2000 IU/mL)+EDTA (5mM) ile muamelesi sonucu elde edilen SEM görüntüsü	90

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>Enterococcus</i> cinsinde tanımlanan virülans faktörler (14,28,29)	9
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan <i>Enterococcus faecalis</i> suşları.....	39
Tablo 4.2. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> suşları	40
Tablo 4.3. Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Germany)	40
Tablo 4.4. Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck, Germany)	40
Tablo 4.5. M17 Broth (Merck, US)	41
Tablo 4.6. Müller-Hinton Broth (Oxoid, UK)	41
Tablo 4.7. Fosfatla Tamponlanmış Tuz (PBS)	43
Tablo 4.8. Alkol / Aseton Çözeltisi	43
Tablo 4.9. Evrensel Nötralizan	43
Tablo 5.1. Farklı pH değerine sahip besi ortamlarında geliştirilen suşların zon çapları	57
Tablo 5.2. Çalışmada kullanılan nisin bakteriyosinlerinin ve çeşitli dezenfektanların <i>E. faecalis</i> izolatlarının inhibisyonu için belirlenen MİK ve MBC değerleri	58
Tablo 5.3. MİK değerleri varyans analizi tablosu (**p<0.01)	62
Tablo 5.4. Dezenfektanların ve nisinin MİK değerlerine göre elde edilen bakteri ve ajan interaksiyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)	63
Tablo 5.5. MBC değerleri varyans analizi tablosu (**p<0.01)	64
Tablo 5.6. Dezenfektanların ve nisinin MBC değerlerine göre elde edilen bakteri ve ajan interaksiyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)	64
Tablo 5.7. Zaman-Ölüm denemesi varyans analizi tablosu (**p<0.01)	69

Tablo 5.8. Dezenfektanların ve nisinin Zaman-Ölüm değerlerine göre elde edilen bakteri ve ajan interaksiyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)	69
Tablo 5.9. Dezenfektanların ve nisinin Zaman-Ölüm değerlerine göre elde edilen bakteri, ajan ve saat interaksiyonu Duncan analizi pozitif kontrol değerlerinin tablosu (**p<0.01)	70
Tablo 5.10. Dezenfektanların ve nisinin Zaman-Ölüm değerlerine göre elde edilen bakteri, ajan ve saat interaksiyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)	71
Tablo 5.11. Nisin-MBEC denemesi varyans analizi tablosu (**p<0.01)	80
Tablo 5.12. Nisin-MBEC verilerine göre yapılmış bakteri ve saat intereksiyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)	80
Tablo 5.13. NaOCl-MBEC denemesi varyans analizi tablosu (**p<0.01)	81
Tablo 5.14. NaOCl-MBEC verilerine göre bakteri, ajan konsantrasyonu ve saat interaksiyonu Duncan analizi pozitif kontrol değerlerinin tablosu (**p<0.01)	82
Tablo 5.15. NaOCl-MBEC verilerine göre bakteri ve ajan konsantrasyonu interaksiyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)	82
Tablo 5.16. NaOCl-MBEC verilerine göre bakteri, ajan konsantrasyonu ve saat interaksiyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)	83
Tablo 5.17. EDTA-MBEC denemesi varyans analizi tablosu (**p<0.01)	84
Tablo 5.18. EDTA-MBEC çalışmalarında kullanılan ajan konsantrasyonları Duncan analizi tablosu (**p<0.01)	85
Tablo 5.19. CHX-MBEC denemesi varyans analizi tablosu (**p<0.01)	85
Tablo 5.20. CHX-MBEC çalışmalarında kullanılan bakteri ve saat interaksiyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)	86

Tablo 5.21. *E. faecalis* 73, 74, 79, 114, OG1RF, ATCC 29212 suşlarının nisin ve diğer dezenfektanların kombinasyonu ile gerçekleştirilen sinerjetik etki çalışmasının sonuçları

90



SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
IU	International Unit
mM	Milimolar
ATCC	American Type Culture Collection
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L.lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
TSB	Tryptic Soy Broth
TS	Trypticase Soy
MHB	Mueller-Hinton Broth
PBS	Phosphate Buffered Saline
CHX	Chlorhexidine digluconate
NaOCl	Sodium Hypochlorite
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MBC	Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
MBEC	Minimal Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu
SEM	Scanning Electron Microscope

1. GİRİŞ

Başta tıp ve gıda endüstrisi olmak üzere, hayatın her alanında patojen mikroorganizmalarla yapılan mücadele yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu mücadelede kullanılan kimyasal (klorheksidin diglukonat, hidrojen peroksit, sodyum hipoklorit, formaldehid, kuaterner amonyum bileşikleri, formaldehid, izopropil alkol, etil alkol, benzalkonyum klorit ve sodyum diklor izosiyanat gibi), fiziksel (basınç, sıcaklık, sonikasyon ve radyasyon gibi) ve biyolojik (enzim temelli deterjanlar, virüsler ve bakteriyosinler, antibiyotikler ve diğer mikrobiyal metabolitler gibi) ajanların etkinliğinin planktonik formlar esas alınarak belirlenmesi ve bu esastan hareketle dezenfeksiyon, sanitasyon ve sterilizasyon yöntemlerinin geliştirilmesi nedeniyle, biyofilm formları patojenite ve kontaminasyon etkeni olarak giderek artan bir önem kazanmıştır. Bu nedenle günümüzde klinik ve endüstriyel mikrobiyolojide, mikrobiyal kontaminasyonların ve enfeksiyonların önlenmesi ve eradikasyonunda temel yaklaşım, mücadele ajanlarının biyofilm yapıları üzerindeki etkinlikleri esas alınarak seçilmesi eksenine oturtulmuştur. Bir mikroorganizmanın biyofilm formunun, yukarıda özetlenen mücadele ajanlarının tümüne karşı, aynı mikroorganizmanın planktonik formundan çok daha yüksek düzeyde dirençli olduğu bilinmektedir (1). Diğer yandan antibiyotiklerin yoğun ve yanlış kullanımı sonucunda çoklu ilaç dirençli mikroorganizma suşlarının gelişiminin teşvik edilmesi, klasik fiziksel ve kimyasal dezenfeksiyon ve sterilizasyon ajanlarının çevre yanında insan ve hayvan sağlığına karşı çok sayıda yan etkisinin tespit edilmesi, mikrobiyal enfeksiyon ve kontaminasyonlarla mücadelede çevreci ve tüketici sağlığını tehdit etmeyen yeni mücadele ajanlarının ve yöntemlerinin geliştirilmesi zorunluluğunu doğurmuştur (2).

Mikrobiyal biyofilmler; bağımsız (planktonik) hücrelerin ara yüzeylere, birbirine ya da substratlara tutunduktan sonra, ürettikleri hücre dışı polimerik bir matris ile çevrenmeleri sonucu oluşur. Biyofilmleri oluşturan hücreler bu yapıların içerisinde çok hücreli formlara benzer gelişme fizyolojisi ve genetik ifade göstermeleri nedeniyle, planktonik formlardan çok farklı yapısal ve fonksiyonel özellikler kazanmaktadırlar (3). Başta bakteriler olmak üzere birçok mikroorganizma türünün, özellikle çevresel stres koşullarına yanıt olarak biyofilm yapıları oluşturdukları belirlenmiştir. Olgun biyofilm yapıları; metabolitler, besin maddeleri ve atıkların dağıtımına olanak sağlayacak şekilde organize olmuş yüksek organizasyonlu, tek tabakalı ya da üç boyutlu yapılardır (1). Yukarıda da bahsedildiği gibi, tek ya da çok sayıda bakteri türünden oluşabilen bakteriyel biyofilm yapıları; klasik sanitasyon, dezenfeksiyon ve

sterilizasyon ajanları ve yöntemlerine karşı, bu türlerin planktonik formlarından çok daha yüksek düzeyde direnç göstermektedir. Bu karakteristikleri biyofilm yapılarını, süreklilik arz eden klinik ve endüstriyel kontaminasyonların ana kaynağı haline getirmiştir. Diğer yandan enterokoklar gibi oportünistik olarak kabul edilen bazı bakterilerin, biyofilm yapıları içerisinde patojen özelliği kazandığı saptanmıştır (4).

Enterococcus cinsi (enterokoklar); Gram-pozitif, genel olarak sesil, aerobik ya da fakültatif anaerobik, katalaz negatif ve kok morfolojisi ile karakterize edilen bakteri türlerini içermektedir. Çok zorlu ortam koşullarında dahi (yüksek ve düşük sıcaklık, yüksek basınç, yüksek tuz konsantrasyonu gibi) yaşamlarını sürdürebilmektedirler. *E. faecalis*'in de üyesi olduğu enterokoklar; doğal ortamları dış kovuğu, bağırsak, erkek ve dişi genital sistemi olan oportünistik patojenler olarak tanımlanmaktadır. İdrar yolu enfeksiyonları, endokardit, intra abdominal ve pelvik enfeksiyonlar, katater bağlantılı enfeksiyonlar, cerrahi yara enfeksiyonları ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonları ile bağlantılı nazokomiyal enfeksiyonların (hastane enfeksiyonları) en yaygın etkenleri enterokok cinsi üyeleridir (5). *Enterococcus* cinsinin 12 türü bulunmasına karşın, *E. faecalis* yukarıda özetlenen enterokok enfeksiyonlarının yaklaşık olarak %90'ından sorumludur. Bu bakteri dış kovuğu ve kataterlerde biyofilm yapıları oluşturarak kalıcılık kazanmaktadır (6). Bu durum, *E. faecalis*'in klinik önemini açık bir şekilde ifade etmektedir. Enterokoklar yaygın gıda kontaminantları olmaları nedeniyle gıda endüstrisinde de büyük önem taşımaktadır. Gıda işletmelerinde; üretim tanklarında, gıda aktarım hatlarında ve diğer organik ve inorganik yüzeylerde biyofilm oluşturmak suretiyle sürekli kontaminasyon kaynağını teşkil etmekte, metal korozyonlarına, gıda bozulmalarına ve hijyenik sorunlara yol açarak ciddi ekonomik kayıplara ve sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Kısaca biyofilm yapılarının; endüstri, çevre ve sağlık alanlarında ciddi sorunlara neden olduğu açıktır (7,8).

Bu literatür verileri ışığında; tez çalışmada, özellikle dünyada klinik ve endüstriyel anlamda ciddi bir sorun haline gelen ve nazokomiyal enfeksiyonların %10'unun ve insan enterokok enfeksiyonlarının %90'ının etkeni olan *E. faecalis* biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesi ve eradikasyonunda yeni ve etkin biyoteknolojik yöntemlerle geliştirilen ajanların tanımlanması ve uygulama yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle; peynir starter kültürlerinin temel bileşeni olan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin bakteriyosininin saf formunun ve araştırma grubumuz

tarafından izole edilerek tanımlanan nisin üreticisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun nisin üretimi ve etkinliği bakımından optimize edilmiş bir mutantının (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LAC339, Şimşek vd., 2009) *E. faecalis* biyofilminin oluşumu ve eradikasyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. Nisin tüm dünyada insan ve çevre üzerine yan etki içermeyen GRAS (Generally Recognised As Safe) bir bakteriyosin olarak tanımlanmıştır ve özellikle Gram-pozitif bakteriyel kontaminasyonlarla mücadelede kullanılmaktadır. Ancak nisinin *E. faecalis* biyofilm yapıları üzerinde etkinliğinin araştırıldığı bir çalışma literatürde yer almamaktadır. *E. faecalis*'in planktonik formlarına karşı nisinin yüksek düzeyde etkinlik gösterdiği ise yine çalışma grubumuz tarafından belirlenmiştir (9). Bu veriler ve ön çalışmalardan hareketle, *E. faecalis* biyo-filmlerine karşı mücadelede araştırılacak temel ajan olarak nisin seçilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise nisinin klinik ve endüstriyel amaçlarla kullanılan ticari dezenfektanlarla değişik oranlarda kombinasyonunun enterokokal biyofilm yapıları üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Burada hedef, nisinin dezenfektanlar ile kombine edilmesi sonucu, biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesi ve eradikasyonunda uygulanacak etkin dezenfektan konsantrasyonunun düşürülmesi suretiyle, söz konusu dezenfektanların insan sağlığı ve çevre üzerindeki olumsuz etkilerinin en aza indirilmesidir.

Gerek saf nisin ve gerekse nisin üreticisi suş ile *E. faecalis* biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesi ve eradikasyonunda etkin ve uygulanabilir bir konsantrasyon ve yöntemin tespiti, çalışma sonuçlarının sadece yerel değil, evrensel uygulama alanı bulması anlamına gelmektedir. Çalışmada kullanılan nisin üreticisi suşun Türkiye kaynaklı olması ve sadece araştırma grubumuzda bulunması da söz konusu mücadele ajanının üretiminin ülkemizde yapılması olanağını doğuracaktır. Çalışmanın ikinci basamağı olarak tasarlanan nisinin ticari dezenfektanlar ile birlikte kullanım olanaklarının araştırılması kısmında ise, nisin bakteriyosininin tek başına uygulamalarının mümkün olmadığı koşullarda çeşitli dezenfektanlar ile birlikte kullanılarak etkinliğinin artırılması ve nisinin, dezenfektanın uygulama konsantrasyonunu düşürme olasılığı araştırılmıştır.

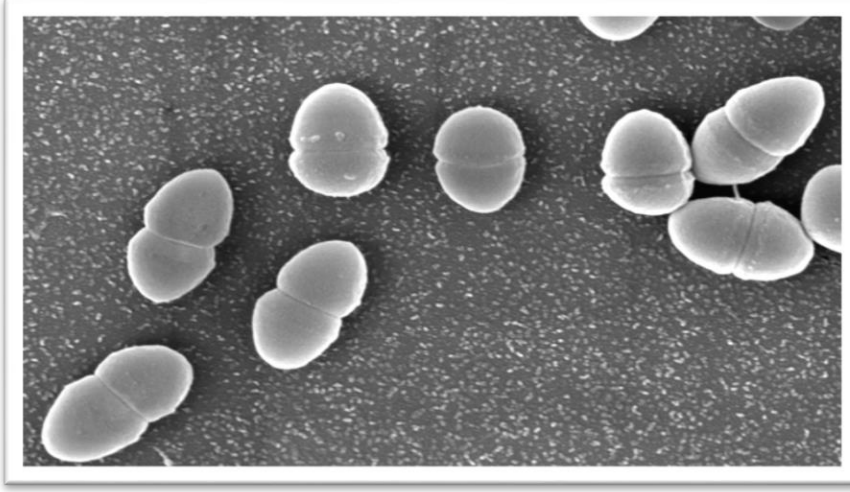
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. *ENTEROCOCCUS* CİNSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Enterokok adı ilk defa 1899 yılında, Fransa’da Thiercellin tarafından yayımlanan bir makalede kullanılmıştır. Bu adın verilmesindeki en temel neden, Gram-pozitif diplokok cinsine ait olan bu yeni türün bağırsak kökenli bir tür olduğunun vurgulanmak istenmesidir. Aynı yıllarda endokardit hastalığına dair yürütülen çalışmalarda, hastalığın en büyük etkeni olarak *Micrococcus zymogenes* mikroorganizması gösterilse de, daha sonraki yıllarda da sürdürülen çalışmalar ve bu doğrultuda yayımlanan makaleler, hastalık etkeninin enterokok cinsi bakteriler olduğunu göstermiştir (10). İlk olarak 1906 yılında Andrews ve Horder, endokardit hastalığına sahip olan bir hastanın bağırsağından izole ettikleri mikroorganizmaya, insan bağırsak florasının karakteristik özelliklerini taşıdığını düşündüklerinden dolayı *Streptococcus faecalis* (faecalis, dışkı ile alakalı olan) adını vermişlerdir (11).

Enterococcus ailesi, 1984 yılında Schleifer ve Klipper-Balz tarafından yapılan DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyon çalışmaları, 16S rRNA çalışmaları sonucunda tanımlanmıştır. Yaptıkları bu çalışmalarla, *S. faecalis* ve *S. faecium* suşlarının diğer streptokoklardan farklı olduklarını kanıtlamışlardır. Ayrıca süperoksit dismutaz ile yapılan serolojik çalışmaları da ekleyerek *Streptococci sensu lato*’yu; *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* ve *Lactococcus* olarak 3 ana cinse ayırmışlardır. Enterokoklar, diğer laktik asit bakterileri (*Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*) ile beraber Gram-pozitif bakterilerin klostiridyal alt ayrımında bulunmaktadır (12,13).

Enterococcus cinsi Gram-pozitif, aerobik ya da fakültatif aerobik, katalaz negatif ve kok şeklinde bakterilerdir (Şekil 2.1). *Enterococcus* cinsi üyeleri birkaç istisna dışında hareketsizdir ve zorlu çevresel koşullara adapte olarak çeşitli yüzeylerde aylarca canlı kalabilmektedirler. *Enterococcus* cinsi üyelerinin optimum üreme sıcaklığı 35°C olmakla beraber, bazı türlerinin üreme sıcaklığı 10°C-45°C arasında değişmektedir. pH 4.5-9.0 arasında üreme yeteneğine sahiptirler.



Şekil 2.1. *Enterococcus*'un taramalı elektron mikroskop görüntüsü (13)

Enterokoklar; doğal ortamları ağız florası, insan ve hayvan genital sistemi ve bağırsak florası olan oportünistik patojenlerdir. Üriner sistemi, dolaşım sistemi, karın içi ve pelvik sistemi ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarına neden olan yaygın nazokomiyal (hastane orijinli) ajanlar oldukları bilinmektedir (14). Genel olarak insan gastrointestinal kanalında bulunan mikroorganizmalar olmalarının yanında, gıdaların organoleptik özellikler kazanmasında, özellikle birçok peynir çeşidinin spesifik aromalar geliştirmesinde, patojenlere karşı bakteriyosin üretilmesinde ve birçok gıdanın üretiminde starter ve koruyucu kültür olarak da kullanılmaktadırlar. Lakin bazı et ürünlerinin bozulmasında da aktif rol oynadıklarının rapor edilmiş oluşu, farklı enterokok türlerinin çok farklı metabolik özelliklere sahip olduğunu gösterir niteliktedir (6,7). Bazı kuzey Avrupa ülkelerinde patojenite ile ilişkili olmayan enterokok türlerinin starter kültür bileşeni olarak kabul görmesi, bu türün biyofilm oluşumunun engellenmesi stratejilerini gıda endüstrisi açısından daha da önemli hale getirmiştir (15).

Enterococcus cinsinin 12 türü olmasına karşın, *E. faecalis* yukarıda özetlenen enterokok enfeksiyonlarının yaklaşık %90'ından sorumludur. Genellikle katater gibi tıbbi cihazların üzerinde ya da içinde biyofilm yapısı oluşturarak tedavisi zor enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu durum *E. faecalis*'in klinik önemini açık bir şekilde ifade etmektedir. Aynı zamanda yaygın gıda kontaminantları olmaları nedeniyle gıda endüstrisinde de büyük önem taşımaktadırlar. Gıda işletmelerinde; gıda aktarım hatlarında, üretim tanklarında ve diğer birçok yüzeyde *E. faecalis* bakterisi biyofilm oluşturarak sürekli kontaminasyon kaynağını teşkil etmekte, metal korozyonlarına, gıda bozulmalarına ve hijyenik sorunlara yol açarak ciddi ekonomik kayıplara ve sağlık sorunlarına neden olmaktadır.

E. faecalis'in planktonik formları, klasik sanitasyon, dezenfeksiyon ve sterilizasyon ajanlarına karşı oldukça duyarlı iken, aynı bakterinin biyofilm formlarının ise bu uygulamalara yüksek düzeyde direnç gösterdiği belirlenmiştir. *E. faecalis*'in neden olduğu kontaminasyonların ve enfeksiyonların kalıcılığı ve sürekliliğini belirleyen bu özellik, esas olarak söz konusu ajanların biyofilm yapılarına penetrasyonlarının güçlüğünden kaynaklanmaktadır (16). Etki mekanizmaları farklılık içerse de; kullanılan antibiyotikler ya da dezenfektanların biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesi ve eradikasyonunu sağlamasındaki temel ölçüt, daha önce de belirtildiği gibi bu amaçla kullanılan ajanların biyofilm matriksinden içeriye girebilme yeteneğidir. *E. faecalis* biyofilmleri yabancı ajanları tutarak, biyofilm yapısına girişlerini engelleyen ekzopolisakkarit, protein, lipit ve DNA içeren bir polimer ile çevrilidir. Bu durum biyofilmin kendisi ile mücadelede kullanılan ajanların içeriye girmesini engelleyen ana bariyer olduğunu göstermektedir. Diğer yandan biyofilm matriksindeki elektrostatik etkileşimlerin de kimyasalların penetrasyonunu engellemede önem taşıdığı belirlenmiştir (17). Bu veriler ise klasik mücadele ajanlarının ve uygulama yöntemlerinin *E. faecalis*'in biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesi ya da eradikasyonunda doğru bir şekilde kullanılmadığını ve yeterli olmadığını göstermektedir. Bu nedenle özellikle *E. faecalis*'in biyofilm yapıları esas alındığında, bu yapı ile mücadelede seçilecek olan ajanların; çevre ve insan sağlığına karşı olumsuz bir etkisi olmayan, etkin bir hücresel hedefi olan ve biyofilme penetrasyon yeteneği yüksek olan ajanlar olması önem taşımaktadır.

2.2. ENTEROKOKLARDA PATOJENİTE VE VİRÜLANS

2.2.1. HASTANE PATOJENİ OLARAK ENTEROKOKLAR

Enterokoklar daha öncede bahsedildiği üzere, dünya üzerinde geniş bir yayılım gösteren çoklu ilaç direncine sahip hastane patojenleridir. Hastalardan izole edilen patojenler arasında ikinci sırada yer alan enterokokların sebep oldukları hastalıklar arasında; endokardit, sepsis, cerrahi yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, menenjit ve yeni doğan enfeksiyonları bulunmaktadır (14). *Enterococcus* cinsi, ekolojik olarak birbirinden farklılıklar gösteren 40'tan fazla tür içermektedir. Enterokokal enfeksiyonların ise %90'ından fazlasına *E. faecalis* ve *E. faecium* türleri neden olmaktadır (10).

Çoklu ilaç direncine sahip olan enterokokların genomunun yaklaşık olarak %30'u mobil elementlerden ve virülans faktörlerden oluşmaktadır. Enterokokların genomunda yer alan

mobil elementlerin büyük bir kısmını feromon duyarlı plazmidler, konjugatif plazmidler ve konjugatif transpozonlar oluşturur (18). Plazmide sahip olmayan enterokok suşları tarafından sentezlenen ve salgılanan seks feromonları aracılığı ile, plazmid içermeyen bu suşlar ve feromon-duyarlı plazmid içeren suşlar arasında gerçekleşen konjugasyon sayesinde suşlar arasında antibiyotik direnç genleri ve birçok virülans faktörü etkili bir şekilde aktarılmaktadır. Böylece çoklu ilaç direnci gösteren yeni fenotiplere sahip suşlar ortaya çıkmaktadır (19).

Enterokokların hastane ortamlarında dirençli hale gelmelerinde, suşlar arasında meydana gelen yatay gen transferinin önemi oldukça büyüktür. Son yıllarda yaygın olarak kullanılan antibiyotikler, hastalık etmeni olan enterokokların antibiyotiklere karşı direnç düzeyini önemli oranda arttırarak onların kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına ve insan bağırsak mikrobiyotasının bozulmasına neden olmaktadır (20). 1980'li yılların ortalarında çoklu ilaç direncine sahip olan enterokok suşları ile yapılan çalışmalar, izolatların yatay gen transferi ile direnç genlerini birbirlerine aktardıklarını ve yarıdan fazla izolatın aynı hemolitik klondan geldiklerini göstermiştir (21). Vankomisin-dirençli *E. faecalis* suşuna (V583) ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde, enfekte olmuş bir hastanın kan örneğinde rastlanmıştır. Günümüzde ise hastane kaynaklı endemik ve epidemik çoklu ilaç direncine sahip olan enterokokal enfeksiyonlarına sıklıkla rastlanmaktadır (22).

2.2.2. GIDA PATOJENİ OLARAK ENTEROKOKLAR

Enterokoklar yaygın gıda kontaminantları olmaları nedeniyle gıda endüstrisinde de büyük önem taşımaktadır. Gıda işletmelerinde, gıda aktarım hatlarında, özellikle paketleme aşamasında ve sonrasında, soğuk zincir uygulamalarında yapılan hatalar sonucunda ve gıdaların temas halinde bulunduğu yüzeylerde biyofilm oluşturmak suretiyle sürekli kontaminasyon kaynağını teşkil eden enterokoklar, metal korozyonlarına, gıda bozulmalarına ve hijyenik sorunlara yol açarak ekonomik kayıplara ve sağlık sorunlarına neden olurlar. Gıda sektöründe karşılaşılan enterokok sorunlarında da başlıca enterokok türü, klinik enfeksiyonlarda olduğu gibi, *E. faecalis* olarak tespit edilmiştir (15). Fakat bazı fermente süt ve süt ürünlerinde yapısal ve aromatik özelliklerin gelişiminde özellikle *E. faecalis* büyük öneme sahiptir. Enterokoklar, proteolitik ve esterolitik aktiviteleri ve diasetil üretimleri sonucunda süt ve süt ürünlerinin olgunlaşmasını ve kendilerine özgü aroma geliştirmelerini sağlamaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı özellikle kuzey Avrupa ülkelerinde patojenite ile

alakası olmayan bazı enterokok türlerinin starter kültür bileşeni olarak kullanımı kabul görmüştür (15). Peynir ürünlerinin içinde bulunan enterokokların ürüne olan bir diğer faydası ise sentezledikleri bakteriyosinler ile gıdaları bozulma etmeni olan organizmalardan korumalarıdır. Son yıllarda süt ürünlerinden elde edilen enterokok izolatlarının sentezledikleri bakteriyosinler hakkında yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Elde edilen veriler, özellikle starter kültür olarak kullanılan enterokok suşlarının plazmidleri tarafından sentezlenen bakteriyosinlerin geniş etki spektrumuna sahip olduklarını göstermektedir (23). Bakteriyosin sentezleme özelliğinde olan enterokoklar, starter kültür olarak kullanılması halinde eklendiği ürünün tazeliğini korumakta ve raf ömrünü uzatmakta olduğu için gıda endüstrisinde sıklıkla tercih edilmektedir (24).

Enterokoklar süt ve süt ürünlerinin yanı sıra birçok gıda maddesinde de bulunmaktadır. Et ve et ürünleri ise bu gıdaların başında yer almaktadır. Hayvanların bağırsağında kolonize olan enterokok suşları, özellikle hayvanların kesimi sırasında dağılarak et ürünlerinin kontamine olmasına neden olurlar. Yapılan çalışmalar doğrultusunda elde edilen veriler, et ürünlerinden en çok *E. faecalis* ve *E. faecium* suşlarının izole edildiğini göstermiştir (7). Bununla birlikte enterokoklar, ısıtma işlemi görmüş et ürünlerinde yüksek sıcaklığa karşı dirençli olduğundan, pastörizasyon sonrası canlı kalarak ya da dilimleme ve paketlenme gibi işlem basamaklarında çapraz kontaminasyona bağlı olarak ürünlerde bozulmalara yol açarlar (25). Dolayısıyla enterokok enfeksiyonlarından korunmak amacı ile üreticiler tarafından yaygın olarak kullanılan yol, ısıtma işlemi sonrasında konserve kutusu ve plastik paketlere konulan ürünlerin tekrar ısıtma uygulamaya tabi tutulmasıdır. Böylelikle enterokokal kontaminasyonların önüne geçilmektedir (26).

2.2.3. ENTEROKOKLARDA BULUNAN VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

Enterokokların antibiyotik dirençlerinin yanında sahip oldukları virülans faktörleri de onların patojenite özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Virülans faktörleri mikroorganizmaların hastalık oluşturma yeteneklerini arttıran moleküllerdir. Enterokokların virülansında, Patojenite Adaları (PAI) olarak adlandırılan ve genom üzerinde farklı bölgelerde kümelenmiş olan gen bölgeleri ve plazmidlerde kodlanan virülans genleri rol oynamaktadır (14). Agregasyon faktörü (AF), sitolizin, jelatinaz, enterokok yüzey proteinleri (ESP), hemolizin ve hiyaluronidaz enterokokal virülans faktörlerinin en temel örnekleri arasında yer almaktadır. Enterokokal virülans

faktörlerinin büyük bir kısmı plazmidler üzerinde kodlanırken; Esp, sitolizin ve agregasyon faktörü ise PAI içinde kodlanmaktadır (27). Enterokoklarda tanımlanan virülans faktörler Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. *Enterococcus* cinsinde tanımlanan virülans faktörler (14,28,29)

Enterokokal Virülans Faktörler	Fonksiyon ve rolleri
Cyl <i>-cylL_L, cylL_S</i>	Sitolizin öncüleri; ökaryotik ve Gram-pozitif hücrelerin büyük çoğunluğunu lize eden aktif sitolizin üretiminde gerekli olan genlerin ifadesini sağlar
<i>-cylM</i>	Sitolizinin posttranslasyonel modifikasyonu
<i>-cylB</i>	Sitolizinin transportu
<i>-cylA</i>	Sitolizinin aktivasyonu
GelE <i>-gelE</i>	Toksin; jelatin, kollajen ve hemoglobini hidrolize eder Endokardit, peritonit ve endoftalminin asıl sebebinin oluşturur Bağırsak epitel hücrelerinden bakterilerin translokasyonunu sağlar Otolizin ve biyofilm oluşumunu aktive eder Fsr Quorum Sensing sistemi ile regüle edilir
AS proteinleri	Önemli adhezin proteinleridir Biyofilm oluşumunda etkin rol alır Endokardite neden olur

Tablo 2.1. *Enterococcus* cinsinde tanımlanan virülans faktörler (14,28,29) (devamı)

ElrA (<i>E. faecalis</i>) -elrA	Hücre duvarı ile ilişkili proteindir Üzerinde yaşadığı canlının makrofajlarını enfekte eder Peritonit hastalığına neden olur
Ebp (<i>E. faecalis</i>), Ebp_{fm} (<i>E. faecium</i>) -ebp	Özellikle <i>E. faecalis</i> 'in biyofilm oluşturmada görev alan pili kümesini oluşturmaktadır Ebp pilusunun ifadesi, RNA prosesi ve pozitif regülatörlerin de içinde bulunduğu çevresel büyüme şartları tarafından kontrol edilmektedir Biyofilm oluşumunda aktif rol oynar Özellikle <i>E. faecalis</i> hücrelerinin konak canlı içerisinde trombositlere, fibrinojene ve kollojene bağlanmasını sağlar
SrtA	Üriner sistemde katater bağlantılı enfeksiyonlara neden olur Biyofilm oluşumunda aktif rol oynar
epa lokusu	Hücre duvarı ile bağlantılı proteinlerdir Enterokok hücrelerinin, bağırsak epitel doku hücrelerinden geçişini ve biyofilm oluşturmalarını sağlar Bakteri hücrelerini, konak canlının polimorfonükleer nötrofil hücrelerine karşı korur
DGlDAG	Konak canlıının bağırsak epitel hücrelerine adhezyonunu sağlar Biyofilm oluşumunda aktif rol oynar Bakteriyemi nedenleri arasında yer alır
Ace (<i>E. faecalis</i>), Acm (<i>E. faecium</i>) -ace, acm	Ace, kollojen ve laminine adhezyonu sağlarken, Acm protein hücrelerin kollojene adhezyonunu sağlamaktadır Üriner system enfeksiyonlarına ve endokardite neden olurlar

Tablo 2.1. *Enterococcus* cinsinde tanımlanan virülans faktörler (14,28,29) (devamı)

Diğer virülans faktörler	
Megaplazmidler (<i>E. faecium</i>)	Enterokokların, konak canlıının gastrointestinal yolağında kolonize olmalarını sağlar Peritonite neden olurlar
Gls24 (<i>E. faecalis</i>), Gls20 ve Gls33 (<i>E. faecium</i>)	Peritonite neden olurlar Gls24 ise ayrıca endokardite neden olan etmenler arasında yer alır
Peroksidazlar -NADH peroksidaz (<i>E. faecalis</i>) -Ahp (<i>E. faecalis</i>) -Tpx (<i>E. faecalis</i>)	Bakteri hücrelerinin, konak canlıının hücreleri tarafından fagositoza uğramalarını engeller Peritonite neden olan etmenler arasında yer alırlar
MsrAB (<i>E. faecalis</i>)	Bakteri hücrelerinin, periton makrofajları arasında yaşamasını sağlar Üriner sistem enfeksiyonlarına neden olur
PerA (<i>E. faecalis</i>)	Biyofilm oluşumunda görev alır <i>In vitro</i> şartlarda makrofajlar içerisinde bakteri hücrelerinin yaşamasını sağlar Peritonite neden olan etmenler arasında yer alır
Bop	Biyofilm oluşumunda görev alır Bakteriyeminin çok uzun sürmesine neden olan etmenler arasında yer alır
SigV	Bakterimiye, üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan etmenler arasında yer alır
Süperoksit	Bakterimiye neden olur Konak canlıının bağırsak epitel hücrelerinde hücre-DNA hasarının indüklenmesini sağlar
Hyaluronidaz	Konak canlıının bağ dokularındaki mukopolisakkarit yapının depolimerize olmasını sağlayarak bakteri hücrelerin geçişini kolaylaştırır

2.3. BİYOFİLMİN TANIMI VE TARİHÇESİ

19. yy'dan 20.yy'ın ortalarına kadar olan süre, mikrobiyoloji bilim dalında "saf kültür dönemi" olarak anılmaktadır (30). Bu zaman diliminde bakterilerin tek bir hücre olarak yaşamlarını sürdürdüğü düşünülmekte ve karakterizasyon çalışmalarında ise sadece sıvı ya da katı besi ortamları kullanılmaktaydı. Günümüzde ise gelişen analiz teknikleri sayesinde, bakteriyel biyokütlenin sadece %1'lik kısmının planktonik formda olduğu saptanmıştır (31).

Biyofilm yapısının keşfi ilk kez Anthony van Leewenhoek tarafından 17.yy'da gerçekleşmiş ve çalışması sırasında kendi dış plaklarından elde ettiği bakteri topluluğuna "animalkuli" adını vermiştir. Henrici, 1933 yılında kümelenmiş bakterilerin fotoğrafını çekerek elde ettiği bu görüntü için "su içerisinde yaşayan bakterilerin birçoğu tek başına serbest bir formda olmayıp bir yüzey üzerinde bir arada yaşamaktadırlar" ifadesini kullanmıştır (32). Çevre mikrobiyologları tarafından ilk defa su arıtma tesislerinde karşılaşılan ve biyofilm yapısı oluşturmuş bakteriler için "bakteri topluluğu" terimi kullanılmıştır. Günümüze kadar ise mikrobiyal biyofilmlerin tanımlanmasında yukarıda örneklerini gördüğümüz gibi birçok farklı ifade kullanılmıştır.

Klinik mikrobiyoloji alanında ise ilk kez 1977 yılında Høiby tarafından kronik enfekte hastaların akciğerlerinde *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin kümelendiği tespit edilmiştir (33). Bu alanda ise biyofilm terimi ilk kez Costerton ve arkadaşları tarafından 1978 yılında kullanılmıştır(34). Costerton ve arkadaşlarının dış plakları ve nehir kenarlarındaki hareketsiz mikrobiyal topluluklarla yaptıkları çalışmalarla mikroorganizmaların canlı veya cansız yüzeylere tutunma mekanizmaları ve buldukları ekolojik niş içerisindeki kazanımları hakkında biyofilm yapıları ile ilgili çok çeşitli teoriler ortaya koymuşlardır. 1987 yılında ise aynı araştırmacılar inceledikleri bu doğa fenomenini kapalı bir yaşam şekli olarak ifade etmişlerdir (35,36). 1933 yılında Amerikan Mikrobiyoloji Derneği, bu yapıları ifade etmek için "biyofilm" kelimesini uygun bulduklarını açıklamıştır (37).

Bakteriyel biyofilmler, tedavisi oldukça zor olan (endokardit, kistik fibrozis, prostetik eklem enfeksiyonları, intravenöz katater ve stentlerden kaynaklanan enfeksiyonlar gibi) birçok kronik hastalığın başlıca etmenidir. Biyofilm kaynaklı oluşan bu hastalıkların en temel özelliklerinden biri ise, biyofilm içerisinde yaşayan bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç gösteriyor olmalarıdır (4). Biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların antibiyotik dirençlerine paralel

olarak, konakçı sistemin doğal ve adaptif immün yanıtlarına ve giderek artan oranda yüksek ısı, ışık, basınç gibi ekstrem şartlara karşı da direnç kazanmaktadırlar. Biyofilmin sahip olduğu bu özellikler ise onların buldukları ortamdan temizlenmelerini oldukça zor hale getirmektedir (4,38,39).

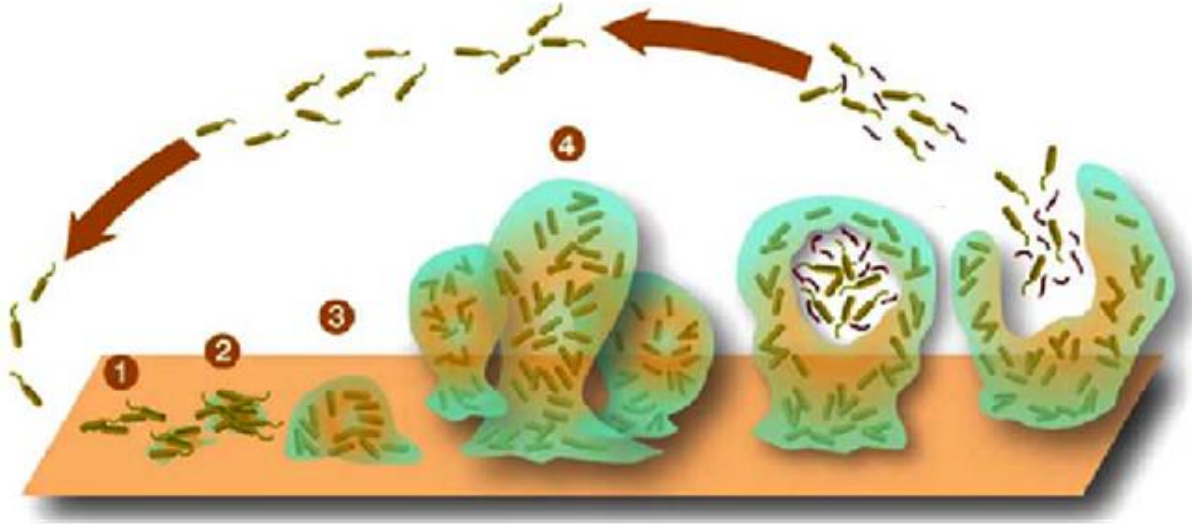
Daha öncede belirtildiği gibi herhangi bir yüzeye bağlanarak biyofilm oluşturan mikroorganizmalar planktonik formlarına kıyasla antibiyotiklere, klasik sanitasyon, dezenfeksiyon ve sterilizasyon ajanlarına karşı çok daha yüksek düzeyde direnç göstermektedirler. Bu nedenle günümüzde klinik ve endüstriyel mikrobiyolojide, biyofilm kaynaklı enfeksiyonların önlenmesinde ve eradikasyonunda temel yaklaşım, kullanılacak mücadele ajanlarının, kullanım konsantrasyonunun ve muamele süresinin belirlenmesinde biyofilm yapılarının esas alınmasıdır (40).

2.4. BİYOFİLM OLUŞUM BASAMAKLARI

Biyofilm, mikrobiyal hücrelerin ara yüzeylere, birbirlerine ya da çeşitli substratlara bağlanarak oluşturdukları kompleks bir yapıdır. Bir biyofilmin yapısı ve mimarisi, mikroorganizmaların buldukları ortamların debisine ve biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların tür çeşitliliğine bağlıdır. Biyofilmler tek bir tür tarafından oluşturulabildiği gibi, içerisinde birçok farklı türü de barındırabilir. Biyofilm içerisinde yer alan birçok farklı türün oluşturduğu mikrokoloniler, besin maddeleri ve su taşıyan kanallarla birbirlerine bağlıdırlar. Biyofilmi oluşturan hücreler, çok hücreli formlara benzeyen gelişme fizyolojileri ve biyofilm oluşum sürecine katılan genler bakımından planktonik formlarından çok daha farklı yapısal ve fizyolojik özellikler taşımaktadır (31).

Biyofilm oluşumunu dört ana evre ile incelemek mümkündür (41). Bu aşamalar sırasıyla (Şekil 2.2):

- 1) Yüzey üzerinde ince tabakanın oluşumu
- 2) Mikroorganizmaların yüzeye geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olarak tutunması
- 3) Yüzey kolonizasyonu ve biyofilm oluşumu
- 4) Biyofilm hücrelerinin ortamdaki kopması'dır.



Şekil 2.2. Biyofilm oluşum aşamaları (42)

2.4.1. YÜZEY ÜZERİNDE İNCE TABAKANIN OLUŞUMU

Doğal ortamlarında mikroorganizmalar bir yüzeye bağlı olarak yaşamamaktadır. Planktonik haldeki bir mikroorganizmanın herhangi bir yüzeye tutunup gelişebilmesi için o yüzey üzerinde ince bir film tabakasının oluşması gerekmektedir. Yüzey üzerinde bulunan bu film tabakası, bulunduğu yüzeyin kimyasal modifikasyonuna neden olarak mikrobiyal tutunmayı çok kuvvetli bir şekilde etkilemektedir. İnce bir tabakanın varlığı ilk olarak Loeb ve Neihof (1975) tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar, deniz ortamında yaptıkları çalışmalarda, deniz içerisinde bulunan yüzeyler üzerinde çeşitli biyokimyasal reaksiyonların gerçekleştiğini, ortamda bulunan polimerik maddelerin yüzeyin hem fiziksel hem de kimyasal yapısını değiştirdiğini, meydana gelen bu değişimlerin ise deniz içerisinde yaşayan mikroorganizmaların yüzeye tutunmalarını kolaylaştırdığını ve daha kolay bir şekilde kolonize olabildiklerini göstermişlerdir (43). Dış plaklarının incelendiği bir çalışmada ise, üzerlerinde biyofilm oluşmadan önce dış minelerinin protein benzeri bir yapıyla kaplandığı ve içerisinde genellikle albumin, glikoprotein, lipid, lizozim, fosfoprotein ve tükürük sıvısını oluşturan diğer bileşenleri içerdiği saptanmıştır (40). Bir yüzeyin topografisi, mikrobiyal bağlanmayı sağlayan temel etkenlerden bir diğeridir. Bir yüzey ne kadar pürüzlü olursa, o yüzey üzerinde mikrobiyal tutunma ve akabinde biyofilm oluşumu o kadar hızlı gerçekleşmektedir. Yüzey pürüzlülüğünün yanı sıra, yüzeyin fizikokimyasal özellikleri de mikrobiyal tutunmayı arttıran en önemli etkenlerden biridir. Birçok çalışmanın sonucunda, mikroorganizmaların hidrofobik ve non-

polar yüzeylere (Teflon veya plastik gibi), hidrofilik yüzeylerden (cam) daha hızlı bağlandıkları saptanmıştır (44).

2.4.2. MİKROORGANİZMALARIN YÜZEYE TUTUNMASI

Bakterinin yüzeye ilk tutunma aşamasında, yüzeye arasında zayıf bağlar (çeşitli hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals bağları gibi) oluşturulur. Bu aşamada bakteriler yüzeye çok yakın olmakla beraber tam anlamıyla yüzeye etkileşim içerisinde değildirler. Geri dönüşümlü bağlanma olarak da adlandırılan bu aşamada bakteriler, tutunacakları yüzeyde yeterli besin maddesi olup olmadığını kontrol ederler. Uygun ortamı buldukları anda ise yüzeye kurdukları zayıf bağlar yerini daha güçlü olan etkileşimlere (Dipol-Dipol etkileşimi, çeşitli hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen bağları gibi) bırakır ve geri dönüşümsüz tutunma gerçekleşir. Aynı zamanda bakteriler flagella ve pili gibi organelleriyle ve salgıladıkları ekstrasellüler polimerik maddeleriyle de (EPS) yüzeylere geri dönüşümsüz olarak bağlanabilirler. Tutunmayı kolaylaştıran EPS birçok bakteri türünde tanımlanmış olsa da, EPS oluşturmayan bazı bakteri hücrelerinin de çeşitli yüzeylere bağlanabildikleri belirlenmiştir (44).

Biyofilm hücreleri yüzeye kalıcı bir şekilde bağlandıktan sonra buldukları ortamdan eradikasyonları oldukça zorlaşmaktadır. Oluşan biyofilmi yüzeyden uzaklaştırmak için güçlü mekanik kuvvet, enzim, dezenfektan, çeşitli sanitizere ve yüksek ısı işlemlere ihtiyaç duyulmaktadır (45). Gıda endüstrisinde en çok *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* türleri biyofilm oluştururken, klinik alanda ise en çok enterokok türlerinin oluşturduğu biyofilmlere rastlanmaktadır (41,46).

2.4.3. KOLONİ GELİŞİMİ VE OLGUN BİYOFİLM OLUŞUMU

Yüzeye tutunmuş olan bakteriler bu evrede gelişmeye ve bölünmeye başlar. Gelişen ve sayıca artan bakteri hücreleri yüzeyde mikrokoloniler oluştururlar. Mikrokolonilerin yüzeyde tutunmasını sağlayan en büyük etken ise ürettikleri EPS'tir. EPS, bakteri ve yüzey arasında bağ doku görevi görerek, koloniyi her türlü çevresel strese karşı korumaktadır (31). Biyofilm yapısı, bünyesinde yaşayan bakterilerin UV ışınlarına karşı direnç kazanmalarını, diğer bakteriler ile genetik aktarım yapmalarını ve sekonder metabolit üretimlerinin artmasını sağlamaktadır. Biyofilm yapısındaki koloniler arasında besin ve su taşınımı ve aynı zamanda atıkların

ortamdan uzaklaştırılması, bakterilerin oluşturdukları kılcal damar yapısındaki su kanalları aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Su kanalları biyofilm içerisinde primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapmaktadır. Biyofilm içerisindeki dolaşım pasif difüzyonla gerçekleştirilirken, dışarıdan moleküllerin alımı kolaylaştırılmış difüzyonla gerçekleştirilmektedir (3). Biyofilm yapısında yer alan su kanallarının ayrıca oksijen taşıdığı da düşünülmektedir. Difüzyonun belirli limitlerinin olması ve oksijenin hızla tükenmesi nedeniyle biyofilmin alt katmanlarında oksijen varlığı oldukça azdır. Bu durum ise biyofilm içerisinde aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların bir arada nasıl yaşadığını açıklamaktadır (3,47).

2.4.4. HÜCRELERİN BİYOFİLM YAPISINDAN KOPARAK DAĞILMASI

Farklı bölgelerde de biyofilm oluşturmak amacıyla hücreler, içerisinde yaşadıkları biyofilmden koparak başka bölgelerde kolonize olmaya devam ederler. Hücrelerin biyofilmden ayrılması birden fazla mekanizmayla gerçekleşebilir. Bu ayrılma dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, iç enzimatik bozulma, EPS veya biyofilm yapısını yüzeye bağlayan diğer proteinlerin yapısındaki bozulma gibi biyofilm içerisinde görülen metabolik olayların sonucu olarak da gerçekleşebilmektedir (47). Ortamlarından ayrılan bu hücreler, farklı yüzeylere tutunarak tekrar biyofilm yapısı oluştururlar.

2.5. ENTEROKOKAL BİYOFİMLER

Enterokolar, tarihsel süreçte insanların ve hayvanların bağırsağında kommensal olarak yaşayan mikroorganizmalar niteliğinde iken, günümüzde birçok antibiyotiğe ve birçok dezenfektana karşı direnç kazanmaları sonucunda patojen mikroorganizmalar olarak değerlendirilmektedirler. Yapılan araştırmalar, özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinin nazokomiyal hastalıkların en önemli nedenleri arasında ilk sıralarda yer aldığını göstermektedir (14). Enterokoklar, bakteriyemi ve endokarditin yanı sıra üriner sistem enfeksiyonları ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarına da neden olmaktadır. Antibiyotik direncine sahip olmalarının yanında, çeşitli virülans faktörlere sahip olmaları onların biyofilm oluşturmalarına katkıda bulunmaktadır.(8). Böylece biyofilm içerisinde yer alan mikroorganizmalar antibiyotik direncinin yanı sıra giderek artan oranda çeşitli dezenfektanlara, antimikrobiallere, yüksek ısı, ışık, basınç gibi ekstrem çevre şartlarına karşı da dirençli hale gelmektedir. Bu durum, biyofilmlerin buldukları yüzeyden eradikasyonlarını oldukça zorlaştırmaktadır (6).

Son yıllarda enterokoklar üzerine yapılan çalışmalarda, enterokokların biyofilm oluşturma sürecinde aktif olan birçok gen tanımlanmıştır. Tanımlanan bu genler büyük oranda, hücrelerin birbirlerine ve yüzeye tutunmalarını sağlayan yüzey proteinlerini, otolizin proteinlerini ve glikolipitleri kodlamaktadır (48).

2.5.1. YÜZEYE TUTUNMADA ROL OYNAYAN FAKTÖRLER

Enfeksiyon sürecinin en önemli basamağı, patojen bakterilerin konak canlıının dokularına tutunmasıdır. Enterokokların, konak canlıının gastrointestinal ve üriner sisteminde yer alan doku ve hücrelere bağlanması, sahip oldukları adhezin proteinleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Adhezinlerin bakterilerin kolonizasyonunu gerçekleştirmede önemli roller üstlendikleri düşünülmektedir. Agregasyon faktörü, Esp, Ace en önemli adhezin proteinleri arasında yer almaktadır (16). Esp'nin adhezyonda ve özellikle konak canlıının bağışıklık sisteminden korunmada aktif rol oynadığı çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (49). Üriner sistem enfeksiyonlarında *E. faecalis*'in konak canlıda kalıcılığını ve kolonizasyonunu agregasyon faktörleri aracılığı ile sağladığı da çalışmalar sonucunda belirtilmiştir (50). Agregasyon materyalleri, önemli virülans faktörlerinden olup bağırsak hücreleri mikrovilluslarına mikroorganizmaların tutunmasını sağlamaktadır. Agregasyon proteinlerinde yer alan Arg-Gly-Asp-Ser aminoasit dizisinin oluşturduğu motifin ökaryotik hücreye bağlanmada rol aldığı düşünülmektedir (51). Ace adhezin proteini ise kommensal ve patojen özellikteki *E. faecalis* izolatlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Ace, kollojen tip I ve IV'e (laminin ve dentin) bağlanmak suretiyle, bakteri hücrelerinin konak canlıya tutunmasını sağlamaktadır. İnsanlarda endokardit hastalığının görülmesine neden olan en önemli etkenler arasında Ace yer almaktadır. *E. faecium*'da ise *acm* geninin homologu olan *ace* geni bulunmakta ve sentezlediği Ace adhezin proteini, Acm ile kısmen benzerlik göstermektedir (52). Özellikle *E. faecalis* izolatlarında bulunan ve bakteri hücrelerinin abiyotik ve biyotik yüzeylere tutunmasında görev aldığı düşünülen adhezin proteinlerinden bir diğeri ise EfaA proteindir. EfaA proteininin patojenitesi üzerinde yapılan çalışmalar ise halen devam etmektedir (53). Adhezin proteinleri, biyofilm oluşumu esnasında hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlarlar. Bu nedenle, bu proteinlerin ne zaman veya ne kadar ifade edileceği hücrelerin büyüme fazına ve hücrelerin bulunduğu ortamın şartlarına bağlıdır.

2.5.2. KONAK CANLINİN BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİN BASKILANMASINDA ROL OYNAYAN FAKTÖRLER

Patojen mikroorganizmalar, konak canlının immün sistemini nötr ya da kendilerine zarar veremeyecek duruma getirirlerse, ancak o zaman konak canlının mukozasını veya diğer bariyerleri aşarak dokularına veya hücrelerine tutunabilir ve bu şekilde enfeksiyon geliştirebilirler. Lipotaykon asit (LTA), ekstraselüler süperoksitler ve salgıladıkları bazı feromonlar, patojenlerin konak canlının bağışıklık sistemini baskılamada kullandığı çeşitli proteinler arasında yer almaktadır.

LTA çoğunlukla Gram-pozitif bakterilerin hücre yüzeyleri üzerinde bulunmakta ve enterokokların D grubu antijenini oluşturmaktadırlar. Gram-pozitif bakterilerin yüzeyi sürekli olarak farklı mikroçevresel şartlara maruz kalmaktadır. Mikroorganizmaların bu şartlara uyum sağlamasında D-alanin LTA; katyonik homeostasiyi sağlamada, otolitik aktivitelerin modülasyonunda, metal katyonların asimilasyonunda ve bakteriyel zarın diğer birçok elektromekanik özelliklerinin ayarlanmasında birçok fonksiyonel görev üstlenmektedir. Bunun yanı sıra LTA, konak canlının trombositlerine, lenfositlerine, eritrositlerine ve epitel hücreleri gibi çeşitli ökaryotik hücrelerine bağlanarak konak canlının immün cevabının baskılanmasında da görev almaktadır (54).

Ekstraselüler süperoksitler, enterokok türlerinden en çok *E. faecalis* ve *E. faecium* türlerinde görülmektedir. Bakteriler tarafından sentezlenen süperoksitler mikroçevreye salınarak bakteri için dezavantaj olan etmenleri elimine eder ve bakterinin hayatta kalma süresinin uzamasını sağlar. Bakteriyemi ve endokarditli hastalardan izole edilen klinik kaynaklı suşlarda yüksek oranda süperoksit radikale rastlanmıştır. Bu nedenle süperoksit üretiminin virülansla ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür (55).

E. faecalis'te sinyal peptitleri olarak görev alan seks feromonları 7-8 aminoasit uzunluğunda, küçük, hidrofobik peptitlerdir. Seks feromonlarının, *E. faecalis*'te bulunan belirli konjugatif plazmidlerin transfer sıklığını arttırdığı bilinmektedir. Antibiyotik direnci, sitolizin üretimi gibi virülans faktörlerin suşlar arasında yatay gen transferi ile aktarılmasında yine seks feromonları görev almaktadır (55).

2.5.3. SALGILANAN FAKTÖRLER

Enterokoklar tarafından salgılanan en önemli virülans faktörlerden bir diğeri sitolizindir. Sitolizin, ökaryotik hücreleri lize edebilen ve aynı zamanda bakterisidal etki gösteren ender lantibiyotikler arasında yer almaktadır. Sitolizin gen kodları, feromon duyarlı plazmidler veya patojenite adaları bulunduran kromozomlar üzerinde yer almaktadır. Sitolizinin sentezlenmesinde rol alan genlerin; *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA* ve *cylI* olduğu araştırmalar sonucunda belirlenmiştir. Sitolizin, ökaryotik canlılarda kırmızı kan hücrelerinin, retina hücrelerinin, polimorfonükleer nötrofillerin ve makrofajların lizisinde görev almaktadır (56).

Hücre dışına salgılanan bir diğeri enterokokal virülans faktör ise jelatinazdır. Özellikle gıdalardan izole edilen *E. faecalis* suşlarında jelatinaz üretiminin yüksek olduğu saptanmıştır. *E. faecalis*'te bulunan *fsr* lokusu tarafından jelatinaz ifadesinin düzenlendiği bilinmektedir. Bakteri hücrelerinde bulunan, yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonunda yine jelatinaz görev alır. Ayrıca peptidoglikanı sindiren bir enzim olan otolizini aktive ederek hücre dışına ekstraselüler DNA'nın çıkmasına ve böylelikle biyofilm oluşumunun hızlanmasına aracılık eder (14).

Hyaluronidaz, hyaluronik asiti tahrip ederek doku hasarına yol açan hücre dışına salgılanan bir diğeri virülans faktördür. Bağ dokuda yer alan mukopolisakkaritleri depolimerize ederek bakterilerin konak canlıda yayılmasını sağlar. Mukopolisakkaritlerin depolimerizasyonu sonucu oluşan disakkaritler ise, bakteriler tarafından besin kaynağı olarak kullanılır. Hiyaluronidaz, kromozom üzerinde yer alan *hyl* geni tarafından kodlanmaktadır (29).

2.5.4. GLİKOLİPİTLER

Birçok Gram-pozitif bakteride, hücre zarında bulunan glikolipitlerin biyofilm oluşumu esnasında görev aldığı tespit edilmiştir. *E. faecalis* suşunda bulunan *bsgA* geni glikolipit sentezinde görev alan glikoziltransferaz enziminin üretiminde rol alır. Yapılan çalışmalar sonucunda, glikolipit sentezinde görev alan genin mutasyonu sonucunda doğal ve mutant tiplerin biyofilm oluşturma özellikleri incelenmiş ve mutant mikroorganizmaların plastik yüzeylerde biyofilm oluşturmamadıkları, bağırsak hücrelerinin yüzeyine bağlanma özelliklerini

kaybettikleri belirlenmiştir. Bu çalışma sonrasında glikolipitlerin de biyofilm oluşumunda görev aldığı gösterilmiştir (57).

2.5.5. HÜCRE DUVARI POLİSAKKARİTLERİ VE KAPSÜL

Bakteriyel kapsül komponentleri fagozitoza ve diğer birçok dış etkene karşı dayanıklı olduğundan, konak canlının bağışıklık sisteminden korunmada rolleri önemlidir. Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda özellikle klinik *E. faecalis* izolatlarında kapsüler polisakkaritin ifadesini sağlayan genlerin operon halinde düzenlendiği belirlenmiştir (27).

Enterokoklarda hücre duvarı ile ilgili olan birçok polisakkaritin sentezlenmesinde enterokokal polisakkarit antijen (*epa*) lokusu görev almaktadır. Glikozil transferaz enzimini ifade ettiği düşünülen ve *orfde4* geni olarak da bilinen *epaB* geni ile yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda, mutant olan hücrelerin polistiren yüzeylere tutunamadığı gözlenmiştir. Faz-kontrast mikroskobu ile yapılan incelemelerde ise, *epaB*-mutant hücrelerinin oluşturduğu biyofilmlerin yoğunluğunun çok az olduğu belirlenmiştir (58).

2.6. BAKTERİYOSİNLER

Gıda kaynaklı birçok laktik asit bakteri türü; *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, bakteriyosin adı verilen küçük antimikrobiyal proteinler üretmektedir. Bakteriyosinler, sentezlendikleri türe yakın olan türdeki mikroorganizmaların inhibisyonunda etkilidirler. Bakterilerin sentezledikleri bakteriyosinler aracılığı ile mikroorganizmaların, birbirlerine karşı göstermiş oldukları antagonist özellikler uzun yıllardan beri bilim adamlarının dikkatini çekmiştir ve araştırma konuları arasında yer almıştır (24).

İlk kez 1877 yılında, Pasteur ve Joubert tarafından, "antraks" hastalığı taşıyan hayvanlarda *Escherichia coli*'nin bazı suşları ile *Bacillus anthracis* arasında antagonist bir etki saptanmıştır (59). Bakteriyosinlerin kimyasal aktiviteleri ise ilk olarak 1925 yılında Andre Gratia tarafından tanımlanmıştır. Üzerinde çalışma yaptığı bakteriyosin *E. coli*'nin bir türü tarafından sentezlendiği için, "kolisin" olarak adlandırmış ve bu terim daha sonra 1946 yılında Fredericq ve Gratia tarafından kullanılmıştır (59,60).

1928 yılında ise Rogers, *Lactobacillus bulgaricus* üzerine, *Lactococcus lactis* tarafından üretilen bir maddenin inhibitör olarak etkinlik gösterdiğini saptamış ve bu maddeyi daha sonra "nisin" olarak adlandırmıştır (61). Yapılan klinik çalışmalar doğrultusunda nisin, antibiyotik olarak değerlendirilmiş ve N grubu streptokoklar tarafından sentezlendiği için "N Inhibitory Substance" yani kısaca "NİSİN" olarak anılmaya başlanmıştır (62).

2.6.1. BAKTERİYOSİNLERİN BİYOLOJİSİ

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından sentezlenen ve genelde sentezlendikleri türe yakın olan türdeki bakterilerin inhibisyonunda etkili olan küçük peptit ya da protein yapısındaki moleküllerdir (63).

Bakteriyosinlerin bakteriler tarafından neden sentezlendiğine dair geliştirilmiş birçok teori bulunmaktadır. Geliştirilen bu teorilerden birine göre bakteriyosinler, protein metabolizmasının birer yan ürünüdür. Savunma mekanizması olarak da düşünülen bakteriyosin sentezini birçok bakteri türü gerçekleştirmektedir (64). Farklı bakteri türlerinin bulunduğu ortamlarda besin kaynaklarının azalmasına bağlı olarak bakterilerin enerji üretimleri de yavaşlar. Bu durum, bakterilerin rekabete dayalı antagonizma geliştirmelerine neden olur. Bakteriyosinler ise genel olarak rekabete dayalı ortamlarda bakterilerin sentezlediği en önemli bakterisidal nitelikteki proteinlerdir (65). Bakteriyosinlerin biyokimyasal özellikleri, moleküler ağırlıkları, etki spektrumları, etki mekanizmaları ve genetik yapıları oldukça heterojendir (66).

Genelde bakteriyosinlerle antibiyotikler, aralarında birçok farklılık olmasına rağmen, zaman zaman karıştırılmaktadır. Bakteriyosinler ile antibiyotikler arasındaki en önemli farklardan biri; bakteriyosinlerin ribozomal olarak sentezlenmesine karşın, antibiyotiklerin ikincil metabolizma ürünleri oluşudur. Bakteriyosinler pre-peptitler olarak sentezlenmekte ve daha sonra yapısındaki N-terminal lider peptidin posttranslasyonel işlemler sonucunda ayrılmasıyla aktif hale geçmektedir. Antibiyotikler ise enzimatik işleme sonucu aktif olmaktadır. Bakteriyosinler, bakterilerin gelişme fazında üretilirken, antibiyotikler gelişimin durma fazında sentezlenen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (24). Bunun yanında, antimikrobiyal spektrumları, toksik özellikleri ve direnç mekanizmaları da oldukça farklıdır (67).

Bakteriyosinlerin sentezinden sorumlu olan genler genellikle mobil elementlerle bağlantılıdır. Bu genler, kromozomal kökenli ise transpozonlarla ilişkili bir şekilde ya da plazmid üzerinde bulunurlar. Bakteriyosin sentezini kontrol eden gen bölgelerinde birçok benzerliğin bulunması, yakın türler arasında plazmid aktarımlarının olduğunu ve zamanla esansiyel bölgeler dışında kalan kısımlarda meydana gelen küçük mutasyonlarla bakteriyosin çeşitliliğinin sağlandığını düşündürmektedir (68).

Bakteriyosin sentezleyen suşlar, bakteriyosinlerle beraber eş zamanlı olarak sentezledikleri immünite (direnç) proteinleri sayesinde kendi bakteriyosinlerinin inhibe edici aktivitelerinden korunmaktadırlar. Direnç proteinlerini kodlayan genler de bakteriyosinleri kodlayan gen kümesinin içerisinde yer almaktadır. Yapılan çalışmalar, sentezlenen tek bir proteinin, üretici bakteriyi, sentezlediği bakteriyosinin etkilerinden koruduğunu kanıtlamıştır. Bu proteinler, özellikle hücre zarının içerisinde ya da hücre zarının yüzeyine bağlı olarak bulunurlar. Bazı immün proteinler ise hücre duvarında bulunmakta ve bakteriyosinlerin sentezlendikleri hücrelere tekrar girmesini engellemektedir (65).

2.6.2. LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ TARAFINDAN SENTEZLENEN BAKTERİYOSİNLER

Laktik asit bakterileri, Gram-pozitif, fakültatif anaerobik veya mikroaerofilik, basil ve koklardan oluşan, *Firmicutes* filumuna ait bakterilerden oluşmaktadır. Spor oluşturmayan, katalaz-negatif olan bu grubun en önemli cinsleri arasında *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* yer almaktadır (69). Bütün laktik asit bakterileri anaerobik şartlar altında gelişim göstermekle beraber, zorunlu anaerob olan bakteriler gibi oksijene karşı duyarlı değildirler. Sitokrom ve elektron taşıma sistemi bulundurmadıklarından, sadece substrat düzeyinde fosforilasyon yolu ile enerji elde edebilmektedirler (12).

Laktik asit bakterileri (LAB) organik asit, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit, antifungal peptitler ve bakteriyosinler gibi çok çeşitli antimikrobiyal bileşikler üretebilme özelliğine sahiptirler. Laktik asit bakterileri fermentasyon sonucu çok sayıda antimikrobiyal nitelikte bileşik ürettiklerinden, son yıllarda özellikle gıda sektöründe gıda koruyucusu olarak kullanım olanaklarının araştırılması, yoğun bir çalışma alanı haline gelmiştir (66,70).

Laktik asit bakterilerinin birçok türü bakteriyosin üretmektedir. Üretilen bakteriyosinlerin türüne bağlı olarak özellikle *Staphylococcus aureus*, *Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Clostridium spp.* gibi patojen bakterilerin inhibisyonu sağlanabilmektedir (66). Bakteriyosinler, genellikle etkilerini Gram-pozitif patojen bakteriler üzerinde gösterirken, bazı bakteriyosinler Gram-negatif bakterilerin de gelişimini engellemektedir. Laktobasiller tarafından üretilen laktosin27, laktisinB, helvesitinJ gibi bakteriyosinler, bazı Gram-negatif patojen mikroorganizmalara karşı da inhibisyon özellik gösteren başlıca bakteriyosin türleridir (71).

LAB bakteriyosinleri genel olarak gıda sektöründe, gıda koruyucu olarak kimyasal maddelerin yerine kullanılmaktadır. Güvenli olmaları, ökaryotik hücrelere karşı toksik etki göstermemeleri, pH ve sıcaklık değişimlerine karşı tolerans göstermeleri, geniş spektrumda antimikrobiyal özellik içermeleri, üretici hücrelere zarar vermiyor olmaları ve ortamda uzun süre aktif olarak kalmadıklarından dolayı patojen mikroorganizmaların direnç geliştirmelerinin çok zor olması, bu bileşiklerin en önemli özellikleri arasında yer almaktadır (62,72).

Laktik asit bakterilerinden *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin bakteriyosini, en iyi karakterize edilmiş bakteriyosinlerden biridir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye sahip olması, insanlara karşı toksik etki göstermemesi, termostabil bir yapıya sahip olması, düşük pH değerlerinde aktivite gösterebilmesi nisin bakteriyosininin gıda ve sağlık alanında kullanımını arttırmıştır (73). Nisin bakteriyosini 1969 yılında FAO/WHO tarafından güvenilir doğal gıda koruyucusu olarak tescillenmiştir (71). Nisin bakteriyosininin yanı sıra, *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen asidofilin ve laktosidin, *Lactobacillus plantarum* tarafından sentezlenen laktosin gibi bakteriyosinler de biyokimyasal özellikleri bakımından iyi karakterize edilmiş, antimikrobiyal özellikleri yüksek olan bakteriyosinlerdir (74).

Nisin ve benzeri lantibiyotikler, Gram-pozitif bakteriler tarafından sentezlendikleri için, etkilerini büyük oranda Gram-pozitif bakteriler üzerinde gösterirler. Hücre zarının ve hücre duvarının biyosentezini engellemeye yönelik olarak inhibe edici etkileri vardır. Gram-negatif bakterilerde etkili olmamalarının asıl nedenlerinden biri de, Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı ve membran yapılarının lantibiyotiklere karşı geçirgen nitelikte olmamasıdır (24). Genel anlamda lantibiyotikler katyonik yapıda peptitlerdir. Hedef bölgeleri olan hücre zarında ise anyonik nitelikteki moleküller fazladır. Bu nedenle anyonik ve katyonik moleküller arasındaki

etkileşimden dolayı lantibiyotikler direk etkilerini hücre zarı üzerindeki anyonik molekülere bağlanarak gösterirler (75). Genel anlamda bakteriyosinler amfipatik ve katyonik yapılarıyla, hücre zarı geçirgenliğini arttırarak ve por oluşturarak hücre ölümünü gerçekleştirirler. Bazı bakteriyosinler ise hücre zarıyla beraber hücre duvarı oluşumunu da engellemektedir (65).

Lantibiyotikler adıyla da bilinen Grup I bakteriyosinleri, hücre inhibisyonunu iki şekilde gerçekleştirmektedir. Hedef molekülleri hem hücre zarının hem de hücre duvarının sentezinde görev alan lipid II molekülüdür. Lipid II molekülü hücre zarının yapısına katılırken, hücre duvarı sentezinde ise hücre duvarının yapısı için esansiyel olan peptidoglikan monomerlerini taşıyarak görev almaktadır (68). Lantibiyotiklerin en önemlilerinden biri olan nisin de inhibitör aktivitesini gerçekleştirirken kullandığı hedef molekülü lipid II molekülüdür. Katyonik özellik gösteren nisin, anyonik yapıdaki lipid II molekülüne bağlanarak hücre zarıyla etkileşime girer ve hücre zarı üzerinde por oluşturmaya başlar. Nisin, aynı zamanda lipid II molekülüne bağlanarak, hücre duvarı sentez mekanizmalarından "Lipid II çevrimini" inhibe ederek hücre duvarı sentezini de engellemiş olur. Bazı bakteriyosinler ise etkilerini sadece hücre duvarı sentezini engelleyerek gösterirler (72,76).

2.6.2.1. Nisin bakteriyosini

Nisin, lantibiyotikler olarak da bilinen Grup I bakteriyosinlerinin en önemli üyesidir. Ayrıca, *L. lactis* tarafından sentezlendiği belirlenmiş ilk bakteriyosindir. Oldukça geniş bir spektrumda etki gösterebildiğinden, gıda sektöründe gıda koruyucu olarak, sağlık sektöründe ise terapötik ajan olarak kullanılmaktadır (12).

Nisin bakteriyosini, daha öncede belirtildiği üzere 1928 yılında İngiltere’de Rogers ve Whitter’in yaptığı çalışmalarda, laktokokların diğer laktik asit bakterilerinin gelişimlerini inhibe ettiğinin belirlenmesi sonucu bulunmuştur (77). Whitehead ise 1933 yılında, nisini izole etmiş ve protein yapıda olduğunu kanıtlamıştır. 1944 yılında Mattick ve Hirsch, yaptıkları çalışmalar sonucunda bu bileşiği saflaştırmayı başarmış ve birçok bakteri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Mastitis adı verilen kemik iltihabı ile mücadelede ve II. Dünya Savaşı sırasında çekilen penisilin kıtlığı nedeniyle, nisin bakteriyosini üzerine yapılan çalışmalar giderek artmıştır (78). 1969 yılında FAO ve WHO tarafından güvenilirliği onaylanmış ve ticari olarak kullanımına izin verilmiş ilk bakteriyosin nisindir.

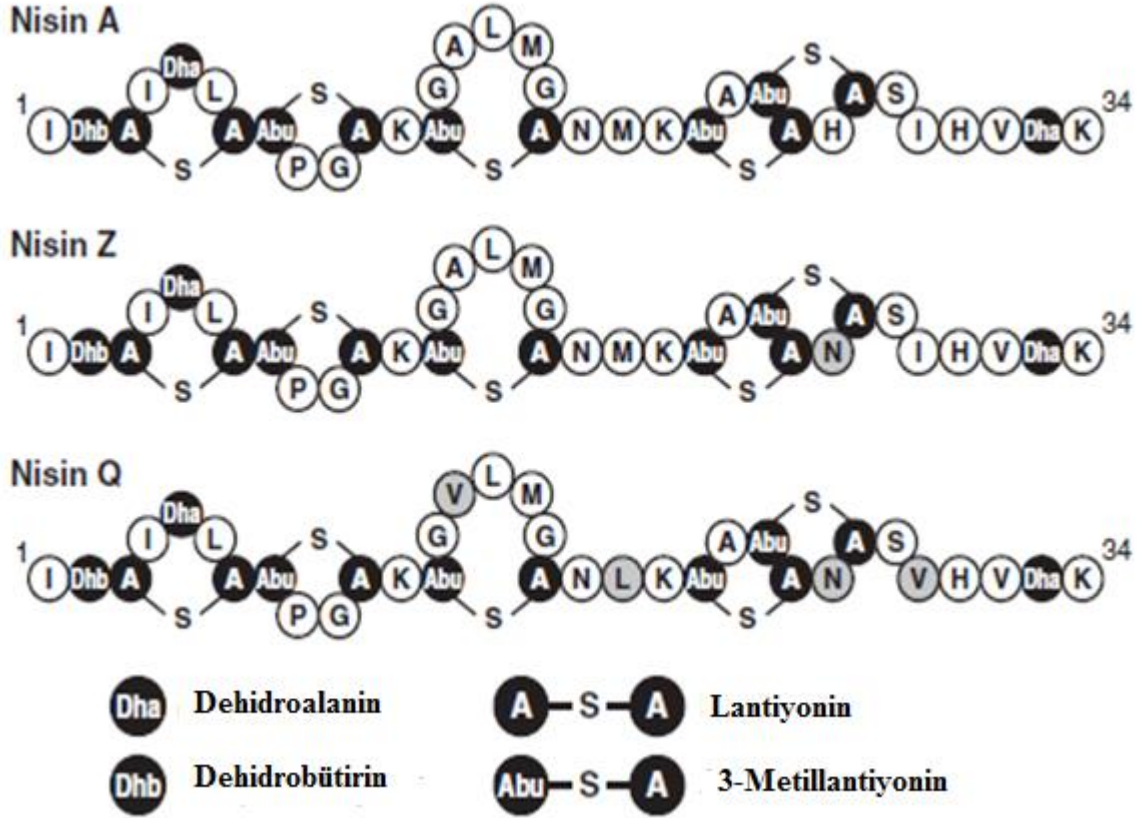
E234 kod numarasıyla gıda sektöründe, gıda koruyucu olarak, başta Japonya olmak üzere birçok ülkede kullanılmaktadır (23,64,79).

Nisin, Gram-pozitif bir bakteriden sentezlendiği için birçok Gram-pozitif bakteri nisine karşı duyarlıdır. Ancak nisin Gram-negatif bakteriler üzerinde de düşük oranda antimikrobiyal etkisi bulunmaktadır. Nisin, Gram-pozitif bakterilerin vejetatif formları yanında, *Clostridium* ve *Bacillus* sporlarına karşı da antimikrobiyal etki göstermektedir (24). Bu nedenle nisin, özellikle gıda sektöründe yüksek sıcaklıktan etkilenen ve dolayısıyla ısı işlem uygulanamayan asidik gıdaların bozulmasında rol oynayan patojenlerin vejetatif ve spor formlarının inhibisyonu için kullanılmaktadır (23,24).

2.6.2.1.1. Nisin bakteriyosininin yapısal özellikleri

Nisinin primer yapısı 1971 yılında Gros ve Morrel tarafından yürütülen çalışmalar sonucu aydınlatılmıştır (80). Sonraki yıllarda yapılan kütle ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi çalışmaları ile elde edilen veriler doğrultusunda primer yapının doğruluğu kanıtlanmıştır (64). Nisin, yapısında 34 aminoasit bulunduran katyonik ve hidrofobik özellikler gösteren bir polipeptittir. Moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 3500 Da'dur. Yapısında, doğada ender rastlanan ve posttranslasyonel modifikasyona uğrayan lantiyonin (Lan), metillantiyonin (MeLan), dehidrobütirin (Dhb) ve dehidroalanin (Dha) aminoasitleri bulunmaktadır. Nisin yapısında bulunan lantiyonin köprülerinden dolayı lantibiyotikler grubunda yer almaktadır (64).

Günümüze kadar nisinin birçok varyantı tanımlanmıştır. Bu varyantlar arasında Nisin A, Nisin Z ve Nisin Q ticari açıdan büyük önem taşımaktadır (Şekil 2.3). Nisin varyantları arasında görülen temel farklılık, primer yapıda bazı pozisyonlardaki aminoasit değişimleridir. Nisin A'da aminoasit dizisinin 27. pozisyonunda histidin aminoasiti bulunurken, Nisin Z'de ise 27. pozisyonda asparajin aminoasidi bulunmaktadır. Aminoasitler arasındaki bu farklılık nisin varyantlarının antimikrobiyal etkinliğini değiştirmemekte ancak, çözünürlükleri ve difüzyon yetenekleri gibi özelliklerini değiştirmektedir. Nisin Z, Nisin A'ya göre daha fazla çözünürlüğe ve daha hızlı difüzyon edebilme özelliğine sahiptir ki bu durum nisinin gıda uygulamalarında önem taşımaktadır (64,81). Nisin Q ise en son tanımlanmış olan nisin varyantıdır. Japonya'da bir nehirde izole edilmiş olan *L. lactis* suşundan elde edilmiştir (62).

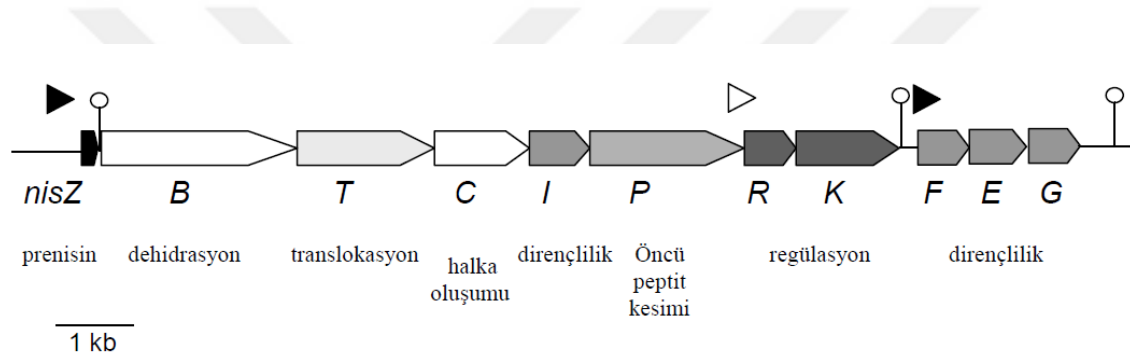


Şekil 2.3. Nisin varyantları (82)

Nisin Q, her ne kadar Nisin A ve Nisin Z ile benzer yapılar gösterse de, NMR bulgularına bakıldığında Nisin Q'nun sentezlendiği gen lokusunun diğer varyantların sentezlendiği lokuslara çok az benzediği saptanmıştır. Nisin Q, Nisin A ve Nisin Z bakteriyosinlerine genetik olarak uzak olsa da, bu üç varyant aynı biyosentez yolağına sahiptirler (62,83). Nisin Q, Nisin A ve Nisin Z bakteriyosinlerinden primer yapı olarak 3 veya 4 aminoasit bakımından farklılık göstermektedir. Bu farklılık, Nisin Q'yu biyokimyasal özellikleri ve antimikrobiyal kapasiteleri bakımından diğer iki nisin varyantından ayırır. Nisin Q oksidasyona diğer iki nisin varyantından daha dayanıklıdır. Nisin bakteriyosinlerinin yapısını bozan en önemli etkenlerden biri de bakteriyosinlerin oksidasyona uğramasıdır. Nisin Q'nun ise oksidasyona karşı gösterdiği kararlılık, primer yapısında katlanma bölgelerinde metionin aminoasidinin bulunmayışından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, gıda işleme süreçleri gibi oksidasyon işleminin fazla olduğu alanlarda Nisin Q'nun kullanımı daha yararlıdır (83).

2.6.2.1.2. Nisin bakteriyosininin sentez mekanizması

Nisin sentezinden sorumlu olan gen kümesinin lokasyonu sabit olmayıp, kromozomda transpozonlar üzerinde ya da plazmidlerde bulunmaktadır. Genetik tamamlama testleri sonucunda transpozonda nisin üretiminden sorumlu olan bölgenin 14 kb büyüklüğünde ve 11 gene sahip bir regülön olduğu saptanmıştır (Şekil 2.4). Bu regülön *nisA/Z/Q* *BTCIPRK* ve *nisFEG* olmak üzere nisin tarafından indüklenebilen iki operon bölge içermektedir (73,84). Regülonda ayrıca *nisRK* bölgeleri önünde sürekli çalışan bir promotor bölge bulunmaktadır. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda ortamda nisin olmasa bile, *nisI* transkriptinin bulunduğu belirlenmiştir. Bu bulgu *nisI* geni önünde yer alan ve sürekli çalışan bir iç promotorun varlığına işaret etmektedir (85).



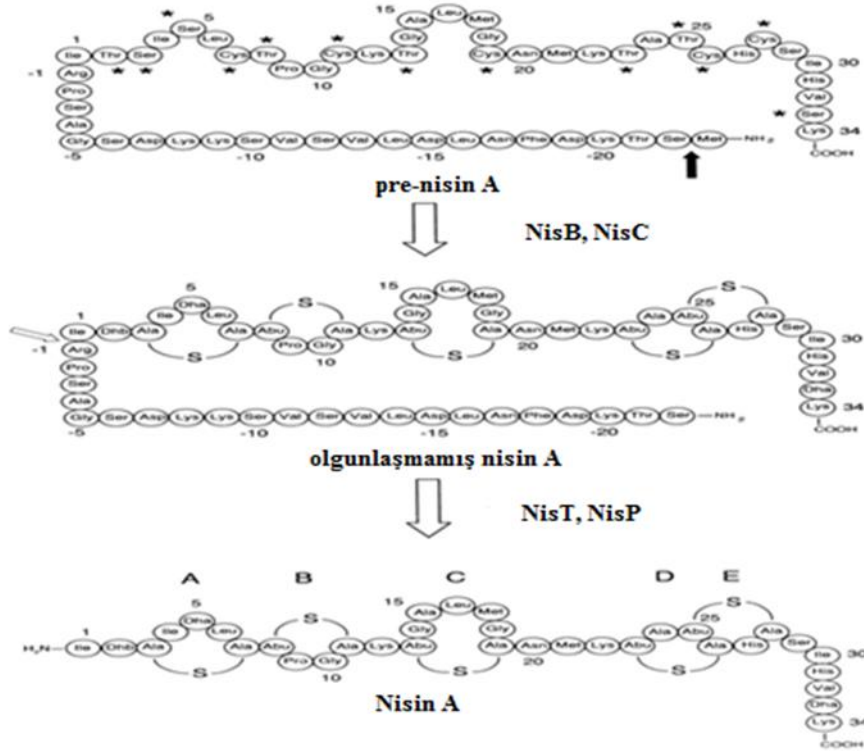
Şekil 2.4. Nisin biyosentezinde yer alan genlerin organizasyonu (73)

Nisin biyosentezinde rol alan genlerden *nisB* geni NisB proteinini sentezleyerek, serin ve treonin aminoasitlerinin dehidrasyonunu sağlamaktadır. Biyosentezden sorumlu diğer gen ise *nisT* genidir. *nisB* geni ise "dur" kodonunu izlemektedir. Yapılan çalışmalarda NisT proteinlerinin bakterilerde bulunan ABC taşıma sistemine benzer bir sistem oluşturdukları belirlenmiştir. Nisin biyosentezinden sorumlu bir diğer gen ise *nisC* genidir. Bu gen tarafından sentezlenen NisC proteini, serbest sistein aminoasitlerinin dehidrasyonunda ve metil-lantiyonin köprülerinin oluşumunda görev almaktadır. Nisin biyosentezinden sorumlu olan son gen *nisP* genidir. Bu gen tarafından sentezlenen NisP proteini, aktif biyolojik nisin oluşumunda rol almaktadır. NisP proteini proteaz aktivitesi göstererek, prenisin lider peptidinin degradasyonunu sağlamaktadır (73).

Birçok Gram-pozitif bakteride olduğu gibi, nisin üretici suşların membranları da nisin peptidine karşı duyarlıdır. Nisin sentezleyen suşların, bu proteine karşı direnç kazanmasında görev alan genler ise nisin operonunda yer alan *nisI*, *nisF*, *nisE* ve *nisG* genleridir. Yapılan çalışmalar

sonucunda *nisFEG* geni tarafından sentezlenen proteinlerin ABC transport kompleksini oluşturdukları belirlenmiştir. Diğer bir gen olan *nisI* geninden NisI proteininin ifadesi sonucu, nisin üreticisi suşun sentezlediği nisine karşı olan dirençliliğinin arttığı belirlenmiştir (65,73).

Aktif nisinin oluşumunda ilk basamak, prepeptit nisinin yapısında bulunan serin ve treonin aminoasitlerinin NisB dehidrataz enzimi ile dehidre edilerek dehidroalanin ve dehidrobütirin oluşturulmasıdır. Dehidrataz enzimi ile modifiye olan bu aminoasitler daha sonra NisC siklaz enzimi ile siklasyon reaksiyonlarına girerek lantiyonin halkaları oluşturulur. Bu reaksiyonlar sonucunda nisin prepeptidi, NisT proteini ile hücre zarındaki ABC taşıyıcı proteinlerinden dışarı çıkarılır. Hücre dışına çıktığında prepeptidin yapısında bulunan lider peptit, NisP proteaz enzimi ile nisinin yapısından ayrılır ve prepeptidin posttranslasyonel modifikasyonu tamamlanmış olur. İnaktif yapıdaki prepeptit artık aktif hale geçmiştir (Şekil 2.5) (86).



Şekil 2.5. Nisinin posttranslasyonel modifikasyonları (86)

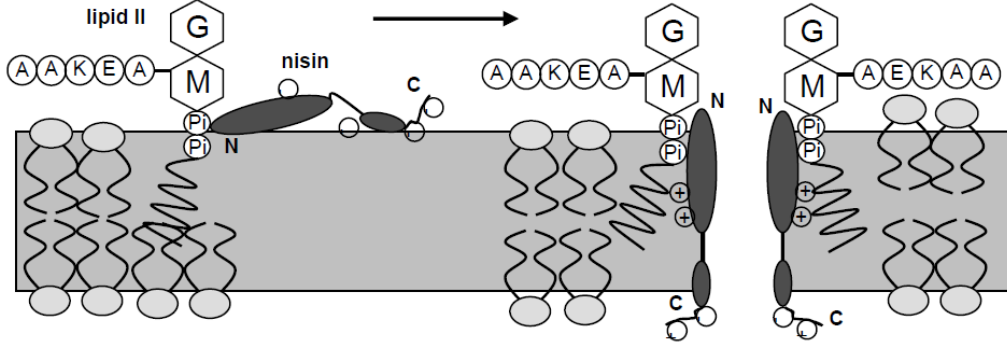
2.6.2.1.3. Nisin bakteriyosininin aktivite mekanizması

Nisin bakteriyosini daha önce de belirtildiği gibi Gram-pozitif bakterilerin inhibisyonunda görev almaktadır. Nisinin etkisini gösterdiği bu bakterilere; *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria* ve *Mycobacterium* örnek

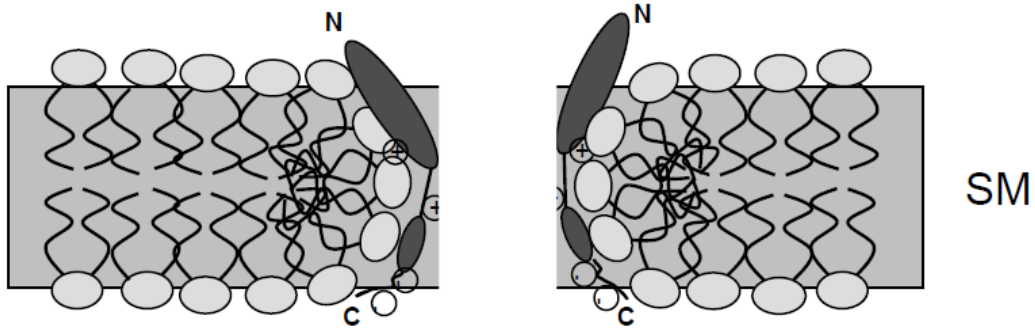
verilebilir. Gram-pozitif spor oluşturan cinslerden ise *Bacillus* ve *Clostridium spp.*'nin inhibisyonunda etkilidir. Bunun yanı sıra bazı Gram-pozitif bakteriler içerdikleri nisinaz enzimi sayesinde nisine karşı direnç gösterirler. Nisinaz enzimi, nisin bakteriyosinini inaktive eden bir enzimdir. Genel olarak nisin, Gram-negatif bakterilere, mantarlara ve virüslere karşı etkili olamamaktadır. Spora ve vejetatif hücrelere olan etkisi ise hala tartışma konusudur (64).

Nisin antimikrobiyal etkisini, hedef hücrenin sitoplazmik membranında por oluşturarak göstermektedir. Gram-pozitif bakterilerin en önemli özelliklerinden biri, hücre zarının ve hücre duvarının yapısında bulunan anyonik özellikteki lipit molekülleridir. Katyonik ve hidrofobik yapıdaki nisin molekülleri, anyonik yapıdaki lipit moleküllerine bağlanarak por oluşumunu başlatırlar. Hücre zarında porun oluşturulmasıyla hücre içerisinde bulunan iyonlar dışarı çıkarak ortamın pH dengesini ve polarizasyonu bozarlar. Hücre, kendisi için ATP sentezleyemeyecek hale gelir ve canlılığını yitirir (64,72).

Nisin, sitoplazmik membran üzerindeki por oluşumunu, mikromolar ve nanomolar konsantrasyonlarda olmak üzere iki şekilde gerçekleştirmektedir. Mikromolar konsantrasyonda nisin molekülü, hücre zarındaki anyonik lipit moleküllerine bağlanarak fosfolipid gruplarının baş kısımlarının oluşturduğu grupların arasına girer. Bu şekilde nisin molekülleri, fosfolipid grupları arasında birikerek zar üzerinde porlar meydana getirirler (72). Ortamda bulunan nisin molekülleri nanomolar miktarlarda ise, direk olarak lipid II molekülüne bağlanırlar. Nisinin, lipid II molekülüne karşı olan ilgisi, hücre zarının yapısında bulunan diğer anyonik özellikteki lipit moleküllerine göre daha fazladır. Nisinin, lipid II molekülüyle olan etkileşimi sonucu hücre zarında meydana getirdiği porlar, hücre zarında reseptör olmadan meydana getirdiği porlardan daha kararlı bir yapıya sahiptir (72). Yapılan çalışmalar nisin molekülünün por oluşturma esnasında her iki ucunun da lipit faz içerisine girdiğini ve membran yüzeyine paralel olarak konumlandığını göstermiştir (Şekil 2.6, Şekil 2.7). Yüksek konsantrasyondaki nisin, lipit dinamiğini bozmakta ve membrandaki anyonik fosfolipitleri eğerek por oluşumuna yol açmaktadır (64,72).



Şekil 2.6. Nisin ve Lipit II molekülünün etkileşimi (87)



Şekil 2.7. Nisinin hücre zarında por oluşturması (87)

2.6.2.1.4. Nisin bakteriyosininin kullanım alanları

Hedef organizmaya bağlı olarak nisin kullanım alanı genel olarak 3'e ayrılmaktadır. Bu alanlar genel olarak laktik asit bakterilerinden kaynaklanan kontaminasyonları engellemek, *Listeria monocytogenes* gibi patojenik Gram-pozitif bakterilerin gelişimini engellemek ve *Clostridium botulinum* gibi spor oluşturan Gram-pozitif bakterilerin inhibisyonunu sağlamaktır. Bu grupların dışında kalan mikroorganizmalar için nisin genellikle tek başına aktif değildir. Farklı bakterisidal ajanlarla kullanımı, nisin antimikrobiyal aktivitesini arttırmaktadır (74,88).

Nisinin fiziksel ve kimyasal özellikleri göz önüne alındığında, nisin çözelti halinde kullanımının daha etkili olduğu görülmüştür. Eğer nisin katı halde kullanılacaksa gıda içerisinde çok iyi çözülmüş olmasına dikkat edilmelidir. Bunun yanında nisin, gıda yüzeylerine spreysel şekilde püskürtülerek de kullanılmaktadır. Nisin kullanılacağı yöntem birkaç basamaktan oluşuyorsa, nisin son basamakta kullanılması aktivitesini daha uzun süre göstermesini sağlar. Nisin kullanım miktarı, koruyucu olarak kullanılacağı maddenin

içeriğine, ortamın pH'sına, uygulanacak olan ısıl işlemlere ve nisinle beraber kullanılacak olan diğer kimyasallara bağlıdır (74,83,86).

Son yıllarda gıda ve sağlık sektöründe nisinin kullanımını giderek artmaktadır. Özellikle gıda alanında kimyasal katkı maddelerinin kullanımının artmasıyla beraber, tüketicilerin kaliteli, besleyici değeri yüksek, vitamince zengin ve az işlenmiş olan gıdalara talebi gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle, tüketicilerin hızla artan bu talepleri karşısında, üreticiler kimyasal işlemlerden ve kimyasal gıda koruyuculardan çok, doğal olanı kullanmaya yönelmişlerdir. Biyokoruma yöntemi adı verilen yöntemle üreticiler, gıdaların bozulması sebebiyle oluşan ekonomik kayıpların azaltılması, üretim maliyetlerinin düşürülmesi, gıda zinciri boyunca mikrobiyal patojenlerin bulaşmasının engellenmesini sağlayan, artan tüketici talepleri doğrultusunda besleyici değeri yüksek ve kaliteli gıdaların üretimi için mikroorganizmalar tarafından üretilen metabolitleri kullanmaya başlamışlardır. Sağlık alanında ise antibiyotiklerin yaygın ve yanlış kullanımı sonucunda, patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere dirençli hale gelmesi, yeni tedavi yöntemleri bulmayı zorunlu kılmıştır. Yeni bir antibiyotığın bulunması hem zor hem de çok pahalı olduğundan, bu alanda çalışan araştırmacılar, dikkatlerini antimikrobiyal özellikteki bakteriyosinler üzerinde toplamışlardır.

2.7. BİYOFİLM İLE MÜCADELEDE YAYGIN OLARAK KULLANILAN ANTİMİKROBİYALLER

2.7.1. KLORHEKZİDİN DİGLUKONAT (CHX)

Klorhekzidin diglukonat (CHX), günümüzde kullanılan dezenfektanlar arasında en çok tercih edilenlerden biridir. Özellikle ağız florasında bulunan ve enfeksiyonel hastalıklara neden olan patojen bakterilerin inhibisyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (89). Gram-pozitif, Gram-negatif patojenler ve mantarlar üzerinde geniş spektrumlu bakterisidal etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalar, CHX'in çok güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu; fakat insanlarda az da olsa toksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Toksik etkisinin az oluşu, CHX'in diğer antimikrobiyaller arasında en çok tercih edilen ajan olmasının en önemli nedenleri arasında yer almaktadır. Bir diğer önemli özelliği ise, antimikrobiyal etkisinin kullanıldığı yüzeyde uzun süre kalmasıdır (90).

CHX amfipatik yapıda bir molekül olup, genellikle bakterilerin hücre yüzeyindeki fosfolipidlerle ve proteinlerle etkileşime girer. CHX'in hücre zarında bulunan bu moleküllerle etkileşime girmesi sonucunda hücrenin zar bütünlüğü ve iyon dengesi bozulur. Yüksek konsantrasyonlarda CHX ise, hücre zarının tamamının yıkımına neden olur. CHX, özellikle vankomisin-dirençli enterokokların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Glikopeptit yapıda bir antibiyotik olan vankomisin, patojen bakterilerin, özellikle enterokokların, peptidoglikan yapımında öncü olarak kullanılan D-alanil-D-alanin rezidüleri ile kompleks yapıda bileşikler oluşturarak peptidoglikan sentezini engellemektedir. Fakat enterokok suşlarının büyük bir kısmı bu duruma karşı direnç geliştirmiştir. Özellikle Van-A ve Van-B tipindeki vankomisine dirençli olan enterokok (VRE) suşları, transpozonlar aracılığı ile vankomisin direnç genlerini kazanmaları sonucunda hücre duvarını sentezlemek için alternatif yollar geliştirmişlerdir (14,91). Suşların kendi bünyelerine aldıkları direnç genleri sayesinde hücre duvarı yapımında kullanılan ve vankomisin antibiyotiğiyle kompleks oluşturan D-alanil-D-alanin rezidüleri yerine, D-alanil-D-laktat rezidüleri kullanılmaya başlanmıştır. Vankomisin ise, D-alanil-D-laktat rezidüsü için oldukça düşük bir affiniteye sahiptir. Bu öncülleri kullanarak çapraz bağlarla oluşturdukları hücre duvarı yapıları, vankomisin antibiyotiğine karşı oldukça dirençlidir (92). Dolayısıyla vankomisin direnç genlerine sahip enterokoklar ile mücadelede bu antibiyotiğin kullanımı sonuç vermemektedir.

Vankomisin-dirençli enterokokların da dâhil olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonların giderilmesi için sağlık kurumları tarafından gerekli önlemler dikkatle alınmaya çalışılmaktadır. Enfeksiyonlarla mücadelede en çok kullanılan yöntemlerden biri de, özellikle enterokokların kolonizasyonu sonucu enfeksiyon kaynağı olarak görülen santral venöz kataterlerin CHX'e batırılarak kullanılmasıdır. Hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların temizliğinde, hastaların da üzerinde bir müddet kalacak şekilde, CHX'den yararlanılmaktadır. Ayrıca hastane giysileri, içine CHX konulmuş suyla yıkandıktan sonra hastalar için kullanılmaktadır. Böylece hastaların cildi üzerinde sürekli olarak CHX bulunmakta ve çeşitli enfeksiyonlara karşı hastayı korumaktadır (92). Yapılan çalışmalar sonrasında, CHX'in insanlar tarafından antiseptik olarak kullanımının çok düşük oranlarda duyarlılığa neden olduğu saptanmıştır. Özellikle yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardaki kullanım konsantrasyonu % 2-4 arasında değişmekte olup, cilt üzerinde neden olduğu herhangi bir irritasyona henüz rastlanmamıştır. Fakat hayvanlarla yapılan deneylerde CHX'in direk olarak nöral dokulara uygulanmasının ardından, hayvanlarda menenjel toksisiteye rastlanmıştır. CHX kuru olarak

kullanıldığında, cilt üzerindeki uygulaması çok daha kolay hale gelmektedir ve aynı zamanda epidural, kranial ve nöroşirurji işlemlerinde de uygulaması pratik ve güvenlidir. Vajinal enfeksiyonlarda ise %0.05-1 konsantrasyonlarında kullanıldığında yan etkilerinin minimum seviyeye indiği gözlenmiştir. Ancak CHX'in uygulamaları esnasında göz ve kulak çevresine ayrıca dikkat edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (90).

CHX'in geniş bir etki spektrumuna sahip olması nedeniyle uzun zamandır yoğun bir şekilde kullanılması, araştırmacıların bu ajana karşı zaman içerisinde mikroorganizmaların direnç kazanma olasılığını göz önünde bulundurmasına yol açmıştır. Bu konuda araştırmalar halen sürdürülmektedir.

2.7.2. SODYUM HİPOKLORİT (NAOCL)

Hipoklorit solüsyonları ilk olarak ağartıcı ajanlar (bleaching agent) olarak hayatımıza girmiştir. İlerleyen zamanlarda ise sodyum hipoklorit, Labarraque tarafından loğusalarda ve ardından diğer enfeksiyon hastalarında tedavi amaçlı olarak kullanılmaya başlanmıştır (93). 19. yüzyılın sonlarına doğru Koch ve Pasteur tarafından yapılan kontrollü deneylerin sonucunda, sodyum hipoklorit o dönemdeki en etkili dezenfektan olarak belirlenmiş ve kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır (94). Birinci Dünya Savaşı sırasında ise kimyager Henry Drysdale Dakin ve cerrah Alexis Carrel, %0.5 konsantrasyonundaki sodyum hipoklorit solüsyonunu açık yaraların tedavisinde ve dezenfeksiyonunda kullanmışlardır (95). Geniş spektrumlu olmasının yanında, sodyum hipokloritin mikroorganizmalar üzerinde spesifik olmayan öldürme özelliğinin olması, aynı zamanda sporosidal ve virüsidal olması ve nekrotik dokuları çözebilmesi en önemli özellikleri arasında yer almaktadır. Sodyum hipokloritin bütün bu özellikleri, özellikle endodonti alanında en çok kullanılan antimikrobiyal olmasını sağlamıştır (93,96).

Sodyum hipokloritin etki mekanizmasını gösteren denklem şu şekildedir;



Bu kimyasal reaksiyon yorumlandığında, sodyum hipokloritin, organik asitlerle ve yağ asitleriyle kimyasal tepkimeye girerek onları yağ asidi tuzlarına (sabun) ve gliserole dönüştürdüğü ve kalan solüsyonun bu şekilde yüzey gerilimini azalttığı anlaşılmaktadır (97). Sodyum hipoklorit solüsyonu, aminoasitleri nötralize ederek su ve tuz oluşturmaktadır. Nötralizasyon esnasında hidroksil iyonları (OH⁻), sodyum hipoklorit bileşiğinden ayrılarak,

salındıkları ortamın pH değerini bazik hale getirirler. Sodyum hipoklorit çözeltisi içinde bulunan bir diğer kimyasal ise hipokloröz asitidir. Hipokloröz asit, organik dokularla tepkimeye girerek ortama klor (Cl^-) iyonunun verilmesini sağlar. Ortamdaki Cl^- iyonları ise, protein moleküllerinin amino grubuyla birleşerek kloramin bileşiklerini oluşturur ve sonuçta hücre metabolizmasını olumsuz yönde etkilerler. Hipokloröz asit (HOCl^-) ve hipoklorit iyonları (OCl^-) aminoasit degradasyonuna ve hidrolize neden olurlar (97). Ortamdaki serbest Cl^- iyonları ise, bakteri enzimlerinin sülfhidril gruplarına (SH^-) tersinir olmayan bir şekilde bağlanarak oksitlenme tepkimesine sokar ve böylece enzimlerin inhibisyonuna neden olur. NaOCl çözeltisi antimikrobiyal etkisini özetle bu şekilde göstermiş olur (97,98).

NaOCl çok güçlü bir bazdır ($\text{pH} \geq 11$). Daha önce de belirtildiği gibi NaOCl 'nin çok etkili bir antimikrobiyal olmasının temel sebeplerinden biri yapısındaki OH^- iyonlarının çözünerek ortamın pH'sını yükseltmesidir (99). NaOCl 'nin ortamın pH'sını yükseltmesiyle, bu bileşiği oluşturan diğer kimyasallar ortama salınır ve bakteri hücrelerinin hücre zarı bütünlüğünü bozar. Bunun yanı sıra lipit peroksidasyonu ile fosfolipit degradasyonuna ve hücre metabolizmasında değişimlere yol açar (99). Ortama verdikleri hidroksil iyonlarıyla veya kloraminasyon reaksiyonuyla, bakterilerin metabolizması için çok büyük önem taşıyan enzimlerin tersinir olmayan şekilde inhibisyonuna neden olarak antimikrobiyal etkilerini gösterirler. Aynı zamanda NaOCl , saponifikasyon reaksiyonuyla yağ asitlerini ve lipitleri, sabun ve gliserole dönüştürerek organik dokuları çözebilmektedir. Endodontide NaOCl 'nin en çok bu özelliğinden yararlanılmaktadır (93).

NaOCl 'nin antimikrobiyal etkisini ölçmek amacıyla günümüze kadar birçok *in vitro* çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların en önemlilerinden biri, Walker vd., (1936) tarafından çift mukavemetli klorlu soda (%5 NaOCl) ile endodonti alanında yapılan çalışmadır (100). Bu çalışmadan sonra yürütülen çalışmalarda ise endodonti alanında kök kanalları dezenfeksiyonu için kullanılacak daha etkili bir dezenfektan bulunamamıştır. Benzer bir çalışma, Siquera vd., (2011) tarafından yine endodonti alanında yapılmış ve %4 konsantrasyona sahip NaOCl ajanının, kök kanalında enfeksiyon oluşturan *E. faecalis* suşunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (101). Gomes vd., (2001) NaOCl ile yaptıkları çalışmalarda, NaOCl 'nin dezenfektan olarak en iyi şekilde etkisini gösterebildiği 5 farklı konsantrasyon oranını (%0.5, %1, %2.5, %4 ve %5) hesaplamışlar ve bu aralıklarda özellikle *E. faecalis* suşunu ortamdaki eradike ettiğini bildirmişlerdir (102). NaOCl 'nin dezenfektan olarak çok fazla kullanım alanına sahip olmasına

rağmen, yapılan çalışmalar bu ajanın bir takım dezavantajlara sahip olduğunu göstermiştir. NaOCl'nin en çok rastlanan dezavantajlarından biri, metal korozyonuna neden olmasıdır. Özellikle tıbbi cihazların temizliğinde yaygın olarak kullanılan NaOCl, çok yoğun kullanıldığı takdirde özellikle metal yüzeylerin çatlamasına, oksitlenmesine ve metal yüzey geriliminin düşmesine neden olmaktadır (103). Bu nedenle NaOCl'nin kullanım aralığına her zaman dikkat edilmelidir.

2.7.3. ETİLENDİAMİN TETRA ASETİK ASİT (EDTA)

Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) çok iyi bilinen bir metal şelatlama ajanıdır. EDTA genel olarak diş ve diş eti hastalarında görülen enfeksiyonların tedavisinde, tıbbi cihazların temizliğinde, veterinerlik alanında, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların cerrahi yaralarının temizlenmesinde ve ağır metal iyonlarıyla zehirlenme vakası görülen hastaların tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu bir dezenfektandır. Özellikle yaraların tedavisi esnasında kullanıldığında, metalloproteinaz enzimlerini inhibe ederek doku onarımına yardımcı olmaktadır (104). Yapılan çalışmalar sonucunda, EDTA'nın özellikle katater ve benzeri yüzeylerde oluşan biyofilmlerin eradikasyonunda farklı ajanlarla (çeşitli antibiyotikler, sitrik asit, polihekzametil bisguanid ve gümüş gibi) beraber kullanıldığında daha yüksek düzeyde aktivite gösterdiği saptanmıştır (105).

EDTA'nın en önemli özelliklerinden birisi de, biyofilmin yapısında bulunan çeşitli iyonların (magnezyum, bakır, çinko, demir vb) dengesini bozarak ve bakterinin hücre duvarını şelatlayarak, aynı anda hem biyofilmin ortamdaki eradikasyonuna, hem de patojen bakterilerin ölümüne neden olmasıdır (105).

Patojen mikroorganizmalar cerrahi yaraların üzerini kontamine ederek, biyofilm yapısı oluştururlar. Oluşturdukları biyofilmin etrafını ise EPS ile kapatarak, biyofilmin kalıcılığını sağlamaktadırlar. EPS, biyofilmi antimikrobiyalere karşı korumakta ve biyofilmin hem çeşitli ajanlara hem de zorlu çevresel koşullara karşı direncini arttırmaktadır. Bu nedenle genel olarak, biyofilmlerin eradikasyonu için antimikrobiyaller tek başlarına kullanıldığında yeterince etki edememektedir. Bu durumun en önemli nedenlerinden biri de, daha önce de belirtildiği gibi, piyasada var olan ve yaygın bir şekilde kullanılan dezenfektanların biyofilmlerin eradikasyonu için değil, daha çok mikroorganizmaların planktonik formlarını ortadan kaldırmaya yönelik olarak tasarlanmasından kaynaklanmaktadır. EDTA ise, çok uzun yıllardan beri EPS

ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. EPS ekstraksiyonunun en önemli amacı, EPS'yi oluşturan kimyasal bileşenleri açığa çıkartmaktır. EDTA ise, EPS'nin katyon konsantrasyonunu değiştirerek, EPS'nin suda çözünürlüğünü arttırmakta ve beraberinde birçok antimikrobiyal ajanın biyofilmin içine nüfus etmesini sağlamaktadır (105,106). EDTA'nın diğer dezenfektanlarla, antibiyotiklerle ve enzimlerle ikili kombinasyonlar halinde kullanılması sonucunda hem biyofilmlerin eradikasyonunda hem de yeni biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (107).



3. GEREKÇE VE AMAÇ

Biyofilm yapıları, mikrobiyal üremenin predominant formudur. Başta bakteriler olmak üzere birçok mikroorganizma türü, çevresel stres koşullarına yanıt olarak biyofilm yapısı oluşturmaktadır. Tek ya da çok sayıda bakteri türünden oluşabilen biyofilm yapıları, klasik sanitasyon, dezenfeksiyon ve sterilizasyon ajanları ve yöntemlerine karşı, bu türlerin planktonik formlarından çok daha yüksek düzeyde direnç göstermektedir. Biyofilm yapılarının bu özellikleri, onları klinik ve endüstriyel kontaminasyonların ana kaynağı haline getirmiştir. Gerek mikrobiyal enfeksiyon ve kontaminasyonlarla mücadelede kullanılan klasik ajanların, biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesinde ve eradikasyonunda yetersiz kalması ve gerekse bu ajanların uygulanan materyal yanında insan sağlığına ve çevreye karşı da olumsuz etkiler içermesi, biyofilm yapıları ile mücadelede yeşil biyoteknolojik ajanların ve yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir.

Bilimsel ve teknolojik gereksinimler doğrultusunda tasarladığımız çalışmamızda temel amaç; tüm dünyada klinik ve endüstriyel anlamda ciddi bir sorun haline gelen *E. faecalis* biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesi ve var olan biyofilmlerin eradikasyonunda yeni ve etkin bir yeşil biyoteknolojik ajanın tanımlanması ve uygulama yönteminin geliştirilmesidir. Bu amaçla öncelikle; peynir starter kültürlerinin temel bileşeni olan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin bakteriyosininin saf formunun ve araştırma grubumuz tarafından izole edilerek tanımlanan nisin üreticisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun nisin üretimi ve etkinliği bakımından optimize edilmiş bir mutantının (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LAC339, Şimşek vd., 2009) *E. faecalis* biyofilminin oluşumu ve eradikasyonu üzerine etkinliği ve bu etkinliğin biyolojik esasını tanımlamaktır. Nisin, Gram-pozitif bakteriyel kontaminasyonlarla mücadelede kullanılan, insan ve çevre üzerinde yan etki içermeyen GRAS (Generally Recognized As Safe) bir bakteriyosin olarak tanımlanmıştır. Ancak nisin *E. faecalis* biyofilm yapıları üzerinde etkinliğinin araştırıldığı bir çalışma ise henüz yoktur. *E. faecalis*'in planktonik formlarına karşı nisin yüksek düzeyde etkinlik gösterdiği ise yine çalışma grubumuz tarafından belirlenmiştir (9). Bu verilerden hareketle, *E. faecalis* biyofilmlerine karşı mücadelede etkinliği araştırılacak ajanlar arasında "nisin" ilk sırada yer almıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise nisinin klinik ve endüstriyel amaçlarla kullanılan ticari dezenfektanlarla değişik oranlarda kombinasyonunun etkinliği araştırılmıştır. Burada hedef, nisinin çeşitli dezenfektanlar ile kombine edilmesi sonucu, biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesi ve eradikasyonunda uygulanacak etkin dezenfektan konsantrasyonunun düşürülmesi suretiyle, söz konusu dezenfektanların insan sağlığı ve çevre üzerindeki olumsuz etkilerinin en aza indirilmesidir.

Gerek saf nisin ve gerekse nisin üretici suş ile *E. faecalis* biyofilm yapılarının engellenmesi ve eradikasyonunda etkin ve uygulanabilir bir konsantrasyon ve yöntemin tespiti, çalışma sonuçlarının sadece ülkemiz genelinde değil evrensel ölçekte uygulama alanı bulması anlamına gelmektedir. Çalışmada kullanılacak nisin üreticisi suşun Türkiye kaynaklı olması ve sadece araştırma grubumuzda bulunması da ileride bu çalışmamızdan yola çıkılarak üretilecek bir mücadele ajanının patentlenmesi olanağını doğuracaktır. Çalışmanın ikinci aşaması olarak tasarlanan nisinin ticari dezenfektanlar ile birlikte kullanım olanaklarının araştırılması çalışmalarının başarılı sonuçlar vermesi, nisinin tek başına uygulamalarının mümkün olmadığı koşullarda kullanılan dezenfektanın etkinliğini arttıracak ve birlikte kullanıldığı dezenfektanın, söz konusu dezenfektanın tek başına kullanılması durumundaki konsantrasyona kıyasla, daha düşük miktarlarda kullanımına olanak tanıyacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BAKTERİLER VE GELİŞME KOŞULLARI

Tez çalışmasında kullanılan 4 adet *E. faecalis* suşu (gıda kökenli *E. faecalis* 73 ve 74 kodlu suşlar ve klinik kökenli *E. faecalis* 79 ve 114 kodlu suşlar) ve 2 adet kontrol suşu (*E. faecalis* ATCC OG1RF ve *E. faecalis* ATCC 29212), nisin üreticisi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun nisin üretimi ve etkinliği bakımından optimize edilmiş bir mutanıtı (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LAC339, Şimşek vd., 2009) (Tablo 4.1 ve 4.2) Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı bünyesinde oluşturulan kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Stok kültürler, -80°C'de %15 gliserol ilave edilen Tryptic Soy Broth (TSB) sıvı besin ortamında saklanmaktadır. Çalışma süresince kullanılan kültürler, stok solüsyonlarından alınarak 1/10 oranında TSB sıvı besin ortamına inoküle edilmiş ve 37°C'de 1 gece geliştirildikten sonra denemeye alınmıştır.

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan *Enterococcus faecalis* suşları

Suşun Cinsi	Suşun Kodu
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212
<i>E. faecalis</i>	ATCC OG1RF
<i>E. faecalis</i>	73
<i>E. faecalis</i>	74
<i>E. faecalis</i>	79
<i>E. faecalis</i>	114

Tablo 4.2. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* suşları

Suşun Cinsi	Suşun Kodu
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LL27
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LAC339
<i>Micrococcus luteus</i>	İndikatör suş

4.1.2. BESİYERLERİ

Tablo 4.3. Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Germany)

İçerik	g/L
Pepton (Kazein'den)	17 g
Pepton (Soya'dan)	3 g
di-Potasyum Hidrojen Fosfat	2.5 g
D(+)-Glikoz	2.5 mL
NaCl	5 g

Besiyeri içerikleri 800 mL dH₂O içerisinde çözüldükten sonra besiyeri hacmi yine dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Ortam pH'sı 7.3 ± 0.02 'ye ayarlandıktan sonra sıvı besiyeri cam tüplere dağıtılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilizasyonun ardından çalışmalarda kullanılmıştır.

Tablo 4.4. Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck, Germany)

İçerik	g/L
Tripton (Fluka, France)	10 g
Maya ekstratı (Merck, Germany)	5 g
Sodyum klorür (Merck, Germany)	10 g
Agar (Merck, Germany)	15 g

Besiyeri içerikleri 800 mL steril dH₂O içerisinde çözüldükten sonra besiyeri hacmi yine dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Ortam pH'sı 7.0 ± 0.2 'ye ayarlandıktan sonra sıvı besiyeri

cam tüplere dağıtılmış ve otoklavda 121 °C’de 15 dk sterilizasyonun ardından çalışmalarda kullanılmıştır. Katı besiyerleri için, bu ortama 15 g agar ilave edildikten sonra, otoklavda 121 °C’de 15 dk sterilizasyonun ardından besiyeri su banyosunda 50 °C’ye kadar soğutulup, steril petrilere dökülmüştür.

Tablo 4.5. M17 Broth (Merck, US)

İçerik	g/L
Polipepton	5 g
Fitopepton	5 g
Maya ekstraktı	2.5 g
Et ekstraktı	5 g
B-disodyum gliserofosfat	19 g
Laktoz (%10)	50 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 mL
Askorbik asit	0.5 g

Besiyeri içerikleri 950 mL steril dH₂O içerisinde çözüldükten sonra, ortam pH’sı 7.2 ± 0.2 ’ye ayarlanarak, otoklavda 121 °C’de 15 dk sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından, besiyeri su banyosunda 45 °C’ye soğutulduktan sonra, ayrı sterilize edilen laktoz çözeltisi (50 mL) ilave edilerek hazırlanan besiyeri çalışmalarda kullanılmıştır.

Tablo 4.6. Müller-Hinton Broth (Oxoid, UK)

İçerik	g/L
Et ekstraktı	30 g
Kazein hidrolizat	17.5 g
Nişasta	1.5 g

Besiyeri içerikleri 800 mL dH₂O içerisinde çözüldükten sonra besiyeri hacmi yine dH₂O ile 1000 mL’ye tamamlanmıştır. Ortam pH’sı 7.3 ± 0.1 ’ye ayarlandıktan sonra sıvı besiyeri cam

tüplere dağıtılmış ve otoklavda 121 °C’de 15 dk sterilizasyonun ardından çalışmalarda kullanılmıştır.

4.1.3. DEZENFEKTANLAR VE ÇÖZELTİLER

4.1.3.1. Dezenfektanlar

Ticari Nisin (Nisaplin®)

Ticari nisin (Nisaplin®, SIGMA-ALDRICH), %2.5 oranında nisin bakteriyosini içermektedir. Toz halindeki bu bakteriyosin, 0.02 N HCl çözeltisi içerisinde çözüldükten sonra, 0.45µm por çapındaki filtreden geçirilip, önceden steril edilmiş olan mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Çalışmada kullanılan nisin çözeltisi, her suşun MİK değeri esas alınarak, denemelerden önce taze hazırlanmıştır.

Klorhekzidin diglukonat (CHX)

Çalışmada kullanılan CHX (SIGMA-ALDRICH) konsantrasyonları oldukça düşük olduğu için, öncelikle %20 konsantrasyona sahip olan stok CHX çözeltileri oluşturulmuş, ardından çalışmada kullanılacak olan konsantrasyonlar, stok solüsyonun su ile dilüe edilmesi yoluyla hazırlanmıştır.

Sodyum hipoklorit (NaOCl)

Çalışmada kullanılan NaOCl’nin (SIGMA-ALDRICH) çalışmada kullanılacak dozlarının hazırlanması amacıyla, %10’luk NaOCl çözeltisi su ile seyreltilerek %5’lik NaOCl stok çözelti hazırlanmış, ardından çalışmada kullanılacak olan konsantrasyonlar, %5’lik stok solüsyonun su ile dilüsyonu yoluyla elde edilmiştir.

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)

0.01M EDTA çözeltisi hazırlamak için; öncelikle 0,1g MgSO₄.7H₂O tuzu tartılmış ve 100 mL steril su ile çözelti haline getirilmiştir. NaOH tampon çözeltisiyle EDTA’nın tam olarak çözünmesi sağlandıktan sonra 121 °C’de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilen çözelti denemelerde kullanılmıştır.

Tablo 4.7. Fosfatla Tamponlanmış Tuz (PBS)

İçerik	g/L
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

İçerikler 800 mL steril dH₂O içerisinde çözüldükten sonra, çözeltinin hacmi yine dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti, otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilizasyonun ardından çalışmalarda kullanılmıştır.

Tablo 4.8. Alkol / Aseton Çözeltisi

İçerik	L
Saf etanol	80 mL
Aseton	20 mL

Tablo 4.9. Evrensel Nötralizan

İçerik	g/L
L-Histidin	1 g
L-Sistein	1 g
İndirgenmiş glutatyon	2 g
ddH ₂ O	20 mL

Hazırlanan çözelti, otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilizasyonun ardından çalışmalarda kullanılmıştır.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. *ENTEROCOCCUS* SUŞLARININ BİYOFİLM ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İzolatların biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılmasında Extremina vd., (2010) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (108). Trypticase Soy Broth (TSB) sıvı ortamında 37°C’de 18 saat geliştirilen enterokok izolatları, yine TSB ortamı kullanılarak 1:10 oranında seyreltikten sonra 12 kuyulu polistiren mikrodilüsyon plaklarına inoküle edilmiş ve farklı inkübasyon sürelerindeki biyofilm üretim düzeylerinin belirlenmesi amacı ile 37 °C’de 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde tutunmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile kuyular 3’er defa fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmış ve oluşan biyofilm tabakası 1 saat boyunca 60 °C’de kurumaya bırakılmıştır. Ardından oluşan biyofilmler 210 µl %95’lik metanolde 20 dk boyunca bekletilmiştir. Sürenin bitimiyle metanol kuyulardan uzaklaştırılarak, 210 µl %1’lik kristal viyole kuyulara eklenmiş ve boya 20 dk boyunca ateş başında kurutularak plaklardaki biyofilm yapısının boyanması sağlanmıştır. Ardından kuyulara 200 µl alkol ± aseton çözeltisi (%80 etanol + %20 aseton) ilave edilerek 30 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş ve biyofilm yapısı içerisinde tutulan boyanın çözünmesi sağlanmıştır. Son olarak oluşan biyofilm yapısının yoğunluğu spektrofotometre yardımı ile 595 nm dalga boyunda Elisa Reader (Perkin Elmer, US) cihazı ile ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda bakteri kültürleri için elde edilen OD değerlerine göre biyofilm üretim özellikleri tanımlanmıştır. $OD_{595} < 0.120$ biyofilm üretmeyen, $0.120 < OD_{595} < 0.240$ zayıf biyofilm üreticisi, $OD_{595} > 0.240$ ise güçlü biyofilm üreticisi bakteri örnekleri olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm denemeleri 3 paralel 2 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. *L. LACTIS* LL27 VE *L. LACTIS* LAC339 SUŞLARININ BAKTERİYOSİN ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN KUYU DİFÜZYON YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Denemelerde kullanılan nisin üreticisi olan *L. lactis* LL27 suşu %1 fruktoz (w/v) içeren M17 besiyerinde, 30 °C’de, anaerob koşullarda geliştirilirken, *L.lactis* LL27 suşunun nisin üretimi ve etkinliği bakımından optimize edilmiş mutanti olan *L.lactis* LAC339 suşu taşıdığı plazmidin antibiyotik direnci içermesi nedeni ile 5 µg/mL eritromisin ve %1 fruktoz (w/v) içeren M17 besiyeri içerisinde, 30 °C’de anaerob koşullarda geliştirilmiştir. İndikatör suş olan *Micrococcus luteus* ise LB broth ortamında 30 °C’de 18 saat geliştirilmiştir.

Antimikrobiyal aktiviteye sahip suşların bakteriyosin üretim özelliğinin kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmesi için; 37 °C’de 18 saat geliştirilen kültürler, 6000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Üretilen bakteriyosin, hücre dışına salınacağı için santrifüj sonrasında üst sıvı steril tüplere aktarılmış ve ortam pH’sı 6N NaOH ile pH 6.5-7’ye ayarlanarak nötralize edilmiştir. Bu aşamada asitlikten kaynaklanacak inhibisyon nedeni ile oluşabilecek hataların önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Nötralize edilen üst sıvı daha sonra 0.45 µm por çaplı membran filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. LB broth ortamında geliştirilen indikatör bakteri, %0.7 oranında agar içeren 5mL yumuşak agar (LB) ortamına inoküle edilmiş ve GM17 agar plaklarının üzerine ikinci bir tabaka halinde homojen şekilde yayılmıştır. Ortamın katılaşmasının ardından agar üzerinde 6 mm çapında kuyucuklar açılmış ve bakteri üst sıvıları açılan kuyucuklara 100 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Kontrol kuyusuna ise 100 µl steril PBS ilave edilmiştir. İndikatör suşun gelişme koşulu olan 30 °C’de inkübasyonun ardından, kuyuların etrafında oluşan berrak zonlar ölçülerek inhibisyon etkinlikleri değerlendirilmiştir (109).

4.2.3. MİNİMUM İNHİBİSYON KONSANTRASYONU (MİK) VE MİNİMUM BAKTERİSİDAL KONSANTRASYONUNUN (MBC) BELİRLENMESİ

Bu denemelerde nisin ve dezenfektanların [Klorheksidin diglukonat (CHX), Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ve Sodyum hipoklorit (NaOCl)], test bakterilerine karşı etkisi, MİK ve MBC düzeyleri Tong vd. (2014) esas alınarak belirlenmiştir (110). Bu amaçla test bakterilerinin planktonik formları kullanılmıştır. Kullanılan dezenfektanlar ve nisin, bir sonraki kuyuda 2 kat oranında azalacak şekilde ayarlanmış ve kuyulara eklenmiştir. Ardından 18 saatlik *E. faecalis* kültürleri yaklaşık 10^8 cfu/mL (OD_{625} , 0.08-0.13) olacak şekilde TSB besi ortamında dilüe edilerek çalışmalar için standart bir değere getirilmiştir. TSB besi ortamında hazırlanan bakteri solüsyonları 1:10 oranında dilüe edildikten sonra, 96 kuyucuklu mikrotitre plaklarına inoküle edilmiş ve 37 °C’de 18 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda ise, kullanılan dezenfektanların, bakteri kültürlerinin üremesini engellediği en düşük konsantrasyon MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri olarak kaydedilmiştir.

Kullanılan dezenfektanların ve nisin bakteriyosinlerinin MİK değerlerinin hesaplanmasının ardından, minimum bakterisidal konsantrasyonlarının (MBC) hesaplanması aşamasına geçilmiştir. Belirlenen MİK değerleri, bakteri gelişimini engelleyen en düşük antimikrobiyal

ajan konsantrasyonlarını ifade ederken, MBC değerleri ise, incelenen bakterinin %99,9'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonu (mg/L veya µg/mL) olarak tanımlanmaktadır. MBC değerlerinin hesaplanmasında, MİK değerleri belirlenirken kullanılan 96 kuyucuklu mikrotitre plaklarından 100'er µL alınmış ve 900 µL steril PBS üzerine ilave edilerek seri dilüsyonları gerçekleştirilmiştir. Dilüe edilen bakteri süspansiyonlarından 10'ar µL alınıp Müller-Hinton Agar (MHA) plaklarına damlatılmış ve 37 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 4.1). 24 saatlik inkübasyonun bitiminde MHA plaklarından canlı hücre sayımı yapılmak suretiyle MBC'ler belirlenmiştir. MBC değerlerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır;

Logaritmik ölüm:

$$\text{Log-ölüm} = [\log]_{10}(\text{başlangıç cfu/mL}) - [\log]_{10}(\text{kalan cfu/mL})$$

Yüzde ölüm:

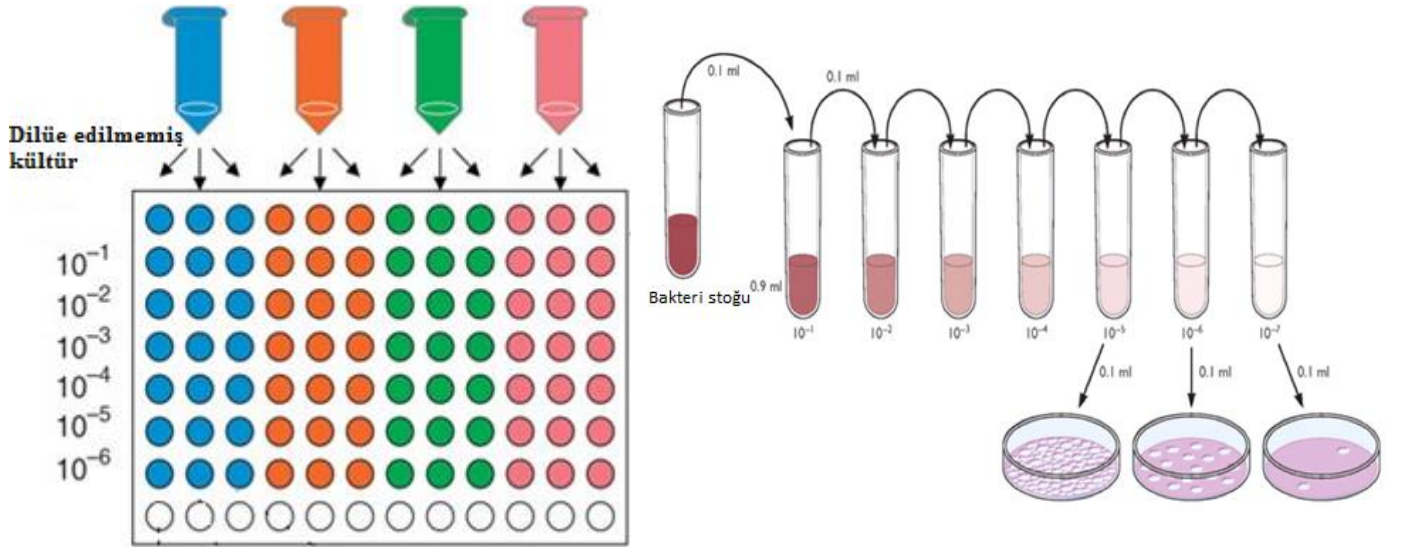
$$\% \text{ ölüm} = [1 - (\text{kalan cfu/mL}) / (\text{başlangıç cfu/mL})] \times 100$$

Canlı hücre yüzdesi:

$$\% \text{ Canlı hücre} = [(\text{dezenfektan sonrası kalan cfu/mL}) / (\text{başlangıç cfu/mL})] \times 100$$

Logaritmik yüzde canlı hücre :

$$\text{Log } \% \text{ canlı hücre} = [\log]_{10} (\% \text{ canlı hücre})$$



Şekil 4.1. MBC hesaplanmasında kullanılan mikrodilüsyon yöntemi (111)

4.2.4. ZAMAN – ÖLÜM (TIME-KILL) DENEMESİ

Çalışmada kullanılan dezenfektanların etki sürelerinin belirlenmesinde Tong vd. (2014) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (110). Bu yöntemin MİK ve MBC denemelerinden temel farkı denenen antimikrobiyal maddelerin etkisinin ne kadar sürede gerçekleşeceğini tespitine olanak tanınmasıdır. Bir diğer fark ise kullanılan dezenfektanın etkisinin bakterisidal ya da bakteriyostatik karakterinin tanımlanmasını sağlamasıdır. Bu amaçla ilk olarak 18 saatlik aktif *E. faecalis* kültürleri yaklaşık 10^7 cfu/mL olacak şekilde TSB besi ortamında dilüe edilmiştir. Ardından Nisin MİK değeri, CHX MİK değeri, EDTA MİK değeri, NaOCl MİK değeri içeren TSB besiyerlerine inoküle edilmiş ve oda sıcaklığında 6, 12 ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 6. saatinde, her tüpten 100 µl alınarak, 900 µl PBS içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Devam edilen seri dilüsyonlarla 10^{-6} düzeyine ulaşılmıştır. Hazırlanan her dilüsyon tüpünden (10^{-1} - 10^{-6}) 10^7 ar µl alınarak MHA ortamlarına damla ekimler yapılmış ve 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonunda koloni sayımı yapılarak mikroorganizmaların canlılık düzeyleri, dolayısı ile dezenfektanların hücreler üzerine olan etkisi belirlenmiştir. 18 ve 24 saat inkübasyondan sonra da, 6 saat inkübasyonun ardından olduğu gibi, dilüsyonları yapılmış olan her örnekten 10^7 ar µl alınarak MHA ortamına damla ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyonun ardından koloni sayımı yapılarak, mikroorganizmaların canlılık düzeyleri belirlenmiştir. Her grup için denemeler farklı günlerde gerçekleştirilmiş ve 3 tekrardan oluşmuştur.

4.2.5. ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN MİNİMAL BİYOFİLM ERADİKASYON KONSANTRASYONLARININ (MBEC) BELİRLENMESİ

Antimikrobiyal maddelerin *E. faecalis*'in olgun biyofilm yapılarının eradikasyonu üzerindeki etkisi, daha hassas inceleme olanağı sağlayan MBEC (Minimal Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu) yöntemi ile belirlenmiştir. MBEC değerlerinin belirlenmesinde Extremina vd. (2011) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (108). Test bakterilerinin 18 saatlik aktif kültürlerinin optik yoğunluğu OD_{570} 'te 0.07 düzeyine ayarlanmış ve mikrotitre plaklarındaki her kuyucuğa 200 µl bakteri süspansiyonu aktarılmıştır. Mikrotitre plaklarında biyofilmin oluşması için plaklar, yatay düzlemde çalkalamak suretiyle 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra biyofilm oluşumuna katılmayan ya da gevşek tutunan hücreleri ortamdaki uzaklaştırmak amacı ile kuyular 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkama

aşamasından sonra biyofilm oluşturulan mikrotitre plakları içerisine aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda antimikrobiyal maddeler eklenerek, plaklar oda sıcaklığında 12, 18 ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde kuyular tekrar 3 defa PBS çözeltisi ile yıkanmış ve evrensel nötralizasyon çözeltisi ile 15 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kuyular, evrensel nötralizan ile muamele edildikten sonra tekrar PBS ile 3 defa yıkanmış ve biyofilm yapısı 60 °C’de 1 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucuklarda kalan biyofilm yapılarının fikse edilmesi amacı ile kuyulara 200 µl %95’lik metanol ilave edilerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra kuyulara, biyofilm yapısının boyanması için 200 µl kristal viyole eklenmiş ve plaklar oda sıcaklığında 20 dakika boyunca bekletilmiştir. Boyama basamağını takiben, boyanın kuyulardan uzaklaştırılması için, kuyular dH₂O ile yıkanmıştır. Son olarak ise plaklarda kalan biyofilm yapılarının içinde tutulan boya, kuyulara 200 µl etanol/aseton (% 80 / % 20, v/v) ilave edilerek çözülmüştür. Kalan biyofilm miktarını belirlemek amacı ile çözünen boya Elisa Reader (Perkin Elmer, US) cihazında 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

MBEC çalışmamızda denenen antimikrobiyallerin son konsantrasyonları;

Nisin: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 ve 100 IU/mL

CHX: 2.5, 1.25, 1, 0.8, 0.6 ve 0.4 mg/L

*EDTA: 320, 160, 80, 40, 20 ve 10 mM

NaOCl: %2, 1, 0.5, 0.25, 0.05 (v/v) olarak belirlenmiştir.

(*): MBEC denemelerinde EDTA ajanının konsantrasyonunu ayarlarken daha önce yapmış olduğumuz MİK ve MBC çalışmalarımızdan elde ettiğimiz değerler temel alınmış ve kullanacağımız konsantrasyonlar mM olarak hesaplanmıştır.

4.2.6. SİNERJETİK ETKİ (CHECKERBOARD) DENEMESİ

Nisin ve diğer antimikrobiyal ajanlar arasındaki sinerjetik etkinin belirlenmesi için gerçekleştirilen bu denemede Odds, (2003) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (112). Çalışmada 96 kuyulu mikrodilüsyon plağının y ekseninde nisin, her bir suşun MİK değeri dikkate alınarak, MİK değerinin 2 kat üstü ve 4 kat altı olacak şekilde dilüe edilmiştir. X ekseninde ise denenecek diğer antimikrobiyal ajanların dilüsyonları gerçekleştirilmiştir. Bu

yöntemle, nisin ve diğer antimikrobiyal ajanların fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon indeksi (FIC) tanımlanmıştır. FIC indeksinin hesaplanmasında aşağıda verilen formül kullanılmıştır.

FIC index= FIC A + FIC B = (Kombinasyondaki A antimikrobiyal ajanının MİK değeri/A antimikrobiyal ajanının tek başına MİK değeri) + (Kombinasyondaki B antimikrobiyal ajanının MİK değeri/ B antimikrobiyal ajanının tek başına MİK değeri)

Sinerjisizm; FIC indeks ≤ 0.5 ise,

Pozitif katkı etkisi; FIC indeks 0.5-4.0

Antagonizm; FIC indeks ≥ 4.0 olarak belirlenmiştir.

Denemeler farklı günlerde 3 tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.7. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU GÖRÜNTÜLEMESİ İLE NİSİN VE DEZENFEKTANLARIN BİYOFİLM YAPILARINA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Antimikrobiyal ajanların tek tek ve nisin ile birlikte oluşturulan kombinasyonlarının (Grup A) *E. faecalis* biyofilm yapıları üzerine etkisi, örneklerin SEM incelemeleri sonucunda görüntülenmiştir. Bu amaçla ilk olarak *E. faecalis* ATCC OG1RF suşu'nun TSB besi ortamında 37 °C'de 24 saat boyunca cam üzerinde biyofilm oluşturması sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan cam slaytlar lamelin elmas kesici ile SEM'in kurutma aparatına sığacak şekilde 1 x 1.3 mm boyutlarında kesilmesi ile elde edilmiştir. Cam slaytlar biyofilm denemelerinde kullanılmadan önce 1 gece boyunca aseton içerisinde bekletilmiştir. Aseton içerisinde gece boyunca bekletilen camlar ardından 30 dk boyunca deterjanlı suya daldırılarak yıkanmıştır. Bu işlemi takiben cam yüzeyler distile su ile iyice yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Son olarak cam yüzeyler otoklavda 121 °C'de 15 dk boyunca sterilize edilmiştir. Besiyeri olarak bu çalışmamızda da yine TSB kullanılmıştır. Mikroplaklar içerisine 200 µl besiyeri eklenerek cam yüzeyler kuyucukların içerisine bırakılmıştır. Mikroplaklar daha sonra 37 °C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra biyofilm oluşumuna katılmayan ya da gevşek tutunan hücreleri ortamdaki uzaklaştırmak amacı ile cam yüzey 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra, üzerinde biyofilm olan yüzeye, aşağıda belirtilen konsantrasyonlarda antimikrobiyal maddeler eklenerek oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde cam yüzey tekrar 3 kez PBS ile

yıkanmış ve ardından evrensel nötralizan çözeltisi ile 15 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Evrensel nötralizan ile muamele edildikten sonra, yüzey tekrar PBS ile 3 kez daha yıkanmıştır. Ardından fiksasyon işlemi için, cam yüzey 1 gece boyunca oda sıcaklığında %2.5 glutaraldehit çözeltisinde inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra 3 kez PBS ile yıkama basamağı tekrar edilmiş ve yüzey, dehidrasyon basamağı için aşamalı olarak, düşük derişimden yüksek derişime doğru etanol içerisinde (%25-%35-%50-%70-%90 ve %100 v/v) bekletilmiştir. Dehidrasyon işleminden sonra örnekler kurutma basamağına alınmıştır. Ortamın sıcaklığına ve materyalin büyüklüğüne göre kurutma süresi değişmektedir. Biyofilmlerde yüzey değişimleri önemli olduğu için, örneklerde kritik nokta kurutması uygulanmıştır. Bu yöntemde kullanılan cihaz (Emitech, K850X) biyofilm üzerindeki etanol ile sıvı CO₂'nin yerinin değişmesini sağlamaktadır. Cihazda bulunan vana açıldığında, sıvı CO₂ kritik noktada, belirli basınçta ve sıcaklıkta (35 °C ve 1100 bar) gaz haline geçerken, örnek de deforme olmadan kurumuş olur. Örneğin hava ile teması sıfır olmalıdır. Böylece örnek yüzeyi daha az bozulur. Yüzeyin görüntülenebilmesi için elektron yansıtıcı / elektron saptırıcı bir madde olan altın-paladium ile kaplanması gerekmektedir. Aynı zamanda bu kaplama ile kırılğan olan örnekler bozulmalara karşı korunmuş olur (113). Kritik nokta kurutması yöntemiyle kurutulan yüzeyimiz, daha sonra altın-paladyum ile kaplanmıştır (Emitech, K550X). Yukarıda bahsedilen aşamaların dehidrasyon basamağı ve sonrası hizmet alımı yolu ile Ankara Üniversitesi Elektron Mikroskopu Birimi'nde gerçekleştirilmiştir (Zeiss Evo 40, Carl Zeiss AG).

E. faecalis ATCC OG1RF suşu tarafından oluşturulan biyofilme çalışma esnasında muamele edilecek olan ajanların konsantrasyonları;

Grup A1: 2000 IU/mL Nisin

Grup A2: 2000 IU/mL Nisin + tespit edilen en etkin CHX konsantrasyonu

Grup A3:2000 IU/mL Nisin + tespit edilen en etkin EDTA konsantrasyonu

Grup A4: 2000 IU/mL Nisin + tespit edilen en etkin NaOCl konsantrasyonu

Grup A5: Kontrol; Fosfat ile tamponlanmış tuzlu su (PBS) şeklinde belirlenmiştir.

4.2.8. İSTATİSTİKİ ANALİZLER

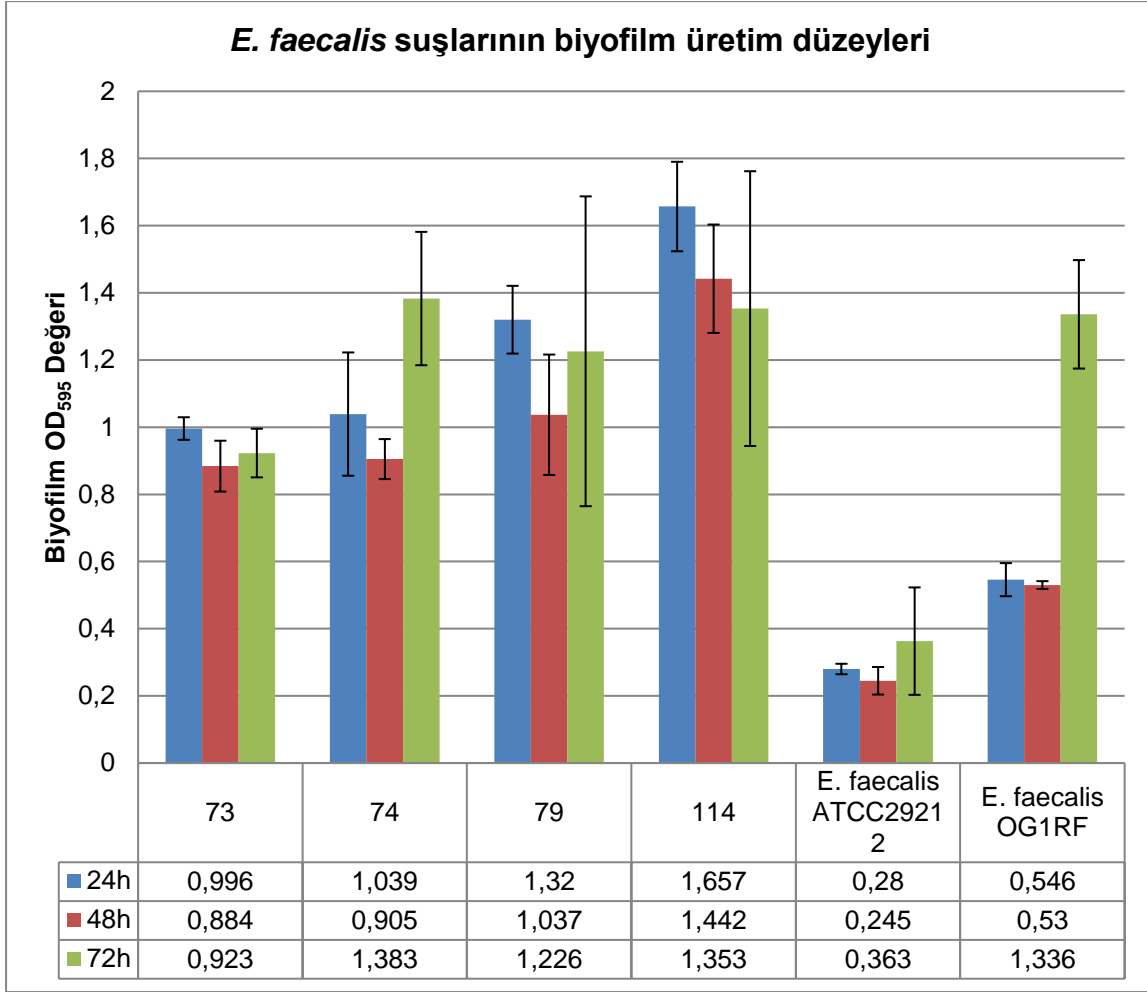
Çalışmada yer alan bağımsız değişkenler çok fazla sayıda grup içerdiğinden dolayı, deneyler sonucunda elde edilen verilerin istatistikî analizleri Varyans Analizi (ANOVA) ile incelenmiştir. Varyans analizi, bağımsız değişkenlerin kendi aralarında nasıl etkileşime girdiklerini analiz etmek için kullanılan bir istatistik yöntemidir. Özellikle iki veya daha fazla sayıdaki örneklerin ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığını test etmek için varyans analizi kullanılmaktadır. Varyans analizi ile incelenen verilerin anlamlı olup olmadığı ise F cetvelleriyle tespit edilmektedir. Analiz esnasında hesaplanan F değeri, F tablosunda yer alan değerden küçük ise, incelenen veri "anlamsız" olarak kabul edilmektedir. Eğer hesaplanan F değeri, tabloda yer alan F değerinden büyük ise, incelenen veriler "anlamlı" olarak kabul edilmektedir. Anlamlı olarak kabul edilen değerlerin gruplandırılmasında "Duncan Testi" kullanılmaktadır. Duncan testi ile örnek ortalamaları arasındaki farklar tespit edilerek gruplandırmalar yapılır. Gruplandırmalar ise harflerle ifade edilmektedir (114).

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. SUŞLARIN BİYOFİLM ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda; $OD_{595} < 0.120$ biyofilm üretmeyen, $0.120 < OD_{595} < 0.240$ zayıf biyofilm üreten, $OD_{595} > 0.240$ ise güçlü biyofilm üreticisi bakteri örnekleri olarak değerlendirilmiştir (108). Bu değerler esas alınarak sonuçlarımız yorumlandığında, tüm 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.

E. faecalis ATCC OG1RF suşu 24 saat inkübasyon süresi sonrasında $OD_{595} = 0.546$ düzeyinde biyofilm üretirken, inkübasyon süresi 72 saat olduğunda biyofilm üretimi $OD_{595} = 1.336$ düzeyine yükselmiştir. Denemede kullanılan izolatlara bakıldığında ise, maksimum biyofilm üretimi klinik kökenli *E. faecalis* 114 suşu tarafından gerçekleştirilmiş, 24 saat inkübasyon süresi bitiminde biyofilm üretim düzeyi $OD_{595} = 1.657$ olarak ölçülmüştür. Diğer izolatlar olan *E. faecalis* 73 ve 79'un 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübasyon süreleri sonrasında ürettikleri biyofilm miktarları arasında önemli bir fark gözlenmezken, gıda kökenli *E. faecalis* 74 suşunun maksimum biyofilm üretiminin 72 saat inkübasyon süresi sonunda gerçekleştirdiği ve $OD_{595} = 1.383$ düzeyinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *E. faecalis* suşlarının biyofilm üretim düzeyleri

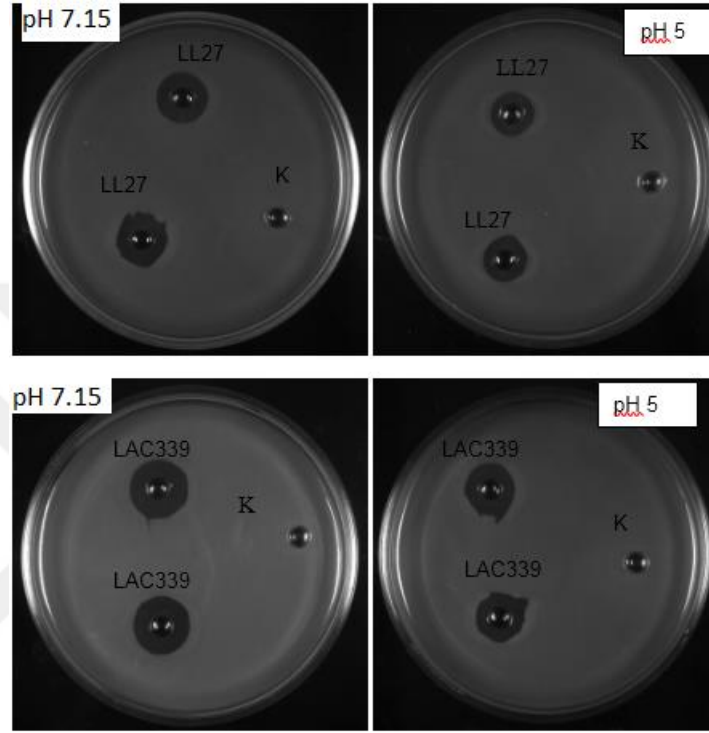
5.2. *L. LACTIS* LL27 VE *L. LACTIS* LAC339 SUŞLARININ BAKTERİYOSİN ÜRETİM ÖZELLİKLERİNİN KUYU DİFÜZYON YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Antimikrobiyal aktiviteye sahip *L. lactis* LL27 ve *L. lactis* LAC339 suşlarının farklı pH değerlerine sahip besi yerlerinde bakteriyosin üretim özellikleri kuyu difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır (Şekil 5.2) (Tablo 5.1). Çalışmalarda indikatör bakteri olarak *Micrococcus luteus* kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen kuyu difüzyon denemesinde inkübasyon sonrasında oluşan berrak zonlar ölçülmüş ve nisin üretiminin her iki suş için de (*L. lactis* LL27 ve *L. lactis* LAC339) normal besiyeri pH'sında (pH 7.15) daha yüksek düzeyde olduğu, besiyeri pH'sının 5'e ayarlanması durumunda ise nisin üretiminin az da olsa azaldığı belirlenmiştir.

Tablo 5.1. Farklı pH değerine sahip besi ortamlarında geliştirilen suşların zon çapları

	Normal besiyeri pH'ında geliştirilen suşların zon çapları	pH 5' e ayarlanan besiyerinde geliştirilen suşların zon çapları
<i>L. lactis</i> LL27	15 mm	13 mm
<i>L. lactis</i> LAC339	17 mm	14 mm



Şekil 5.2. Suşların bakteriyosin üretim özelliklerinin kuyu difüzyon testi ile araştırılması; K: kontrol olarak kuyulara damlatılan PBS'yi ifade etmektedir

5.3. MİNİMUM İNHİBİSYON KONSANTRASYONLARININ (MİK) VE MİNİMUM BAKTERİSİDAL KONSANTRASYONLARININ (MBC) BELİRLENMESİ

Elde edilen MİK ve MBC değerleri kıyaslandığında, değerlerinin birbirine çok yakın olduğu gözlenmektedir. Çalışmalar boyunca denenen 3 farklı dezenfektan (CHX, EDTA ve NaOCl) ve nisin bakteriyosininin (Ticari Nisin ve *L. lactis* LL27 ve *L. lactis* LAC339 suşlarından saflaştırılan nisin) MİK ve MBC değerlerinin, *E. faecalis* izolatlarının bazıları için aynıken, bazı izolatlar için beklendiği gibi MBC değerleri MİK değerlerinden daha yüksek bulunmuştur (Tablo 5.2) (Şekil 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8).

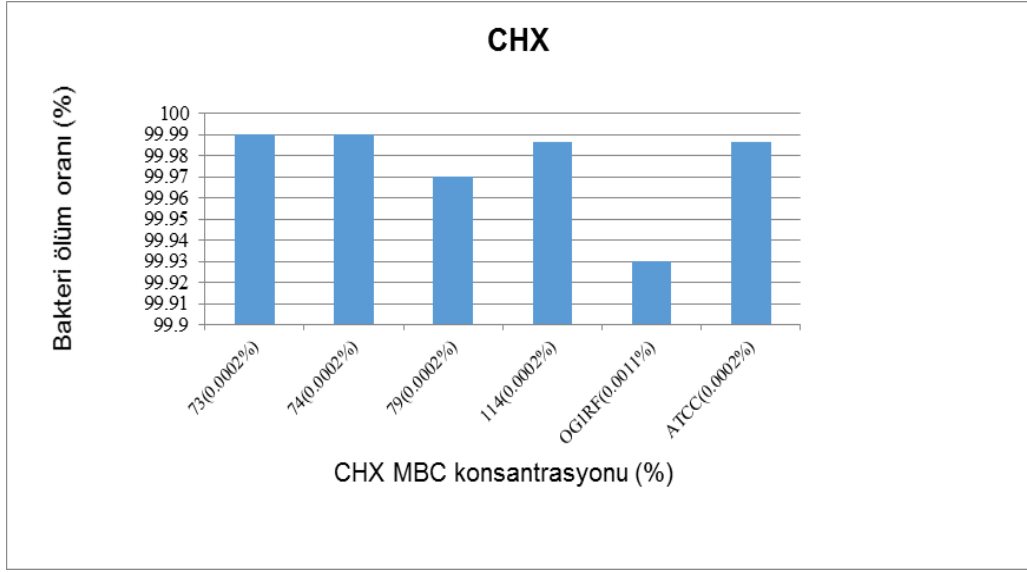
Tablo 5.2. Çalışmada kullanılan nisin bakteriyosinlerinin ve çeşitli dezenfektanların *E. faecalis* izolatlarının inhibisyonu için belirlenen MİK ve MBC değerleri

MIC	CHX	EDTA	NaOCl	Ticari Nisin (Nisaplin)*	<i>L. lactis</i> LL27**	<i>L. lactis</i> LAC339***
<i>E. faecalis</i> 73	0.0002%	5 mM	0.50%	12.5 IU/mL	50 IU/mL	50 IU/mL
<i>E. faecalis</i> 74	0.0002%	5 mM	0.50%	12.5 IU/mL	50 IU/mL	100 IU/mL
<i>E. faecalis</i> 79	0.0002%	5 mM	0.50%	12.5IU/mL	50 IU/mL	100 IU/mL
<i>E. faecalis</i> 114	0.0002%	5 mM	0.50%	50 IU/mL	50 IU/mL	100 IU/mL
<i>E. faecalis</i> OG1RF	0.0002%	5mM	0.50%	25 IU/mL	50 IU/mL	100 IU/mL
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	0.0002%	5 mM	0.50%	25 IU/mL	50 IU/mL	50 IU/mL
MBC	CHX	EDTA	NaOCl	Ticari Nisin (Nisaplin)*	<i>L. lactis</i> LL27**	<i>L. lactis</i> LAC339***
<i>E. faecalis</i> 73	0.0002%	5 mM	0.50%	12.5 IU/mL	50 IU/mL	100 IU/mL
<i>E. faecalis</i> 74	0.0002%	10 mM	1%	12.5 IU/mL	50 IU/mL	100 IU/mL
<i>E. faecalis</i> 79	0.0002%	10 mM	0.50%	25 IU/mL	50 IU/mL	100 IU/mL
<i>E. faecalis</i> 114	0.0002%	10 mM	0.50%	50 IU/mL	100 IU/mL	100 IU/mL
<i>E. faecalis</i> OG1RF	0.0011%	10 mM	0.50%	25 IU/mL	100 IU/mL	100 IU/mL
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	0.0002%	10 mM	0.50%	25 IU/mL	100 IU/mL	100 IU/mL

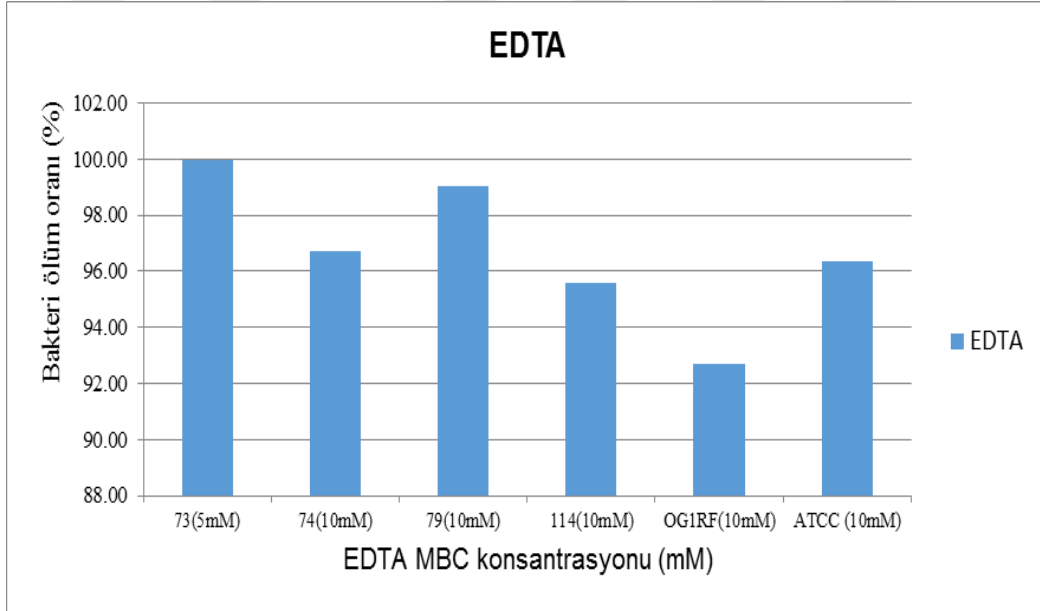
*1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.

**1000 IU/mL *L.lactis* LL27 nisin bakteriyosini 2.5 µg/mL Nisine eşdeğerdir.

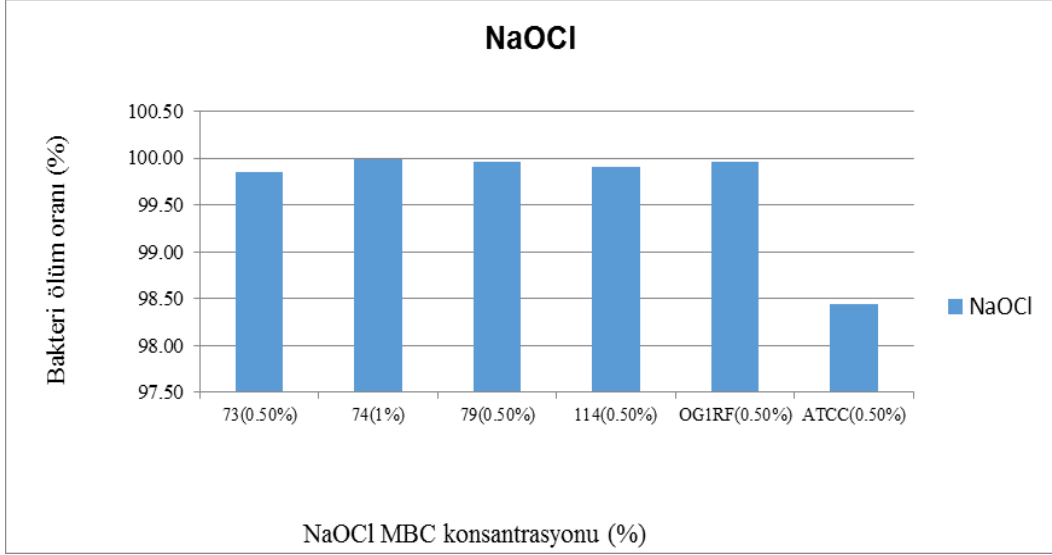
***1000 IU/mL *L.lactis* LAC339 nisin bakteriyosini 2.5 µg/mL Nisine eşdeğerdir (115).



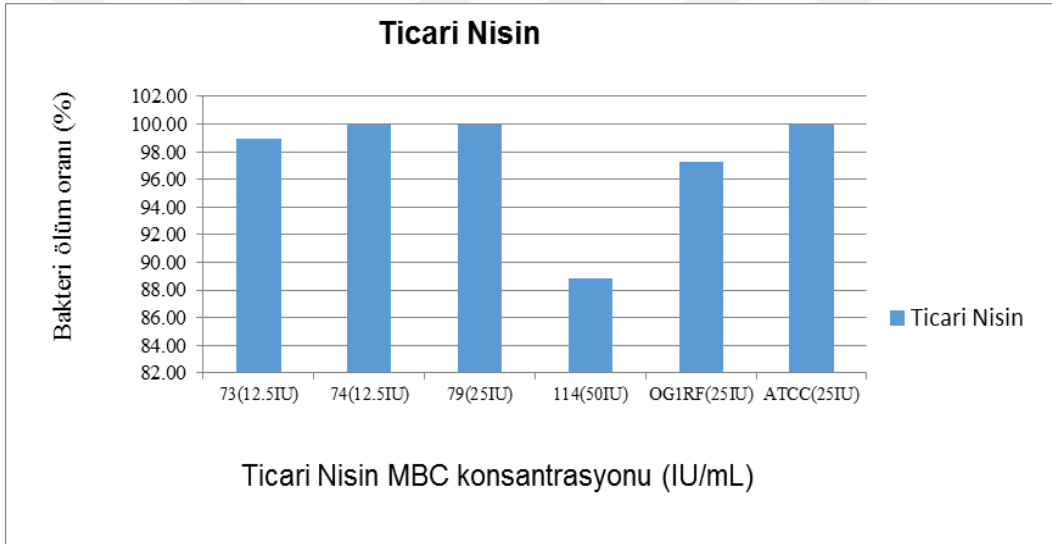
Şekil 5.3. CHX'in *E. faecalis* izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri



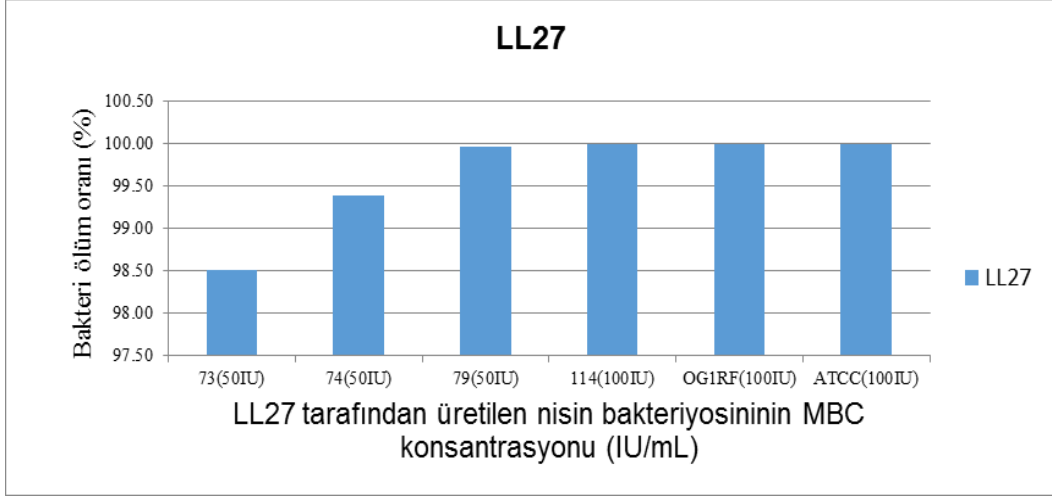
Şekil 5.4. EDTA'nın *E. faecalis* izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri



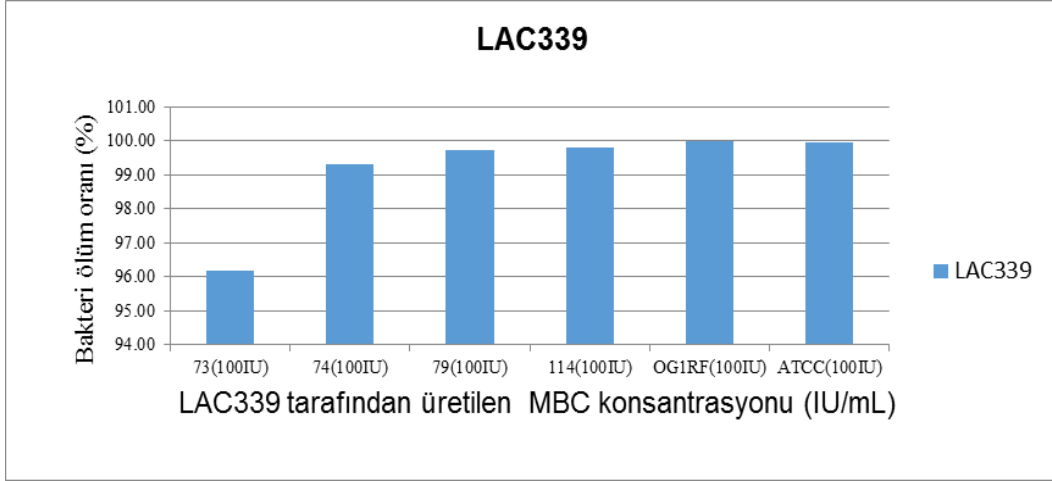
Şekil 5.5. NaOCl'nin *E. faecalis* izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri



Şekil 5.6. Ticari nisinin (Nisaplin) *E. faecalis* izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



Şekil 5.7. *L.lactis* LL27 tarafından üretilen nisin bakteriyosininin *E. faecalis* izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri (1000 IU/mL *L.lactis* LL27 nisin bakteriyosini 2.5 µg/mL Nisine eşdeğerdir.)



Şekil 5.8. *L. lactis* LAC339 tarafından üretilen nisin bakteriyosininin *E. faecalis* izolatları üzerine belirlenen MBC değerleri (1000 IU/mL *L.lactis* LAC339 nisin bakteriyosini 2.5 µg/mL Nisine eşdeğerdir.)

Bakteri kültürlerinin ölüm oranlarına bakıldığında, kullanılan dezenfektanların denenen minimum konsantrasyonlarında dahi [CHX (%0.0002), EDTA (10 mM), NaOCl (%0.50)] çok etkili oldukları görülmektedir . Denemelerde ticari nisin, *L. lactis* LL27 suşundan izole edilen nisin ve onun nisin üretim özelliği yükseltilmiş mutanlığı *L. lactis* LAC339 suşundan izole edilen nisin olmak üzere 3 farklı nisin bakteriyosini kullanılmıştır. Nisin bakteriyosininin minimum bakterisidal konsantrasyonunu heaplama için yapılan çalışmalarda en etkili nisin örneğinin ticari nisin olduğu görülmektedir.

Elde edilen istatistik verilerine bakıldığında, bakteri ve ajan interaksiyonunun %1 ($p<0.01$) oranında anlamlı olduğu görülmektedir (Tablo 5.3). CHX, EDTA ve NaOCl dezenfektanlarının MBC çalışmalarında kullanılan konsantrasyonları, *E. faecalis* suşlarının yaklaşık olarak %99.9'unu öldürmüştür ($p<0.01$). En etkili ajan olarak tespit edilen CHX, bütün *E. faecalis* suşları üzerinde öldürücü etki göstermiştir. Nisin bakteriyosinleri arasında ise, *E. faecalis* suşları üzerinde öldürücü etkisini en yüksek düzeyde gösteren nisinin ticari nisin olduğu saptanmıştır. Ticari nisini etkinlik açısından *L. lactis* LL27 ve *L. lactis* LAC339 suşları tarafından üretilen nisin bakteriyosini izlemiştir ($p<0.01$) (Tablo 5.4).

Tablo 5.3. MİK değerleri varyans analizi tablosu (** $p<0.01$)

V. K.	S.D.	MİK Değerleri	
		K.O.	F
Bakteri	5	464.70	61.17**
Ajan	5	20417.51	2687.91**
Bakteri × Ajan	25	380.67	50.11**
Hata	72	7.59	
Genel Toplam	107		

V.K.: Varyans Kaynağı
S.D.: Serbestlik Derecesi
K.O.: Kare Ortalama

Tablo 5.4. Dezenfektanların ve nisinin MİK değerlerine göre elde edilen bakteri ve ajan interaksiyonu Duncan analizi tablosu (** $p<0.01$)

<i>E.faecalis</i> suşları	AJANLAR						ORTALAMA
	CHX	EDTA	NAOCl	TİCARİ NİSİN	LL27	LAC339	
73	0.0002 F	4.167 F	0.5833 F	12.50 E	50.00 B	50.00 B	19.54 C
74	0.0002 F	4.167 F	0.6667 F	12.50 E	50.00 B	100.0 A	27.89 B
79	0.0002 F	4.167 F	0.6667 F	16.67 E	50.00 B	100.0 A	28.58 B
114	0.0002 F	4.167 F	0.6667 F	41.67 C	50.00 B	100.0 A	32.75 A
OG1RF	0.0003 F	4.167 F	0.5000 F	25.00 D	50.00 B	100.0 A	29.94 B
ATCC	0.0002 F	4.167 F	0.5833 F	25.00 D	50.00 B	50.00 B	21.63 C
Ortalama	0.00021E	4.167 D	0.6111 E	22.22 C	50.00 B	83.33 A	

E. faecalis suşları üzerinde dezenfektanlar ve nisin bakteriyosinleri ile yürütülen MBC çalışmaları ile elde edilen veriler doğrultusunda yapılan istatistiki değerlendirmeler sonucunda, bakteri ve dezenfektanların interaksyonu %1 ($p<0.01$) oranında anlamlı çıkmıştır (Tablo 5.5). Duncan analiz tablosuna bakıldığında, bakteriler üzerindeki en etkin ajanın CHX olduğu gözlenirken, en düşük etkiyi ise *L.lactis* LAC339 tarafından üretilen nisin göstermiştir. 73 kodlu gıda kaynaklı *E. faecalis* suşu bütün dezenfektanlardan ve nisinden en çok etkilenen suş olurken, 114 kodlu *E. faecalis* klinik izolatu ise dezenfektanların ve nisinin, diğer izolatlarla oranla en az etki gösterdikleri suş olmuştur (Tablo 5.6).

Tablo 5.5. MBC değerleri varyans analizi tablosu (** $p<0.01$)

V. K.	S.D.	MİK Değerleri	
		K.O	F
Bakteri	5	849.19	11.02**
Ajan	5	31076.50	403.33**
Bakteri × Ajan	25	285.67	3.71**
Hata	72	77.05	
Genel Toplam	107		

V.K.: Varyans Kaynağı
S.D.: Serbestlik Derecesi
K.O.: Kare Ortalama

Tablo 5.6. Dezenfektanların ve nisinin MBC değerlerine göre elde edilen bakteri ve ajan interaksyonu Duncan analizi tablosu (** $p<0.01$)

<i>E.faecalis</i> suşları	Ajanlar						Ortalama
	CHX	EDTA	NAOCI	TİCARİ NİSİN	LL27	LAC339	
73	0.000003 G	3.750 FG	0.6667 G	12.50 FG	50.00 CD	83.33 AB	25.04 D
74	0.000002 G	10.00 FG	0.8333 G	16.67 EFG	50.00 CD	100.0 A	29.58 CD
79	0.000002 G	8.333 FG	0.6667 G	25.00 EF	66.67 BC	100.0 A	33.44 BC
114	0.000003 G	10.00 FG	0.6667 G	50.00 CD	100.0 A	100.0 A	43.44 A
OG1RF	0.000015 G	10.00 FG	0.5000 G	25.00 EF	83.33 AB	100.0 A	36.47 ABC
ATCC	0.000009 G	10.00 FG	0.5000 G	33.33 DE	100.0 A	100.0 A	40.63 AB
Ortalama	0.0000056 E	8.68 D	0.639 E	27.08 C	75.00 B	97.22 A	

5.4. ZAMAN – ÖLÜM (TIME-KILL) DENEMESİ

Zaman-Ölüm denemesi çalışmasında, denenen antimikrobiyal maddelerin eradikasyon etkisinin ne kadar sürede gerçekleştiği tespit edilmiştir. Elde edilen verilere bakıldığında, MİK değerleri kullanılan dezenfektanların (Nisin, CHX, NaOCl, EDTA) bakteri hücreleri ile; 6, 12, 24 saat inkübasyonları sonrasında bakteri hücrelerinin gelişimi üzerine farklı etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. 73 kodlu *E. faecalis* suşunun Zaman-Ölüm grafiği incelendiğinde, dezenfektanlarla farklı inkübasyon sürelerinde her 3 inkübasyon süresi için en etkili dezenfektanın CHX (%0.0002) olduğu görülmektedir (Şekil 5.9).

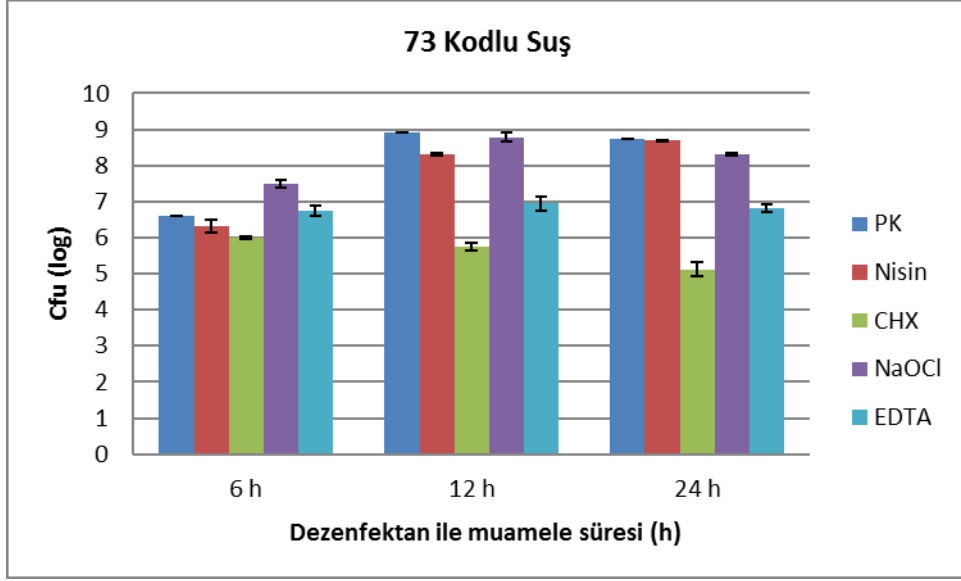
74 kodlu *E. faecalis* suşunun Zaman-Ölüm grafiği incelendiğinde, EDTA (5 mM) 12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde etkili olurken, 6 saatlik inkübasyon sonucunda en etkili dezenfektan nisin (12.5 IU/mL) olarak saptanmıştır (Şekil 5.10).

79 kodlu *E. faecalis* suşunun Zaman-Ölüm grafiği incelendiğinde her 3 inkübasyon süresi içinde en etkili dezenfektan CHX (%0.0002) olarak saptanmıştır (Şekil 5.11).

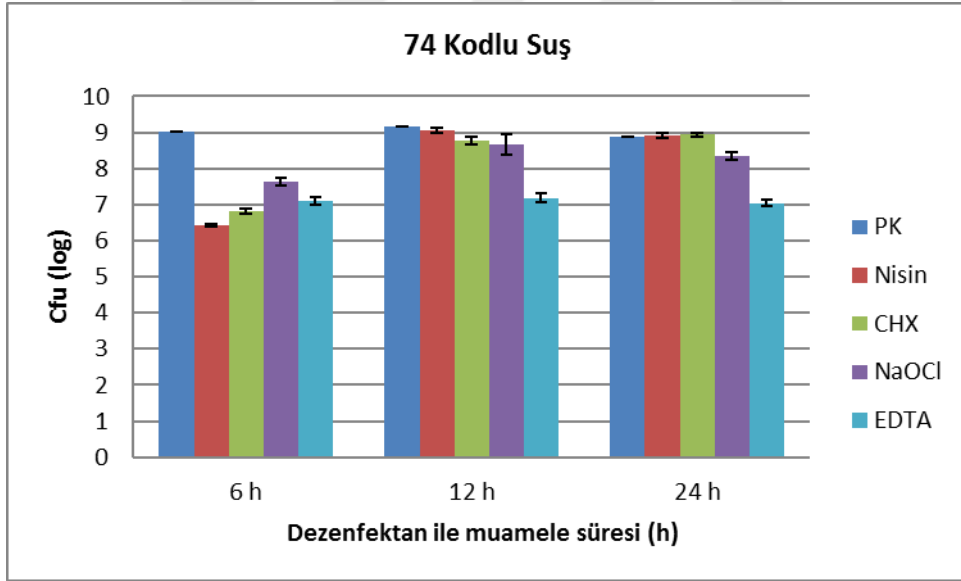
114 kodlu *E. faecalis* suşunun Zaman-Ölüm grafiği incelendiğinde, 6 ve 12 saat inkübasyon sonunda saptanan en etkili dezenfektan nisin (50 IU/mL) olurken, 24 saat inkübasyon sonrasında ise saptanan en etkili dezenfektan NaOCl (%0.50) olmuştur (Şekil 5.12).

E. faecalis OG1RF kontrol suşunun Zaman-Ölüm grafiği incelendiğinde, 6 saat inkübasyon sonunda suşun inhibisyonunda en etkili ajan nisin (25 IU/mL) iken, 12 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda ise EDTA (5 mM) en etkili dezenfektan olarak saptanmıştır (Şekil 5.13).

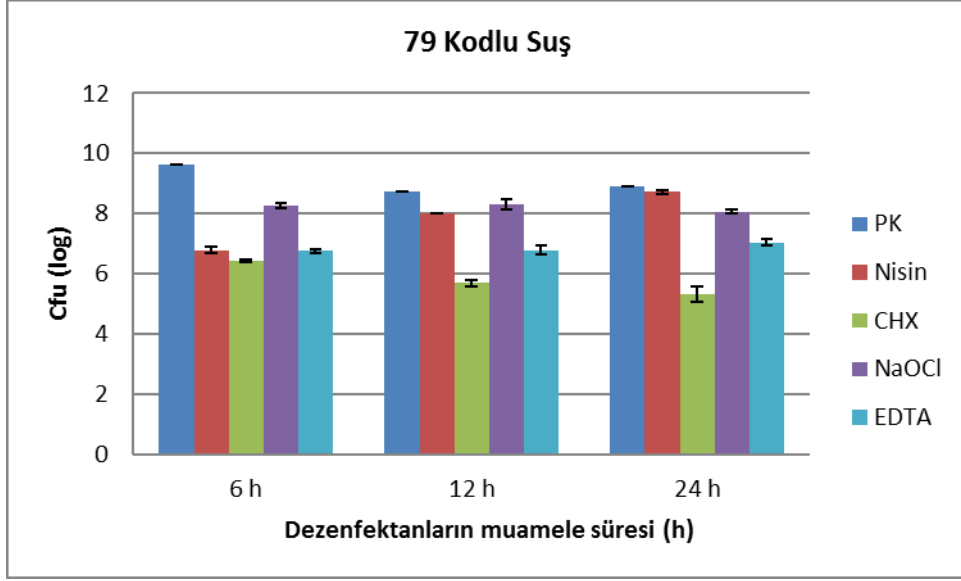
E. faecalis ATCC 29212 kontrol suşunun Zaman-Ölüm grafiği incelendiğinde ise, 6 saatlik dezenfektanlarla inkübasyonun sonucunda en etkili ajan nisin (25 IU/mL) olarak saptanırken, 12 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda en etkili dezenfektan EDTA (5 mM) olarak belirlenmiştir (Şekil 5.14).



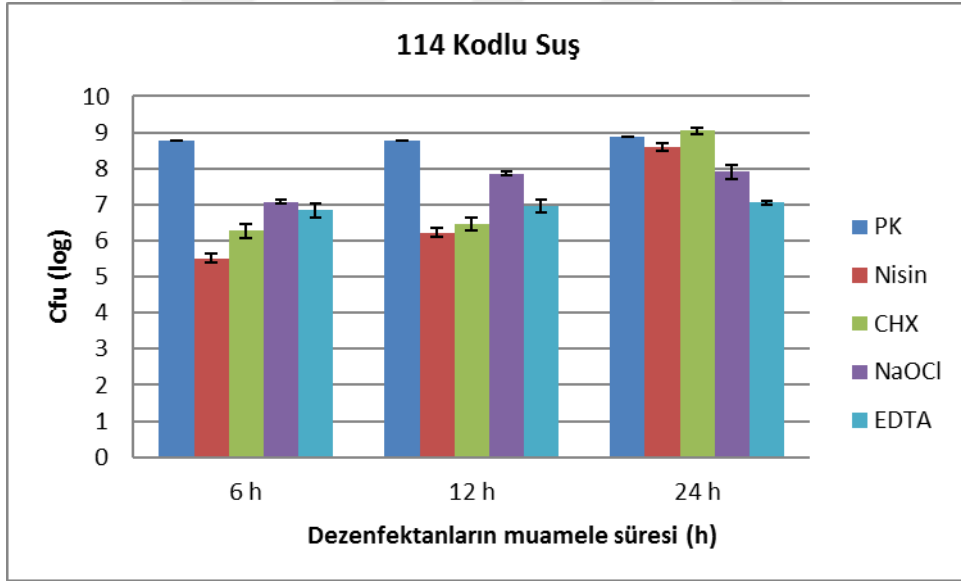
Şekil 5.9. Kullanılan dezenfektanların 73 kodlu *E. faecalis* suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



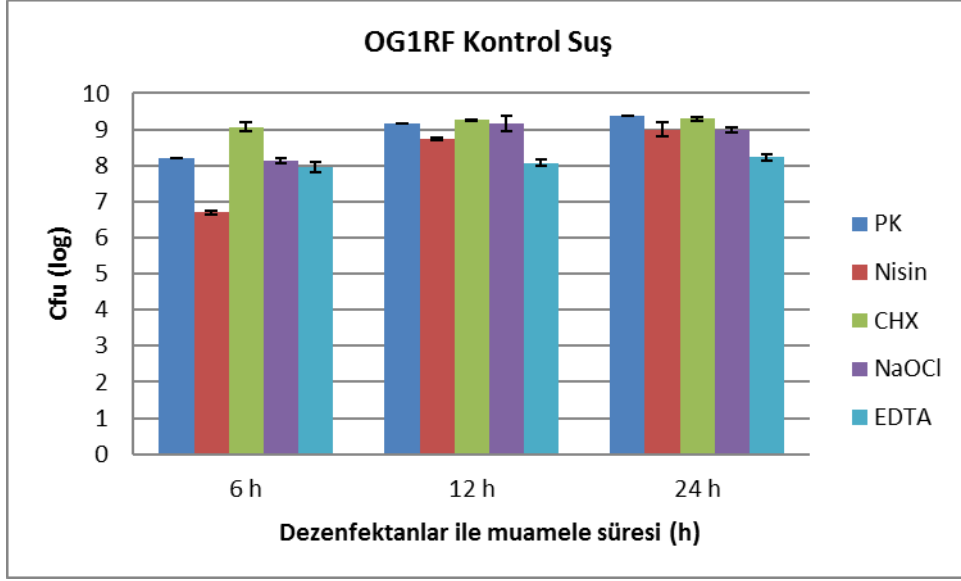
Şekil 5.10. Kullanılan dezenfektanların 74 kodlu *E. faecalis* suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



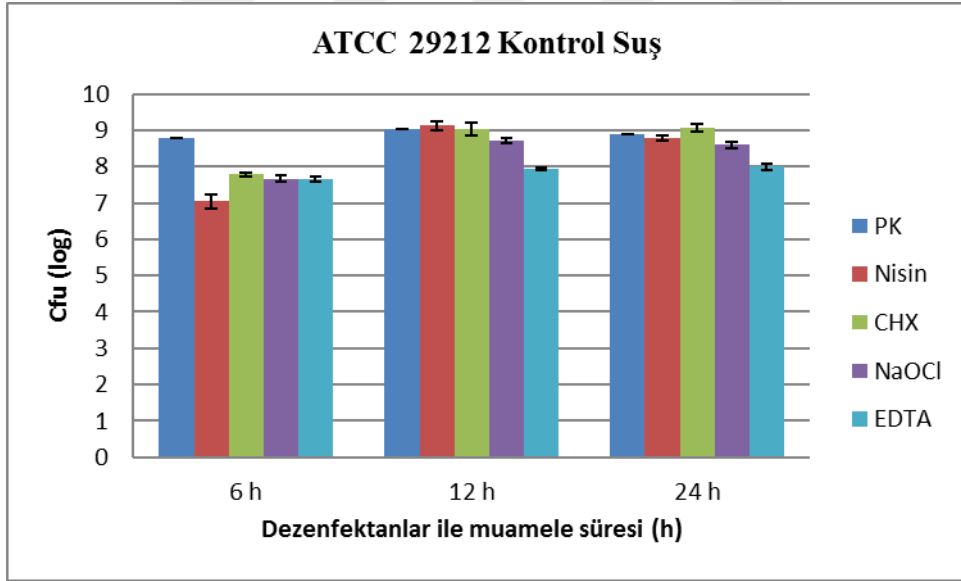
Şekil 5.11. Kullanılan dezenfektanların 79 kodlu *E. faecalis* suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



Şekil 5.12. Kullanılan dezenfektanların 114 kodlu *E. faecalis* suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



Şekil 5.13. Kullanılan dezenfektanların *E. faecalis* OG1RF kontrol suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



Şekil 5.14. Kullanılan dezenfektanların *E. faecalis* ATCC 29212 kontrol suşu üzerinde farklı inkübasyon süreleri sonunda gösterdikleri etkilerin karşılaştırılması (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)

Zaman-Ölüm denemesinde elde edilen verilerin istatistikî analizleri One Way ANOVA testi yapılarak değerlendirilmiştir. Anlamlı çıkan veriler ise Duncan analizine tabi tutulmuştur.

Zaman-Ölüm denemesi için yapılan varyans analizi tablosu incelendiğinde; bakteri, ajan ve inkübasyon süreleri arasındaki etkileşimin %1 ($p<0.01$) oranında anlamlı çıktığı görülmektedir (Tablo 5.7). *E. faecalis* suşları üzerinde genel olarak en etkili dezenfektanlar CHX ve EDTA olarak saptanmıştır (Tablo 5.8, 5.9). Bütün dezenfektanlar ve inkübasyon süreleri dikkate alındığında, 6 saat inkübasyonun sonunda *E. faecalis* suşları üzerinde en etkili ajanlar nisin ve EDTA olarak saptanırken, 12 saat inkübasyon süresi sonunda CHX ajanının daha etkili olduğu tespit edilmiştir. 24 saat inkübasyonun sonunda suşlara en çok etki eden ajanın ise NaOCl olduğu belirlenmiştir. Nisin, 6 saat inkübasyonun sonucunda klinik kökenli *E. faecalis* 114 suşu üzerinde en yüksek düzeyde etki gösteren ajan olmuştur. CHX, 12 saat inkübasyonun sonucunda en yüksek etkinliği *E. faecalis* 79 suşuna karşı sergilemiştir. EDTA ise, 3 farklı inkübasyon süresinin sonunda bütün *E. faecalis* suşlarına karşı yaklaşık olarak aynı düzeyde etkili olmuştur. Denenen tüm inkübasyon sürelerinde, suşların üzerinde en etkili ajan ise EDTA olarak saptanmıştır (Tablo 5.10).

Tablo 5.7. Zaman-Ölüm denemesi varyans analizi tablosu (** $p<0.01$)

V. K.	S.D.	Zaman-Ölüm denemesi	
		K.O.	F
Bakteri	5	8.85	74.98**
Ajan	4	13.55	114.85**
Saat	2	13.12	111.15**
Bakteri × Ajan	20	2.41	20.49**
Bakteri × Saat	10	1.09	19.29**
Ajan × Saat	8	2.42	20.50**
Bakteri × Ajan × Saat	40	0.49	4.21**
Hata	90	0.12	
Genel Toplam	179		

V.K.: Varyans Kaynağı
S.D.: Serbestlik Derecesi
K.O.: Kare Ortalama

Tablo 5.8. Dezenfektanların ve nisinin Zaman-Ölüm değerlerine göre elde edilen bakteri ve ajan interaksyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)

<i>E.faecalis</i> suşları	Ajanlar					Ortalama
	PK	NiSiN	CHX	NaOCl	EDTA	
73	8.09 DEF	7.77 EFG	5.62 J	8.19 CDEF	6.83 I	7.30 D
74	9.01 A	8.13 DEF	8.17 CDEF	8.22 CDEF	7.11 HI	8.13 B
79	9.08 A	7.83 EF	5.81 J	8.21 CDEF	6.85 I	7.56 C
114	8.80 AB	6.76 I	7.25 GHI	7.61 FGH	6.95 I	7.47 CD
OG1RF	8.91 A	8.13 DEF	9.20 A	8.75 ABC	8.08 DEF	8.61 A
ATCC	8.89 AB	8.32 BCDE	8.62 ABCD	8.32 BCDE	7.86 EF	8.41 A
Ortalama	8.80 A	7.82 C	7.45 D	8.22 B	7.28 D	

Tablo 5.9. Dezenfektanların ve nisinin Zaman-Ölüm değerlerine göre elde edilen bakteri, ajan ve saat interaksyonu Duncan analizi pozitif kontrol değerlerinin tablosu (**p<0.01)

<i>E.faecalis</i> suşları	6 saat-PK	12 saat-PK	24saat-PK	Ortalama
73	6.60 VWXYZZ	8.91 ABCDEFGHI	8.74 ABCDEFGHIJKLM	7.30 D
74	9.01 ABCDEFGH	9.14 ABCDE	8.87 ABCDEFGHIJ	8.13 B
79	9.61 A	8.74 ABCDEFGHIJKLM	8.90 ABCDEFGHIJ	7.56 C
114	8.77 ABCDEFGHIJKL	8.75 ABCDEFGHIJKL	8.89 ABCDEFGHIJ	7.48 CD
OG1RF	8.20 CDEFGHIJKLMNO	9.16 ABCDE	9.37 AB	8.62 A
ATCC	8.77 ABCDEFGHIJKL	9.03 ABCDEFGH	8.89 ABCDEFGHIJ	8.41 A
Ortalama	8.49 BC	8.96A	8.94A	

Tablo 5.10. Dezenfektanların ve nisinin Zaman-Ölüm değerlerine göre elde edilen bakteriyel ajan ve saat interaksyonunu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)

Suşlar	AJANLAR x SAAT													Ortalama
	Nisin-6sa	Nisin-12sa	Nisin-24sa	CHX-6sa	CHX-12sa	CHX-24sa	NaOCl-6sa	NaOCl-12sa	NaOCl-24sa	EDTA-6sa	EDTA-12sa	EDTA-24sa		
73														
74	6.31 XYZZZZ	8.31 BCDEFGHIJKL MN	8.68 ABCDEFKLM	6.00 YZZZZZ	5.74 Z	5.12 Z	7.49 NOPQRSTU W	8.78 ABCDEFKLM	8.30 BCDEFGHIJKL MN	6.75 UVWXYZ	6.94 RSTUVWXY	6.81 TUVWXYZ	7.30 D	
79	6.41 WXYZZZ	9.10 ABCDEF	8.90 ABCDEFKLM	6.80 TUVWXYZ	8.76 ABCDEFJKL	8.94 ABCDEFI	7.64 MNOPQRSTU V	8.66 ABCDEFKLM	8.40 BCDEFGHIJKL MN	7.10 PQRSTUWX	7.18 OPQRSTUWX	7.04 QRSTUVWXYZ	8.13 B	
114	6.78 TUVWXYZ	8.01 FGHIJKLMNO PQR	8.72 ABCDEFKLM	6.43 WXYZZZ	5.68 Z	5.31 Z	8.27 BCDEFGHIJKL MN	8.31 BCDEFGHIJKL MN	8.10 EFGHIJKLMN OPQ	6.75 UVWXYZ	6.77 TUVWXYZ	7.03 QRSTUVWXYZ	7.56 C	
OG-IRF	5.50 Z	6.21 XYZZZZ	8.58 ABCDEFKLM	6.26 XYZZZZ	6.45 WXYZZ	9.03 ABCDEF	7.08 PQRSTUWXY Z	7.86 IJKLMNOPQR ST	7.90 HIJKLMNPOQ RS	6.84 STUVWXYZ	6.95 RSTUVWXYZ	7.04 QRSTUVWXYZ	7.48 CD	
ATCC292 12	6.69 UVWXYZ	8.72 ABCDEFHIJKL LM	9.00 ABCDEFKLM	9.07 ABCDEF	9.25 ABCD	9.29 ABC	8.13 DEFGHIJKLM NOP	9.15 ABCDEF	8.97 ABCDEFHIJKL MN	7.94 GHIJKLMNO PQR	8.07 EFGHIJKLMN OPQ	8.22 CDEFGHIJKLM NO	8.62 A	
Ortalama	7.03 QRSTUWXY	9.13 ABCDEF	8.78 ABCDEFKLM	7.78 JKLMNOPQR STU	9.03 ABCDEF	9.07 ABCDEF	7.67 KLMNOPQRSTU V	8.72 ABCDEFKLM	8.60 ABCDEFHIJKL MN	7.70 LMNOPQRSTU V	7.94 GHIJKLMN OPQR	7.99 GHIJKLMN OPQR	8.41 A	
	6.45H	8.24C	8.78AB	7.06G	7.48DEF	7.79D	7.71DE	8.58ABC	8.36C	7.17FG	7.31FG	7.35EFG		

5.5. ANTİMİKROBİYAL MADDELERİN MİNİMAL BİYOFİLM ERADİKASYON KONSANTRASYONUNUN (MBEC) BELİRLENMESİ

Denemelerde kullandığımız *E. faecalis* suşlarının (73, 74, 79, 114 kodlu test suşları ve OG1RF ile ATCC 29212 kontrol suşları), 12, 18 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda oluşturdukları biyofilm yapıları üzerinde dezenfektanların (Nisin, CHX, NaOCl ve EDTA) eradikasyon etkileri Extramina vd., (2011) tarafından önerilen MBEC yöntemiyle araştırılmıştır (108).

73 kodlu *E. faecalis* suşunun dezenfektanlarla 12, 18 ve 24 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, biyofilm eradikasyonunda en etkili nisin konsantrasyonu 250 IU/mL olarak (Şekil 5.15a), en etkili NaOCl konsantrasyonu 12 saat inkübasyon sonucunda %0.25, 18 saat inkübasyon sonucunda %1.0 ve 24 saat inkübasyon sonucunda %2.0 (Şekil 5.15b) olarak, en etkili EDTA konsantrasyonu 12, 18 ve 24 saat inkübasyon sonucunda 10Mm (Şekil 5.15c) ve en etkili CHX konsantrasyonu 12 ve 18 saat inkübasyonun sonucunda %0.8, 24 saat inkübasyonun sonucunda ise %2.0 olarak bulunmuştur (Şekil 5.15d).

74 kodlu *E. faecalis* suşunun dezenfektanlarla 12, 18 ve 24 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, biyofilm eradikasyonunda en etkili nisin konsantrasyonu her 3 inkübasyon sonucunda 1000 IU/mL olarak (Şekil 5.16a), en etkili NaOCl konsantrasyonu 12 saat inkübasyon sonucunda %1.0, 18 ve 24 saat inkübasyon sonucunda %2.0 olarak (Şekil 5.16b), en etkili EDTA konsantrasyonu 12 saat inkübasyon sonucunda 20 Mm (Şekil 5.16c), 18 ve 24 saat inkübasyon sonucunda ise 10 mM olarak, en etkili CHX konsantrasyonu 12 saat inkübasyon sonucunda %2, 18 saat inkübasyon sonucunda %0.4 ve 24 saat inkübasyon sonucunda %1.25 olarak bulunmuştur (Şekil 5.16d).

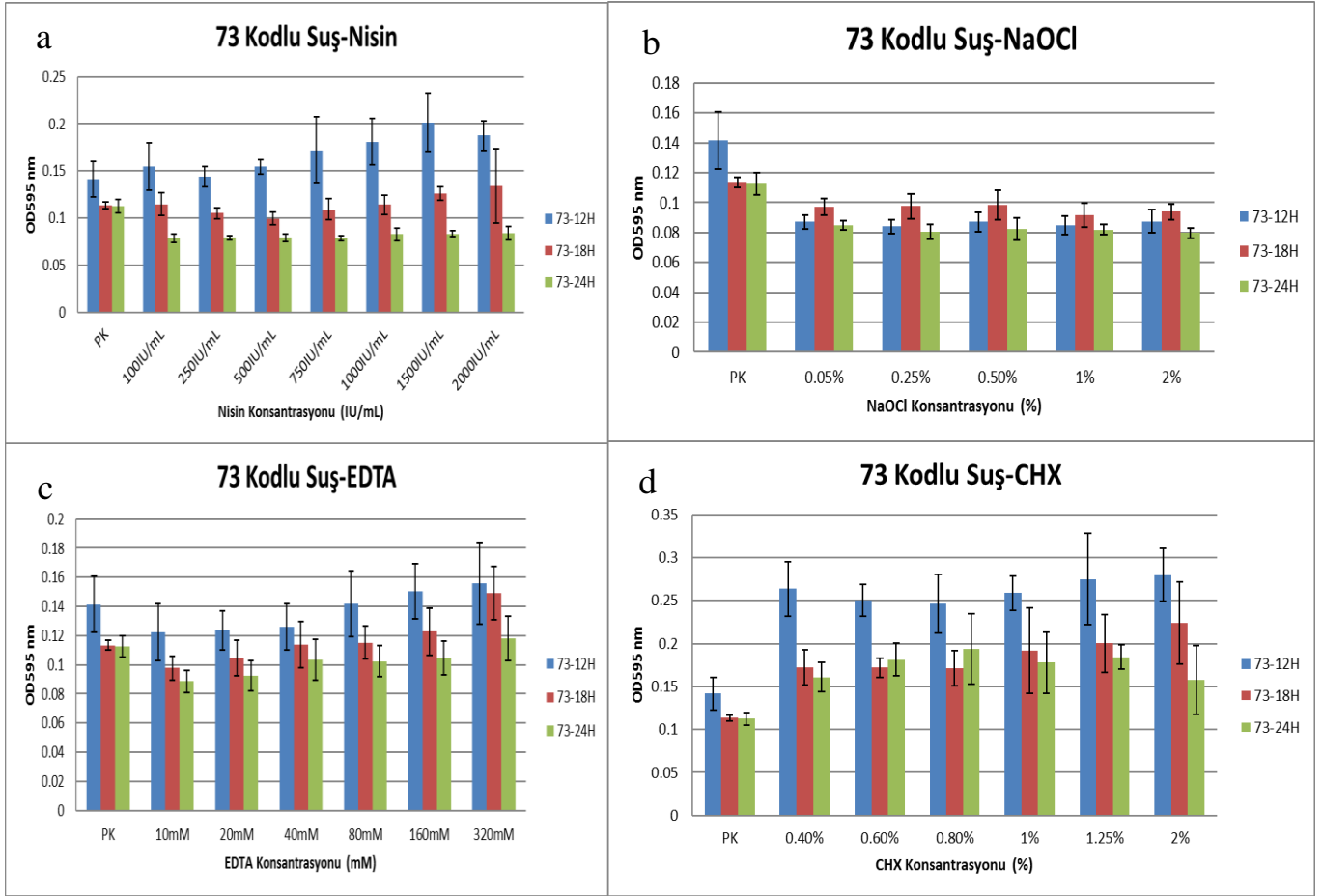
79 kodlu *E. faecalis* suşunun dezenfektanlarla 12, 18 ve 24 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, biyofilm eradikasyonunda en etkili nisin konsantrasyonu 12 saat inkübasyonu sonucunda 250 IU/mL, 18 ve 24 saat inkübasyon sonucunda ise 1000 IU/mL olarak (Şekil 5.17a), en etkili NaOCl konsantrasyonu 12, 18 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonucunda %2.0 olarak (Şekil 5.17b), en etkili EDTA konsantrasyonu 12, 18 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonucunda 10 mM olarak (Şekil 5.17c), en etkili CHX konsantrasyonu 12

ve 18 saat inkübasyon sonucunda %0.4, 24 saat inkübasyon sonucunda ise %1.25 olarak bulunmuştur (Şekil 5.17d).

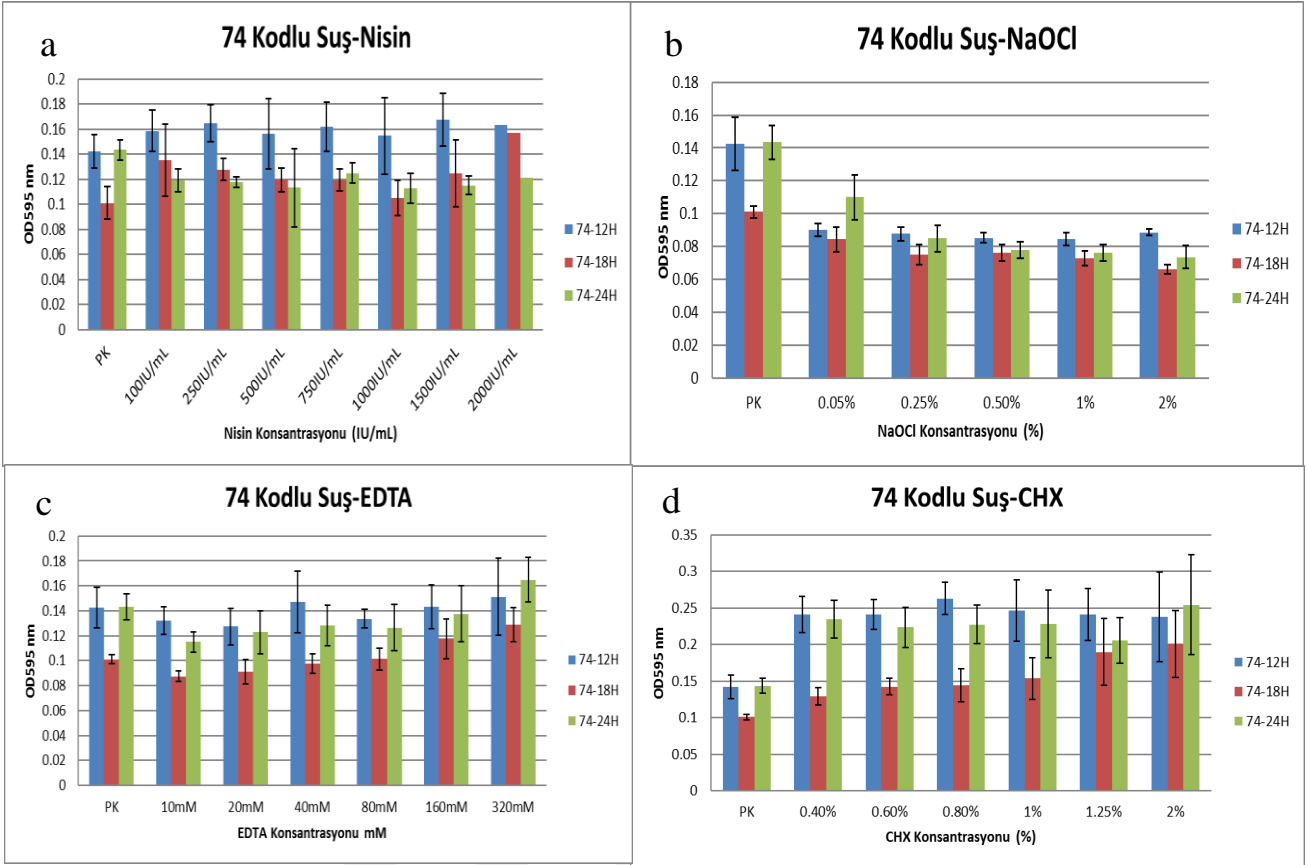
114 kodlu *E. faecalis* suşunun dezenfektanlarla 12, 18 ve 24 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, biyofilm eradikasyonunda en etkili nisin konsantrasyonu 12 saat inkübasyon süresi sonunda 100 IU/mL, 18 saat inkübasyon süresi sonunda 500 IU/mL, 24 saat inkübasyon süresi sonunda 750 IU/mL olarak (Şekil 5.18a), en etkili NaOCl konsantrasyonu 12 saat inkübasyon süresi sonunda %1.0, 18 saat inkübasyon süresi sonunda %0.5 ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda %0.25 olarak (Şekil 5.18b), en etkili EDTA konsantrasyonu 12 saat inkübasyon süresi sonunda 20 mM, 18 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda 10 mM olarak (Şekil 5.18c), en etkili CHX konsantrasyonu 12 saat inkübasyon süresi sonunda %0.8, 18 saat inkübasyon süresi sonunda %0.6 ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda ise %2.0 olarak bulunmuştur (Şekil 5.18d).

OG1RF kodlu *E. faecalis* kontrol suşunun dezenfektanlarla 12, 18 ve 24 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, biyofilm eradikasyonunda en etkili nisin konsantrasyonu 12 saat inkübasyon süresi sonunda 750 IU/mL, 18 saat inkübasyon süresi sonunda 500 IU/mL ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda 1500 IU/mL olarak (Şekil 5.19a), en etkili NaOCl konsantrasyonu 12 saat inkübasyon süresi sonunda %0.25, 18 ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda %0.50 olarak (Şekil 5.19b), en etkili EDTA konsantrasyonu 12 ve 18 saat inkübasyon süreleri sonunda 20 mM ve 24 saat inkübasyon süresi sonunda 10 mM olarak (Şekil 5.19c), en etkili CHX konsantrasyonu 12, 18 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda %0.6 olarak bulunmuştur (Şekil 5.19d).

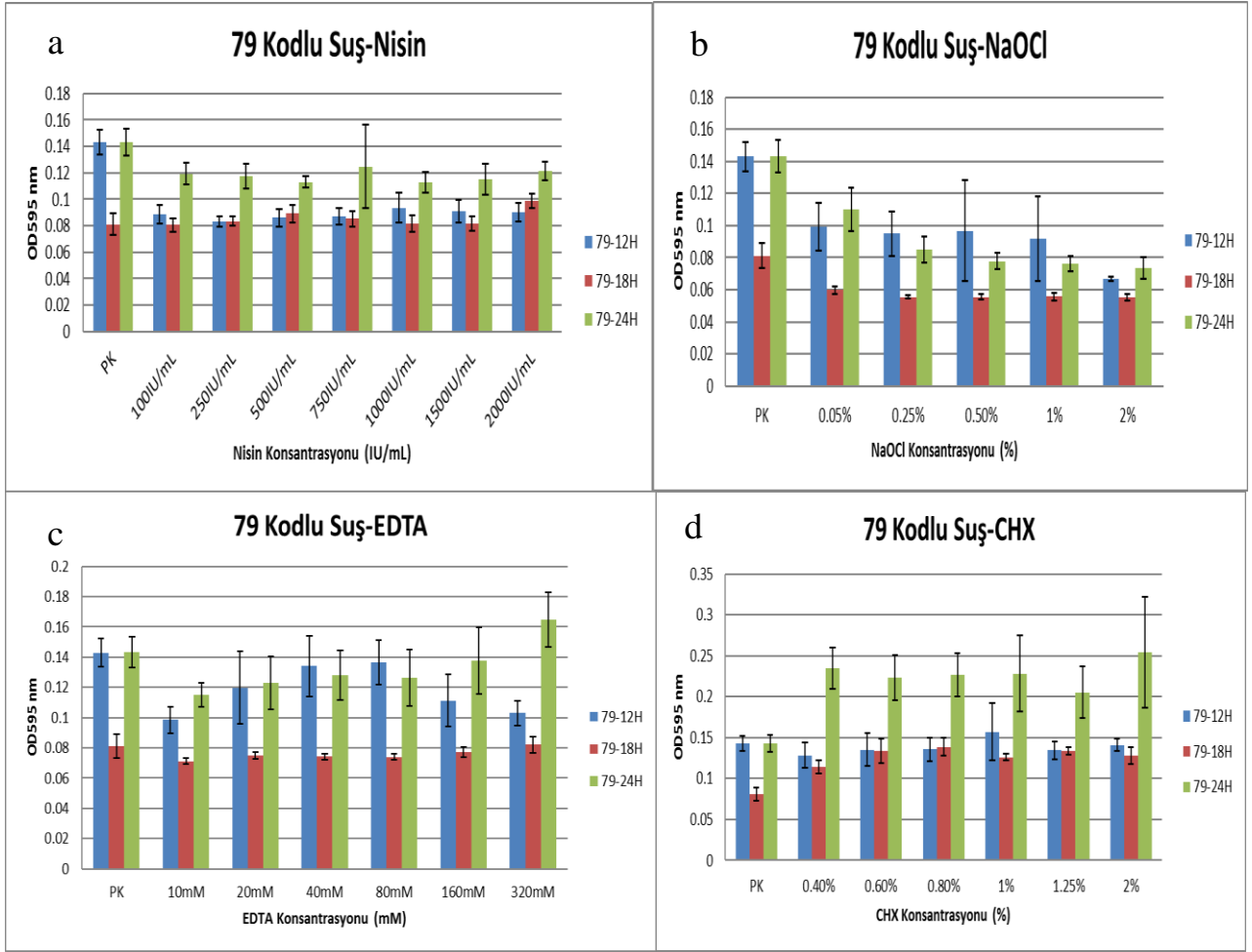
ATCC 29212 kodlu *E. faecalis* kontrol suşunun dezenfektanlarla 12, 18, ve 24 saat inkübasyonları sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, biyofilm eradikasyonunda en etkili nisin konsantrasyonu 12 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda 750 IU/mL, 18 saat inkübasyon süresi sonunda 500 IU/mL olarak (Şekil 5.20a), en etkili NaOCl konsantrasyonu 12 ve 18 saat inkübasyon süreleri sonunda %1.0, 24 saat inkübasyon süresi sonunda %0.25 olarak (Şekil 5.20b), en etkili EDTA konsantrasyonu 12 saat inkübasyon süresi sonunda 20 mM, 18 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda 10 mM olarak (Şekil 5.20c), en etkili CHX konsantrasyonu ise her 3 inkübasyon süresi sonunda %0.8 olarak bulunmuştur (Şekil 5.20d).



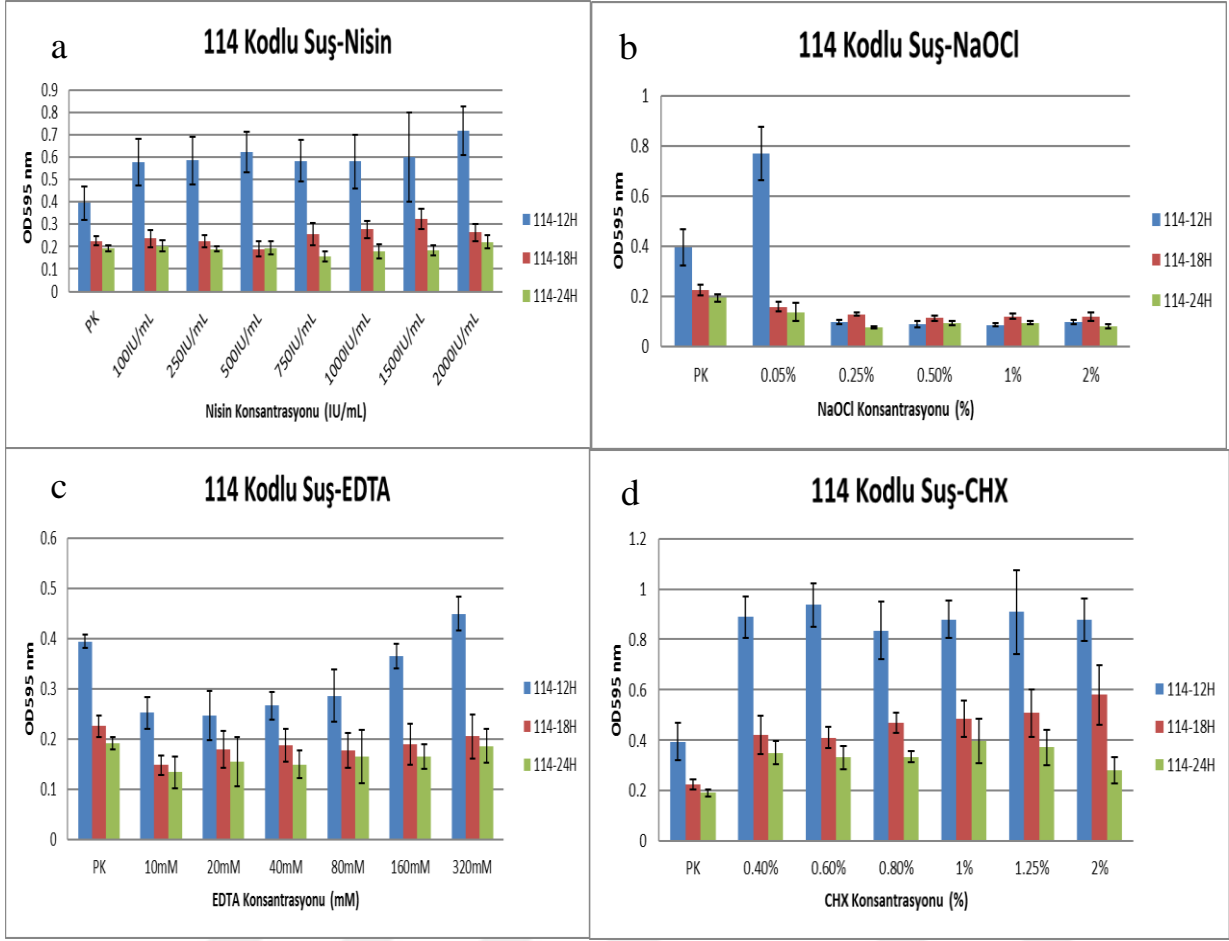
Şekil 5.15. 73 kodlu *E. faecalis* suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki ölçüm sonuçları (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



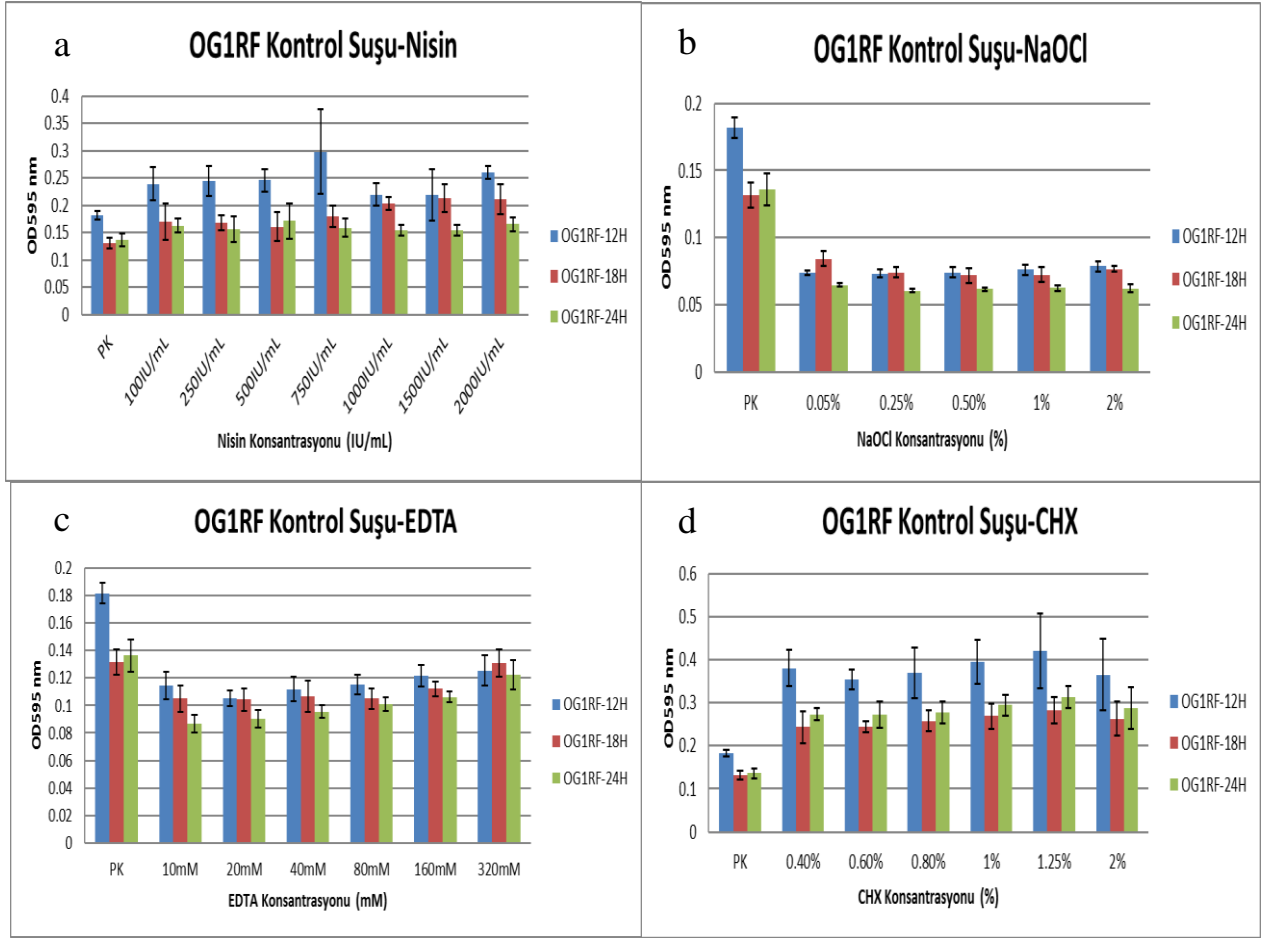
Şekil 5.16. 74 kodlu *E. faecalis* suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki ölçüm sonuçları (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



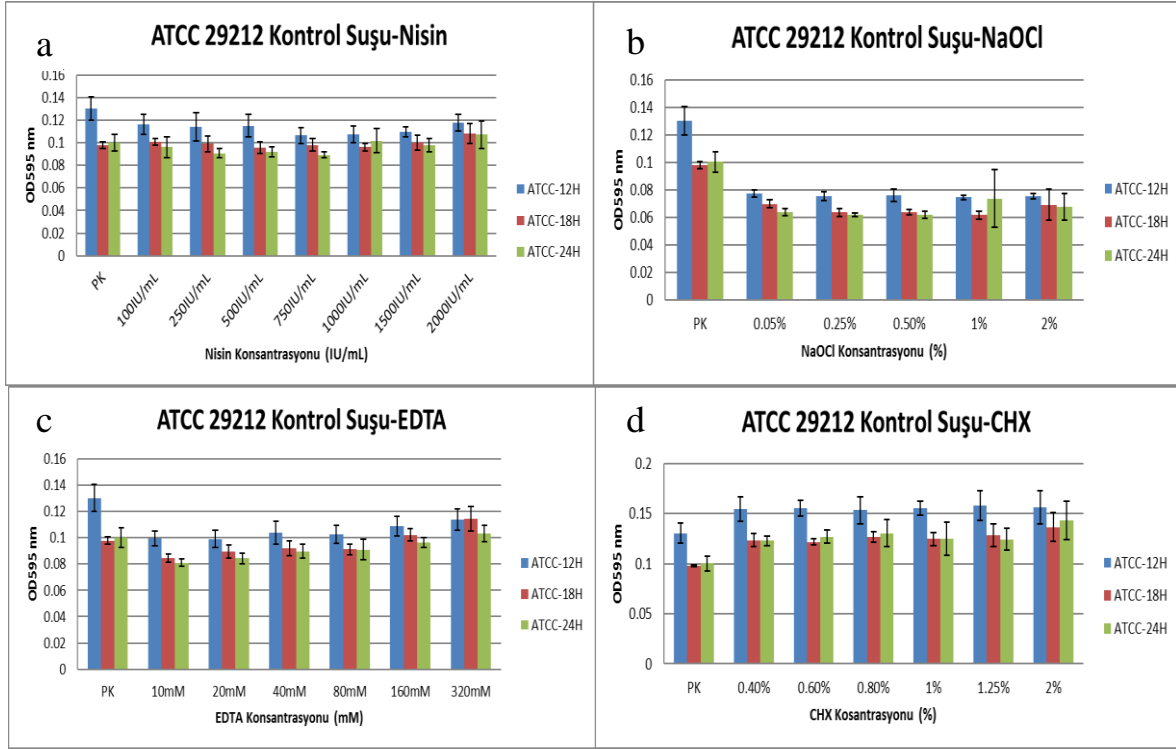
Şekil 5.17. 79 kodlu *E. faecalis* suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a)Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki ölçüm sonuçları (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



Şekil 5.18. 114 kodlu *E. faecalis* suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki ölçüm sonuçları (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



Şekil 5.19. OG1RF *E. faecalis* kontrol suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki ölçüm sonuçları (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)



Şekil 5.20. ATCC 29212 *E. faecalis* kontrol suşu tarafından üretilen biyofilm yapılarının farklı (a) Nisin, (b) NaOCl, (c) EDTA ve (d) CHX konsantrasyonları ile 12, 18 ve 24 h inkübasyonları sonucunda kalan biyofilm yapılarının 595 nm dalga boyundaki ölçüm sonuçları (1000 IU/mL Ticari nisin (Nisaplin) 1 mg/mL Nisine eşdeğerdir.)

MBEC denemesinde elde edilen verilerin istatistiki analizleri One-Way ANOVA ile değerlendirilmiştir. Anlamli çıkan veriler ($p < 0.01$) ise Duncan analizine tabi tutulmuştur. Nisin ajanının MBEC çalışmalarından elde edilen verileri için yapılan varyans analiz tablosuna bakıldığında, bakteri, ajan ve inkübasyon süreleri interaksyonunun %1 oranında ($p < 0.01$) anlamlı çıkmadığı görülmektedir (Tablo 5.11). *E. faecalis* suşlarının inkübasyon süreleri ile orantılı olarak oluşturdukları biyofilm yapıları, varyans analizi ile %1 oranında anlamlı olarak değerlendirilmiş ve Duncan analizine tabi tutulmuştur (Tablo 5.12).

Tablo 5.11. Nisin-MBEC denemesi varyans analizi tablosu (**p<0.01)

V. K.	S.D.	MİK Degeri	
		K.O.	F
Bakteri	5	0.632	79.63**
Ajan	7	0.006	0.7234
Saat	2	0.436	54.92 **
Bakteri × Ajan	35	0.002	0.3024
Bakteri × Saat	10	0.147	18.51**
Ajan × Saat	14	0.002	0.2984
Bakteri × Ajan × Saat	70	0.002	0.2365
Hata	288	0.008	
Genel Toplam	431		

V.K.: Varyans Kaynağı
S.D.: Serbestlik Derecesi
K.O.: Kare Ortalama

Tablo 5.12. Nisin-MBEC verilerine göre yapılmış bakteri ve saat intereksiyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)

<i>E. faecalis</i> suşları	Saat			Ortalama
	12 saat	18 saat	24 saat	
73	0.1672 CDE	0.1146 DEF	0.08474 F	0.1222 CD
74	0.1586 DEF	0.1236 DEF	0.1209 DEF	0.1344 C
79	0.09536 EF	0.08526 F	0.08543 F	0.08868 D
114	0.5824 A	0.2495 B	0.1899 BCD	0.3406 A
OG1RF	0.2386 BC	0.2386 BC	0.1575 DEF	0.1920 B
ATCC-29212	0.1146 DEF	0.09945 EF	0.09686 EF	0.1036 CD
Ortalama	0.2261 A	0.1421 B	0.1225 B	

NaOCl ajanının MBEC çalışmalarından elde edilen verileri için yapılan varyans analizi tablosuna bakıldığında bakteri, ajan ve saat interaksiyonlarının %1 oranında (p<0.01) anlamlı olduğu görülmektedir (Tablo 5.13). *E. faecalis* suşlarının inkübasyon süreleri ile orantılı olarak oluşturdukları biyofilm yapıları, bakteri ve ajan interaksiyonu, bakteri, ajan ve saat interaksiyonu sonuçları Duncan analizine tabi tutulmuştur (Tablo 5.14, 5.15). Bakteri ve ajan

konsantrasyonlarının Duncan analizi tablosuna bakıldığında, uygulanan bütün NaOCl konsantrasyonlarının yaklaşık olarak aynı oranda eradikasyon gücüne sahip olduğu gözlenmektedir. Suşlar tarafından oluşturulan biyofilm yapılarının eradikasyonunda en düşük etkiyi %0.05 konsantrasyonundaki NaOCl göstermiştir (Tablo 5.15). Bakteri, ajan ve inkübasyon süreleri için yapılan Duncan analizi sonucunda ise, uygulanan konsantrasyonların inkübasyon süresi fark etmeksizin yaklaşık olarak aynı etkiyi gösterdikleri saptanmıştır. En düşük etkiyi ise %0.05 konsantrasyonundaki NaOCl ajanı 12 saat inkübasyon süresi sonunda göstermiştir. NaOCl ajanının eradikasyon gücünden en az oranda etkilenen suş ise, klinik kökenli *E. faecalis* 114 suşu olarak tespit edilmiştir (Tablo 5.16).

Tablo 5.13. NaOCl-MBEC denemesi varyans analizi tablosu (**p<0.01)

V.K.	S.D.	NaOCl-MBEC Değeri	
		K.O.	F.
Bakteri	5	0.070	15.75 **
Ajan	5	0.052	11.65 **
Saat	2	0.042	9.50 **
Bakteri × Ajan	25	0.017	3.76 **
Bakteri × Saat	10	0.015	3.28 **
Ajan × Saat	10	0.011	2.54 **
Bakteri × Ajan × Saat	50	0.011	2.47 **
Hata	216	0.004	
Genel Toplam	323		

V.K.: Varyans Kaynağı

S.D.: Serbestlik Derecesi

K.O.: Kare Ortalama

Tablo 5.14. NaOCl-MBEC verilerine göre bakteri, ajan konsantrasyonu ve saat interaksyonu Duncan analizi pozitif kontrol değerlerinin tablosu (**p<0.01)

<i>E. faecalis</i> suşları	12 sa-PK	18 sa-PK	24sa-PK	Ortalama
73	0.1416C	0.1134C	0.1127C	0.0936B
74	0.1424C	0.1010C	0.1433C	0.0899B
79	0.1430C	0.0812C	0.0922C	0.0742B
114	0.3944B	0.2254C	0.1920C	0.1698A
OG1RF	0.1816C	0.1315C	0.1362C	0.0841B
ATCC	0.1302C	0.0978C	0.1001C	0.0755B
Ortalama	0.1889A	0.1251B	0.1294B	

Tablo 5.15. NaOCl-MBEC verilerine göre bakteri ve ajan konsantrasyonu interaksyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)

<i>E. faecalis</i> suşları	Konsantrasyon-NaOCl						Ortalama
	PK	0,05%	0,25%	0,5%	1%	2%	
73	0.1225 C	0.08977 C	0.08727 C	0.08922 C	0.08606 C	0.08700 C	0.09364 B
74	0.1289 C	0.09481 C	0.08245 C	0.07978 C	0.07785 C	0.07606 C	0.08998 B
79	0.1055 C	0.07311 C	0.06936 C	0.06949 C	0.06817 C	0.05991 C	0.07425 B
114	0.2706 B	0.3540 A	0.09915 C	0.09769 C	0.09934 C	0.09782 C	0.1698 A
OG1RF	0.1498 C	0.07431 C	0.06923 C	0.06902 C	0.07026 C	0.07226 C	0.08414 B
ATCC-29212	0.1094 C	0.07010 C	0.06673 C	0.06706 C	0.06976 C	0.07052 C	0.07559 B
Ortalama	0.1478 A	0.1260 A	0.07903 B	0.07871 B	0.07857 B	0.07726 B	

EDTA ajanının MBEC alışmalarından elde edilen verileri iin yapılan varyans analizi tablosuna bakıldığında, bakteri ve ajan interaksiyonu, ayrıca bakteri, ajan ve inkubasyon surelerinin interaksiyonunun %1 ($p<0.01$) oranında anlamlı çıkmadığı belirlenmiştir (Tablo 5.17) EDTA ajanının uygulanan konsantrasyonları ise varyans analizinde %1 oranında anlamlı çıktığından, Duncan analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçta en yüksek etkiye sahip olan konsantrasyon 10 mM olarak belirlenirken, uygulanan daha yüksek konsantrasyonlar ile arasında bir fark görülmemiştir (Tablo 5.18).

Tablo 5.17. EDTA-MBEC denemesi varyans analizi tablosu (** $p<0.01$)

V.K.	S.D.	EDTA-MBEC Değeri	
		K.O.	F
Bakteri	5	0.145	47.61**
Ajan	6	0.012	3.99**
Saat	2	0.081	26.45**
Bakteri × Ajan	30	0.002	0.5634
Bakteri × Saat	10	0.021	6.74**
Ajan × Saat	12	0.001	0.2142
Bakteri × Ajan × Saat	60	0.001	0.2822
Hata	252	0.003	
Genel Toplam	377		

V.K.: Varyans Kaynağı
S.D.: Serbestlik Derecesi
K.O.: Kare Ortalama

Tablo 5.18. EDTA-MBEC çalışmalarında kullanılan ajan konsantrasyonları Duncan analizi tablosu (**p<0.01)

Konsantrasyon	EDTA-MBEC Değerleri
PK	0.1478 A
10mM	0.1112 B
20mM	0.1165 B
40mM	0.1230 AB
80mM	0.1253 AB
160mM	0.1345 AB
320mM	0.1502 A

CHX ajanının MBEC çalışmalarından elde edilen verileri için yapılan varyans analizi tablosuna bakıldığında, bakteri ve ajan interaksiyonunun ve aynı zamanda bakteri, ajan ve inkübasyon sürelerinin interaksiyonunun %1 oranında anlamlı çıkmadığı görülmektedir (Tablo 5.19). Bakterilerin oluşturduğu biyofilm miktarı ile inkübasyon süreleri arasındaki ilişki ise %1 oranında anlamlı çıkmış ve veriler doğrultusunda yapılan bakteri ve saat interaksiyonunu gösteren Duncan analizi tablosunda, 18 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda suşların hemen hemen aynı miktarda biyofilm oluşturdukları tespit edilmiştir (Tablo 5.20).

Tablo 5.19. CHX-MBEC denemesi varyans analizi tablosu (**p<0.01)

V. K.	S.D.	MİK Değeri	
		K.O.	F
Bakteri	5	1.426	59.78 **
Ajan	6	0.103	4.29 **
Saat	2	0.577	24.20 **
Bakteri × Ajan	30	0.015	0.6123
Bakteri × Saat	10	0.195	8.1618**
Ajan × Saat	12	0.006	0.2422
Bakteri × Ajan × Saat	60	0.004	0.1479
Hata	252	0.024	
Genel Toplam	377		

V.K.: Varyans Kaynağı
S.D.: Serbestlik Derecesi
K.O.: Kare Ortalama

Tablo 5.20. CHX-MBEC çalışmalarında kullanılan bakteri ve saat interaksiyonu Duncan analizi tablosu (**p<0.01)

<i>E. faecalis</i> suşları	Saat			Ortalama
	12 sa	18 sa	24 sa	
73	0.2450 CDE	0.1778 DE	0.1668 DE	0.1966 C
74	0.2303 CDE	0.1515 DE	0.2166 CDE	0.1995 C
79	0.1393 DE	0.1223 DE	0.1124 E	0.1247 C
114	0.8173 A	0.4434 B	0.3230 BC	0.5279 A
OG1RF	0.3523 BC	0.2416 CDE	0.2648 CD	0.2862 B
ATCC	0.1517 DE	0.1226 DE	0.1247 DE	0.1330 C
Ortalama	0.3227 A	0.2099 B	0.2014 B	

5.6. SİNERJETİK ETKİ (CHECKERBOARD) DENEMESİ

Nisin ve diğer dezenfektanlar arasındaki sinerjetik etkinin belirlenebilmesi için gerçekleştirilen bu denemede Odds vd. (2003) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır (112). Çalışmada ortalama fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FIC) hesaplamaları esas alınmıştır. Bu yöntemde, tüm satır ve sütunlardaki üreme olmayan en düşük ilaç konsantrasyonunun olduğu kuyucuklar değerlendirilmeye alınmıştır. Bu kuyucukların her biri için A ve B ilacının FIC değerleri hesaplanmış, her kuyucuk için ayrı ayrı FIC değerleri hesaplanarak, elde edilen değerler toplanıp kuyucuk sayısına bölünmüş ve FIC değerlerinin ortalaması alınmıştır.

$$FIC \text{ index} = FIC A + FIC B = (\text{Kombinasyondaki A antimikrobiyal ajanının MİK değeri} / A \text{ antimikrobiyal ajanının tek başına MİK değeri}) + (\text{Kombinasyondaki B antimikrobiyal ajanının MİK değeri} / B \text{ antimikrobiyal ajanının tek başına MİK değeri})$$

Plak üzerinde kullanılan her iki dezenfektanın MİK değerleri, sinerjetik etki çalışması ile eş zamanlı olarak tekrar çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan plakların temsili görünümü Şekil 5.21, 5.22 ve 5.23'te verilmektedir. Çalışmada elde edilen değerler;

Sinerjisizm; FIC indeks ≤ 0.5 ise,

Pozitif katkı etkisi; FIC indeks 0.5-4.0

Antagonizm; FIC indeks ≥ 4.0 olarak değerlendirilmiştir.

								Nisin MİK Değeri *	CHX MİK Değeri **	
A	50 IU/mL 0,0008 %	50 IU/mL 0,0004 %	50 IU/mL 0,0002 %	50 IU/mL 0,0001 %	50 IU/mL 0,00005 %	50 IU/mL 0,000025 %	50 IU/mL 0,0000125 %	50 IU/mL	0,0008%	PK
B	25 IU/mL 0,0008 %	25 IU/mL 0,0004 %	25 IU/mL 0,0002 %	25 IU/mL 0,0001 %	25 IU/mL 0,00005 %	25 IU/mL 0,000025 %	25 IU/mL 0,0000125 %	25 IU/mL	0,0004%	PK
C	12,5 IU/mL 0,0008 %	12,5 IU/mL 0,0004 %	12,5 IU/mL 0,0002 %	12,5 IU/mL 0,0001 %	12,5 IU/mL 0,00005 %	12,5 IU/mL 0,000025 %	12,5 IU/mL 0,0000125 %	12,5 IU/mL*	0,0002%**	PK
D	6,25 IU/mL 0,0008 %	6,25 IU/mL 0,0004 %	6,25 IU/mL 0,0002 %	6,25 IU/mL 0,0001 %	6,25 IU/mL 0,00005 %	6,25 IU/mL 0,000025 %	6,25 IU/mL 0,0000125 %	6,25 IU/mL	0,0001%	PK
E	3,125 IU/mL 0,0008 %	3,125 IU/mL 0,0004 %	3,125 IU/mL 0,0002 %	3,125 IU/mL 0,0001 %	3,125 IU/mL 0,00005 %	3,125 IU/mL 0,000025 %	3,125 IU/mL 0,0000125 %	3,125 IU/mL	0,00005%	NK
F	1,56 IU/mL 0,0008 %	1,56 IU/mL 0,0004 %	1,56 IU/mL 0,0002 %	1,56 IU/mL 0,0001 %	1,56 IU/mL 0,00005 %	1,56 IU/mL 0,000025 %	1,56 IU/mL 0,0000125 %	1,56 IU/mL	0,000025%	NK
G	0,78 IU/mL 0,0008 %	0,78 IU/mL 0,0004 %	0,78 IU/mL 0,0002 %	0,78 IU/mL 0,0001 %	0,78 IU/mL 0,00005 %	0,78 IU/mL 0,000025 %	0,78 IU/mL 0,0000125 %	0,78 IU/mL	0,0000125%	NK

Şekil 5.21. 73 kodlu *E. faecalis* suşu için hazırlanan Nisin+CHX sinerjetik etki çalışması plak düzeni

							Nisin Mik Değeri *	NaOCl Mik Değeri **		
A	50 IU/mL 2,0 %	50 IU/mL 1,0 %	50 IU/mL 0,5 %	50 IU/mL 0,25 %	50 IU/mL 0,125 %	50 IU/mL 0,0625 %	50 IU/mL 0,03125 %	50 IU/mL	2,0 %	PK
B	25 IU/mL 2,0 %	25 IU/mL 1,0 %	25 IU/mL 0,5 %	25 IU/mL 0,25 %	25 IU/mL 0,125 %	25 IU/mL 0,0625 %	25 IU/mL 0,03125 %	25 IU/mL	1,0 %	PK
C	12,5 IU/mL 2,0 %	12,5 IU/mL 1,0 %	12,5 IU/mL 0,5 %	12,5 IU/mL 0,25 %	12,5 IU/mL 0,125 %	12,5 IU/mL 0,0625 %	12,5 IU/mL 0,03125 %	12,5 IU/mL*	0,5 %**	PK
D	6,25 IU/mL 2,0 %	6,25 IU/mL 1,0 %	6,25 IU/mL 0,5 %	6,25 IU/mL 0,25 %	6,25 IU/mL 0,125 %	6,25 IU/mL 0,0625 %	6,25 IU/mL 0,03125 %	6,25 IU/mL	0,25 %	PK
E	3,125 IU/mL 2,0 %	3,125 IU/mL 1,0 %	3,125 IU/mL 0,5 %	3,125 IU/mL 0,25 %	3,125 IU/mL 0,125 %	3,125 IU/mL 0,0625 %	3,125 IU/mL 0,03125 %	3,125 IU/mL	0,125 %	NK
F	1,56 IU/mL 2,0 %	1,56 IU/mL 1,0 %	1,56 IU/mL 0,5 %	1,56 IU/mL 0,25 %	1,56 IU/mL 0,125 %	1,56 IU/mL 0,0625 %	1,56 IU/mL 0,03125 %	1,56 IU/mL	0,0625 %	NK
G	0,78 IU/mL 2,0 %	0,78 IU/mL 1,0 %	0,78 IU/mL 0,5 %	0,78 IU/mL 0,25 %	0,78 IU/mL 0,125 %	0,78 IU/mL 0,0625 %	0,78 IU/mL 0,03125 %	0,78 IU/mL	0,03125 %	NK

Şekil 5.22. 73 kodlu *E. faecalis* suşu için hazırlanan Nisin+NaOCl sinerjetik etki çalışması plak düzeni

							Nisin MİK Değeri *	EDTA MİK Değeri **		
A	50 IU/mL 20 mM	50 IU/mL 10 mM	50 IU/mL 5 mM	50 IU/mL 2,5 mM	50 IU/mL 1,25 mM	50 IU/mL 0,625 mM	50 IU/mL 0,3125 mM	50 IU/mL	20 mM	PK
B	25 IU/mL 20 mM	25 IU/mL 10 mM	25 IU/mL 5 mM	25 IU/mL 2,5 mM	25 IU/mL 1,25 mM	25 IU/mL 0,625 mM	25 IU/mL 0,3125 mM	25 IU/mL	10 mM	PK
C	12,5 IU/mL 20 mM	12,5 IU/mL 10 mM	12,5 IU/mL 5 mM	12,5 IU/mL 2,5 mM	12,5 IU/mL 1,25 mM	12,5 IU/mL 0,625 mM	12,5 IU/mL 0,3125 mM	12,5 IU/mL*	5 mM**	PK
D	6,25 IU/mL 20 mM	6,25 IU/mL 10 mM	6,25 IU/mL 5 mM	6,25 IU/mL 2,5 mM	6,25 IU/mL 1,25 mM	6,25 IU/mL 0,625 mM	6,25 IU/mL 0,3125 mM	6,25 IU/mL	2,5 mM	PK
E	3,125 IU/mL 20 mM	3,125 IU/mL 10 mM	3,125 IU/mL 5 mM	3,125 IU/mL 2,5 mM	3,125 IU/mL 1,25 mM	3,125 IU/mL 0,625 mM	3,125 IU/mL 0,3125 mM	3,125 IU/mL	1,25 mM	NK
F	1,56 IU/mL 20 mM	1,56 IU/mL 10 mM	1,56 IU/mL 5 mM	1,56 IU/mL 2,5 mM	1,56 IU/mL 1,25 mM	1,56 IU/mL 0,625 mM	1,56 IU/mL 0,3125 mM	1,56 IU/mL	0,625 mM	NK
G	0,78 IU/mL 20 mM	0,78 IU/mL 10 mM	0,78 IU/mL 5 mM	0,78 IU/mL 2,5 mM	0,78 IU/mL 1,25 mM	0,78 IU/mL 0,625 mM	0,78 IU/mL 0,3125 mM	0,78 IU/mL	0,3125 mM	NK

Şekil 5.23. 73 kodlu *E. faecalis* suşu için hazırlanan Nisin+EDTA sinerjetik etki çalışması plak düzeni

Yapılan çalışmanın sonucunda elde edilen veriler Tablo 5.21’de gösterilmektedir. Tabloya bakıldığında genel olarak ajanların birbirine pozitif katkıda buldukları görülmektedir. Sadece gıda kökenli *E. faecalis* 74 suşu ve *E. faecalis* ATCC 29212 kontrol suşunun inhibiyosunda nisin ve CHX birlikte kullanıldığında antagonistik etki göstermişlerdir. 73 kodlu suşta en iyi inhibisyon etkisini gösteren ajan kombinasyonu Nisin+EDTA, 74 kodlu suşta Nisin+NaOCl, 79 kodlu suşta Nisin+EDTA, 114 kodlu suşta Nisin+EDTA, OG1RF kontrol suşunda Nisin+NaOCl ve ATCC 29212 kontrol suşunda ise Nisin+EDTA olarak belirlenmiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, suşlar üzerinde en etkili kombinasyonun Nisin+EDTA olduğu görülmektedir.

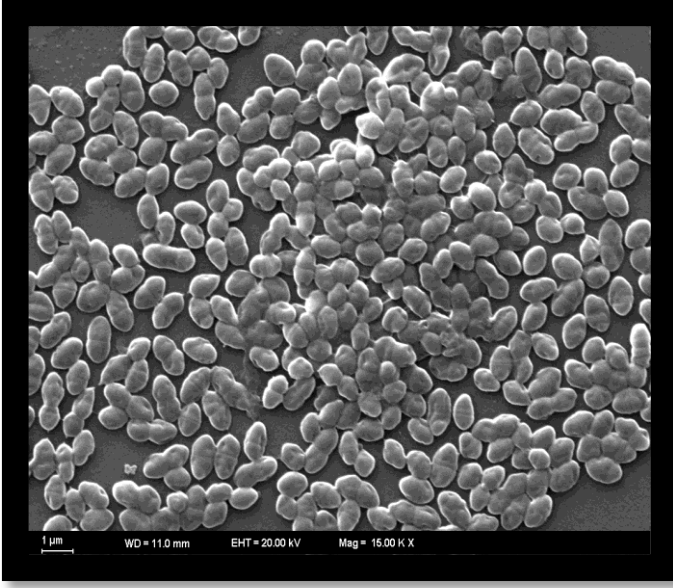
Tablo 5.21. *E. faecalis* 73, 74, 79, 114, OG1RF, ATCC 29212 suşlarının nisin ve diğer dezenfektanların kombinasyonu ile gerçekleştirilen sinerjetik etki çalışmasının sonuçları

<i>E. faecalis</i> 73		
Nisin+CHX	2.58	Pozitif katkı
Nisin+NaOCl	2.15	Pozitif katkı
Nisin+EDTA	1.3228	Pozitif katkı
<i>E. faecalis</i> 74		
Nisin+CHX	4.97	Antagonizm
Nisin+NaOCl	2.3031	Pozitif katkı
Nisin+EDTA	2.409	Pozitif katkı
<i>E. faecalis</i> 79		
Nisin+CHX	3.24	Pozitif katkı
Nisin+NaOCl	2.303	Pozitif katkı
Nisin+EDTA	1.9658	Pozitif katkı
<i>E. faecalis</i> 114		
Nisin+CHX	2.784	Pozitif katkı
Nisin+NaOCl	2.27625	Pozitif katkı
Nisin+EDTA	1.5473	Pozitif katkı
<i>E. faecalis</i> OG1RF		
Nisin+CHX	2.8475	Pozitif katkı
Nisin+NaOCl	2.2849	Pozitif katkı
Nisin+EDTA	2.3523	Pozitif katkı
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		
Nisin+CHX	5.1339	Antagonizm
Nisin+NaOCl	2.4708	Pozitif katkı
Nisin+EDTA	2.2152	Pozitif katkı

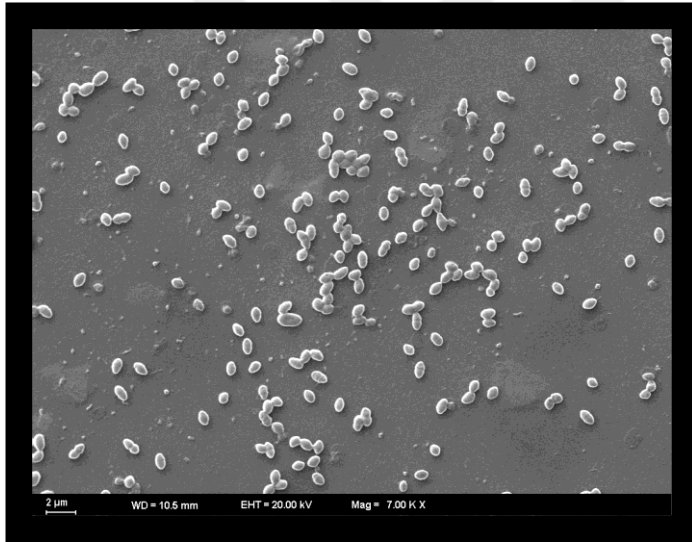
5.7. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) GÖRÜNTÜLENMESİ İLE NİSİN VE DEZENFEKTANLARIN BİYOFİLM YAPILARINA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

E. faecalis OG1RF kontrol suşunun kullanıldığı çalışmada, oluşturulan örneklerin SEM analizine hazırlanmasında Dufour vd. (2007) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. Elde edilen SEM görüntüleri incelendiğinde, nisin tek başına ve diğer dezenfektanlarla oluşturulan kombinasyonlarının, suş tarafından cam yüzeyde oluşturulan biyofilmin tamamının eradikasyonunu sağlayamadığı ancak önemli düzeyde azalttığı görülmektedir (Şekil 5.24-5.28).

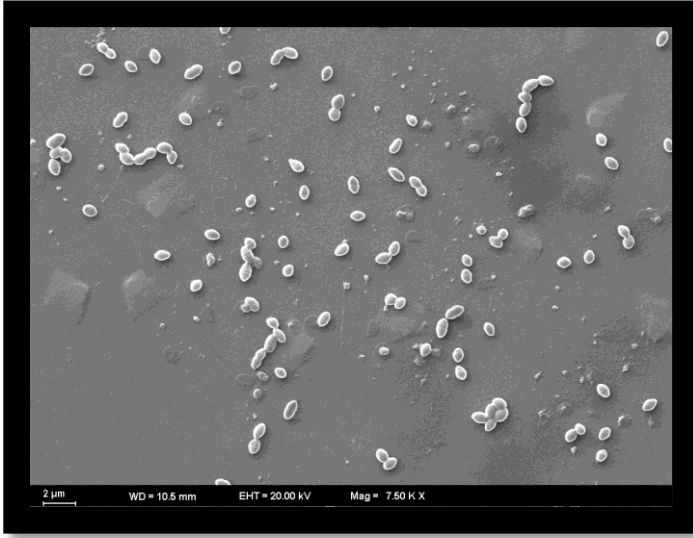
Yüzey üzerinde oluşan biyofilm yapılarının eradikasyonunda en yüksek etkiyi Nisin (2000 IU/mL) + EDTA (5 mM) kombinasyonu göstermiştir. En düşük etkiyi ise Nisin (2000 IU/mL) + CHX (%0.0002) kombinasyonu göstermiştir. Nisin (2000 IU/mL) + NaOCl (%0.5) kombinasyonunun oluşturulan biyofilmler üzerindeki etkisi, Nisin ve EDTA'nın oluşturduğu kombinasyonun göstermiş olduğu etkiye oldukça yakın bulunmuştur.



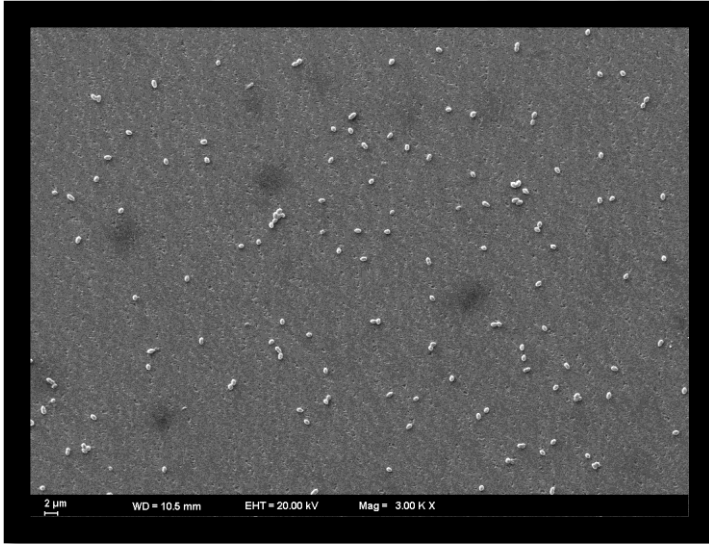
Şekil 5.24. *E. faecalis* OG1RF kontrol suşu tarafından oluşturulan biyofilm yapısının SEM görüntüsü



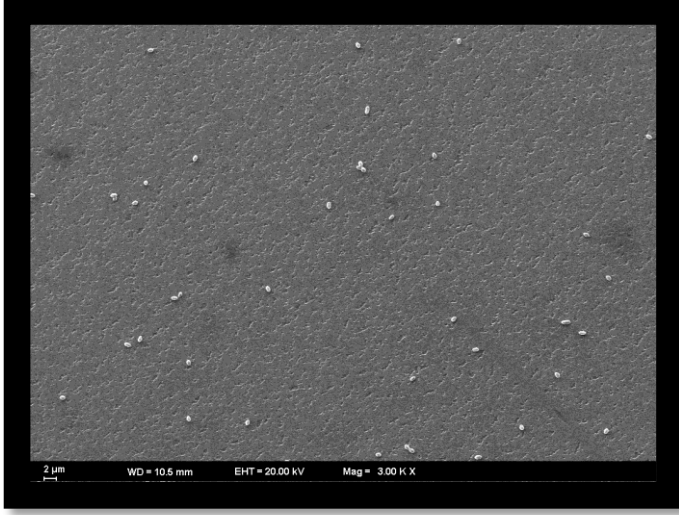
Şekil 5.25. *E. faecalis* OG1RF kontrol suşunun oluşturduğu biyofilm yapısının Nisin (2000 IU/mL) ile muamelesi sonucu elde edilen SEM görüntüsü



Şekil 5.26. *E. faecalis* OG1RF kontrol suşunun oluşturduğu biyofilm yapısının Nisin (2000 IU/mL)+CHX (%0.0002) ile muamelesi sonucu elde edilen SEM görüntüsü



Şekil 5.27. *E. faecalis* OG1RF kontrol suşunun oluşturduğu biyofilm yapısının Nisin (2000 IU/mL)+NaOCl (%0.5) ile muamelesi sonucu elde edilen SEM görüntüsü



Şekil 5.28. *E. faecalis* OG1RF kontrol suşunun oluşturduğu biyofilm yapısının Nisin (2000 IU/mL)+EDTA (5 mM) ile muamelesi sonucu elde edilen SEM görüntüsü

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enterokoklar, dünya genelinde (özellikle *Staphylococcus aureus*, grup A streptokoklar veya pnömokoklarla karşılaştırıldığında) tehlikeli patojen niteliğindeki mikroorganizmalardır. Son yıllarda sağlık ve gıda alanında karşılaşılan bakteri kaynaklı sorunların en büyük kaynağı olarak değerlendirilmektedirler. Gıdaların doğal florasında bulunmasının yanında, starter kültür kapasitelerinden dolayı da gıda endüstrisinde önemli bir yere sahiptirler. Fakat enterokok suşlarının içerdiği virülans genler, antibiyotik direnç özellikleri ve oluşturdukları biyofilm yapıları nedeniyle, enterokokların gıda endüstrisinde starter kültür olarak kullanılıyor olması araştırmacılar arasında tartışma yaratmaktadır (14). Bu suşlar süt ve süt ürünlerinde, et ürünlerinde, hazır gıdalarda bulunabilmekte ve hatta probiyotik olarak kullanılan enterokok suşları dahi antibiyotiklere karşı dirençli olabilmektedir (46). Enterokok suşlarından özellikle *E. faecalis*, hastane enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı patojenler olarak son yıllarda daha sık karşımıza çıkmaktadır. Bu bakteri, özellikle idrar yolu enfeksiyonları, bakteriyemi, menenjit, cerrahi yara enfeksiyonları, yeni doğan enfeksiyonları gibi birçok hastane kaynaklı enfeksiyonun kaynağını oluşturmaktadır (14).

Biyofilmler, yüzeylere tutunan bir grup bakteri tarafından oluşturulan ve yüzeyi bakteri hücrelerinin ürettikleri hücre dışı polimerik matrisle kaplı olan bir yapıdır. Biyofilmi oluşturan hücreler, çok hücreli formlara benzer gelişme fizyolojisi ve genetik ifade göstermeleri sonucu, planktonik formlarından çok farklı yapısal ve fonksiyonel özellikler sergilerler. Bakteri hücreleri evrimsel süreçte, biyofilm yapısı içerisinde çok iyi kolonize olma yeteneğini kazanmış ve en zorlu şartlar altında dahi yaşamlarını devam ettirebilme yeteneğine sahip olmuştur (31). Günümüzde, özellikle patojen mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerle yürütülen çalışmalarda ana hedef; genetik ve biyokimyasal esasının belirlenmesi suretiyle biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesi ve eradikasyonunun sağlanmasıdır. Fakat biyofilmlerin içerisinde var olan farklı yapılar ve bakteriler, biyofilm yapılarının antimikrobiyal ajanlara karşı direnç kazanmasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra klasik sanitasyon, dezenfeksiyon ve sterilizasyon ajanları ve yöntemlerine karşı, biyofilmlerin içerisinde yer alan suşlar planktonik formlarından çok daha yüksek düzeyde direnç göstermektedirler. Bu nedenle günümüzde mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesi ve eradikasyonunda temel stratejiler; patojen bakterilerin planktonik formları değil, biyofilm yapıları dikkate alınarak belirlenmektedir (40). Mikrobiyal enfeksiyon ve kontaminasyonlarla mücadelede kullanılan ajanların ve yöntemlerin çevre ve

insan sağlığına karşı olumsuz etkiler içermesi, biyofilm yapıları ile mücadelede yeşil biyoteknolojik ajanların bulunması ve bu doğrultuda mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi zorunluluğunu doğurmuştur.

Bakteriyosinler, prokaryotik antimikrobiyal proteinler veya antimikrobiyal peptitlerdir. Genellikle katyonik ve hidrofobik yapıdaki bu moleküller, çeşitli patojenlere karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal etki gösterebilen ve potansiyel biyoteknolojik uygulamalara olanak sağlayan, yeşil biyoteknolojik ajanlardır (67). Özellikle günümüzde gıda kaynaklı patojenlerin yol açtığı problemlerin olması ve gıdaların bozulmaması için kullanılan kimyasal koruyucuların istenilmemesi sebebiyle, yeni ve güvenilir biyokoruyuculara olan ilgi giderek artmıştır. Bu nedenle bakteriyosinler, çeşitli ilaçlara karşı direnç kazanmış olan mikroorganizmaların kontrolünde çok önemli bir seçenek oluşturmuştur. Birçok bakteriyosin insan, bitki ve hayvan sağlığını korumak ve gıda kalitesini ve güvenliğini geliştirmek amacıyla araştırılmaktadır (116).

Yeşil biyoteknolojik ajan ve yöntemlerin geliştirilmesi doğrultusunda tasarladığımız çalışmamızdaki temel amaçlardan biri; klinik ve endüstriyel anlamda ciddi bir sorun haline gelen *E. faecalis* suşlarının biyofilm yapılarının oluşumunun engellenmesinde ve oluşan biyofilmlerin eradikasyonunda, peynir starter kültürlerinin temel bileşeni olan *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin bakteriyosininin saf formunun ve araştırma grubumuz tarafından izole edilerek tanımlanan nisin reticisi *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 suşunun nisin üretimi ve etkinliği bakımından optimize edilmiş bir mutantının (*L. lactis* subsp. *lactis* LAC339, Şimşek vd., 2009) *E. faecalis* biyofilminin oluşumu ve eradikasyonundaki etkinliğini araştırmaktır (117). Nisin, tüm dünyada insan ve evre üzerinde yan etki içermeyen GRAS (Generally Recognized As Safe) bir bakteriyosin olarak tanımlanmıştır. Nisin, zellikle Gram-pozitif bakterilerle mücadelede kullanılmaktadır (66). Ancak daha önce de belirtildiği gibi, nisinin *E. faecalis* biyofilm yapıları üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma henüz yoktur. Dolayısı ile tez çalışmamıza benzer bir çalışma literatürde yer almamaktadır.

E. faecalis'in planktonik formlarına karşı nisinin yüksek düzeyde etkinlik gösterdiği çalışma grubumuz tarafından daha önceden belirlenmiştir (9). Çalışmamızın ilk basamağında; ticari nisin (Nisaplin), *L. lactis* LL27 ve *L. lactis* LAC339 tarafından sentezlenen nisin bakteriyosinlerinin, denemelerde kullanılan *E. faecalis* suşlarının planktonik formlarının inhibisyonunda kullanılan konsantrasyonları ile, diğer dezenfektanların (CHX, NaOCl ve

EDTA) bu suşların planktonik formlarının inhibisyonunda kullanılan konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Bu aşamada nisin ve diğer dezenfektanların, *E. faecalis* suşlarına karşı etkisi MİK ve MBC düzeyleri esas alınarak belirlenmiştir. Belirlediğimiz MİK değerleri, bakteri gelişimini engelleyen en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonlarını ifade etmektedir. Denemeler sonucunda, nisin bakteriyosinlerinin ve kullanılan diğer dezenfektanların çok düşük konsantrasyonlarda dahi *E. faecalis* suşlarının gelişimini engellediği saptanmıştır. Çalışmada ticari nisin için elde ettiğimiz MİK değeri genel olarak 50 IU/mL konsantrasyonunun altındadır. *L. lactis* LL27 ve *L. lactis* LAC 339 suşları tarafından üretilen nisin bakteriyosinlerinin elde edilen MİK değerleri ise genel olarak 100 IU/mL konsantrasyonunun altındadır. Ancak, ticari nisinin daha düşük konsantrasyonunun, grubumuz tarafından izole edilen *L. lactis* LL27 ve nisin üretim özelliği genetik mühendisliği teknikleri ile artırılmış varyantı *L. lactis* LAC339 tarafından üretilen nisinden daha etkili olduğunu söylemek mümkündür. Lakin ticari olarak sağlanan nisinin kullanımı hem ekonomik açıdan daha maliyetli olmakta hem de dışa bağımlılığı sürdürmektedir. Bu kapsamda tez çalışmamızda kullandığımız farklı nisin bakteriyosinlerinin etkilerini değerlendirdiğimizde, etkinliğini daha yüksek konsantrasyonda gösterse de grubumuz tarafından izole edilen *L. lactis* LL27 ve yine tarafımızdan tasarlanan *L. lactis* LAC339 kodlu suşun ileri aşamalarda farklı alanlarda da kullanılabilme potansiyeli taşıdığını söylemek mümkündür.

Khan vd., (2014) nisin bakteriyosininin Gram-pozitif bakteriler üzerindeki inhibisyon etkisini gözlemek için yaptıkları çalışmalarda, nisin için belirlenen inhibisyon etkisine sahip konsantrasyon 125-150 IU/mL aralığında değişmektedir (118). Bauttefroy vd. (2000) tarafından yürütülen çalışmada ise genel olarak 50 IU/mL konsantrasyonundaki nisinin, Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (119). Genel olarak nisin ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen en önemli sonuç, nisinin ortamın pH değerinden çok çabuk etkileniyor olmasıdır. Yüksek asiditeye sahip olan ortamlarda nisinin patojenler üzerindeki inhibisyon etkisinin arttığı gözlenmiştir (24). Nisinin yüksek asiditeye sahip olan ortamlarda gösterdiği antimikrobiyal etki Tong vd., (2010) tarafından endodontoloji alanında yapmış oldukları çalışmalarla araştırılmıştır. Özellikle ağız boşluğunda enfeksiyona neden olan bakteriler Gram-pozitif bakteriler olduğundan dolayı, çalışmalarında *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus fermenti* ve *Lactobacillus acidophilus* bakterileri üzerinde nisinin öldürücü etkisini araştırmış ve nisinin önemli ölçüde etkili olduğunu saptamışlardır. Aynı zamanda ağız içinin düşük pH değerine sahip olması, burada salgılanan enzimlerin nisine zarar

vermemesi ve özellikle ortamda Gram-pozitif bakterilerin bulunması, nisinin antimikrobiyal aktivitesini göstermesindeki en büyük etkenler olduğunu belirtmişlerdir (120). Denememizde kullanılan nisin bakteriyosinleri kendi aralarında sıralandığında, en yüksek etkiyi ticari nisin gösterirken, en düşük etkiyi ise *L.lactis* LAC339 suşu tarafından sentezlenen nisin bakteriyosini göstermiştir. Bu durumun, tarafımızdan saflaştırılan nisinin saflığının, ticari nisinden daha az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer dezenfektanların MİK ve MBC değerleri incelendiğinde, onların da çok düşük konsantrasyonlarda *E. faecalis* suşları üzerinde etkili oldukları tespit edilmiştir. MİK ve MBC çalışmaları sonucunda planktonik formlar üzerine en etkili ajan CHX olarak bulunmuştur. Çok düşük bir konsantrasyonda dahi (%0.0002) *E. faecalis* suşlarının tamamına yakını öldürmüştür. Daha önceki çalışmalara bakıldığında da CHX dezenfektanının patojen bakteriler üzerinde çok etkili bir dezenfektan olduğu bilgisine rastlanmaktadır. CHX özellikle endodonti alanında *E. faecalis* patojenlerinin inhibisyonu amacıyla kullanılmaktadır. En etkin konsantrasyonu ise %2 olarak belirtilmektedir (121–123). CHX'in insan sağlığına olan zararlı etkilerinden dolayı, özellikle endodonti alanında CHX'in kullanımını indirmek amacıyla Tong vd., (2014) tarafından ağız boşluğunda sıkça bulunan ve çok çeşitli enfeksiyonlara neden olan *E. faecalis* ATCC 29212 suşuyla yapılmıştır. Nisin ve CHX ile yaptıkları çalışmada, nisinin de CHX kadar *E. faecalis* suşları üzerinde etkili olduğunu saptamışlardır (124). Her iki antimikrobiyal maddenin de çalışma mekanizması aynı olduğundan, günümüzde bu alanda yapılan çalışmalar CHX'in yerine nisin kullanımını destekler niteliktedir. Çalışmamızda kullandığımız bir diğer antimikrobiyal ajan olan NaOCl, etki mekanizması bakımından CHX ile benzerlik göstermektedir (123). Daha önce de belirttiğimiz gibi NaOCl, güçlü antimikrobiyal etkisi ve organik yapıdaki maddeleri kolayca çözebilmesi nedeniyle özellikle endodonti alanında en sık kullanılan dezenfektanlar arasında yer almaktadır. NaOCl'nin bu avantajlarının yanı sıra, dental plakları tam olarak temizleyememesi, yüksek toksisiteye sahip olması, kullandıkları cihazlarda korozyona neden olması gibi birçok dezavantajı da bulunmaktadır (125). Her iki ajanın da birarada kullanıldığı çok sayıda çalışma literatürde yer almaktadır. Bu çalışmalardan biri Cintra vd., (2013) tarafından diş köklerinin temizliğinde CHX ve NaOCl ajanlarının beraber kullanılmasının etkilerinin araştırıldığı çalışmadır (126). Yaptıkları çalışmanın sonucunda iki ajanın beraber kullanılmasıyla, turuncu renkte ve toksisitesi oldukça yüksek olan bir çökeltinin meydana geldiğini belirlemişlerdir. Parakloroanilin (PCA) adı verilen bu çökeltinin, CHX ve NaOCl arasında meydana gelen asit-baz tepkimesi sonucunda oluştuğunu saptamışlardır. Çalışmanın devamında ise, oluşan PCA

çökeltisinin oranının, kullanılan NaOCl ile doğru orantılı olduğu araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir. Cintra vd., (2013) yapmış oldukları bu çalışma sonucunda, özellikle ağız temizliğinde beraber kullanılan bu iki ajanın insan sağlığı açısından çok zararlı olacağı belirtilmiştir (126). Dubey vd., (2016) tarafından *E. faecalis* suşlarıyla yapılan çalışmada, %2.5 konsantrasyonundaki NaOCl'nin, *E. faecalis* suşlarının üzerinde önemli derecede antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (127). NaOCl ve CHX dezenfektanlarıyla beraber yapılan bir başka çalışma ise Jeansonne vd., (1994) tarafından geręekleřtirilmiřtir. CHX ve NaOCl dezenfektanlarının hangisinin *E. faecalis* suşları üzerinde en çok etkiye sahip olduğunu belirlemek amacıyla geręekleřtirilen bu çalışmada, %2.0 konsantrasyonundaki CHX'in *E. faecalis* suşları üzerinde, %5.25 konsantrasyonundaki NaOCl'den daha etkili olduğu bulunmuştur (128). Delany vd., (1982) tarafından yürütölen çalışmada ise, %0.2 konsantrasyonuna sahip olan CHX'in ağızda yer alan patojen bakteriler üzerinde yüksek oranda öldürücü etkiye sahip olduğu bulunmuştur (129). NaOCl ve EDTA dezenfektanlarının, *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışma Baumgartner vd., (2007) tarafından yapılmıştır (130). %5.25 konsantrasyonundaki NaOCl ve %15 konsantrasyonundaki EDTA'nın beraber kullanılmasının, özellikle implantlarda yer alan patojenlerin temizlenmesinde oldukça etkili olduğu, araştırma sonucunda belirlenmiştir (130). Çalışmamızda da *E. faecalis* suşları üzerinde CHX ve NaOCl ajanlarının göstermiş oldukları etki, literatür verileri ile paralel bir şekilde, birbirlerine çok yakın olarak bulunmuştur.

Zaman-Ölüm denemelerinde ise, çalışmamızda kullandığımız dezenfektanların etkisinin ne kadar sürede geręekleřtięi tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda, nisin bakteriyosininin sadece ticari nisin (Nisaplin) olan formu denemeye alınmıştır. Kullanılan dezenfektanların, 6,12 ve 24 saat inkübasyonları sonrasında *E. faecalis* suşlarına karşı elde edilen MİK değerleri, bu dezenfektanların farklı etkinliklere sahip olduğunu kanıtlamıştır. Veriler incelendiğinde, nisinin etkisini en çok 6 saat inkübasyon süresi sonunda göstermiş olduğu saptanmıştır. Nisinin genel yapısı incelendiğinde, bulunduğu ortamda çok uzun süre kalamayan ve hemen yapısı bozulan protein veya peptit yapıda bir molekül olduğu bilinmektedir (131). Bu nedenle nisinin, tek başına kullanıldığında etkisini 6 saat inkübasyon süresi sonunda göstermesi, nisin hakkındaki mevcut bilgilerimiz ile uyumludur. Hatta bu inkübasyon süresi içerisinde göstermiş olduğu inhibitör etkisi diğer ajanlara oranla oldukça yüksektir. 12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde, suşlar üzerinde çok fazla etkili olamamasının nedeni olarak çok çabuk bozulan (degrade olan) yapısı gösterilebilir. Bu nedenle nisinin konsantrasyonun arttırılması ya da sürekli sistemlerle

ortama kademeli olarak nisin ilave edilmesi ile daha etkili sonuçlar elde etmek mümkün olacaktır. Diğer ajanlara bakıldığında, her 3 inkübasyon süresinde de en etkili ajan CHX olarak bulunmuştur. Test edilen her 3 inkübasyon süresinde de birbirine yakın sonuçlar elde edilse de, görece en etkili sonuç 6 saat inkübasyon süresi sonunda sağlanmıştır. CHX'ten sonra enterokok türlerinin planktonik formları üzerinde en etkili ajanın EDTA olduğu belirlenmiştir. Tüm inkübasyon süreleri sonunda göstermiş oldukları etki birbirine oldukça yakın bulunmuştur. En düşük etkiyi ise NaOCl ajanı göstermiştir. Nisin dışında kullanılan ajanlardan elde edilen bulguların, daha önceden yapılan çalışmalarla paralellik taşıdığı görülmektedir. Bu 3 dezenfektanın tüm suşlar üzerindeki öldürücü etkisi aynı iken, nisin 6 saat inkübasyon süresinin sonunda gıda kökenli *E. faecalis* 73 suşu üzerinde en yüksek öldürücü etkiyi sergilemiştir.

Antimikrobiyal maddelerin minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyonlarının (MBEC) belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, *E. faecalis* suşlarının, 12, 18 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonunda oluşturdukları biyofilm yapısı üzerinde dezenfektanların etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde, oluşan biyo-film-lerin eradikasyonunda en etkili ajanın NaOCl olduğu ve en etkin NaOCl konsantrasyonunun ise %2 olduğu saptanmıştır. NaOCl ajanının biyo-film-ler üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalarda genel olarak etkin konsantrasyon %5-6 olarak belirlenmiştir (97,121). Fakat yapılan bir çalışmada, *E. faecalis* suşu tarafından oluşturulan biyo-film-lerin eradikasyonunda %1 konsantrasyonunda NaOCl'nin etkili olduğu saptanmıştır (99). Çalışmamızda elde edilen veriler istatistiki değerlendirmeye tabi tutulduğunda; %0.05'in üzerinde kullanılan tüm NaOCl konsantrasyonlarının (%0.25, %0.5, %1, %2) *E. faecalis* biyo-film-leri üzerinde yaklaşık olarak aynı etkiyi gösterdiği görülmektedir. Diğer ajanlar için, olgun biyo-film-lerin eradikasyonundaki en etkili EDTA ve CHX konsantrasyonlarının inkübasyon süresine ve suşlar tarafından oluşturulan biyo-film-in yapısına göre değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. MBEC çalışmasında kullanılan nisin konsantrasyonları, yapılan istatistiki analizler sonucunda anlamlı olarak değerlendirilememiştir ($p < 0.01$). Literatür verilerinde, nisin'in tek başına patojen suşların oluşturdukları biyo-film-lerin eradikasyonunda başarılı olmadığı, başka dezenfektanlarla beraber kullanıldığında daha etkili sonuçlar verdiği sonucu öne çıkmaktadır (119,132). Özellikle nisin'in, biyo-film-lerin dış kısmında bulunan EPS'nin yapısını bozabilen ajanlarla beraber kullanımı oldukça olumlu sonuçlar vermektedir (133,134). Nisin ve EDTA'nın beraber kullanımının, gıdaların raf ömrü üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışma Economou vd., (2009) tarafından yürütülmüştür (133). Yaptıkları çalışmada tavuk etinin raf ömrünü uzatmak amacıyla belirli

konsantrasyonlarda nisin ve EDTA'nın beraber kullanımının *Pseudomonas* sp. ve enterobakter gibi Gram-negatif bakterilerin ve *Brochothrix thermosphacta* ve laktik asit bakterileri gibi Gram-pozitif bakterilerin üremelerini büyük oranda engellediklerini saptamışlar ve tavuk etinin raf ömrünün en az 4 gün daha uzadığını belirlemişlerdir (133). Nisin ve EDTA'nın beraber kullanımının araştırıldığı bir diğer çalışma Kopermsub vd., (2011) tarafından yapılmıştır (134). Nisin ve EDTA'nın beraber gösterdikleri antimikrobiyal etki süresinin uzatılmasını amaçladıkları bu çalışmada "Niosom" adı verilen ve liposomların yapısına benzeyen, kapsül şeklinde noniyonik sürfaktanlar kullanılmıştır. *Staphylococcus aureus* ve *E.coli* suşlarının kullanıldığı bu çalışmada, kapsül içine alınan nisin ve EDTA bileşenlerinin etki sürelerinin uzadığı tespit edilmiştir (134). Daha önce nisinin gıda koruyucu olarak kullanıldığı çalışmalar incelendiğinde, nisinin gıdada bulunan indirgenmiş şekerlerle Maillard reaksiyonuna girerek, lipit ve proteinlerle spesifik olmayan bağlar oluşturduğu saptanmıştır (135,136). Bunun yanı sıra, taze gıdalarda koruyucu olarak kullanılan nisinin, gıdalardaki proteazlar tarafından parçalandığı yine araştırmalar sonucunda belirtilmiştir (137). Kopermsub vd., (2011)'nin yaptıkları bu çalışmayla nisinin serbest halde kullanılması sonucunda belirlenen dezavantajların önüne geçilmiş ve EDTA gibi antimikrobiyal maddelerle kullanımı ile patojen bakteriler üzerinde göstermiş oldukları antimikrobiyal etki sürelerinin uzatılmasına ek olarak, ajan kombinasyonlarını daha aktif hale getirmişlerdir (134).

Sinerjetik etki denemelerinden elde edilen veriler, nisinin diğer dezenfektanlarla kombinasyonunun, antibakteriyel etkinliklerine pozitif katkıda bulunduğuna işaret etmiştir. Özellikle nisin ve EDTA ajanının beraber kullanımı, *E. faecalis* suşlarının planktonik formları üzerinde en etkili sonucu vermiştir. Diğer en etkili kombinasyon ise nisin ve NaOCl'nin oluşturduğu kombinasyondur. En düşük etkiyi gösteren ikilinin ise nisin ve CHX olduğu saptanmıştır.

Patojen bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin eradikasyonunda EDTA önemli bir role sahiptir. Özellikle Gram-negatif bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin eradikasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakterilerin hücre duvarlarının yapısında lipopolisakkaritler ve gliserofosfolipitler bulunmaktadır. Metal iyonlarla şelat oluşturabilen EDTA, bu bakterilerin dış zarlarında yer alan LPS'nin yapısında bulunan divalent katyonlara (Ca^{+2} , Mg^{+2}) bağlanarak zarın stabilizasyonunu bozmaktadır. Sonuç olarak hücre duvarı zarar görmüş bakteriler, bakteriyosinlere maruz kaldıklarında, daha kolay etkilenmektedirler (105). Bu iki inhibitör

ajanın beraber kullanıldığı çalışmalardan biri Tu vd. (2002) tarafından yürütülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda nisin ve EDTA kombinasyonunun, *Salmonella* Typhimurium patojeninde etkili olduğu tespit edilmiştir (138). Çalışmamızda ise *E. faecalis* suşlarının inhibisyonunda, nisin ve EDTA'nın beraber kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar, her iki ajanın da tek tek kullanılmasıyla elde edilen sonuçlara oranla oldukça yüksektir. Çalışmanın son basamağı olan ve *E. faecalis* OG1RF kontrol suşunun oluşturduğu biyofilmlerin eradikasyonunda çeşitli ajanların birlikte kullanılarak göstermiş oldukları etkilerin SEM ile görüntülenmesinde de en etkili inhibitör kombinasyonunun nisin ve EDTA tarafından oluşturduğu gözlenmiştir. Nisin ve EDTA'nın birbirleriyle olan sinerjetik etkilerini gösteren bir çalışma da Branen vd., (2003) tarafından *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis* ve *Pseudomonas fluorescens* suşları kullanılarak yapılmıştır (139). Yapılan çalışmada suşlar 18 ve 24 saatlik inkübasyonlarından sonra, EDTA ve nisin ayrı ayrı kullanımının yanısıra sinerjetik etki yöntemi kullanılarak birlikte etkileri de araştırılmıştır. Çalışmada kullandıkları EDTA'nın konsantrasyonu Gram-negatif patojenler için 156-10.000 µg/mL arasında değişirken, nisin konsantrasyonu 3.9-46.9 µg/mL (156.25-1875 IU/mL) arasında değişmiştir. Gram-pozitif patojenler için kullanılan EDTA'nın konsantrasyonu 7.8-500 µg/ml arasında iken nisin konsantrasyonu 1.95-31.3 µg/mL (78.125-1251.3 IU/mL) arasında değişmiştir (139). Elde ettikleri MİK ve MBC değerlerini incelediklerinde ise, 250 µg/ml konsantrasyonundaki EDTA'nın *L. monocytogenes* patojeninin üremesini engellediği, 1250-5000 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda ise Gram-negatif bakterilerin üremelerini engellediği saptanmıştır. Fakat EDTA'nın hiçbir suş için bakterisidal etki göstermediği belirlenmiştir. 312.5 IU/mL konsantrasyonundaki nisin tek başına kullanıldığında, *L. monocytogenes* suşunun hem üremesini engellediğini (bakteriyostatik etki) hem de bakterisidal etki gösterdiğini, fakat tek başına kullanıldığında Gram-negatif bakterilere karşı etkili olmadığını belirtmişlerdir. Nisin ve EDTA, *L. monocytogenes* ve *E. coli* patojenlerine karşı beraber kullanıldıklarında sinerjetik etki göstermiş, fakat *Salmonella* ve *Pseudomonas*'a karşı birlikte kullanımlarında çok az etki edebildikleri belirtilmiştir. Nisin ile beraber kullanıldıklarında düşük konsantrasyonlardaki EDTA'nın yeterli olduğu, yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında ise patojenler üzerindeki aktivitelerinde hiçbir değişiklik oluşmadığı bulgular arasında yer almaktadır (139). Branen vd., (2003) tarafından yapılan bu çalışmada yüksek konsantrasyonlardaki EDTA ve nisin, patojenlerin planktonik formları üzerinde etkili oldukları gözlemlenirken, tarafımızdan

yürütülen çalışmada düşük konsantrasyonlarda EDTA ve nisin beraber kullanımının *E. faecalis* patojenlerinin oluşturdukları biyofilm yapılarını dahi eradike edebildiği belirlenmiştir.

Biyofilmlerin eradikasyonunda en çok kullanılan ajanlardan biri de NaOCl'dir. Özellikle endodonti alanında, *E. faecalis* patojenlerinin oluşturmuş olduğu biyofilmlerin eradikasyonunda NaOCl yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, biyofilmlerin eradikasyonunda kullanılan en etkin NaOCl konsantrasyonunun %0.5-%5.25 arasında olduğu belirlenmiştir (100,140). Kozol vd., (1988) tarafından yapılan araştırmada, klinik kullanımlarda insan sağlığına karşı en az tehlike arz eden NaOCl konsantrasyonunun %0.025 olduğu belirtilmiştir (141). NaOCl ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda ise, NaOCl'nin sitotoksik ve bakterisidal etkisini gösterebilmesi için en az %0.5 konsantrasyonunda kullanılması gerektiği vurgulanmıştır (142). Çalışmamızda gerçekleştirilen denemeler sonucu, *E. faecalis* suşlarının planktonik formları üzerinde en etkin NaOCl konsantrasyonunun %0.5 olduğu görülmektedir. Bu bulgumuz, Pashley vd., (1985) tarafından önerilen konsantrasyon ile uyumludur (142). Zaman-Ölüm denemelerine, %0.5 konsantrasyonundaki NaOCl ajanı, suşlar üzerindeki en yüksek öldürücü etkisini 6 saat inkübasyon süresi sonunda göstermiştir. MBEC denemelerinde de en etkili ajan NaOCl olarak belirlenmiştir. NaOCl ajanının MBEC çalışmalarından elde edilen veriler için yapılan varyans analizi sonucunda, değerler %1 oranında anlamlı bulunmuştur. Ardından *E. faecalis* suşları ve NaOCl ajanının interaksyonu için yapılan Duncan analizinde ise, *E. faecalis* biyofilmlerinin eradikasyonu için kullanılan tüm NaOCl konsantrasyonlarının yaklaşık olarak aynı etkiyi gösterdiği saptanmıştır. Eradikasyonda en düşük etkiyi %0.05 konsantrasyonundaki NaOCl göstermiştir. Çalışmamızda NaOCl ile yürütülen denemelerden elde edilen bulgular, yukarıda özetlenen literatür verileri ile uyumludur.

Antimikrobiyal ajan olarak kullanılmasının yanında, NaOCl'nin insan sağlığını ve çevreyi etkileyen birçok dezavantajı da bulunmaktadır. Yüksek sitotoksik etkisi, ağır bir kokuya sahip olması ve solunumunun zararlı olması, metal korozyonlarına neden olması NaOCl'nin en önemli dezavantajları arasında yer almaktadır (97,142). NaOCl ajanı, genel olarak etkisini bakteri için önemli olan enzimleri inhibe ederek gösterir (98). Fakat *E. faecalis* gibi patojen nitelikteki mikroorganizmalar, NaOCl'ye karşı direnç gösterebilmektedirler (123). NaOCl'nin yüksek konsantrasyonlarda kullanılmasının insan sağlığı açısından oldukça zararlı olduğu bilinmektedir (102). Bu nedenle, yaptığımız çalışmalarda NaOCl ajanını nisin bakteriyosini ile

beraber kullanarak, *E. faecalis* suşları tarafından oluşturulan biyofilm yapılarının eradikasyonunda uygulanacak olan etkin dezenfektan konsantrasyonunun düşürülmesi hedeflenmiştir. NaOCl ve nisin arasındaki sinerjetik etkinin belirlenebilmesi için yaptığımız çalışmada ise, genel olarak birbirlerinin antimikrobiyal etkilerine pozitif katkıda buldukları saptanmıştır. Nisin ve NaOCl'nin Enterokokal biyofilm yapıları üzerine etkinliğinin belirlendiği ve sinerjetik etkileşiminin tanımlandığı ilk bulgular olması açısından verilerimiz bilimsel ve teknolojik açıdan önem arz etmektedir. Bu etkinlik söz konusu konsantrasyonlarda farklı çevresel parametreler incelenerek detaylandırılması, ileri araştırmaların yapılmasını gerektirmektedir.

E. faecalis suşlarının gelişiminin engellenmesinde en çok kullanılan ajanlardan bir diğeri ise CHX'tir. CHX, katyonik bisguanit yapıda olan bir dezenfektandır. Bakteriler üzerindeki hedef bölgesi olan, hücre duvarı üzerinde bulunan negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime girmek suretiyle, hücre duvarı üzerinde por oluşturarak zarın geçirgenliğini artırır ve hücre içi dengenin bozulmasıyla hücrenin ölümüne neden olurlar (143). CHX, düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında potasyum ve fosfor gibi küçük moleküller hücreyi terk ederken, daha yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında ise hücre sitoplazmasının presipitasyonuna ve/veya koagülasyonuna neden olmaktadır (102). CHX ve nisin ile yapılan çalışmalar, her iki ajanın da etki mekanizmasının yaklaşık olarak aynı olduğunu göstermiştir. Her iki ajan da bakteri hücre duvarında por oluşturarak, hücrenin ölümüne neden olmaktadır (124,143). Ağız florasında yoğun olarak bulunan *E. faecalis* suşlarının planktonik formlarının eradikasyonunda Tong vd., (2014) tarafından yapılan çalışmada nisin ve CHX ajanı beraber kullanılmıştır. Çalışmada, her iki ajanının tek başına kullandıklarında göstermiş oldukları etkiyi, beraber kullandıklarında gösteremedikleri saptanmıştır. Bu durumun en önemli nedeninin, her iki ajanın da etki mekanizmasının aynı oluşu olarak yorumlamışlardır (124). Tarafımızdan yürütülen çalışmada ise, CHX ve nisin ajanlarının tek başına kullandıklarında elde edilen sonuçlar ve beraber kullandıklarında elde edilen sonuçlar, daha önceden farklı kültürler ile yapılan bu çalışma bulguları ile benzerlik taşımaktadır. Fakat daha önce *E. faecalis* suşlarının oluşturmuş olduğu biyofilmlerin eradikasyonunda bu iki ajanın beraber kullanıldığı bir çalışma literatürde yer almamaktadır. *E. faecalis* suşlarının oluşturduğu biofilmlerin eradikasyonu ile ilgili olan çalışmamızda CHX ve nisin beraber kullanılmasıyla, olgun biyofilmlerin eradikasyonunun tam olarak gerçekleştirilemediği saptanmıştır. *E. faecalis* biyofilm yapıları üzerinde nisin ve

diğer dezenfektanların birlikte etkisinin araştırıldığı bir çalışmanın literatürde bulunmayışı, sonuçlarımızı kıyas yaparak tartışma olanağı tarafımıza sunmamaktadır.

Bakteriyosinlerle yapılan çalışmalar sonucunda; bakteriyosinlerin diğer antimikrobiyal ajanlarla ya da çok çeşitli fenolik bileşiklerle beraber kullanıldığında, hedef mikroorganizmanın ortamdaki eradikasyonunda daha etkili oldukları belirlenmiştir (144). Özellikle patojen bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin eradikasyonunda tek bir ajanın yeterli derecede antimikrobiyal etki gösteremediği, biyofilmlerin üzerinde yer alan polimerik matriksi temizleyemediği ve organik kalıntıları yeterli derecede çözemediği saptanmıştır (98).

Çalışmamızda kullandığımız *E. faecalis* suşları, birçok antibiyotiğe, kimyasal ve mekanik temizleme yöntemlerine ve birçok antiseptiğe karşı direnç gösteren nazokomiyal enfeksiyonların en önemli sebebini oluşturan bakteri türüdür. Günümüzde *E. faecalis* patojenine karşı en çok kullanılan dezenfektanlar CHX ve NaOCl'dir (99,121,145). Yıllardır kullanılan bu dezenfektanların hem insan hem de çevre üzerine olumsuz birçok etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle yaptığımız çalışmada, *E. faecalis* tarafından oluşturulan biyofilmlerin eradikasyonunda kullanılan kimyasalların yanında, yeşil bir ajan olan nisin bakteriyosininin kullanılmasının, kimyasalların konsantrasyonunu düşürdüğü ve böylece insan sağlığı ve çevre açısından çok önemli bir alternatif oluşturduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda, nisin bakteriyosini ile beraber kullanıldıklarında, özellikle NaOCl ve EDTA ajanlarının düşük konsantrasyonlarda dahi oldukça etkili oldukları belirlenmiştir. Daha önce de bahsedilen özelliklerinden dolayı, nisine karşı bakterilerin direnç geliştirmesinin çok zor olması, çevre ve insan sağlığına karşı yan etkilerinin bulunmayışı, nisinin önemini ve kullanım potansiyelini oldukça arttırmaktadır. Bu konuda literatürde herhangi bir çalışmanın yer almaması, yapılan bu araştırmanın orijinalitesini göstermektedir. Tez kapsamında elde edilen bu veriler, literatüre bu konu hakkında katkı sağlayacak ve konunun daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacak niteliktedir. Diğer yandan nisin/NaOCl ve nisin/EDTA preparatlarının ticari kullanım potansiyellerinin araştırılması, çalışmamız sonuçlarının uygulamada kullanımını belirleyecek ana unsurdur. Bu anlamda, bulgularımız ve tespit ettiğimiz etkin konsantrasyonların söz konusu çalışmalara ivme kazandırması olasıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 2000;182(10):2675–2679.
2. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* 2012;45(2):502–531.
3. Donlan RM, Costerton JW, Donlan RM, Costerton JW. Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002;15(2):167–193.
4. Alice S. Prince MD. Biofilms, Antimicrobial Resistance, and Airway Infection. *N. Engl. J. Med.* 2002;347(14):1110–1111.
5. McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering RC, Gilmore MS. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 2007;2(7). doi:10.1371/journal.pone.0000582.
6. Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Hellwig E, Arweiler N, Vach K, Wittmer A, Al-ahmad A. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical specimens, and Oral sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* 2015;6(January). doi:10.3389/fmicb.2015.01534.
7. Franz CM. AP, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 1999;47(1-2):1–24.
8. Holmberg A, Rasmussen M. Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly resistant to antibiotics. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015;84(1):10–12.
9. Şanlıbaba P, Akkoç N, Akçelik M. Identification and Characterisation of Antimicrobial Activity of Nisin A Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27. *Czech J. Food Sci.* 2009;27(1):55–64.
10. Murray BE. The Life and Times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990;3(1):46–65.
11. Lancefield RC. The Serological Differentiation of Pathogenic and non-pathogenic Strains of Hemolytic Streptococci From Parturient Women. *J. Exp. Med.* 1935;61(3):335–349.

12. Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 1997;36:1–29.
13. Devriese LA, Pot B, Van Damme L, Kersters K, Haesebrouck F. Identification of Enterococcus species isolated from foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 1995;26(2):187–197.
14. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012;10(4):266–278.
15. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 2006;106(1):1–24.
16. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 2007;56(12):1581–1588.
17. Talebi M, Moghadam NA, Mamooii Z, Enayati M. Antibiotic Resistance and Biofilm Formation of Enterococcus faecalis in Patient and Environmental Samples. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(10). doi:10.5812/jjm.23349.
18. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001;67(4):1628–1635.
19. Palmer KL, Kos VN, Gilmore MS. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2010;13(5):632–639.
20. Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance. *Immunology* 2013;138(1):1–11.
21. Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant Enterococcus faecalis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991;35(8):1626–1634.
22. Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, Solliday J, Clarke B. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989;33(9):1588–1591.
23. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar N Ben. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 2007;120(1-2):51–70.

24. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2007;13(4):194–199.
25. Franz C. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 2003;88(2-3):105–122.
26. Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. Enterococci in the Environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012;76(4):685–706.
27. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Putative Surface Proteins Encoded within a Novel Transferable Locus Confer a High-Biofilm Phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 2006;188(6):2063–2072.
28. Comerlato CB, de Resende MCC, Caierão J, d’Azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2013;108(5):590–595.
29. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endodontic Disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2004;15(5):308–320.
30. Brown H. News from the Institute of Food Research. In: *News From the Institute of Food Research.*; 2014.
31. Hall-stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial Biofilms: From the Natural Environment To Infectious Diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;2(February). doi:10.1038/nrmicro821.
32. Henrici AT, Johnson DE. Studies of Freshwater Bacteria. *J. Bacteriol.* 1935;30(1):61–93.
33. Hoiby N, Flensburg EW, Beck B, Friis B, Jacobsen S V, Jacobsen L. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. *Scand. J. Respir. Dis.* 1977;58(2):65–79.
34. Costerton JW, Geesey GG, Cheng K-J. How Bacteria Stick. *Sci. Am.* 1977;238(1):86–95.
35. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci. Am.* 1978;238(1):86–95.

36. Hall-stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;2(2):95–108.
37. Costerton JW, Lewandowski Z, Debeer D, Caldwell D, Korber D, James AG. Biofilms, the Customized Microniche. *J. Bacteriol.* 1994;176(8):2137–2142.
38. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* 2013;2(2):288–356.
39. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358(9276):135–138.
40. Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.* 2010;43(4):573–583.
41. Srey S, Jahid IK, Ha S Do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 2013;31(2):572–585.
42. Topcu W. Mikroorganizmalar ve biyofilm. In: *Mikroorganizmalar ve Biyofilm*. İstanbul; 2012. Available at: <http://docplayer.biz.tr/13345193-Mikroorganizmalar-ve-biyofilm-prof-dr-ayse-willke-topcu-2-udais-26-mayis-2012-istanbul.html>.
43. Loeb GI, Neihof RA. Marine conditioning films. In: *Advances in Chemistry*. Vol 145.; 1975:319–335.
44. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002;8(9):881–890.
45. Augustin M, Ali-Vehmas T, Atroshi F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2004;7(1):55–64.
46. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG. Emergence and Spread of Vancomycin Resistance Among Enterococci in Europe. *Eurosurveillance* 2008;13(47):1–11.
47. Toole GO, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. 2000:49–79.
48. Paganelli FL, Willems RJ, Leavis HL. Optimizing future treatment of enterococcal infections: Attacking the biofilm? *Trends Microbiol.* 2012;20(1):40–49.

49. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 2004;72(10):6032–6039.
50. Shankar N, Lockett CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* Surface Protein Esp in the Pathogenesis of Ascending Urinary Tract Infection. *Role of Enterococcus faecalis Surface Protein Esp in the Pathogenesis of Ascending Urinary Tract Infection.* 2001;69(7):4366–4372.
51. Chuang-Smith ON, Wells CL, Henry-Stanley MJ, Dunny GM. Acceleration of *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation by Aggregation Substance Expression in an Ex Vivo Model of Cardiac Valve Colonization. *PLoS One* 2010;5(12). doi:10.1371/journal.pone.0015798.
52. Nallapareddy SR, Murray BE. Ligand-Signaled Upregulation of *Enterococcus faecalis* ace Transcription, a Mechanism for Modulating Host-E. *faecalis* Interaction. *Infect. Immun.* 2006;74(9):4982–4989.
53. Mannu L, Paba a., Daga E, Comunian R, Zanetti S, Duprè I, Sechi L a. 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(2-3):291–304.
54. Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, Huebner J. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 2006;74(7):4164–4171.
55. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence Factors Of *Enterococcus faecalis*: Relationship to the Endodontic Disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2004;15(5):308–320.
56. Van Tyne D, Martin MJ, Gilmore MS. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins (Basel).* 2013;5(5):895–911.
57. Theilacker C, Sanchez-Carballo P, Toma I, Fabretti F, Sava I, Kropec A, Holst O, Huebner J. Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* 2009;71(4):1055–1069.

58. Teng F, Singh K V., Bourgoigne A, Zeng J, Murray BE. Further characterization of the epa gene cluster and epa polysaccharides of *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 2009;77(9):3759–3767.
59. Oscáriz JC, Pisabarro AG. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* 2001;4(1):13–19.
60. Fredericq P. On the Nature of Colicinogenic Factors : A Review. 1963:159–165.
61. Rogers L. The Inhibiting Effect of *Streptococcus Lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 1928;16(5):321–5.
62. Zendo T. Screening and Characterization of Novel Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013;77(5):893–899.
63. Klaenhammer T. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1993;12(1-3):39–85.
64. De Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG, Vessoni Penna TC. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 2009;20(3-4):146–154.
65. Bastos M, Coelho M, Santos O. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology* 2014:683–700.
66. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 2001;71(1):1–20.
67. Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 2006;16(9):1058–1071.
68. Nissen-Meyer J, Nes IF. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* 1997;167(2-3):67–77.
69. Dinçer E, Kıvanç M, Karaca H. Biyokoruyucu Olarak Laktik Asit Bakterileri ve Bakteriyosinler. *Anadolu Üniversitesi Derleme* 2006;7(2):73–89.
70. De Vuyst L, Vandamme EJ. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.* 1992;138(3):571–578.
71. Zacharof MP, Lovitt RW. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *APCBEE Procedia* 2012;2:50–56.

72. Breukink E, De Kruijff B. The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1999;1462(1-2):223–234.
73. Cheigh CI, Pyun YR. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.* 2005;27(21):1641–1648.
74. Bali V, Panesar PS, Bera MB, Kennedy JF. Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014;(April 2015). doi:10.1080/10408398.2012.729231.
75. Draper L, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Lantibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015;79(2):171–191.
76. Breukink E, Heusden HE Van, Vollmerhaus PJ, Swiezewska E, Brunner L, Walker S, Heck AJR, Kruijff B De. Lipid II Is an Intrinsic Component of the Pore Induced by Nisin in Bacterial Membranes. *J. Biol. Chem.* 2003;278(22):19898–19903.
77. Rogers L, Whittier E. Limiting factors in the lactic fermentation. *J. Bacteriol.* 1928;16(4):211–229.
78. Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Biomedical Applications of Nisin. *J. Appl. Microbiol.* 2015. doi:10.1111/jam.13033.
79. Delves-Broughton J. Nisin and its application as a food preservative. *J. Soc. Dairy Technol.* 1990;43(3):73–76.
80. Gross E, Morell JL. Structure of Nisin. *J. Am. Chem. Soc.* 1971;93(18):4634–4635.
81. Laridi R, Kheadr EE, Benech RO, Vuillemand JC, Lacroix C, Fliss I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *Int. Dairy J.* 2003;13(4):325–336.
82. Şimşek Ö, Akkoç N, Çon AH, Özçelik F, Saris PEJ, Akçelik M. Continuous nisin production with bioengineered *Lactococcus lactis* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009;36(6):863–871.
83. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell Fact.* 2014;13 Supply1(Supply1):S3.
84. Cheng F, Takala TM, Saris PEJ. Nisin biosynthesis in vitro. In: *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. Vol 13.; 2007:248–254.

85. Li H, J. OD. Identification of a nisI promoter within the nisABCTIP operon that may enable establishment of nisin immunity prior to induction of the operon via signal transduction. *J. Bacteriol.* 2006;188(24):8496–8503.
86. Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll GN, Kuipers OP. Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008;65(3):455–476.
87. Wiedemann I, Breukink E, Van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, De Kruijff B, Sahl HG. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* 2001;276(3):1772–1779.
88. Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their Food Applications. *Compr. Rev. Food Sci. food Saf.* 2003;2:82–100.
89. Arias-Moliz MT, Baca P, Ordóñez-Becerra S, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Eradication of enterococci biofilms by lactic acid alone and combined with chlorhexidine and cetrimide. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 2012;17(5):902–906.
90. Edmiston CE, Bruden B, Rucinski MC, Henen C, Graham MB, Lewis BL. Reducing the risk of surgical site infections: Does chlorhexidine gluconate provide a risk reduction benefit? *Am. J. Infect. Control* 2013;41(5 SUPPL.):S49–S55.
91. Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010;16(6):555–562.
92. Bhardwaj P, Ziegler E, Adams H, Palmer KL. Chlorhexidine induces VanA-type vancomycin resistance genes in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016;(January):AAC.02595–15.
93. Raoufi S, Birkhed D. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int. Dent. J.* 2010;60(6):419–423.
94. Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J. Endod.* 2006;32(5):389–398.
95. Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *Br. Med. J.* 1915;2(2852):318–320.

96. Austin JH, Herbert DT. Behavior of Hypochlorite and of Chloramine-T solutions in contact with necrotic and normal tissues in vivo. *Lab. Rockefeller Inst. Med. Res.* 1918;627–633.
97. Correr GM, Alonso RCB, Grando MF, Borges AS, Puppim-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on primary dentin-A scanning electron microscopy (SEM) evaluation. *J. Dent.* 2006;34(7):454–459.
98. Donnell GMC. Antiseptics and Disinfectants : Activity , Action , and Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999;12(1):147–179.
99. Estrela CR, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan M a, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13:113–117.
100. Sharma R, Sharma A, Prasher B. Sodium Hypochlorite and Its Properties. *Int. J. Pharm. Technol.* 2012;4(2):2100–2118.
101. Siqueira JF, Machado a G, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int. Endod. J.* 1997;30:279–282.
102. Gomes B, Ferraz C, Vianna M, Berber V, Teixeira F, de Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int. Endod. J.* 2001;34:424 –428.
103. Kim H, Johnson JW. Corrosion of stainless steel, nickel-titanium, coated nickel-titanium, and titanium orthodontic wires. *Angle Orthod.* 1999;69(1):39–44.
104. Banin E. Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(3):2064–2069.
105. Finnegan S, Percival SL. EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care. *Adv. Wound Care* 2015;4(7):415–421.
106. Liu H, Fang HHP. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol.* 2002;95(3):249–256.
107. Raad I, Hachem R, Tcholakian RK, Sherertz R. Efficacy of Minocycline and EDTA Lock Solution in Preventing Catheter-Related Bacteremia, Septic Phlebitis, and Endocarditis in Rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002;46(2):327–332.

108. Extremina CI, Costa L, Aguiar I, Peixe L, Fonseca P. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J. Microbiol. Methods* 2011;84(2):167–173.
109. Tagg JR, McGiven R. Assay System for Bacteriocins. *Appl. Microbiol.* 1971;21(5):943.
110. Tong Z, Zhang Y, Ling J, Ma J, Huang L, Zhang L. An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0089209.
111. Akkoç N, Abay İ, Yüksel FN, Ariafar N. The Effect of Certain Disinfectants on Biofilm Producer *E. faecalis* Isolates. In: *The Effect of Certain Disinfectants on Biofilm Producer E. faecalis Isolates*. Dublin, Ireland; 2016.
112. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003;52(June):1.
113. Bozzola JJ. Conventional specimen preparation techniques for scanning electron microscopy of biological specimens. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Vol 369.; 2007:449–466.
114. Logan M. *Factorial ANOVA.*; 2010. doi:10.1002/9781444319620.ch12.
115. Uses F. Synonyms definition. *77th JECFA* 2013;4(1986):1–4.
116. Stempel N, Strehmel J, Overhage J. Potential Application of Antimicrobial Peptides in the Treatment of Bacterial Biofilm Infections. *Curr. Pharm. Des.* 2015;21:67–84.
117. Simşek O, Con a H, Akkoç N, Saris PEJ, Akçelik M. Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered *Lactococcus lactis* strains. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009;36(4):481–90.
118. Khan A, Vu KD, Riedl B, Lacroix M. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. *LWT - Food Sci. Technol.* 2015;61(1):124–129.
119. Bouttefroy A, Mansour M, Linder M, Milliere JB. Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. *Int. J. Food Microbiol.* 2000;54(1-2):109–115.

120. Tong Z, Dong L, Zhou L, Tao R, Ni L. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. *Peptides* 2010;31(11):2003–2008.
121. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J. Endod.* 1994;20(June 1994):276–278.
122. Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial Susceptibility of Monoculture Biofilms of a Clinical Isolate of *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* 2009;35(1):95–97.
123. Estrela C, Silva JA, de Alencar AHG, Leles CR, Decurcio DA. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*-a systematic review. *J. Appl. Oral Sci.* 2008;16(6):364–368.
124. Tong Z, Ni L, Ling J. Antibacterial peptide nisin: A potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides* 2014;60:32–40.
125. Vianna ME, Gomes B PFA. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* 2009;107(4):585–589.
126. Cintra LTA, Watanabe S, Samuel RO, da Silva Facundo AC, de Azevedo Queiroz ÍO, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. The use of NaOCl in combination with CHX produces cytotoxic product. *Clin. Oral Investig.* 2013;18(3):935–940.
127. Dubey S. Comparative antimicrobial efficacy of herbal alternatives (*Emblica officinalis*, *Psidium guajava*), MTAD, and 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 2016;6(1):46–49.
128. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J. Endod.* 1994;20(June 1994):276–278.
129. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.* 1982;53(5):518–523.
130. Baumgartner JC, Johal S, Marshall JG. Comparison of the Antimicrobial Efficacy of 1.3% NaOCl/BioPure MTAD to 5.25% NaOCl/15% EDTA for Root Canal Irrigation. *J. Endod.* 2007;33(1):48–51.

131. Dodd HM, Horn N, Gasson MJ. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.* 1990;136(3):555–566.
132. Gill AO, Holley R. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Res. Int.* 2000;33(2):83–90.
133. Economou T, Pournis N, Ntzimani a., Savvaidis IN. Nisin-EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. *Food Chem.* 2009;114(4):1470–1476.
134. Kopermsub P, Mayen V, Warin C. Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. *Food Res. Int.* 2011;44(2):605–612.
135. Sant’Anna V, Malheiros PDS, Brandelli A. Liposome encapsulation protects bacteriocin-like substance P34 against inhibition by Maillard reaction products. *Food Res. Int.* 2011;44(1):326–330.
136. Da Silva Malheiros P, Daroit DJ, Brandelli A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 2010;21(6):284–292.
137. Colas JC, Shi W, Rao VSNM, Omri A, Mozafari MR, Singh H. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron* 2007;38(8):841–847.
138. Tu L, Mustapha a. Reduction of *Brochothrix thermosphacta* and *Salmonella* serotype Typhimurium on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin and nisin combined with EDTA. *J. Food Sci.* 2002;67(1):302.
139. Branen JK, Davidson PM. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *Int. J. Food Microbiol.* 2003;90(1):63–74.
140. Roças IN, Siqueira JF. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: A molecular microbiology study. *J. Endod.* 2011;37(2):143–150.
141. Kozol RA, Gillies C, Elgebaly SA. Effects of Sodium Hypochlorite (Dakin ’ s Solution) on Cells of the Wound Module. *Art Sci. Surg.* 1988;(123):420–423.

142. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J. Endod.* 1985;11(12):525–528.
143. Tong Z, Zhou L, Jiang W, Kuang R, Li J, Tao R, Ni L. An in vitro synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against *Streptococcus mutans*. *Peptides* 2011;32(10):2021–2026.
144. Mills S, Stanton C, Hill C, Ross RP. New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods. *Annu. Rev. Food Sci. Technol. Technol* 2011;2:299–329.
145. Zhang R, Chen M, Lu Y, Guo X, Qiao F, Wu L. Antibacterial and residual antimicrobial activities against *Enterococcus faecalis* biofilm: A comparison between EDTA, chlorhexidine, cetrimide, MTAD and QMix. *Sci. Rep.* 2015;5(August):12944.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İrem Abay

Doğum Yeri: Adana

Doğum Tarihi: 01.01.1987

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca (ileri seviye), İtalyanca (Başlangıç seviyesi)

Eğitim Durumu

Lise: Adana Ayşe Atıl Anadolu Öğretmen Lisesi

Lisans: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2008-2012)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

9. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Uluslararası Kongrelerde basılan bildiriler

Akkoç N, Abay İ, Yüksel FN, Ariafar N. The Effect of Certain Disinfectants on Biofilm Producer *E. faecalis* Isolates. In: Dublin, Ireland; 2016.

116 FoodMicro 2016

Poster Abstracts

Antimicrobial

Antimicrobial/Biocide Resistance

PO1-AB-030

THE EFFECT OF CERTAIN DISINFECTANTS ON BIOFILM PRODUCER *E. FAECALIS* ISOLATES

I. Abay¹, N. AKCELİK^{1*}, M. N. ARIAFAR¹, F. N. YUKSEL¹

¹Biotechnology Institute, Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara, Turkey

Abstract Content: Objectives: Biofilm cells are difficult to be detected and to be eradicated. They are more resistant to antibacterial agents, sanitation and disinfection processes. *Enterococcus faecalis* is an important cause of nosocomial infections. New approaches to combat *E. faecalis* biofilms have been introduced. One of the technologies that has recently gained attention is the use of bacteriocins, such as nisin, which is produced by *Lactococcus lactis*. In this study, commercial nisin and nisin produced by genetically modified *L. lactis* LAC339 strain to improve nisin production was selected as the main antimicrobial agents.

Material and methods: Biofilm producer 4 *E. faecalis* strains were chosen to determine antimicrobial effects of tested agents. MICs and MBCs were determined by the microdilution method using the antimicrobials chlorhexidine digluconat, EDTA, NaOCl and nisin.

Results: Generally the MBC values are expected to be higher than the MIC values but if the antimicrobial agent that is used have a strong killing effect on the bacterial cells, the MIC and MBC values can be same or very close to each other. According to our results, MBC values were mostly same with MIC values. Nisin bacteriocin produced by LAC339 strains has less efficiency compared to commercial nisin. Other tested agents also exhibited strong bactericidal/bacteriostatic effects on *E. faecalis* isolates and control strains.

Conclusions: The present study revealed the first time the antimicrobial effect of nisin bacteriocin on biofilm producer *E. faecalis* isolates not only using commercial nisin but also nisin produced by genetically modified *L. lactis* LAC339. The data from our experiments has shown that certain concentrations of chosen antimicrobials and nisin are very effective against to the planktonic forms of the strains. In future we will investigate the synergistic combinations of tested antimicrobials with nisin should allow the use of lower concentrations of drugs to combat with enterococcal biofilms.

Disclosure of Interest: None Declared

Keywords: MBC, MIC, nisin, antimicrobial, *Enterococcus faecalis*