

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

Salmonella enterica Serovar Virchow Suşlarında Besinsel ve Çevresel Koşulların
Selüloz Üretimi, Kıvrımlı Fimbriya Sentezi ve Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

Mohammad Nima ARIAFAR

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

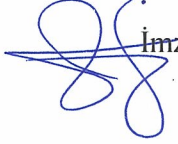
OCAK

2015

ETİK BEYAN

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

Mohammad Nima ARIAFAR

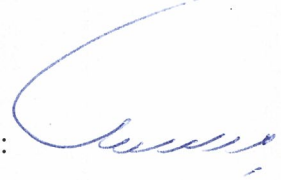
 İmzası

ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK danışmanlığında, Mohammad Nima ARIAFAR tarafından hazırlanan bu çalışma 03/02/2015 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

İmza:



Üye : Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

İmza:



Üye : Prof. Dr. Serdar DİKER

İmza:



Üye : Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA

İmza:



Üye : Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut Özkul

Enstitü Müdürü

ÖZET

Salmonella enterica Serovar Virchow Suşlarında Besinsel ve Çevresel Koşulların Selüloz Üretimi, Kıvrımlı Fimbriya Sentezi ve Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

Mohammad Nima ARIAFAR

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK

Çevresel ve besinsel koşullarının *Salmonella* Virchow suşlarının biyofilm üretimi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada; toplam 16 *S. Virchow* susunun 15 adetinde rdar morfoloji tespit edildi. Bir suş ise bdr morfolojisinde bulundu. Tüm suşlar 48, 72 ve 96 saat inkübasyon süreleri sonunda yüksek düzeyde biyofilm üreticisi olarak saptandı. Besinsel faktör olarak kullanılan tripton konsantrasyonları (0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10g/L), biyofilm üretim düzeyinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken farklı sıcaklık (20, 25, 30, 35, 37, 40 °C) ve pH (4.5, 5.2, 5.9, 6.6, 7.3, 8, 8.7 ve 9.4) değerlerinde suşların biyofilm üretim düzeyleri değişim gösterdi. Bu denemeler sonucunda optimum biyofilm üretiminin pH 6.6' da ve 20 °C'de gerçekleştiği belirlendi. Çevresel faktörlerinin biyofilm üretimi üzerindeki etkisi, Gompertz denklemi kullanılarak bir matematiksel model ile tanımlandı. Modelin tahmin kapasitesi farklı pH (5.3 ve 6.3) ve sıcaklık (23 ve 26 °C) değerleri denenerek başarılı bir şekilde test edildi. Oluşturulan matematiksel modelde sıcaklığın yükselmesine bağlı olarak biyofilm miktarında azalma meydana geldiği belirlendi. Ayrıca pH değerinin yükselmesine bağlı olarak biyofilm miktarında artış gözlemlendi. Çevresel koşulların (sıcaklık ve pH) biyofilm yapısını oluşturan kimyasal bileşenlerin kompozisyonunu etkilediği DMC18 suşunda FTIR incelemeleri sonucunda belirlendi. Özellikle inkübasyon sıcaklığının artışına paralel olarak; protein, karbonhidrat ve nükleik asit piklerinde saptanan düşmeler veya karbonhidrat pikinin tespit edilememesi, çevresel etkilerin biyofilm morfolojisinin ya da pelikül yapısının değişimine de yol açtığına işaret etmektedir.

2015, 96 sayfa

Anahtar kelimeler: *Salmonella* Virchow, Selüloz, Kıvrımlı fimbriya, Biyofilm, Matematiksel modelleme, pH, Sıcaklık, Tripton

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Effects of Nutritional and Environmental Conditions on Cellulose Production, Curli Fimbriae Biosynthesis and Biofilm Production of *Salmonella enterica* Serovar Virchow Strains

Mohammad Nima ARIAFAR

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assist. Prof. Nefise AKÇELİK

In this study, the effect of environmental and nutritional conditions on biofilm production of *Salmonella* Virchow strains was investigated and radar morphotype was determined at 15 out of 16 *S. Virchow* strains. Radar morphotype was determined at only one of the tested strains. All strains produced high level of biofilm following the 48, 72 and 96h incubation periods. Tryptone concentrations (0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10g/L), used as a nutritional factor, did not cause any differentiation at biofilm production levels of strains. Notwithstanding, at different temperature (20, 25, 30, 35, 37, 40 °C) and pH (4.5, 5.2, 5.9, 6.6, 7.3, 8, 8.7 and 9.4) levels, biofilm production levels of strains have been changed. As a result of this experiment, optimum conditions for biofilm production were determined as pH 6.6 and 20 °C. The effect of environmental factors on biofilm production was mathematically modeled using the Gompertz equation. The production capacity of model at different pH (5.3 and 6.3) and temperature (23 and 26 °C) values was successfully tested. Using created mathematical model, it was determined that, the increased temperature cause reduction in biofilm production level. Furthermore, increase on pH value caused an increase of biofilm production. The effect of environmental conditions (temperature and pH) on composition of chemical components of biofilm produced by DMC18 strain was determined as a result of FTIR studies. In particular, during the increase at incubation temperature, the amount of carbohydrate, protein, lipid and nucleic acid was significantly decreased and also unable to determine the carbohydrate peak indicated that environmental conditions might lead changes at biofilm morphotype or biofilm structure.

2015, 96 pages

Keywords: *Salmonella* Virchow, Cellulose, Curli fimbriae, Biofilm, Mathematical modelling, pH, Temperature, Tryptone

TEŞEKKÜR

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

Ayrıca, doktora tez izleme komitemde ve tez jürimde yer alan, tezin başarıyla tamamlanabilmesi için görüş ve düşünceleri ile bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Cumhuriyet ÇÖKMÜŞ ve Doç. Dr. Pınar ŞANLIBABA'ya;

Tezimin istatistiksel analizlerinde bana değerli zamanından ayırarak yardımcı olan ve bilgi birikimini yapmış olduğu yorumlara katarak tezime büyük katkı sağlayan Doç. Dr. Sencer BUZROL'a ve Naşit İĞİCİ'ye;

Laburatuvar ortamında bana yardımcı olan tüm arkadaşlarıma; Dr. Burcu YENER, Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ, Özlem GÜNAY EŞİYOK, Başar KARACA, Neslihan YÜKSEL, Barış YAVAŞ, Neslihan TAŞKALE'ye;

Değerli Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma;

Bu uzun ve zor yolda her zaman yanımda duran varlığını bana hissettiren desteğini benden esirgemeyen ve tüm kalbiyle beni destekliyen biricik eşim Maryam DİANI'ye;

Son olarak; Eğitimim boyunca beni maddi ve manevi destekleyerek, her zaman kararlarıma saygı göstererek yanımda duran anne ve babama;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	I
ONAY SAYFASI	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
SEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
SİMGELER DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	4
2.2. Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi.....	5
2.3. Biofilm Oluşum Evreleri.....	6
2.3.1. İlk tutunma için ince tabakanın oluşumu.....	7
2.3.2. Tutunma.....	9
2.3.3. Tutunan bakterilerin olgunlaşması ve mikrokoloni oluşumu.....	9
2.3.4. Dağılma.....	9
2.4. Ekstrasellüler Polimerik Matriks (EPS).....	10
2.5. <i>Salmonella</i> 'nın Biyofilm Matriksinde Bulunan Önemli Bileşenlerin Genetik ve Biyokimyasal Doğası.....	11
2.5.1. Kıvrımlı fimbriya.....	11
2.5.2. Selüloz.....	13
2.6. Biyofilm Oluşumunda Hücre-Hücre Etkileşimlerinin Rolü.....	14
2.7. <i>Salmonella</i> 'da Biyofilmin Yapısal Karakterizasyonu.....	16
2.8. <i>Salmonella</i> 'da Çevresel Koşullarının Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi ve Biyofilm Üretimiminin Matematiksel Olarak Modellenmesi.....	17
3. GEREKÇE VE AMAC	20
4. MATERYAL VE YÖNTEM	21
4.1. Materyal.....	21
4.1.1. Bakteriler.....	21
4.1.2. Besiyerleri ve çözeltiler.....	21
4.2. Yöntem.....	22
4.2.1. <i>Salmonella</i> suşlarının biyofilm morfolojilerinin belirlenmesi yoluyla kıvrımlı fimbriya ve selüloz sentezi özelliklerinin araştırılması.....	22
4.2.2. Sıvı besiyerlerinde pelikül oluşumu.....	23
4.2.3. <i>S. Virchow</i> suşlarının selüloz üretim özelliklerinin kalkoflor bağlanma denemesi ile araştırılması.....	23
4.2.4. <i>S. Virchow</i> suşlarının biyofilm üretim düzeylerinin belirlenmesi.....	24
4.2.5. Farklı sıcaklık ve pH değerlerinde ile tripton konsantrasyonlarında koşullarında <i>S. Virchow</i> suşlarının biyofilm üretim miktarlarının belirlenmesi.....	24

4.2.6. Farklı pH ve sıcaklık koşullarının kombinasyonları yapılarak <i>S. Virchow</i> suşlarının polistiren yüzeyde oluşturduğu biyofilm miktarının belirlenmesi ve matematiksel model uygulaması.....	25
4.2.6.1. Gompertz denklemi	25
4.2.6.2. Modifiye Gompertz denklemi	28
4.2.6.3. Modifiye Gompertz denklemi'nin biyofilm oluşumunu tanımlamak için kullanılması.	29
4.2.6.4. İkincil modelin oluşturulması.....	31
4.2.6.5. Oluşturulan biyofilm modelinin tahmin çalışmalarının yapılması.....	31
4.2.7. Farklı pH ve sıcaklık koşullarında oluşturulan pelikül yapısının Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR) ile biyokimyasal analizi.....	31
4.2.7.1. FTIR spektroskopisi	31
4.2.7.2. Veri toplama ve işleme	33
4.2.7.3. İstatistiksel Analiz	34
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	35
5.1. <i>Salmonella</i> Suşlarının Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi	35
5.2. Sıvı Besiyerinde Pelikül Oluşumu	35
5.3. Kalkoflor Bağlanma Uygulaması.....	36
5.4. <i>Salmonella Virchow</i> Suşlarında Biyofilm Üretim Düzeylerinin Belirlenmesi	37
5.4.1. Farklı sıcaklık, pH değerlerinde ve tripton konsantrasyonlarında <i>S. Virchow</i> suşlarının biyofilm üretim düzeylerinin belirlenmesi.....	41
5.5. Farklı pH ve Sıcaklık Koşullarında <i>S. Virchow</i> Suşunun Polistiren Yüzeyde Biyofilm üretim düzeylerinin Matematiksel Modellerinin Tespiti	42
5.5.1. Modelin tahmin çalışmalarının yapılması	47
5.6. <i>S. Virchow</i> DMC18 suşunun Farklı pH ve Sıcaklık Koşullarında Ürettiği Pelikül Yapısının Özellikleri.....	50
5.6.1. <i>S. Virchow</i> DMC18 suşunun pelikül yapısının FTIR yöntemiyle incelenmesi	51
5.7. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarının Selüloz Üretimi Üzerine Etkisi.....	60
6. TARTIŞMA VE SONUC	61
KAYNAKLAR.....	66
EKLER	80
EK1: FTIR sonuçlarından elde edilen farklı sıcaklık gruplarına ait pik alanı değerleri	80
EK2: FTIR sonuçlarından elde edilen farklı sıcaklık gruplarına ait pik alanı değerlerin ortalaması	81
ÖZGEÇMİŞ	82
TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Salmonella</i> 'nın taramalı elektron mikroskop görüntüsü	4
Şekil 2.2. Biyofilm oluşum aşamaları	7
Şekil 2.3. Kıvrımlı fimbriya sentezinin model şeması	12
Şekil 2.4. Selüloz biyosentezi ve CsgD regülasyonu	14
Şekil 2.5. Bakteri hücreleri arasından gerçekleşen haberleşmenin model şeması.....	15
Şekil 2.6. <i>Salmonella</i> 'da rdar ve bdar morfotipleri	17
Şekil 4.1. Sıvı besiyerinde sıvı-hava ara fazında bakteri tarafından üretilen pelikül yapısı ve pelikül oluşturmeyen bakteri kültürü.....	23
Şekil 4.2. Gompertz denklemi'nin değişkenlerinin etkisi	27
Şekil 4.3. Modifiye Gompertz denklemi'nin değişkenlerinin grafik üzerinde gösterimi....	29
Şekil 4.4. Gompertz denkleminin değişkenlerinin grafik üzerinde gösterimi.....	30
Şekil 4.5. FTIR spektroskopisi çalışma prensibi	32
Şekil 5.1. <i>S. Virchow</i> suşlarında belirlenen rdar ve bdar morfotipleri	35
Şekil 5.2. Farklı biyofilm morfotipleri içeren <i>S. Virchow</i> suşların selüloz içeriklerinin tanımlanması (A) Selüloz negatif morfotip Selüloz pozitif morfotip.....	37
Şekil 5.3. <i>S. Virchow</i> suşlarında 24 saat sonucunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri	38
Şekil 5.4. <i>S. Virchow</i> suşlarında 48 saat sonucunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri	39
Şekil 5.5. <i>S. Virchow</i> suşlarında 72 saat sonucunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri	40
Şekil 5.6. <i>S. Virchow</i> suşlarında 96 saat sonunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri	40
Şekil 5.7. <i>S. Virchow</i> DMC18 suşunun biyofilm üretim özelliği üzerinde farklı çevresel koşulların etkisi	41
Şekil 5.8. <i>S. Virchow</i> DMC18 suşunun biyofilm üretim özelliği üzerinde farklı pH değerleri ve tripton konsantrasyonlarının etkisi	42
Şekil 5.9. Sabit sıcaklık (20 °C) ve üç farklı pH değerinde (5.2, 5.9 ve 6.6) <i>S. Virchow</i> DMC18 suşunun zamana bağlı biyofilm üretimi için Gompertz denkleminin uygulanması	43
Şekil 5.10. Sabit pH değerinde (pH 6.6) ve üç farklı sıcaklıkta <i>S. Virchow</i> , DMC18 suşunun zamana bağlı biyofilm üretimi için modifiye	44
Şekil 5.11. a (a), μ (b) ve λ (c) parametreleri için ikincil modelinin (Denklem 13) üç boyutlu yüzeyleri	47

Şekil 5.12. <i>S. Virchow</i> DMC18 suşunun biyofilm üretim modelinin, 24 saat inkübasyon süresi için tahmini. 23°C, pH 5.3 (A), 23°C, pH 6.3 (B), 26°C, pH 5.3 (C), 26°C, pH 6.3 (D)	50
Şekil 5.13. Pelikül örneklerinden elde edilen, orta kızılötesi bölgedeki FTIR absorbans pikleri.....	52
Şekil 5.14. OPUS programında gerçekleştirilen integrasyon alan hesaplamasına örnek...	55
Şekil 5.15. 20°C, 25°C ve 30°C gruplarının 1750-1000 cm ⁻¹ arasındaki karşılaştırmalı FTIR absorbans spektrumları. Spektrumlar, ilgili sıcaklıklarda denenen farklı pH koşullarından elde edilen spektrumların ortalamaları alınarak elde edilmiştir. Normalizasyon Amid I pikine göre (7 numaralı pik) yapılması.....	56
Şekil 5.16. A: 20, 25 ve 30°C gruplarının 3700-2700 cm ⁻¹ arasındaki karşılaştırmalı FTIR absorbans spektrumları. Spektrumlar, ilgili sıcaklıklarda denenen farklı pH koşullarından elde edilen spektrumların ortalamaları alınarak elde edilmiştir. Normalizasyon Amid I pikine göre (7 numaralı pik) yapılmıştır. B: 20, 25 ve 30°C gruplarının 7 numaralı pik olan Amid I piki için karşılaştırmalı FTIR absorbans spektrumları. Normalizasyon Amid II pikine göre (8 numaralı pik) yapılmıştır.....	57
Şekil 5.17. 20°C, 25°C ve 30°C gruplarının karşılaştırmalı FTIR absorbans spektrumlarının pik alanlarına göre ANOVA analizi (P< 0.05) sonuçları	58
Şekil 5.18. 1750-1000 cm ⁻¹ arasındaki bölgeye göre yapılan kümeleme analizi	59
Şekil 5.19. <i>S. Virchow</i> DMC18 suşunun farklı inkübasyon sıcaklıklarında selüloz üretimi	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (NaCl'siz).....	21
Çizelge 4.2. Luria Bertani (LB) Broth ve Agar.....	21
Çizelge 4.3. Kongo Kırmızısı İçeren (40 µg/mL) Luria Bertani (LB) Agar (NaCl'siz)	21
Çizelge 4.4. Kalkoflor İçeren (50 µg/mL) Luria Bertani (LB) Agar (NaCl'siz).....	22
Çizelge 4.5. Fosfatla tamponlanmış su (PBS)	22
Çizelge 4.6. Glasiyal asetik asit çözeltisi (%33'lük).....	22
Çizelge 5.1. <i>S. Virchow</i> suşlarında pelikül oluşumu ve oluşturulan pelikülyapılarının fiziksel karakteristikleri	36
Çizelge 5.2. <i>S. Virchow</i> DMC18 suşunun farklı koşullar altında (sıcaklık ve pH) biyofilm oluşumu modeli için kullanılan belirtme katsayısı (R^2_{adj}) ve ortalama karesel hata (OKH) değerleri	43
Çizelge 5.3. İkincil model uygulamasında kullanılan değişkenler	45
Çizelge 5.4. <i>S. Virchow</i> DMC18 suşunun değişik sıcaklıklarda oluşturduğu pelikül yapılarının özellikleri.....	51
Çizelge 5.5. Çalışmamızda belirlenen absorpsiyon piklerinin kaynaklandığı bağlar ve moleküler tanımlamaları.....	53
Çizelge 5.6. Farklı sıcaklık gruplarının ortalama pik alanı değerleri ve Amid I pikine oranlanmış değerleri	54

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
ddH ₂ O	Çift distile (double distilled) su
dk.	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
g	Gram
H ₂ O	Su
HCl	Hidrojen klorür
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
L/l	Litre
LB	Luria Bertani besiyeri (Luria's Broth)
LPS	Lipopolisakkarit
mL	Mililitre
mm	Milimetre
Na ₂ HPO ₄	Sodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NK	Negatif kontrol
°C	Santigrad derece
OD	Optik yoğunluk (density)
PBS	Fosfat tuz tamponu (buffered saline)
pH	Hidrojenin gücü-asitlik (Power of hydrogen)
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı (rotation per minute)
UV	Ultraviyole
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
<i>a</i>	Azami biyofilm konsantrasyonu
<i>μ_m</i>	Azami biyofilm oluşma hızı ve
<i>λ</i>	Biyofilm oluşumunun hızlanmaya başladığı zaman
OKH	Ortalama karesel hata

R^2	Belirtme katsayısı
IR	Kızılötesi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi
ATR	Attenuated Total Reflectance
cm^{-1}	Dalga sayısı birimi

1. GİRİŞ

Salmonella cinsi *Enterobacteriaceae* familyasında yer almakta ve *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür içermektedir. *Salmonella enterica* subspecies *enterica*'nın altı alt türü vardır ve memeli hayvanlarda en çok hastalığa neden olan serovaryeteleri kapsamaktadır (1, 2). Günümüzde gıda kökenli enfeksiyonların başlıca etkenlerinden biri olan *Salmonella* serovaryetelerinin temel bulaş kaynakları arasında; kümes hayvanları eti, kıyma, sosis, yumurta ürünleri, su ürünleri, dondurma, süt tozu ve krema yer almaktadır. Bunun dışında soslar, salatalar, pudingler ve geleneksel süt ürünleri de *Salmonella* riski taşıyan gıdalar arasında bulunmaktadır (3, 4, 5). Gıda işleme yüzeyleri düzgün temizlenmediği takdirde bu alanlarda biyofilm yapıları gelişebilmektedir. Biyofilm yapısındaki bakteriler genellikle çevresel stres koşullarına karşı (Ör: dezenfektanlar) oldukça dirençli olmaları nedeniyle endüstriyel yüzeylerden ve ekipmanlardan giderilmeleri zor olmaktadır. Ayrıca ısı transfer sistemlerinde biyofilm yapılarının oluşması enerji tüketimi arttırmakta ve metal yüzeylerde korozyonu hızlandırmaktadır (6). Biyofilm yapısında bulunan mikroorganizmalar planktonik hücrelere kıyasla antibiyotiklere karşı daha dirençlidir. Bu nedenlerle biyofilm yapısını etkileyen faktörler ve bu yapılardan korunma; gıda üreticilerinin, devlet yönetiminin ve tüketicilerin dikkatini çekmektedir. (6, 7).

Bir biyofilm topluluğu bir ve/veya birden fazla bakteri türünden meydana gelebilmekte ve tek tabakalı ya da üç boyutlu (3D) yapılar oluşturabilmektedir. Olgun biyofilm yapıları; metabolitler, besin maddeleri ve atıkların dağıtımına olanak sağlayacak şekilde organize olmuş su kanallarını içeren yüksek organizasyonlu ekosistemlerdir. Bu mikrobiyal topluluklar uygun şekilde temizlenmemesi halinde gıda-işleme yüzeylerinde gelişebilmekte ve biyofilm yapısına katılan bakteriler temizleme ve sanitasyona karşı güçlü direnç göstermektedir (6, 7, 8). Gıda endüstrisi yüzeylerinde biyofilm oluşması durumunda, burada üretilen gıdalar kontaminasyona açık hale gelmekte ve bu da söz konusu ürünlerin raf ömrünü kısaltmakta ve gıda kökenli hastalıkların yayılmasına neden olmaktadır (9). Sonuç olarak gıda endüstrisinde biyofilm yapılarının oluşumu hem ekonomik kayıplara neden olmakta ve hem de sağlık açısından önemli risk teşkil etmektedir.

Patojenik mikroorganizmaların biyofilm oluşturmak için gıda yüzeylerine, ekipmanlara ve işleme alanlarına tutunduğu ve geliştiği bilinmektedir (6). Örneğin *Listeria monocytogenes* drenaj sistemlerinde, depolama tanklarında, el arabalarında ve gıda ile temas eden diğer materyallerde biyofilm oluşturmaktadır. Değişik araştırmalarda *L. monocytogenes*'in sığırtine, *Salmonella sp.*'nin ise tavuk yüzeyine tutunması gibi, çeşitli patojenlerin gıda yüzeylerine tutunduğu saptanmıştır (6).

Salmonella Cinsi üyeleri gıda kökenli patojenlerin en önemlilerindedir (10). Non-tifoidal salmonellozun birleşik devletlerde her yıl 1.4 milyon insanı etkilediği ve bu enfeksiyon vakalarının % 95'inin gıda kaynaklı bakterilerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir (10). Epidemiyoloji yıllık raporuna göre, Avrupa Gıda Güvenliği uzmanlığı (EFSA) ve Avrupa Hastalık Kontrol Merkezi (ECDC) işbirliği ile yapılan çalışmalar sonucunda, Avrupa Birliğindeki gıda kaynaklı enfeksiyon hastalıklarından *Compylobacter*'den sonra 2. sırada *Salmonella* sorumlu bulunmuştur (11). Salmonelloz salgını maydanoz, rezene, kavun, kereviz sapı, pastörize edilmemiş portakal suyu gibi geniş taze ürün yelpazesi ile ilişkilendirilmiştir (11). Bugüne dek yapılan çalışmalar, bu bakterilerin oldukça farklı yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşturma konusunda çok güçlü olduklarını göstermiştir (7, 12, 13, 14, 15). Yüzeye tutunma ve biyofilm yapısının oluşumuna aracılık eden moleküler mekanizma tam olarak aydınlatılmamış olmasına karşın, *agfD* geninin *Salmonella sp.*'nin biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğu belirlenmiştir (14, 16). *agfD*'nin ifadesini kontrol eden regülasyon mekanizması konusunda bilgi sınırlı olsa da, bakterilerin gen ifadelerini sıcaklık, ozmolarite, O₂, CO₂, pH, azot bileşenleri, besin miktarı, inorganik iyon konsantrasyonu gibi çevresel sinyallere yanıt olarak regüle ettikleri bilinmektedir (14, 16). Dolayısıyla bakteri hücrelerinin tutunması; geliştikleri besin ortamı, hareketlilikleri, hücrelerin gelişme fazı, tutunacakları yüzeyin tipi ve özellikleri, organik materyallerin varlığı, sıcaklık, pH, temas süresinin uzatılması, ekstrasellüler polisakkaritlerin üretimi ve hücre – hücre iletişimi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (6, 17, 18, 19).

Møretro ve arkadaşları tarafından (2009) yapılan çalışma sonucunda *Salmonella* cinsi üyelerinin polimer, çelik ve cam gibi yüzeylerin yanı sıra maydanoz gibi organik yüzeylerde de biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Gıda üretim alanlarında oluşan biyofilm giderilmedikçe sürekli sağlık sorunlarına ve ekonomik kayıplara yol açar. Biyofilm oluşumu gıda sanayisinde ürünlerin raf ömrünün azalmasına, gıda bozulmalarına ve hastalıkların bulaşmasına sebebiyet verir. Kısaca biyofilm yapıları;

endüstriyel, çevresel, halk sağlığı ve tıbbi alanlarda ciddi sorunlara neden olmaktadır (21, 22).

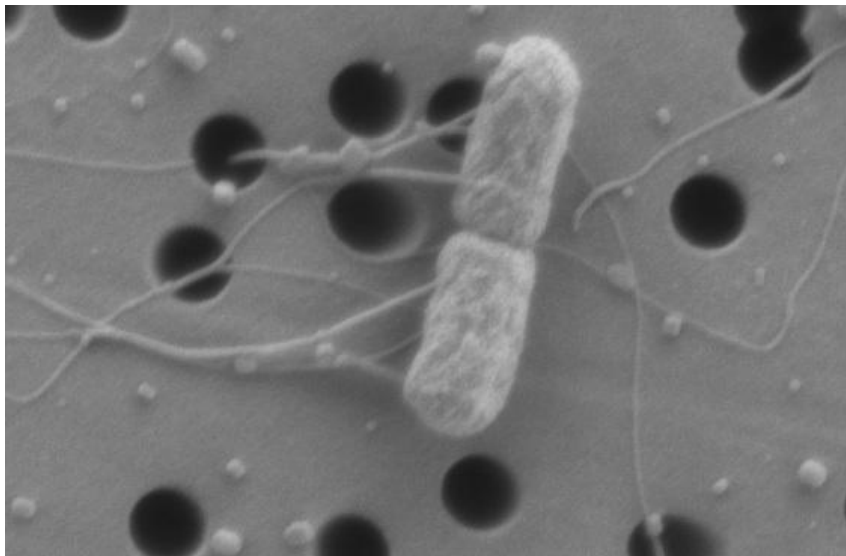
Bu literatür verileri ışığında; tez çalışmasında özellikle kanatlı hayvan üretiminde ciddi sorunlara yol açan *S. Virchow* suşlarında, biyofilm üretimi üzerine besinsel ve çevresel faktörlerin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Tez çalışması kapsamında ayrıca, stres koşulları altında biyofilm yapısında meydana gelen değişmelerin belirlenmesi ve biyofilm oluşumunun matematiksel modelinin çıkarılması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

Salmonella cinsi Gram negatif, aerob veya fakültatif anaerob, spor oluşturmayan, 2.0-5.0 µm boyunda ve 0.7-1.5 µm eninde basil şeklinde bakterilerdir (Şekil 2.1). *Salmonella* cinsi üyeleri genellikle hareketsizdir ve asidik stres, düşük su aktivitesi ve yüksek sıcaklık gibi zorlu koşullara adapte olarak çeşitli yüzeylerde aylarca canlı kalabilmektedirler. *Salmonella* üyeleri 7-48°C sıcaklık aralığında üreme gösterir, ancak optimum üreme sıcaklıkları 37°C olarak belirlenmiştir. pH 4.5-9.0 arasında üreme yeteneğindedirler. Laboratuvar koşullarında üretildikleri besin ortamlarında optimum pH değeri 6.5-7.5 arasındadır (23, 24, 25). *Salmonella* cinsi, *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere iki tür içermektedir.

S. enterica subspecies *enterica*'nın altı alt türü (*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *houstaenae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *indica* ve *S. enterica* subsp. *Arizonae*) vardır ve memeli hayvanlarda en çok hastalığa neden olan serovaryeteleri içermektedir (1, 2). Son çalışmalara göre *Salmonella* cinsinin iki tür altında toplanan 2500 civarında serotipi bulunmaktadır (26). *Salmonella* enfeksiyonları çapraz kontaminasyonlar nedeniyle hızlı bir şekilde yayılma özelliği göstermektedir (27).



Şekil 2. 1. *Salmonella*'nın taramalı elektron mikroskop görüntüsü (28).

2.2. Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi

Mikrobiyoloji bilim dalının evriminde; 1880' den yirminci yüzyılın ortasında kadar geçen süre "saf kültür dönemi" olarak adlandırılmaktadır (28). Bu zaman diliminde bakterilerin serbest ve tek hücreler halinde yaşayan bir yaşam formuna sahip oldukları bilinmekteydi. Bakteri karakterizasyon çalışmalarında temel araçlar sıvı yada agar içeren test besiyerileri ile sınırlıydı. Bu klasik dönem çalışmalarında sağlanan ve bakteriyel hücresel davranışı bağımsız olarak tamamlayan temel bilgi, günümüzde gelişkin analiz teknikleri sayesinde köklü bir değişime uğramıştır. Zira bakteriyel biyokütlenin sadece % 1'inin planktonik fazda olduğu saptanmıştır (8, 30).

Biyofilm yapısının keşfi ilk defa Anthony van Leewenhoek tarafından 1648 yılında gerçekleştirilmiştir. Araştırmacı diş plakalarından elde ettiği bakteri topluluğuna "animalkuli" adını vermiştir. Henrici 1933 yılında kümelenmiş bakterilerin fotoğrafını çekmeyi başarmış ve bu yapılar için; "su kökenli bakterilerin birçoğu serbest ve tek yüzen mikroorganizma şeklinde değil, bir yüzeye tutunarak bir arada üremektedirler" ifadesini kullanmıştır. Çevre mikrobiyologları, klinik mikrobiyologlardan yaklaşık 20 yıl önce bakteriyel topluluk kavramını kabul etmiştir. Bakteri topluluğu terimi ilk kez su arıtma tesislerindeki bakteriler için kullanılmıştır. Rogovska vd. (1961) daha sonra bu ifadeyi biyofilm yapıları olarak değiştirmiştir.

Klinik mikrobiyoloji alanında ise ilk kez Høiby (1977) *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin kronik enfekte hastaların akciğerlerinde kümelendiğini tespit etmiştir. Bu alanda biyofilm terimi ilk kez 1978 yılında Costerton ve arkadaşları tarafından kullanılmış ve aynı araştırmacı tarafından 1987 yılında bu doğa fenomeni kapalı bir yaşam şekli olarak ifade edilmiştir. 1993 yılında Amerikan Mikrobiyoloji Derneği biyofilm kavramını uygun bulunduğunu açıklamıştır (35). Costerton ve arkadaşları tarafından (1999) biyofilm; "bir yüzeye tutunmuş ve kendisi tarafından üretilen polimerik bir matriks içerisine gömülen, bakteri topluluğu" olarak tanımlanmıştır.

Bakteriyel biyofilmlerin, tedavisi oldukça zor olan birçok kronik hastalığın başlıca etmeni olduğu bilinmektedir. Bunların en önemli örneklerini; endokardit, kistik fibrozis, otit, kronik rinosinüzit, kronik ostemiyolit, prostetik eklem enfeksiyonları, interovenöz katater ve stentlerden kaynaklanan enfeksiyonlar ve kronik yara enfeksiyonları oluşturmaktadır

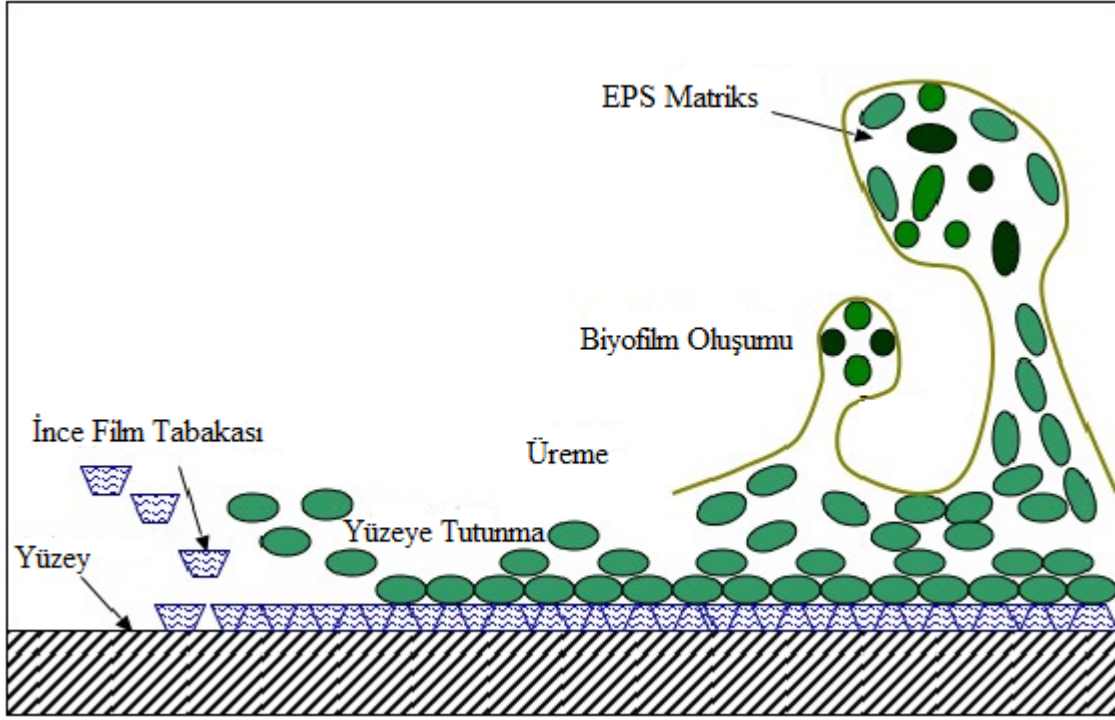
(37). Biyofilm kaynaklı kronik enfeksiyonların en temel karakteristikleri; antibiyotik tedavisine yüksek düzeyde dirençlilik göstermeleridir. Bunun yanında söz konusu enfeksiyonlar, konakçı sistemin doğal ve adaptif immün yanıtlarına karşı da dirençlidirler. Geleneksel olarak mikrobiyologlar bir antibiyotiğin etkinliğini, hastalık etmeni bakteriye karşı minimal inhibasyon konsantrasyonunu (MİK) incelemek suretiyle tayin etmektedirler.

MİK testlerinde planktonik (serbest) formdaki laboratuvar fenotipleri kullanılmaktadır. Dolayısı ile söz konusu testler sonucunda ancak planktonik formdaki bakterilere karşı etkin kemoterapi ve sonitasyon ajanı konsantrasyonu belirlenebilmektedir. Oysa günümüzde aynı bakterilerin biyofilm formlarının öldürülebilmesi için gerekli dozun, planktonik formlara etkili dozun binlerce kat üzerinde olabileceği bilinmektedir. Dolayısı ile kemoterapi ajalarının belirlenmesinde, özellikle biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar söz konusu olduğunda, planktonik bakterilerle yapılan laboratuvar testleri yerine biyofilm yapılarının kullanılması önerilmektedir (38, 39, 40, 41, 42)

2.3. Biyofilm Oluşum Evreleri

Biyofilm oluşumunu esas itibari ile dört ana evre altında incelemek mümkündür (43). Bu aşamalar sırasıyla (Şekil 2.2);

- 1) İnce tabakanın oluşumu
- 2) Tutunma (mikroorganizmaların uygun yüzeye geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak tutunması)
- 3) Büyüme ve yüzey kolonizasyonu, mikrokoloni ve biyofilm oluşumu (fenotipik ve genotipik değişiklikler)
- 4) Biyofilm hücrelerinin kopması olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 2.2. Biyofilm oluşum aşamaları (44).

2.3.1. İlk tutunma için ince tabakanın oluşumu

Doğal ortamda mikroorganizmaların doğrudan bir yüzeye bağlı olmadıkları ve uygun yüzeyin üzerinde oluşan ince film tabakasına (Conditioning film) bağlandıkları bilinmektedir. İnce film tabakası, oluştuğu yüzeyin kimyasal modifikasyonuna sebebiyet vererek mikrobiyal tutunmayı kuvvetli bir şekilde etkiler (45). İnce tabakanın varlığı ilk defa Loeb ve Neihof (1975) tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar mikrobiyal tutunmanın ilk adımının söz konusu ince tabakanın oluşumuyla başladığını öne sürmüşlerdir. Sulu ya da karasal ortamlarda oluşan ince tabakanın yapısında polisakaritler, glikoproteinler ve hüyük bileşiklerin olduğu saptanmıştır (47, 48, 49, 50). Diş plaklarının ağız hastalıkları ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, diş minelerinin biyofilm oluşumundan önce protein benzeri bir yapıyla (pelikül) kaplandığı ve yapının genellikle albümin, glikoproteinler, lipidler, lizozim, fosfoproteinler ve tükürüğü oluşturan diğer bileşenleri içerdiği belirlenmiştir (51). İnce tabakanın biyofilm gelişimindeki esas rolü, özgün yüzeyin fizikokimyasal özeliğini modifiye ederek bakterilerin yüzeye tutunabilmeleri için imkan sağlamasıdır. Bir yüzeyinin topografisi, mikrobiyal tutunma için bir temeldir. Yüzey ne kadar pürüzlü olursa mikrobiyal tutunma ve dolayısıyla biyofilm oluşumu o kadar hızlı gerçekleşir. (52). Yüzey pürüzlülüğünün yanı sıra, yüzeyin fizikokimyasal özeliği de mikrobiyal tutunma için etken faktörlerden biridir. Yapılan

araştırmalar sonucunda teflon veya plastik gibi hidrofobik ve non-polar yzeylerde mikrobiyal tutunmanın, hidrofilik ve polar yzeylere kıyasla daha çok gerçekleştiği belirlenmiştir (53, 54, 55).

2.3.2. Tutunma

Biyofilm oluşumunun bu aşamasında bakteri hücreleri yzeyeyle tam olarak temas kurmamaktadır. Tutunmanın ilk aşaması olan geri dönüşümlü tutunmada bakteri hücresi ile yzeyeyle arasında zayıf etkileşimler olarak bilinen elektrostatik gler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals gleri meydana gelmektedir. Bir nceki aşamada da bahsedildiği gibi yzeyeyle ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin payı çok büyüktür (8, 56, 57). Bu fazda olan bakteriler yzeyeyle yakınındadır, ancak henüz yzeyeyle temas etmiş değillerdir. Mikroorganizmalar geri dönüşümlü tutunma aşamasında, yzeyeyle yaşamak için yeterli besin maddesinin olup olmadığını araştırırlar. Bu aşamadan sonra geri dönüşümsüz tutunma aşamasına geçilir. Geri dönüşümsüz tutunmayı sağlayan gler ise yzeyeyle kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri olarak bilinmektedir. Ayrıca bakteri hücreleri flagella ve pili gibi organelleri ile ve EPS (Ekstraselüler polimerik matriks) oluşturarak yzeyeyle dönüşümsüz olarak bağlanabilirler (56). Katyonlar, çeşitli makromoleküller ve kolloidal materyaller boru hattında tutulduğunda, mikroorganizmalar öncelikle organik materyale dönüşümlü olarak, sonra da flagella ve fimbriya yapıları ile geri dönüşümsüz olarak tutunmayı gerçekleştirirler. Tutunmayı kolaylaştıran EPS yapıları birçok biyofilm üreticisi bakteri türü için tanımlanmıştır. Ancak EPS oluşturmayan bazı bakteri türlerinin de yzeyeyle bağlanabildiği saptanmıştır. Geri dönüşümsüz tutunma aşamasında olan bakteri hücrelerinin yzeyeyle uzaklaştırılması için sonikasyon ve kazıma gibi güçlü işlemlerin yapılması gerekmektedir. Gıda endüstrisinde en yaygın olarak *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* türleri biyofilm oluşurmaktadır. Et yzeyeylelerine bağlanabilen bakteriler arasında ise *L. monocytogenes*, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. sayılabilir (56). Dondurma üreten bir işletmede yapılan çalışmada, üretimden 8 saat sonra dondurma makinesinin taşıyıcı kayışı üzerinde oluşan biyofilm tabakasında *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Escherichia* ve *Edwardsiella* içeren enterobakterler yanında *Aeromonas*, *Plesiomonas*,

Moraxella, *Pseudomonas* ve *Alcaligenes* spp. gibi Gram negatif ve *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* spp gibi Gram pozitif bakteriler izole edilmiştir (58).

2.3.3. Tutunan bakterilerin olgunlaşması ve mikrokoloni oluşumu

Biyofilm oluşumunun bu evresinde tutunan bakteri gelişmeye başlar ve bir müddet sonra bölünür. Ayrıca bu aşamada EPS yapıda, diğer planktonik hücrelerin yakalanması da sağlanır. Bu aşamada ilk bakteri hücresi, tutunduğu yüzeyde koloni oluşturmaya başladıktan sonra aynı yüzeyde başka bakteriler de koloni oluşturmaya başlarlar. Böylece polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür. EPS senteziyle beraber bakteriler oluşan EPS'nin içinde gömülü bir vaziyetle yaşamaya devam ederler. Bu durum bakterileri çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli kılar. Ayrıca biyofilm yapısı, bakterilerin UV ışınlarına karşı direnç kazanmalarına, diğer bakteriler ile genetik aktarım yapmalarına ve sekonder metabolit üretimlerinin artmasına da yol açar (56, 59).

Daha sonraki evrede ise, mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler. Konfokal lazer mikroskopisi ile yapılan çalışmalar bakterilerin, kompleks ekzopolisakkarit ile çevrilmiş mikrokoloniler içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuştur. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (60).

2.3.4. Dağılma

Biyofilm içindeki bir bakterinin farklı bölgelerde kolonize olabilmesi için birtakım dağılma mekanizmalarına ihtiyaç vardır. Biyofilm gelişiminin kopma veya ayrılma evresinde tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum basamağının bir parçası olarak tek bir hücrenin veya çoklu hücrelerin kopmasının bir sonucu da olabilir (56). Tutunmuş hücreler mikrokolonilerin oluşumu için ekzopolisakkarit üretir ve biyofilmin yayılabilmesi için mikroorganizmalar yüzey boyunca yavaşça göç ederek mantar şeklini andıran yapılar oluştururlar. Primitif dolaşım sistemine paralellik gösteren su dolu kanallar, mikrokoloniler arasında oluşturularak besinsel gereksinimlerin giderilmesine ve toksik atıkların uzaklaştırılmasına olanak sağlar. Bu kompleks ve organize yaşamsal yapının nasıl

düzenlendiğine ilişkin sorular hala güncelliğini korumakta ve yeni çalışmalara kaynak teşkil etmektedir (36).

2.4. Ekstrasellüler Polimerik Matriks (EPS)

Biyofilmlerin çoğunda mikroorganizmalar kuru ağırlığın % 10'undan daha azını oluştururken, matriks % 90'dan daha fazlasını oluşturmaktadır. Matriks çoğunlukla mikroorganizmaların kendileri tarafından üretilen ve biyofilm hücrelerinin yerleştiği ekstrasellüler materyaldir. Matriksin içeriği; biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların türüne ve biyolojik ve biyolojik olmayan birçok faktöre bağlıdır. EPS üç boyutlu biyofilm yapısının iskeletini oluşturur. Bu yapı, biyofilmin yüzeylere adezyonu ve kohezyonundan sorumludur (61). EPS'nin içeriğini genellikle bakteriler tarafından sentezlenen ve hücre dışına salgılanan ekzopolisakkaritler, proteinler ve ekstrasellüler DNA oluşturmaktadır.

Ekzopolisakkaritler % 50-70 oranında organik karbon içerir. Söz konusu ekzopolisakkaritlerin çeşitliliği ve miktarı bakteri türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir (62). Bu EPS'ler hücreleri yüzeye bağlayarak adezin gibi davranmaları dışında, hücreleri birbirlerine de bağlayarak antimikrobiyallerin biyofilmler içerisindeki mikrokolonilere difüzyonunu önlemekte ya da geciktirmekte, ve konağın savunma mekanizmalarından biyofilm organizmalarını korumaktadır (60). Biyofilm matriksi içerisinde bulunan bazı polisakkaritlerin, izolasyon koşullarına karşı dayanıksız olmaları nedeniyle kimyasal kompozisyonlarının tanımlanması oldukça zordur (63). Biyofilm matriksinde bulunan en önemli bileşenlerden biri olarak bilinen selüloz, monosakkarit monomerlerinin β 1-4 glikozit bağlarıyla bir araya gelmesiyle oluşmaktadır (64, 65, 66, 67).

Matriks içerisinde bulunan proteinler de selüloz gibi önemli bileşenlerdir. Proteinlerin tipi ve çeşitliliği biyofilmi oluşturan bakteri türüne ve çeşitliliğine bağlı olarak değişmektedir. Protein yapısında olan fimbriyalar bakterilerin inert yüzeylerle olan etkileşiminde önemli rol oynarlar. *S. Typhimurium* genomu 13 fimbriyal operon içermektedir ve bunların bazılarının biyofilm oluşumunda önemli olduğu gösterilmiştir. Amiloid benzeri hücre yüzey proteini olan kıvrımlı fimbriya (curli) konakçı kolonizasyonu, persistans, motilite ve invazyon gibi süreçlerde rol oynayan önemli bir proteindir. *Salmonella*'da kıvrımlı

fimbriya, ilk önce hücre-yüzey etkileşimini ve sonrasında da hücre-hücre interaksyonlarını teşvik ettiği için biyofilm oluşumunda önemlidir (68, 69).

Diğer taraftan hücre dışı DNA (eDNA), biyofilm matriksin yapılaşmasında önem arz etmektedir. Bazı bakterilerin matriks yapısındaki DNA, rastgele bir şekilde kromozomal DNA'dan köken almakta ve bu DNA matriks içerisinde hücre-hücre etkileşimine katkı sağlamaktadır. Yapılan biyofilm çalışmalarında araştırmacılar, hücre dışı DNA'nın Gram pozitif (70, 71) ve Gram negatif (72, 73) bakterilerinin biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynadığını öne sürmüştür.

Biyofilm yapısındaki bakteriler, zorlu büyüme ve çevre şartlarında farklı bir hayatta kalma kapasitesi göstermektedir. Biyofilm yapısındaki bakterilerin bu eşsiz kapasitesi; 1- Biyofilm yapısı içerisindeki bakterilerin çevresel tehditlerden korunmasına, 2- Besinlerin yakalanmasına ve hücrelerin metabolik birlikteliğine, 3- Farklı büyüme gereksinimi olan bakteri türlerinin farklı biyofilm bölgelerinde yaşayabilmesine, 4- Hücreler arası haberleşme ve genetik madde aktarımına, olanak sağlamaktadır (74).

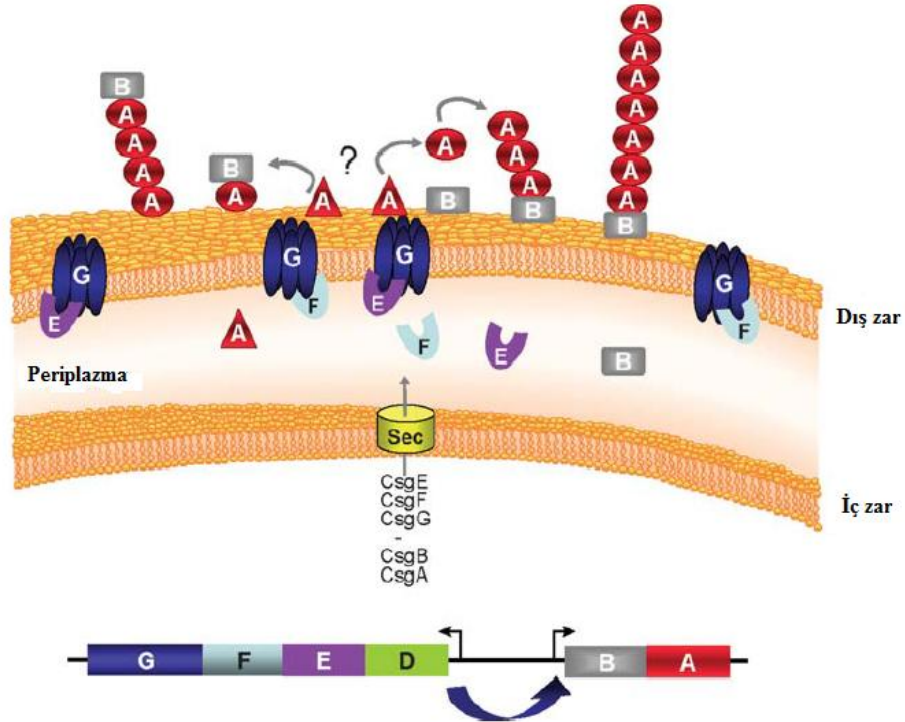
2.5. *Salmonella*'nın Biyofilm Matriksinde Bulunan Önemli Bileşenlerin Genetik ve Biyokimyasal Doğası

2.5.1. Kıvrımlı fimbriya

İlk defa 1980 yıllarında *E.coli*' de tanımlanan kıvrımlı fimbriya proteini, *Enterobacteriaceae* familyasının birçok üyesi tarafından sentezlenmektedir. Kıvrımlı fimbriya bu bakterilerde biyofilm matriksinin bileşenlerinden biridir. Kıvrımlı fimbriyalar bakterilerde; yüzeye tutunmada, hücre agregasyonunda ve biofilm oluşumunda görev yapmaktadır. Kıvrımlı fimbriya içeren bakteriler Diazo Kongo kırmızısı boyası (CR) ile takviye edilmiş katı ortamlar üzerinde üretildiğinde boyanırlar (75). *E. coli* kıvrımlı fimbriya üretiminde rol alan altı protein, *csgBA* ve *csgDEFG* operonları tarafından kodlanmaktadır (76) (Şekil 2.3). *Salmonella* cinsinde de aynı işlevden sorumlu olan homolog operonlar (*agfBA* ve *agfDEFG*) tanımlanmıştır (77, 78). *S. Typhimurium*'da *agf* operonları tarafından kodlanan fimbriyalar ince agregatif fimbriya olarak adlandırılmaktadır. *csgBA* operonu fimbriya'nın ana yapısal alt-birimi olarak bilinen CsgA ve çekirdek protein olan CsgB proteinlerini kodlamaktadır (76, 79). *csgBA* operonunda yer alan *csgC* geni için yapılan çalışmalar sonucunda, bu genin kıvrımlı fimbriya

biyosentezinde herhangi bir rol üstlenmediği saptanmıştır (Collinson vd. 1996, Hammar vd. 1995). CsgA ve CsgB proteinleri yaklaşık aynı boyutlarda olmakta birlikte, dizi analizleri sonucunda sadece % 30 oranında benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. CsgB proteinin yokluğunda kıvrımlı fimbriya sentezlenemez ve ana alt birimi olarak bilinen CsgA proteini polimerize olmamış bir şekilde salgılanır (79, 80).

Kıvrımlı fimbriya sentezi için gerekli olan CsgA ve CsgB proteinlerinin aynı hücreden sentezlenmeleri bir zorunluluk değildir. Bakteriler arası tamamlama olarak adlandırılan süreç sırasında; *csgB* mutant hücreleri tarafından salgılanan CsgA proteini, sadece *csgB* sentezleyen bir diğer hücrenin yüzeyinde kıvrımlı fimbriya sentezi için kullanılabilir. Bakteriler arası tamamlama süreci, verici olarak CsgA proteinini salgılayan suşlar ve alıcı olarak CsgB proteinini salgılayan suşlar kullanılarak tanımlanmıştır (79). *S. enterica*'da bakteriler arası tamamlama süreci kıvrımlı fimbriya sentezi için alternatif bir yoldur (81).



Şekil 2.3. Kıvrımlı fimbriya sentezinin model şeması (82).

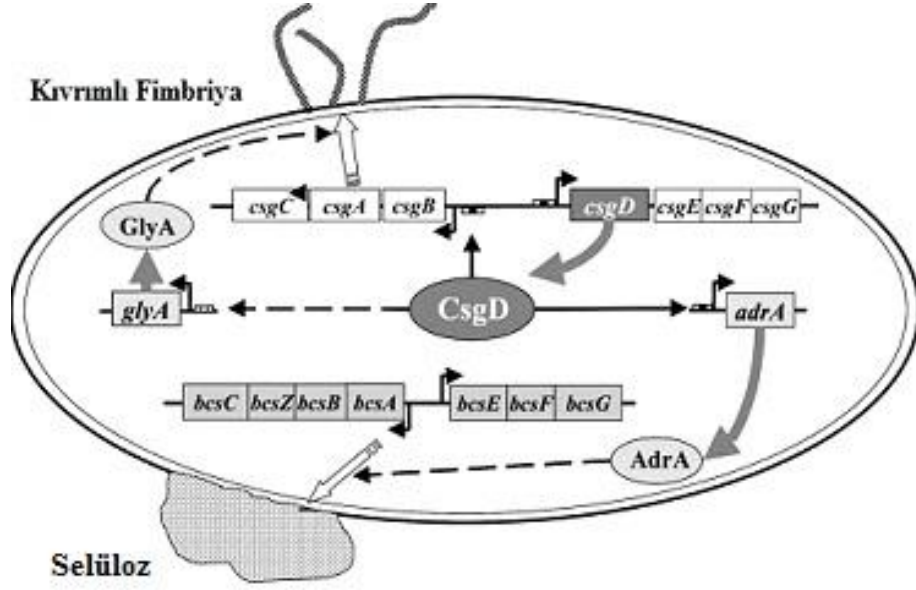
Kıvrımlı fimbriya sentezi için *csgDEFG* operonu tarafından dört protein sentezlenmektedir. Bu proteinlerden CsgD kıvrımlı fimbriyanın sentezi için gereklidir ve promotora bağlanarak *csgBAC* operonunun transkripsiyonunu sağlar (Şekil 2.3) (76).

CsgG proteini hücrelerin dış zarında bir lipoprotein olarak görev yapar ve CsgA ve CsgB'nin kararlılığı ve salgılanması için gereklidir (80, 83). *csgG* mutant suşlar Kongo kırmızı boyası içeren besiyeri ortamında beyaz koloniler oluşturur ve elektron mikroskopisi (EM) incelemesi sonucunda hiçbir fimbriya görüntüsüne rastlanmaz. *csgG* mutant suşları hücreler arası tamamlama sürecinde verici veya alıcı olarak işlev yapamazlar. Fonksiyonel CsgG veya CsgB proteinleri bu hücreler tarafından sentezlenmemektedir (84). CsgE bir priplazmik proteindir ve kıvrımlı fimbriyanın sentezlenmesinde önemli rol oynar. *csgE* mutant suşlarda kıvrımlı fimbriya sentezlenmesi gerçekleşmez ve CsgA ve CsgB proteinlerinin ifade düzeyleri oldukça azalır. *csgE* mutant suşlar tarafından sentezlenen CsgA proteinleri, doğal suşlara kıyasla morfolojik olarak farklılık göstermektedirler (80).

2.5.2. Selüloz

Salmonella'da biyofilm bileşeni olarak önemli bir rol üstlenen selülozun biosentezi CsgD'nin doğrudan *adrA*'ya bağlanması ile pozitif bir şekilde regüle edilmektedir. *adrA* regülatör proteini, bakteriyel selüloz sentez operonu olan *bcsABZC*'yi, hücre içindeki c-di-GMP seviyesini değiştirmek suretiyle regüle etmektedir. Selüloz kompleksi, *bcsA* ve *bcsB* genleri tarafından kodlanmaktadır. *bcsZ* geni ise selüloz enzimini kodlamaktadır (85, 86) (Şekil 2.4).

csgD mutantlarının çok hücreli davranış özelliğinden yoksun olduğu ve Kongo kırmızısı içeren agar plaklarında düz ve beyaz koloni (saw) morfoloji gösterdiği belirlenmiştir (87). *csgD* mutantları kullanılarak cam üzerinde gerçekleştirilen biyofilm denemelerinde, CsgD proteininin biyofilm olgunlaşması için gerekli olduğu ama mikrokoloni oluşumu için önem taşımadığı saptanmıştır (88).



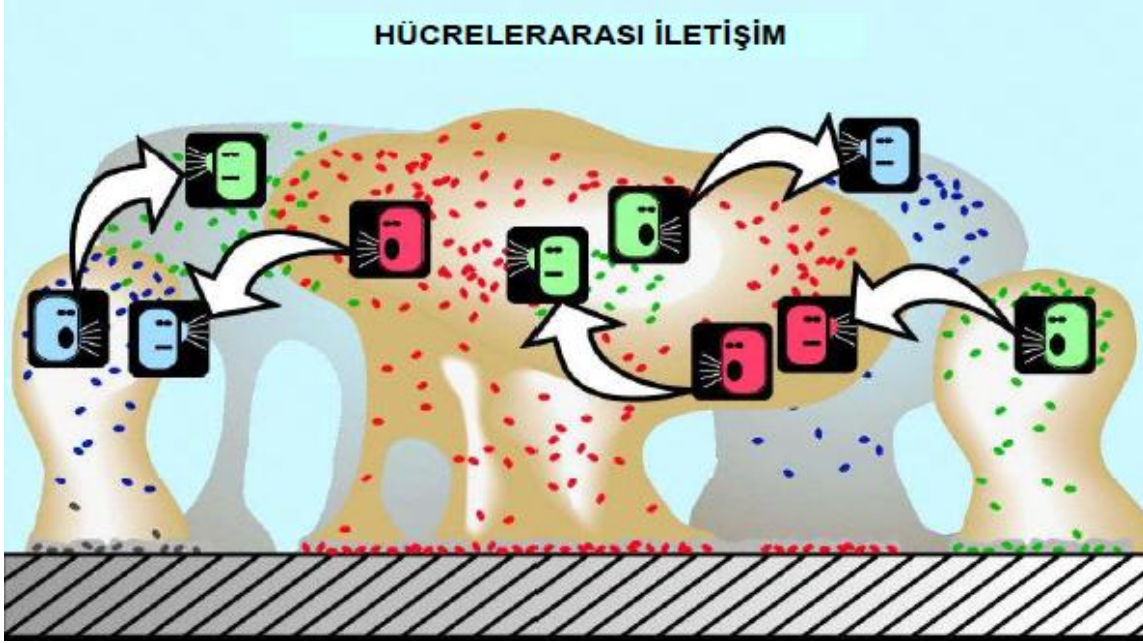
Şekil 2.4. Selüloz biyosentezi ve *CsgD* regülasyonu (86).

2.6. Biyofilm Oluşumunda Hücre-Hücre Etkileşimlerinin Rolü

Biyofilm oluşumu sadece bakterilerin bir araya gelerek ve belirli bir yüzeye tutunarak yapışmaları ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam etmeleri ile özetlenebilecek, rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Bakteriler biyofilm oluşturmak için çeşitli kimyasal iletişim mekanizmaları kullanırlar. Kimyasal sinyalin, lokal hücre dışı konsantrasyonunun belirli bir seviyeye ulaşması, çevrede bulunan bakteriler için o bölgede belirli yoğunlukta bir hücresel kümelenmenin başladığı anlamına gelir. Kimyasal olarak popülasyon yoğunluğunun hissedilmesi işlemine ‘quorum-sensing’ (yeter sayı algılama) adı verilir. Yeter sayı algılama ilk olarak 1979 yılında Nealson ve Hastings’nun bazı Gram negatif bakterilerin belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra bir ışık yaydıklarını fark etmesi ile gündeme gelmiştir. Daha sonra Eberhard ve arkadaşları (1986) N-asil homoserin lakton’nun (AHL) biyoluminisens için gerekli olan agregasyonu başlatan faktör olduğunu kanıtlamıştır (Şekil 2.5).

Bakteriyal topluluğun oluşması için itici güç, mikroorganizmaların rekabete dayalı doğal seleksiyonundan ziyade kendiliğinden örgütlenme ve hücreler arasında haberleşme potansiyelinden kaynaklanmaktadır (91, 92, 93). Bu kavram özellikle bakteriyal biyofilm

topluluklarını incelerken ortaya çıkmaktadır (94, 95). Hücre-hücre iletişiminin biyofilmden hücrelerin ayrılması ve tutunmasında rol oynadığı belirlenmiştir (91).



Şekil 2.5. Bakteri hücreleri arasından gerçekleşen haberleşmenin model şeması (96).

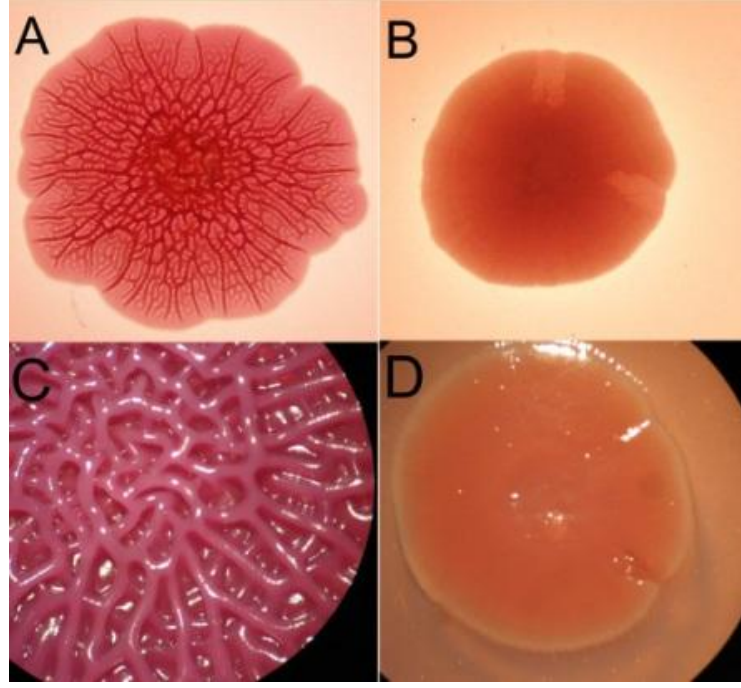
Doğal koşullarda meydana gelen değişimlere bakterilerin başarılı bir şekilde adapte olması; bakterilerin algısal yeteneğine, dış çevreye verdikleri yanıt ve buna uygun olarak gen ifadesini regüle etmesine bağlıdır (91). Hücre-hücre iletişimi (Quorum sensing) oto-indüksiyon (AI) işlemine dayanmaktadır (90). Bu mekanizma ortamdaki diğer bakterilerin izlenmesine olanak sağlayan bir çevre algılama sistemi olarak tanımlanabilir. Hücre iletişim sürecinde kimyasal sinyallere yanıt konsantrasyona bağlı bir durumdur. Fizyolojik yanıt gerçekleşmeden önce sinyal molekülünün kritik eşik konsantrasyonuna ulaşması gerekir (93). Boronol diester molekülleri (AI-2) hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler arasındaki interspesifik ilişkide rol alırken, oligopeptidler ve N-asilhomoserin laktonlar (AHL), Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde intraspesifik ilişkide görev yapan temel AI molekülleridir (93, 94). Hücre-hücre iletişim sisteminin önemli mikrobiyal aktivitelere katıldığı bilinmektedir. Bu aktivitelere; Gram negatif bakterilerde ekstrasellüler enzimlerin sentezi, biofilm gelişimi, antibiyotik üretimi, biyosüpfaktan üretimi, EPS ve ekstrasellüler virülans faktörlerin sentezi, örnek olarak verilebilir (91, 92, 97, 98).

2.7. *Salmonella* 'da Biyofilmin Yapısal Karakterizasyonu

Salmonella 'da matriks bileşenlerine bağlı olarak biyofilm yapılarının morfolojik karakterlerinin değiştiği bilinmektedir. *Salmonella* 'da ekstrasellüler matriksin ana bileşenleri olan selüloz ve kıvrımlı fimbriyanın sentezi sıklıkla birlikte gerçekleşir. Bu koloniler kongo kırmızısı içeren agar besiyerisinde kırmızı, kuru ve pürüzlü (rdar) bir morfolojik gösterirler (86).

Katı besiyerinde bu koloni morfolojisini oluşturan hücreler, genellikle sıvı kültürde hücre kümelenmesi, sıvı-hava ara fazında son derece sıkı bir pelikül yapısı ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumu ile karakterize edilirler (87). *Salmonella* yaşam döngüsü dikkate alındığında, rdar morfolojisinden kaynaklı olan ve sıvı kültürlerde gözlenen hücre kümelenmesinin; *S. Typhimurium*'un virülanslığında rol alan bir faktör olmasından çok, ortamda kalıcılığın sağlanabilmesi için geliştirdiği bir strateji olduğu düşünülmektedir (24).

Kıvrımlı fimbriyanın altı ünitesi (AgfA) sentezinden sorumlu olan gen susturulduğu zaman biyofilm matriksi için yalnız selüloz sentezlenir. Bu durumda ortaya çıkan koloni morfolojisi "pdar" (pembe, kuru ve pürüzlü) olarak tanımlanmaktadır (13, 77). Ekzopolisakkarit olarak yalnızca selüloz sentezleyen bakterilerin sıvı-hava arafazındaki biyofilmleri gevşek ve elastik bir yapıya sahiptir ve sıvı kültürlerde pelikül yapısı oluşturmazlar. Diğer taraftan insersiyonel mutasyonla inaktif hale getirilen ve muhtemelen bir transmembran proteini kodlayan *adrA* geni bakımından mutant suşların oluşturduğu koloniler "rdar" morfolojisi yerine sadece kıvrımlı fimbriyayı sentezleyebilen "bdar" (kahverengi, kuru ve pürüzlü) morfolojisine dönüşmektedir (87). Bu ince agregatif fimbriyalar selülozun oluşturduğu elastik ve stabil bağların aksine hücreler arasında katı ve kırılabilir bağlar kurar. Çok hücreli davranış durumuyla ilişkili olan ve durağan gelişme fazında ifade olunan kıvrımlı fimbriya ve selüloz, *agfD* (*csgD*) tarafından pozitif şekilde regüle edilmektedir. *agfD*'nin delesyonu kırmızı, buruşuk, kuru ve yayılan bir koloni morfolojisi olan rdar'ı; kıvrımlı fimbriya ve selülozu üretemeyen ve beyaz düz bir koloni morfolojisi olan, "saw" morfolojisine çevirmektedir (77) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. *Salmonella*'da rdar (A ve C) ve bdar (B ve D) morfotipleri (100).

2.8. *Salmonella*'da Çevresel Koşullarının Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi ve Biyofilm Üretiminin Matematiksel Olarak Modellenmesi

Genellikle bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm yapıları, bakterilerin çevreye uyum gösterme şekli olarak kabul edilmektedir. Biyofilm yapısındaki bakteri hücrelerinin genotipik ve fenotipik olarak planktonik hücrelere kıyasla farklılık gösterdikleri bilinmektedir (101). Biyofilm yapısı bakterileri UV, metal toksisitesi, pH ve ozmotik değişiklikler, dehidratasyon, konak immün tepkiler, antimikrobiyal maddeler ve dezenfektanlar gibi çeşitli çevresel etkilerden korumaktadır (22, 102, 103, 104). *Salmonella* enfeksiyonlarından korunmayı güçleştiren temel etken, neredeyse tüm serovaryetelerin özellikle stres koşullarında oluşturduğu biyofilm yapılarıdır. Bu bakterilerin biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma yetenekleri, oluşturdukları enfeksiyonların çapraz kontaminasyonlarla hızlı bir şekilde yayılmasına yol açmaktadır (12, 105).

Gram negatif bakterilerde çeşitli çevresel koşullar (besin ihtiyacı, konakçı metabolitleri, kolonize olunan yüzeylerin fiziksel ve kimyasal nitelikleri, sıcaklık, oksijen gerilimi, tuz konsantrasyonu ve ozmolarite) ve bakterinin kendi ürettiği sinyaller (örneğin; indol, siklik-

diguanilat, asetil fosfat ve N-asilhomoserin laktonlar) biyofilm oluşumunda, olgunlaşmasında ve dağılmasında rol oynar (106, 107, 108, 109, 110, 111). Özellikle *Salmonella*'da inkübasyon sıcaklığı, ozmalarite, pH ve atmosfer gibi çevresel faktörlerin biyofilm üzerindeki etkisinin aydınlanması araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (112, 113, 114, 115, 116).

Salmonella 'da genetik ifadenin; sıcaklık, O₂, CO₂, pH ve besin miktarı gibi çevresel koşullarında değiştiği bilinmektedir (87, 117). *S. Typhimurium*'da ve yakın ilişkili bakterilerde, flagellar hareket, pilus ve kolanik asit, lipopolisakkarit, ortak enterobakteriyel antijen lipid II ve selüloz sentezi ile ilgili yapısal genler, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda katkı sağlamaktadır (64, 85, 118, 119, 120). Bakterilerin biyofilm oluşturabilme kabiliyeti buldukları besin ortamı, tutunacakları yüzeyin tipi, sıcaklık, pH, temas süresi gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği çeşitli çalışmalar tarafından kanıtlanmıştır (6, 17, 18, 19).

Farklı konsantrasyonlarda NaCl bulunduran ortamlarda, değişen hücre yüzey özellikleri ve biyofilm dağılmaları arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu ilişki artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak azalan hücre hidrofobitesine dayanmaktadır. Yüksek hidrofobite, yüzeylerde biyofilm oluşumu için son derece önemliyken artan NaCl konsantrasyonu hücre adezyonunu engellemektedir (114).

pH değişimlerinden ve farklı tuz değişimleriyle belirlenen su aktivitesinden, gıda bozulmalarının ve gıda kaynaklı hastalıkların önüne geçilmesinde ve gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasında yararlanılmaktadır. Özellikle geleneksel tuzlama yöntemi (NaCl) gıda kaynaklı patojenlerin ve gıda bozulmalarına sebep olan mikroorganizmaların öldürülmesinde ya da gelişmelerinin önlenmesinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (121). Bu sonuçlar neticesinde gıdalar üzerinde de biyofilm oluşturabildiği bilinen *Salmonella*'nın gıda yüzeylerindeki biyofilmlerinin engellenmesinde tuzlama ve pH etkileri gözetilerek gıda korumasına katkıda bulunulabilir.

Bakteriler de biyofilm gelişiminin başlaması besinlerin var olup olmaması gibi spesifik çevresel etmenlere bağlı olarak değişmektedir. Yapılan bir araştırmada ortamda kısıtlı besin bulunması halinde, *Salmonella*'nın biyofilm üretim miktarının arttığını saptanmıştır (112). Bu nedenle O'Toole vd. (2000) besin yokluğunda kullanılan metabolik yolun bütün biyofilm gelişim döngüsünü kapsayabileceğini belirtmişlerdir.

Biyofilm oluşumu değişik fiziksel, kimyasal ve biyolojik protokolleri kapsayan karmaşık ve dinamik süreçtir. Biyofilmin gelişimi bakterinin cinsine ve karşılaştığı çevre etkenine göre değişiklik göstermektedir. Bu karmaşık yapının anlaşılması ve iyi tanımlanması için matematiksel modelleme önemli bir yöntemdir. Matematiksel modelleme araştırma bilgilerinin doğrulamasının yanı sıra çalışmaların tahmin süreçlerinde de araştırmacılara bilgi sunmaktadır. Matematiksel modellemenin bu özelliği kullanılarak araştırmaların dizayn edilmesinde ve deney yükünün azaltılmasında önemli bir araç olabilir. Yapılan modeller çalışılan bakterilerin farklı koşullar altındaki biyofilm davranışları hakkında önemli bilgiler sunabilmektedirler (123). Çoğu biyofilm çalışmalarında çevresel faktörlerin incelenmesi tek zaman diliminde gerçekleştirilmektedir (115, 124, 125). Bu durum biyofilmin davranışlarının aydınlatılmasında kısıtlı bir bilgi sağlamaktadır. Matematiksel model uygulamaları biyofilm gelişiminde ve oluşumunda etken faktörlerinin çoklu ve farklı zaman diliminde incelenmesini ve biyofilm davranışlarının izlenilebilir hale gelmesine olanak sağlar (115, 126).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Salmonella biyofilmleri klinik ve endüstriyel açıdan ciddi sorunlar yaratmaktadır. Bu sorunlara etkin çözümler bulmada temel yaklaşım, söz konusu bakterilerin biyofilm üretiminde kritik önem taşıyan gereksinimlerini belirlemek ve modellemektir. Bu esaslar doğrultusunda planlanan çalışmada; Türkiye kökenli *Salmonella enterica* serovar Virchow (*S. Virchow*) suşları kullanılarak, bu suşların farklı çevresel koşullarda oluşturduğu biyofilm yapılarındaki çeşitliliğin incelenmesi ve bu koşullara uygun matematiksel modellemenin geliştirilmesi planlanmıştır. Böylece yoğun deney yükü gerektiren çalışmalara ihtiyaç duyulmadan, özellikle endüstriyel çevrelerde bu matematiksel modeller kullanılarak biyofilm yapılarının gelişiminin öngörülmesi ve buna bağlı olarak korunma stratejilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Diğer yandan, çevresel koşullar ekstrasellüler matriks bileşenleri olan kıvrımlı fimbriya ve selülozun üretim düzeylerini değiştirmekte, sonuçta da biyofilm oluşturma davranışlarındaki değişimlerin bu bileşenlerin aktivasyon düzeylerindeki farklılaşmalara mı yoksa çalışılan bakteri örneğinin orijinine mi bağlı olduğu sorusunu akıllara getirmektedir. Benzer şekilde çevresel koşulların değişimine bağlı olarak pelikül yapılarının kararlılığı da değişime uğramaktadır. Çalışmamız ile ilk defa pelikül yapısında ortaya çıkan rijit yapının kaynağının araştırılması amacı ile, farklı çevresel koşullarda oluşturulan pelikül yapıları FTIR denemelerine tabi tutularak yapılarındaki protein ve karbonhidrat miktarları ölçülmüş ve böylece pelikül yapısının kararlılığında rol oynayan ana bileşenin belirlenmesi mümkün olmuştur. Bu yapının stabilitesi üzerinde etkin parametrelerin tanımı biyofilm yapıları ile endüstriyel ve klinik alanda yürütülen mücadeleye yeni boyutlar kazandıracaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Bakteriler

Araştırmada kullanılan ve daha önceki araştırmalarda çiğ tavuk etlerinden izole edilmiş ve serotiplendirmeleri antiserumlar kullanılarak gerçekleştirilen DMC kodlu 16 adet *S. Virchow* suşu, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır.

4.1.2. Besiyerleri ve çözeltiler

Çizelge 4.1. Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck, Germany)

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

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlanır. Bu aşamalardan sonra hazırlanan broth besiyeri cam tüplere dağıtılır ve sterilizasyon işlemi otoklavda ($121^{\circ}\text{C} / 15$ dakika) yapılır.

Çizelge 4.2. Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (NaCl'siz)

İçerik	g/L
Trypton (Fluka,France)	10
Maya ekstraktı (Merck, Germany)	5
Agar (Merck,Germany)	15

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlanır. Bu aşamalardan sonra hazırlanan broth besiyeri cam tüplere dağıtılır ve sterilizasyon işlemi otoklavda ($121^{\circ}\text{C} / 15$ dakika) yapılır.

Çizelge 4.3. Kongo Kırmızısı İçeren ($40 \mu\text{g}/\text{mL}$) Luria Bertani (LB) Agar (NaCl'siz)

İçerik	g/L
Trypton (Fluka,France)	10
Maya ekstraktı (Merck, Germany)	5
Kongo kırmızısı (Sigma-Aldrich, USA)	0,04
Agar (Merck,Germany)	15

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanır. Çözülen içeriğe 0,04 gram Kongo kırmızısı ilave edilir. pH ayarı yapıp 15 gram agar ilavesinden sonra besiyeri 121°C 'de 15 dakika sterilize edilir.

Çizelge 4.4. Kalkoflor İçeren (50 µg/mL) Luria Bertani (LB) Agar (NaCl'siz)

İçerik	g/L
Tripton (Fluka,France)	10
Maya ekstraktı (Merck, Germany)	5
Kalkoflor (Sigma-Aldrich, China)	0,05
Agar (Merck,Germany)	15

Besiyeri içerikleri 1000mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanır. Çözülen içeriğe 0,05 gram kalkoflor (fluorescent brightner) ilave edilir. pH ayarı yapıp 15 gram agar ilavesinden sonra besiyeri 121°C 'de 15 dakika sterilize edilir.

Çizelge 4.5. Fosfatla Tamponlanmış Su (PBS)

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

Ortam içerikleri distile su ile 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra sterilizasyon işlemi 121 °C'de 15 dakika süre ile gerçekleştirilir.

Çizelge 4.6. Glasiyel asetik asit çözeltisi (%33'lük)

İçerik	g/L
Glasiyel asetik asit	33 mL
Distile su	67mL

4.2. Yöntem

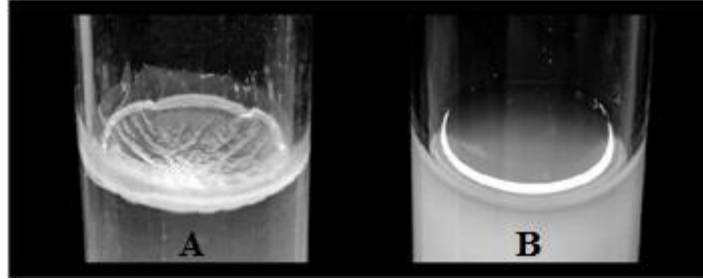
4.2.1. *Salmonella* suşlarının biyofilm morfoloğlarının belirlenmesi yoluyla kıvrımlı fimbriya ve selüloz sentezi özelliklerinin araştırılması

DMC kodlu 16 adet *S. Virchow* suşu -20°C stoğundan alınıp Luria Bertani (LB) broth besiyerlerine % 1 oranında inoküle edildikten sonra 37 °C'de 18 saat çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra aktif kültürlerden % 1 oranında 5'er mL'lik LB^{-NaCl} broth ortamlarına aktarılmış ve suşlar 37

°C’de bir gece inkübe edilmiştir (77). Bir gece inkübasyondan sonra, biyofilm matriksinin bileşenleri için indikatör özellik gösteren Kongo kırmızısını (40 µg/mL) içeren LB^{-NaCl} agar besiyerlerine aktif kültürlerden 10 µL damlatılmış ve petripler 20 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (13). 8 gün sonunda koloniler biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi amacı ile stereo mikroskobunda (Leica, Germany) incelenmiştir.

4.2.2. Sıvı besiyerlerinde pelikül oluşumu

İncelenmeye alınan suşlar 5 mL’lik LB^{-NaCl} broth besiyerlerinde bir gece boyunca 37 °C’de çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiştir. Sıvı-hava ara fazında pelikül oluşumlarının varlığını gösterebilmek için, aktif kültürlerden 0,5’er mL alınarak 4,5 mL LB^{-NaCl} broth besiyerlerine aktarılmıştır. Bakteri örneklerini içeren deney tüpleri; 20 °C’de 8 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra, pelikül oluşumu açısından değerlendirilmiştir (Şekil 4.1) (85).



Şekil 4.1. Sıvı besiyerinde sıvı-hava ara fazında bakteri tarafından üretilen pelikül yapısı (A) ve pelikül oluşturmayan bakteri kültürü (B) (85).

4.2.3. *S. Virchow* suşlarının selüloz üretim özelliklerinin kalkoflor bağlanma denemesi ile araştırılması

S. Virchow serotiplerinin selüloz üretim özelliklerinin araştırılması amacı ile suşlar 5 mL’lik LB^{-NaCl} broth besiyerlerinde bir gece boyunca 37 °C’de çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda aktif kültürden, kalkoflor (selüloz indikatörü) içeren LB^{-NaCl} agar besiyerlerine öze yardımıyla ekim yapılmıştır. Ekim yapılan ortamlar 20 °C’de 8 gün süresince inkübasyona bırakılmış ve 366 nm UV ışık altında incelenerek, selüloz üretim özellikleri, florasan ışık verip vermemelerine göre değerlendirilmiştir (127, 100).

4.2.4. *S. Virchow* suşlarının biyofilm üretim düzeylerinin belirlenmesi

Mikrotitre plak sistemlerinde farklı boyalar kullanılarak birçok mikroorganizmanın biyofilm üretim düzeyleri belirlenebilmektedir (128, 129, 130, 131). Biyofilmin miktar tayininde indikatör boya olarak kristal viyole yaygın şekilde kullanılmaktadır. Yöntem, mikrotitre plak kuyularının çeperlerine tutunmuş biyofilmlerin kristal viyole ile işaretlenmesi, biyofilm matriksine tutunan boyanın ise glasiyal asetik asit (% 33, v/v) çözeltisiyle çözdürülüp, spektrofotometrik (Perkin Elmer Victor 3, USA) olarak ölçülmesini esas almaktadır. Yöntemin bazı basamaklarında, daha kaliteli ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi için bazı modifikasyonlar yapılmıştır.

Tüm suşlar 5 mL'lik LB^{-NaCl} broth besiyerlerinde bir gece boyunca 37 °C'de çalkalamalı koşullarda geliştirilmiştir. Aktif kültürlerin OD değerleri spektrofotometrede 0,2'ye ayarlandıktan sonra, bu kültürlerden 30'ar µL alınarak 100 µL LB^{-NaCl} besiyeri ile karıştırılmış ve mikrodilüsyon plak kuyularına aktarılmıştır. Mikrodilüsyon plakları 20 °C' de (100) optimum biyofilm oluşum zamanını belirlemek amacıyla 24, 48, 72 ve 96 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlanan mikrotitre plaklarındaki kuyulara kristal viyole uygulanmıştır. Biyofilm üretim miktarları, biyofilm yapısında tutulan boyanın OD₅₉₅ dalga boyunda Elisa (Molecular Devices SpectraMax M2 Microplate Reader, USA) okuyucusunda okunması sonucu belirlenmiştir (100).

4.2.5. Farklı sıcaklık ve pH değerleri ile tripton konsantrasyonlarında *S. Virchow* suşlarının biyofilm üretim miktarlarının belirlenmesi

S. Virchow suşlarının biyofilm üretimi için optimum inkübasyon süresi belirlendikten sonra, farklı sıcaklık (20, 25, 30, 35, 37 ve 40°C), pH (4.5, 5.2, 5.9 ve 6.6) ve tripton konsantrasyonlarının (2, 4, 6, 8 ve 10 g/L) biyofilm üretimleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmayı gerçekleştirmek için farklı tripton konsantrasyonunda ve pH değerlerinde besiyerleri hazırlanmış ve uygun koşullarda sterilize edilmiştir. Farklı çevresel koşulların biyofilm üretim üzerindeki etkisi mikrotitre plak yöntemi kullanılarak araştırılmıştır (100). Bu çalışmalar için *S. Virchow* suşları 5 mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarımda bir gece inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Bir gecelik aktif kültürler spektrofotometrede (595_{nm}) OD = 0.2 değerine ayarlandıktan sonra bu kültürlerden 30'ar

μL alınarak 100 μL uygun besiyerlerini içeren mikrotitre plak kuyularına aktarılmıştır. Hazırlanan mikrotitre plakları, 20 °C'de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra ölçüm için gereken aşamalar da daha önce polistiren üzerinde biyofilm oluşumunda belirtildiği gibi tekrarlanmıştır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra ölçümler Elisa okuyucusunda OD₅₉₅'te yapılmıştır.

4.2.6. Farklı pH ve sıcaklık koşullarının kombinasyonları yapılarak *S. Virchow* suşlarının polistiren yüzeyde oluşturduğu biyofilm miktarının belirlenmesi ve matematiksel model uygulaması

Matematiksel model uygulaması bir önceki deney sonuçları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla *S. Virchow* suşlarının biyofilm üretim miktarları zamana (12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 ve 96 saat), sıcaklığa (20, 25, 27.5°C) ve pH (4.5, 5.9 ve 6.6) değerlerine bağlı olarak incelenmiş ve elde edilen değerler bir matematiksel model olarak tanımlanmıştır. Bunun için bir gecelik aktif kültürden 50 μL alınarak 5ml'lik (LB^{-NaCl}) sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 18 saat süresince 37°C çalkalamalı koşullarda (200 rpm) inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen aktif kültürler (LB^{-NaCl} besiyeri) ile OD 0.2 düzeyine (Shimadzu, Japan) kadar seyreltilmiş ve bu süspansiyonlardan 30'ar μL alınarak, 100 μL LB^{-NaCl} içeren 96 kuyulu mikrotitrasyon plaklarına aktarılmıştır. Hazırlanan mikrotitre plakaları farklı sıcaklıklarda (20, 25 ve 27.5°C) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri tamamlanan mikrotitre plaklarında biyofilm ölçümleri daha önce anlatılan aşamalar tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma dört paralel ve iki tekrar olarak yapılmıştır.

4.2.6.1. Gompertz denklemi

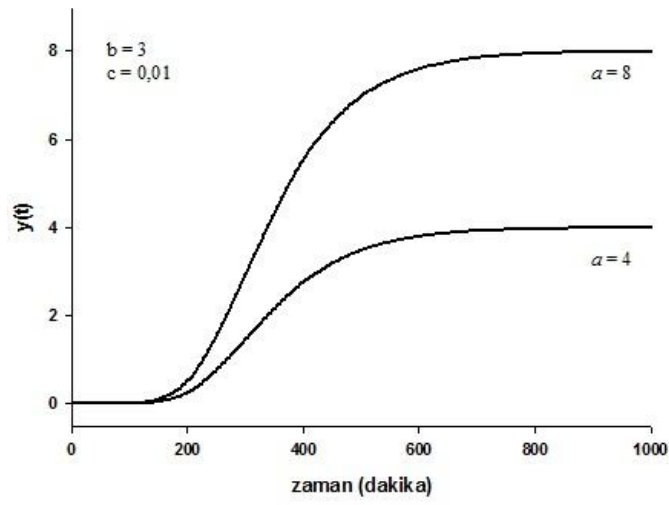
Gompertz denklemi (Denklemler 1) ilk defa 1825 yılında insanların ölüm oranını hesaplamak için kullanılmış bir denklemdir. Daha sonraki yıllarda Gompertz denklemi veya onun modifiye halleri mikroorganizmaların besiyerlerindeki veya gıdalardaki üreme eğrilerini tanımlamak için de çeşitli araştırmacılar tarafından uygulanmıştır (132, 133, 134). Gompertz denkleminin matematiksel ifadesi aşağıda verilmiştir;

$$y(t) = a \cdot \exp[-\exp(b - ct)] \quad (1)$$

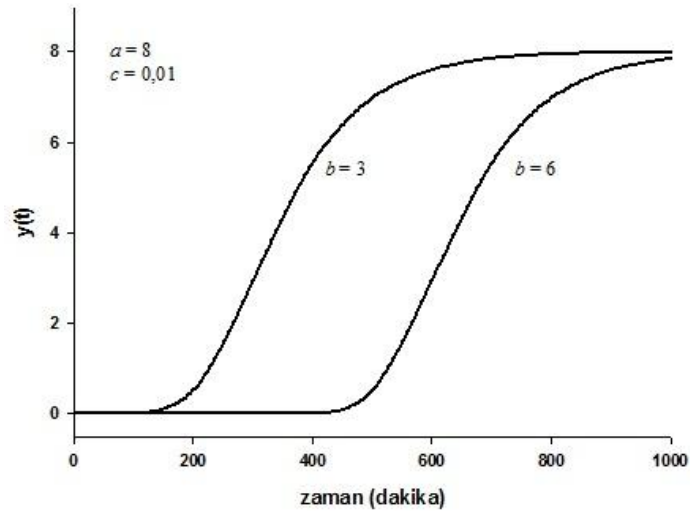
Burada $y(t)$ tanımlanan tepki (örneğin mikroorganizmaların büyümesi), t zaman, a , b ve c ise denklemin değişkenleridir.

Şekil 4.2’de Denklem (1)’in değişkenlerinin etkisi gösterilmektedir. Şekilden de anlaşıldığı gibi a değişkeni azami ya da asimptotik değeri, b değişkeni mikroorganizmaların üremeye başlama zamanını, c değişkeni ise mikroorganizmaların üreme hızını ifade etmektedir. Ancak, denklem (1) incelendiğinde a değişkeni dışında diğer değişkenlerin biyolojik anlamı anlaşılmamaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak için Zwietering ve arkadaşları (1990) Gompertz denklemini modifiye etmişlerdir.

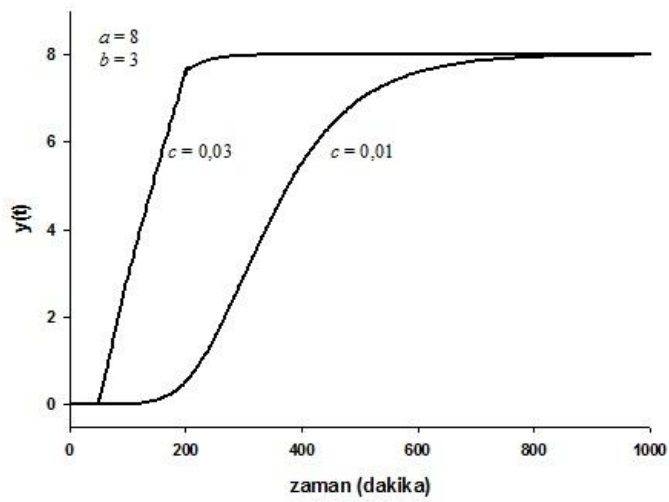
(a)



(b)



(c)



Şekil 4.2. Gompertz denklemi'nin (Denklem 1) değişkenlerinin etkisi.

4.2.6.2. Modifiye Gompertz denklemi

Eğrinin (Şekil 4.3’de görülen eğrilerden herhangi biri) kıvrılma noktasını bulmak için denklem (1)’in zamana göre ikinci türevi saptanır:

$$\frac{dy}{dt} = ac \cdot \exp[-\exp(b-ct)] \cdot \exp(b-ct) \quad (2)$$

veya

$$\frac{dy}{dt} = c \cdot y \cdot \ln\left(\frac{a}{y}\right) \quad (3)$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} = ac^2 \cdot \exp[-\exp(b-ct)] \cdot \exp(b-ct) \cdot [\exp(b-ct) - 1] \quad (4)$$

Kıvrılma noktasında, yani $t = t_i$ olduğunda denklem (1)’in ikinci türevi

$$\text{sıfırdır. } \frac{d^2y}{dt^2} = 0 \rightarrow t_i = b/c \quad (5)$$

Azami büyüme hızı (μ_m) kıvrılma noktasındaki birinci türev kullanılarak

$$\text{hesaplanabilir: } \mu_m = \left(\frac{dy}{dt}\right)_{t_i} = \frac{ac}{e} \quad (6)$$

Denklem (1)’de c yerine $\mu_m e/a$ konulabilir.

Kıvrılma noktasından geçen teğet doğrusunun denklemi şudur:

$$y = \mu_m \cdot t + \frac{a}{e} - \mu_m \cdot t_i \quad (7)$$

Büyümenin başladığı zaman kıvrılma noktasından geçen teğet doğrusunun t eksenine kesiştiği yer olarak tanımlanır:

$$0 = \mu_m \cdot \lambda + \frac{a}{e} - \mu_m \cdot t_i \quad (8)$$

Denklem (5), (6) ve (8) kullanılarak:

$$\lambda = \frac{b-1}{c} \quad (9)$$

Denklem (1)’de b yerine

$$b = \frac{\mu_m e}{a} \lambda + 1 \quad (10)$$

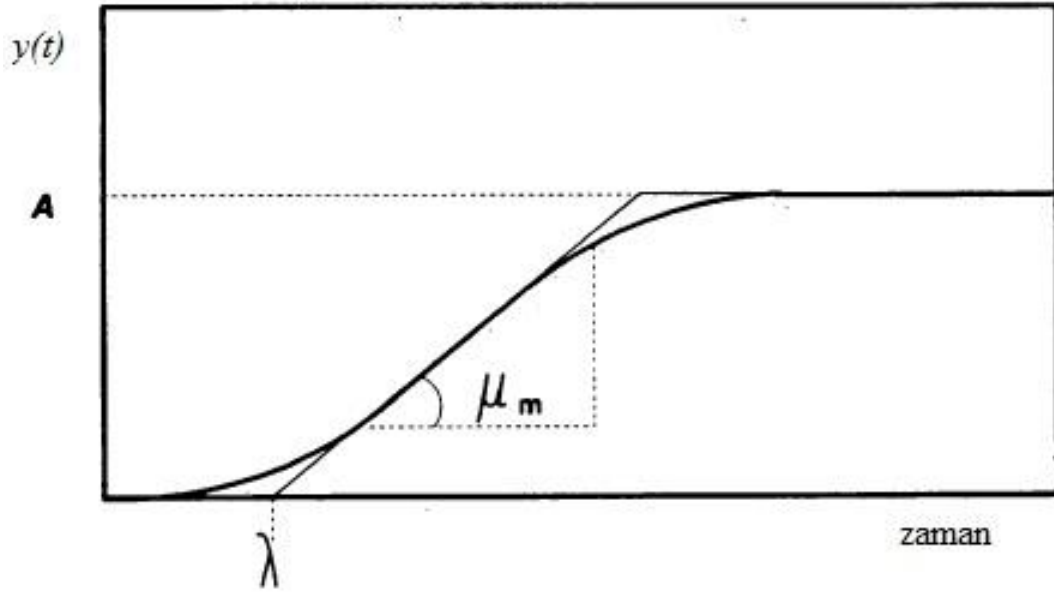
Konulabilir.

Asimptotik değer t sonsuza giderkenki değerdir:

$$t \rightarrow \infty : y \rightarrow a \Rightarrow A = a \quad (11)$$

Denklem (1)'de a yerine A konulursa, modifiye Gompertz denklemi (denklem 12) elde edilir:

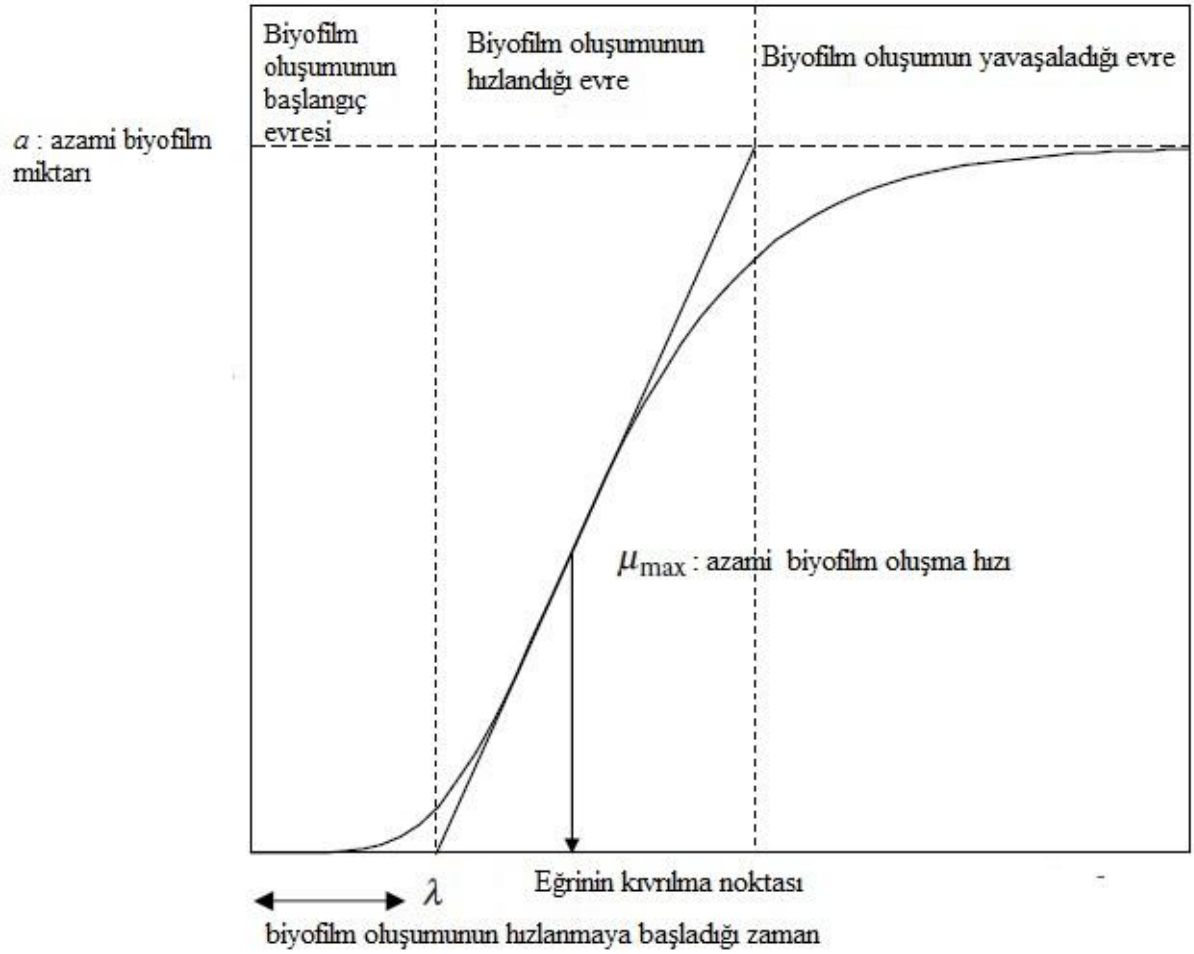
$$y(t) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_m e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (12)$$



Şekil 4.3. Modifiye Gompertz denklemi'nin (Denklem 12) değişkenlerinin grafik üzerinde gösterimi.

4.2.6.3. Modifiye Gompertz denklemi'nin biyofilm oluşumunu tanımlamak için kullanılması

S. Virchow suşlarının biyofilm üretimini (OD_{595} ve zaman) açıklamak için modifiye Gompertz denklemi (denklem 12) kullanılmıştır (134). Bu denklemin biyofilm oluşumunu tanımlayan hali için t zaman; $y(t)$ OD_{595} ; $e = 2,71828$; A azami biyofilm konsantrasyonu; μ_m azami biyofilm oluşma hızı ve λ biyofilm oluşumunun hızlanmaya başladığı zaman olarak alınmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Gompertz denkleminin değişkenlerinin grafik üzerinde gösterimi

Açıklanan bu modele göre eğer zaman $t \rightarrow \infty$, $y(t) \rightarrow a$ ve eğer zaman $t = 0$

$$y(0) = a \cdot \exp\left[-\exp\left(\frac{\mu_m \cdot e}{a} \lambda + 1\right)\right] \quad \text{ancak} \quad \text{hemen} \quad \text{her} \quad \text{zaman}$$

$$y(0) = a \cdot \exp\left[-\exp\left(\frac{\mu_m \cdot e}{a} \lambda + 1\right)\right] \approx 0 \quad \text{olduğu için başlangıç biyofilm miktarı 0 (sıfır)}$$

varsayılabılır.

Bu modelin uygunluğu belirtme katsayısı (R^2) ve ortalama karesel hata (OKH) değerleri dikkate alınarak incelenmiştir. Grafikler ve doğrusal olmayan bağlantımlar SigmaPlot 2000 (Chicago, IL, USA) kullanılarak elde edilmiştir.

4.2.6.4. İkincil modelin oluşturulması

Modifiye Gompertz denkleminin parametrelerinin (a , μ_m ve λ) sıcaklık (T) ve pH'a bağlılığını açıklamak için ikinci derece çok terimli denklem kullanılmıştır.

$$a(T, pH) \text{ or } \mu(T, pH) \text{ or } \lambda(T, pH) = a_0 + a_1T + a_2T^2 + a_3pH + a_4pH^2 + a_5T \cdot pH \quad (13)$$

Bu denklemde a_0 , a_1 , a_2 , a_3 , a_4 ve a_5 ikincil modelin katsayılarıdır. Bu modelde geriye dönüşümlü bağlanım kullanılarak istatistiksel olarak anlamlı olmayan parametreler ($P > 0.05$) elenmiştir.

Modelin uygunluğu, belirtme katsayısı (R^2) ve ortalama karesel hata (OKH) değerleri dikkate alınarak incelenmiştir. Grafikler ve doğrusal olmayan bağlanımlar SigmaPlot 2000 versiyon 12.00 kullanılarak elde edilmiştir (Chicago, IL, USA).

4.2.6.5. Oluşturulan biyofilm modelinin tahmin çalışmalarının yapılması

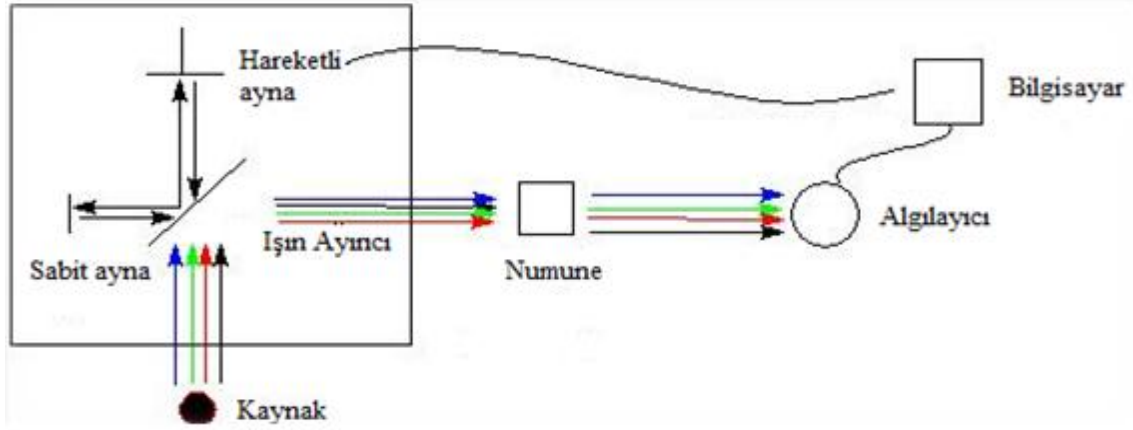
Matematiksel model oluşturulduktan sonra yapılan modelin çalışıp çalışmadığını test etmek için ara sıcaklık (23 ve 26 C) ve ara pH (5.3 ve 6.3) değerleri kullanılarak belirli bir zaman diliminde *S. Virchow* suşlarının biyofilm üretim miktarları mikrotitre plak yöntemi kullanarak saptanmıştır. (136). Elde edilen değerler istatistik analize tabi tutularak oluşturulan modelin doğruluğu araştırılmıştır. Grafikler ve doğrusal olmayan bağlanımlar SigmaPlot 2000 versiyon 12.00 kullanılarak elde edilmiştir (Chicago, IL, USA).

4.2.7. Farklı pH ve sıcaklık koşullarında oluşturulan pelikül yapısının Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR) ile biyokimyasal analizi

4.2.7.1. FTIR spektroskopisi

Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir. IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Matematiksel Fourier dönüşümü spektroskopisinde ışımaya şiddeti, zamanın bir fonksiyonu olarak alınır. Her dalga boyunu ayrı ayrı tarama gerekmeksizin hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir. FTIR spektroskopisi yöntemiyle, incelenen örnekte bulunan maddelerin atomik bağlarının kızılötesi ışığa maruz kaldığında oluşturdukları titreşimler belirlenebilmektedir. Böylece maddelerde meydana gelen çok küçük değişimler bile tespit edilebilmektedir. Bu yöntemle çok çeşitli tiplerdeki örnekler çalışılabilir.

FTIR spektroskopisi, malzeme testleri, kalite kontrol, araştırma ve akademik çalışmalarda bir altın standarttır. FTIR-ATR (Attenuated Total Reflectance); absorpsiyon bantlarının dalga boyunda azalma meydana getirilerek daha az emekle ve örnek kalınlığından bağımsız olarak soğurganlığı çok fazla olabilen farklı maddelerin spektrum analizlerine olanak sağlar. FTIR spektroskopisi çalışma prensibi Şekil 4.5’ te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. FTIR spektroskopisi çalışma prensibi (137).

Şekilden de anlaşılacağı üzere ışık kaynağından ayrıldıktan sonra bir ışın ayırıcıya (beam splitter) gelir. Burada ışın hem sabit aynaya hem de hareketli aynaya gönderilir. Daha sonra ışınlar aynadan yansiyarak “Işın Ayırıcı”ya geri gelir. Buradan da örneğin bulunduğu yere gider. Örnek ile etkileşen ışın heterokromatik yapıdadır. IR spektroskopisinde monokromatörden geçirilen bu ışın tek dalga boyuna indirilir, yani ışın monokromatik yapıdadır. Işın örnek ile etkileştikten sonra algılayıcılar tarafından algılanır ve bilgisayar ile ölçülebilecek anlamlı sinyallere dönüştürülür.

FTIR spektroskopisi ile farklı örnek yükleme aparatları sayesinde katı, sıvı veya gaz örnekler çalışılabilir. Bir kızıl ötesi spektroskopi cihazı temel olarak üç kısımdan oluşur. Bunlar; ışık kaynağı, interferometre ve algılayıcıdır (dedektör). Bunlara ek olarak ışın ayırıcı, örnek yüklenen bölüm ve verilerin işlendiği bilgisayar kısımları da vardır. Algılamadaki temel, diğer spektrofotometrik ölçümlerde olduğu gibi Lambert-Beer yasasıdır. Yani gelen ışığın bir kısmı örnek tarafından soğurulur ve aradaki fark üzerinden hesaplama yapılır.

Belli moleküllerdeki belirli bağlar kızılötesi ışığa maruz kaldıklarında belirli dalga boylarında verdikleri sinyallerle karakterize olurlar. Bu sinyaller üzerinden farklı

koşullardaki değişim rahatlıkla izlenebilir. Bunun haricinde proteinlerin ikincil yapı değişimleri de FTIR ile hassas olarak izlenebilmektedir. Ayrıca örnek hazırlanması çok masraflı olmayıp ölçümlerin çok kısa sürelerde yapılması nedeniyle de rutin kullanıma çok uygundur.

4.2.7.2. Veri toplama ve işleme

Çalışmada farklı sıcaklık (20, 25 ve 30 °C) ve pH değerlerinde (5.2, 5.9 ve 6.6) pelikül oluşturma özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla *S. Virchow* suşları 5 mL'lik LB^{-NaCl} sıvı besiyerlerinde bir gece boyunca 37 °C'de çalkalamalı koşullarda inkübe edilmiş ve sıvı-hava ara fazında pelikül oluşumlarının varlığını gösterebilmek için aktif kültürlerden 0,5 mL alınarak 4,5 mL LB^{-NaCl} sıvı besiyerlerine inoküle edilmiştir. Bakteri örneklerini içeren deney tüpleri 20, 25 ve 30 °C'da 10 gün boyunca statik koşullarda inkübasyona bırakıldıktan sonra tüpler pelikül oluşumu açısından incelenmiştir (85). Test tüpleri, pelikül oluşumlarının yanı sıra, pelikülün elastik, kırılabilir ve rijit özellik göstermesine, sıvı-hava ara fazında oluşan halka yapılarına, besiyerinin bulanıklığı ve tüp tabanında çökelti birikimi gibi bazı değişimlere göre de değerlendirilmiştir (87).

Farklı koşullarda oluşan peliküllerin kimyasal farklılıklarını araştırmak amacıyla FTIR yöntemi kullanılmıştır. Bunun için 10. gün sonunda oluşan peliküller steril koşullarda mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve bir gece liyofilizatörde kurutulmuştur. İşlem sonunda örnekler liyofilizatörden alınarak FTIR cihazında (Bruker Tensor 27 FT-IR) analize tabi tutulmuştur.

Liyofilize edilip kurutulan örnekler, sıvı azot ile soğutulmuş MCT dedektörüne sahip olan Bruker Tensor 27 FTIR cihazında attenuated total reflectance (ATR) aksesuarı (Pike Miracle) ile 3 teknik tekrarlı olarak ölçülmüştür. Spektrumlar orta kızılötesi bölgede 4500-850 cm⁻¹ dalga sayıları arasında 64 "scan" alınarak 4 cm⁻¹ çözünürlükte elde edilmiştir. Teknik tekrarların ortalama spektrumları elde edilerek analizlerde bu ortalama spektrumlar kullanılmıştır.

Elde edilen spektrumlar sıfır çizgisine hizalanmış (baseline işlemi) ve piklerin altında kalan alanlar integrasyon ile hesaplanmıştır. Görsel gösterim amaçlı koyulan spektrumlarda Amid I pikine göre min-max normalizasyonu yapılmıştır. Tüm veri toplama, işleme ve analiz işlemleri OPUS 5.5 programında gerçekleştirilmiştir.

4.2.7.3. İstatistiksel Analiz

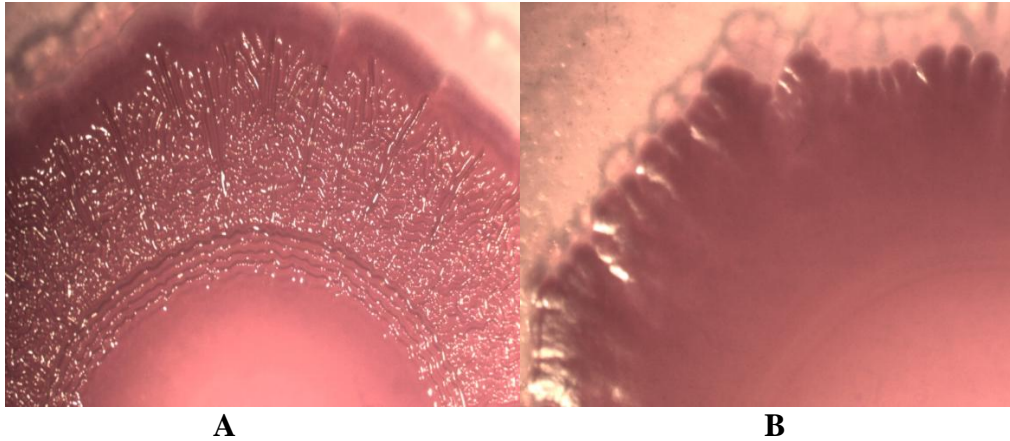
Pik alanları Amid I pikine göre oranlanıp iç standardizasyon sağlandıktan sonra elde edilen değerler ile gruplar arasında ANOVA testi yapılmıştır (% 95 güven aralığında). Levene testi ile varyans homojenliği belirlendikten sonra, Levene p değerine göre Tukey veya Tamhane's T2 karşılaştırma testleri kullanılmıştır. Ayrıca çok değişkenli analiz olarak, spektrumlar üzerinden hiyerarşik kümeleme analizi yapılmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. *Salmonella* Suşlarının Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi

İncelenen 16 adet *S. Virchow* suşunda biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi amacıyla NaCl içermeyen LB broth ortamı kullanılmıştır. NaCl içermeyen ortam düşük ozmolarite nedeniyle kıvrımlı fimbriya üretimi için ideal bir ortam teşkil etmektedir (138). Çalışmada morfotip analizi için tercih edilen NaCl'siz LB agar (LB agar woNaCl) besiyerinde aynı zamanda Coomassie brilliant blue (20 µg/mL) ve kıvrımlı fimbriyanın bağlanabildiği ve biyofilm morfotipi için indikatör bir boya özelliği gösteren Kongo kırmızısı (40 µg/mL) yer almaktadır.

Morfotip analizleri sonucunda DMC33 kodlu suşun ürettiği biyofilm bdar, diğer 15 suşun ürettiği biyofilmler ise rdar morfotipinde tanımlanmıştır. Literatürde tespit edilen diğer biyofilm morfotiplerine ise incelenen suşlarda rastlanmamıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *S. Virchow* suşlarında belirlenen rdar (DMC42) (A) ve bdar (DMC33) (B) morfotipleri.

5.2. Sıvı Besiyerinde Pelikül Oluşumu

Bu denemede, kongo kırmızısı içeren NaCl'siz LB agar besiyerlerinde morfotip özellikleri incelenen 16 adet *S. Virchow* suşunun, sıvı-hava arafazında pelikül oluşturma özellikleri araştırılmıştır.

Elde edilen bulgular sonucunda farklı morfotiplerin pelikül yapılarının fiziksel açıdan farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Rdar morfotipine sahip olan, yani matriksinde hem selüloz hem de kıvrımlı fimbriya içeren suşların pelikül yapıları daha sağlam fiziksel

özelliklere sahip olup, çalkalama ve karıştırma gibi etkiler sonucunda dahi dağılmadan kalabilmektedir (rijit pelikül yapısı). bdar morfotipine sahip olan, yani matriksinde kıvrımlı fimbriya içeren DMC 33 kodlu suşun pelikül yapısı ise çalkalama ve karıştırma gibi etkiler sonucunda dağılmaktadır (65, 87). Çalışılan suşların pelikül oluşturma özellikleri ve oluşturulan pelikül yapılarının karakteristikleri Çizelge 5.1’de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

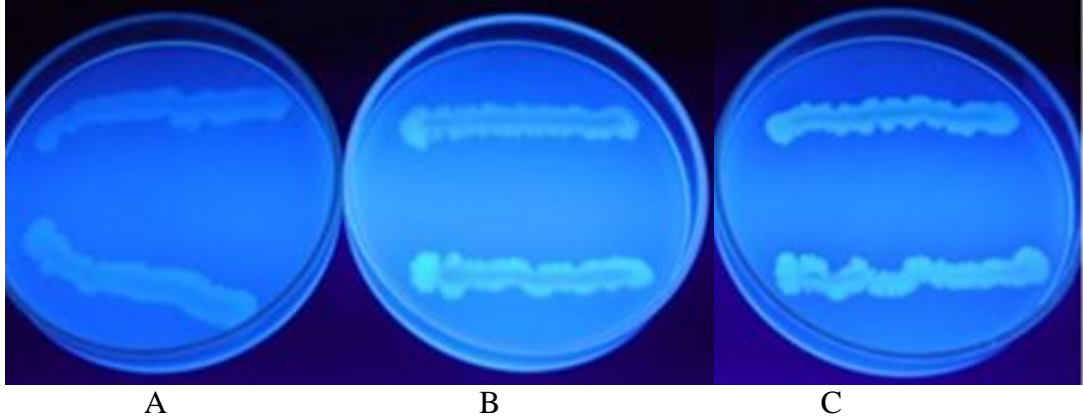
Çizelge 5.1. S. Virchow suşlarında pelikül oluşumu ve oluşturulan pelikül yapılarının fiziksel karakteristikleri

Suş kodları	Pelikül varlığı	Pelikül yapısı	Halka yapısı	Dipte pelet birikimi	Besiyerindeki bulanıklık
DMC5	+	Rijit	Yok	+	Az
DMC6	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC9	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC10	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC11	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC16	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC17	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC18	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC19	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC32	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC33	+	Kırılgan	Var-İnce	+	Çok
DMC42	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC68	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC69	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC83	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
DMC84	+	Rijit	Var-İnce	+	Az

Çizelge 5.1’de görüldüğü gibi uygulamaya tabi tutulan tüm suşlarda pelikül üretimi pozitif olarak tespit edilmiştir. Biyofilm morfotipi açısından da diğer suşlara kıyasla farklılık gösteren DMC 33 nolu suşun (bdar), pelikül yapısının da farklı olduğu (kırılgan), bu çalışmada bir kez daha kanıtlanmıştır.

5.3. Kalkoflor Bağlanma Uygulaması

S. Virchow serotiplerinin selüloz üretim özelliklerinin araştırılması amacı ile suşlar kalkoflor (selüloz indikatörü) içeren LB^{NaCl} katı besiyerlerine aktarılmış ve 20 °C’ de 8 gün süresince inkübasyona bırakılmıştır. Sekizinci gün sonunda bakteriyel üreme 366 nm UV ışık altında incelenerek, suşların selüloz üretim özellikleri, kalkofloru bağlamak suretiyle floresan ışığa verip vermemelerine göre değerlendirilmiştir (Şekil 5.2) (64).



Şekil 5.2. Farklı biyofilm morfotipleri içeren *S. Virchow* suşların selüloz içeriklerinin tanımlanması. (A) Selüloz negatif morfotip (DMC33, bdar morfotipi) (B ve C) Selüloz pozitif morfotip (DMC5 ve DMC69, rdar morfotipi).

Kuvvetli floresan özellik gösteren suşlar selüloz üretimi bakımından pozitif, göstermeyenler ise selüloz üretimi bakımından negatif olarak değerlendirilmiştir. İncelenen örnekler arasında yalnızca DMC33 suşu floresan özellik göstermediğinden bdar morfotipi olarak tanımlanırken, diğer 15 suş rdar morfotipinde tanımlanmıştır.

Bu deneme sonucunda elde edilen veriler Kongo kırmızısı içeren LB katı besiyerinde gerçekleştirilen morfotip tanımlanması çalışması sonucunda elde edilen morfotiplendirme verileri ile uyumluluk göstermektedir.

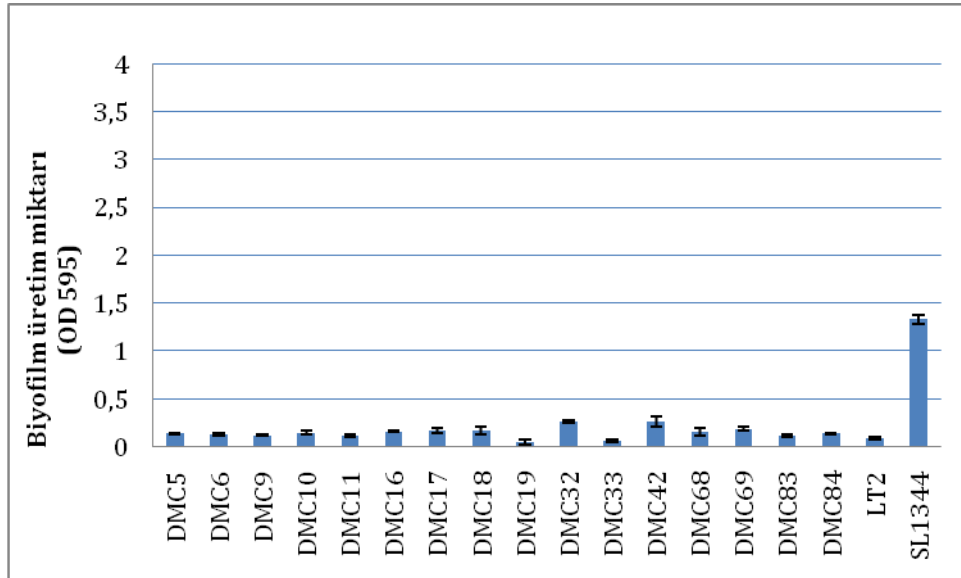
5.4. *S. Virchow* Suşlarında Biyofilm Üretim Düzeylerinin Belirlenmesi

S. Virchow suşlarının biyofilm üretim kapasitelerini belirlemek amacıyla Woodward vd. (2000) tarafından tanımlanan mikrotitre plak yöntemi kullanılmıştır. Suşların biyofilm üretim miktarlarının değerlendirmesinde *S. Typhimurium* LT2 ve SL1344 suşları kontrol olarak kullanılmıştır. Suşların biyofilm üretim açısından sınıflandırılması ise Stepanovic vd. (2000) tarafından önerilen yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Söz konusu yöntemde negatif kontrol (bakteri içermeyen besiyeri) üzerinden cut-off OD (OD_c) değeri hesaplandıktan sonra aşağıdaki değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Cut-off OD (OD_c) değeri, negatif kontrolün ortalaması artı standart hatanın üç katı şeklinde hesaplanmaktadır.

Suşların biyofilm üretim düzeyleri:

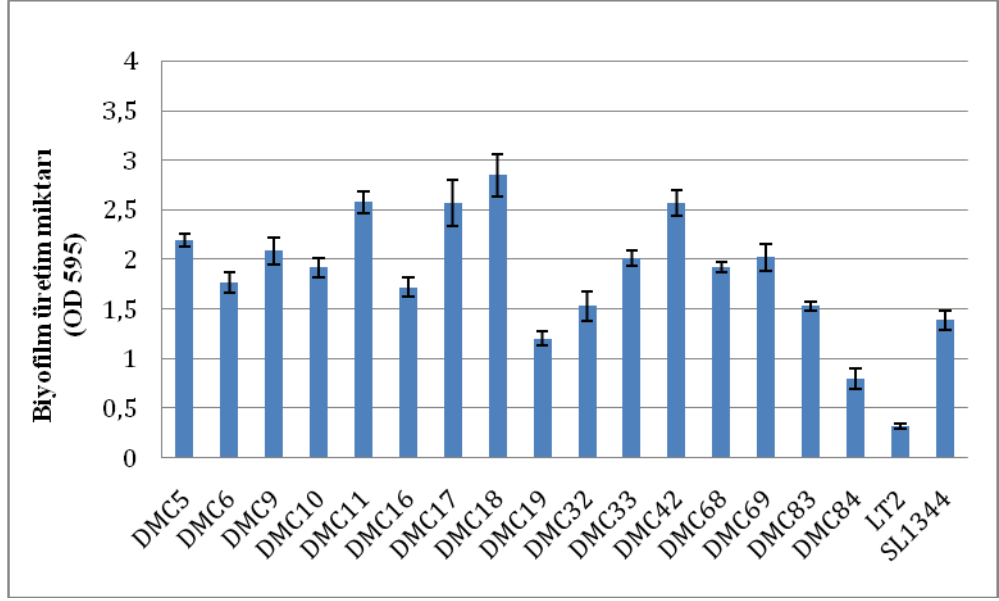
- $OD \leq OD_c$ biyofilm üretimi gerçekleşmemiştir
- $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$, zayıf biyofilm üreticisi (+)
- $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$, orta düzeyde biyofilm üreticisi (++)
- $OD > 4 \times OD_c$, güçlü biyofilm üreticisi (+++) şeklinde değerlendirilmektedir.

Çalışmada OD_c değeri 0.093 olarak hesaplanmıştır. Grafikte de görüldüğü üzere inkübasyonun ilk 24 saatinde denenen suşların tamamında düşük düzeyde biyofilm üretimi tespit edilmiştir (Şekil 5.3). İncelenen suşlar içerisinde yalnızca kontrol suşu olarak kullanılan *S. Typhimurium* SL1344 ilk 24 saatte yüksek miktarda biyofilm üretmiştir (Şekil 5.3).



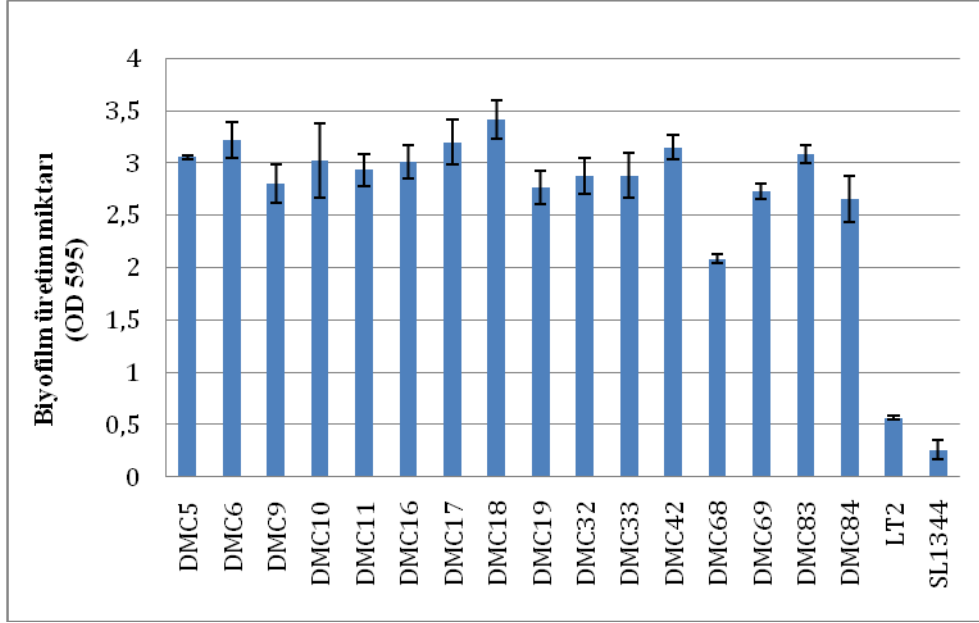
Şekil 5.3. *S. Virchow* suşlarında 24 saat sonucunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri.

İnkübasyon süresi 48 saate çıkarıldığında 24 saatlik inkübasyona kıyasla biyofilm üretim miktarında ciddi artış gözlenmiştir. Çalışılan tüm suşlar 48 saat inkübasyon süresi sonucunda biyofilm düzeyleri açısından güçlü üreticiler olarak tanımlanmıştır. Bu suşlar arasında en kuvvetli biyofilm üreticisi olarak DMC18 suşu belirlenmiştir (Şekil 5.4).



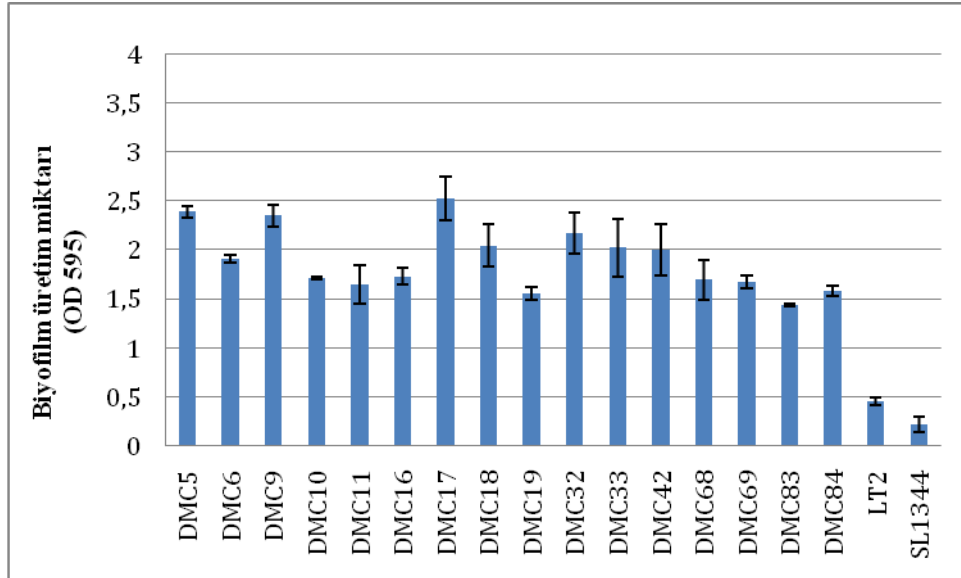
Şekil 5.4. *S. Virchow* suşlarında 48 saat sonucunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri.

Biyofilm üretiminin sürekliliği incelendiğinde, 72 saat inkübasyon süresi sonunda da biyofilm üretiminin devam ettiği belirlenmiştir. 72 saat inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm miktarı, 24 ve 48 saat inkübasyon sonucunda oluşan biyofilm miktarı ile kıyaslandığında, kontrol olarak kullanılan *S. Typhimurium* SL1344 ve LT2 suşlarının biyofilm üretim düzeylerinde düşme gözlenirken, DMC kodlu tüm suşların biyofilm üretim düzeylerinde artış gerçekleşmiştir. 72 saat inkübasyon sonucunda DMC18 kodlu suş, 48 saat inkübasyon sonucunda olduğu gibi, en kuvvetli biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. *S. Virchow* suşlarında 72 saat sonucunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri.

96 saat inkübasyon süresi sonunda alınan veriler incelendiğinde, suşların biyofilm üretimlerinde azalma tespit edilmiştir (Şekil 5.6). Denenen tüm zaman dilimleri sonucunda elde edilen verilerin yorumlanması sonucunda, *S. Virchow* suşlarının biyofilm üretimleri için optimum inkübasyon süresinin 72 saat olduğu belirlenmiştir.

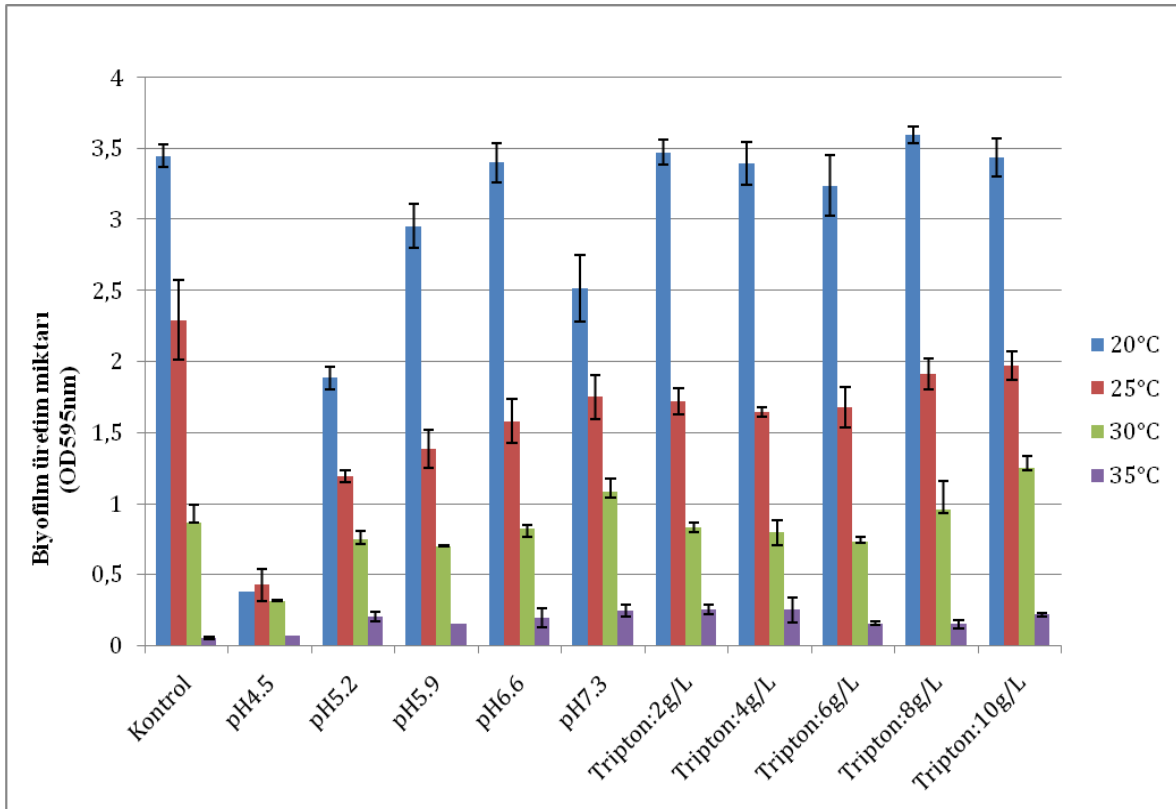


Şekil 5.6. *S. Virchow* suşlarında 96 saat sonucunda belirlenen biyofilm üretim düzeyleri.

5.4.1. Farklı sıcaklık, pH değerlerinde ve tripton konsantrasyonlarında *S. Virchow* suşlarının biyofilm üretim düzeylerinin belirlenmesi

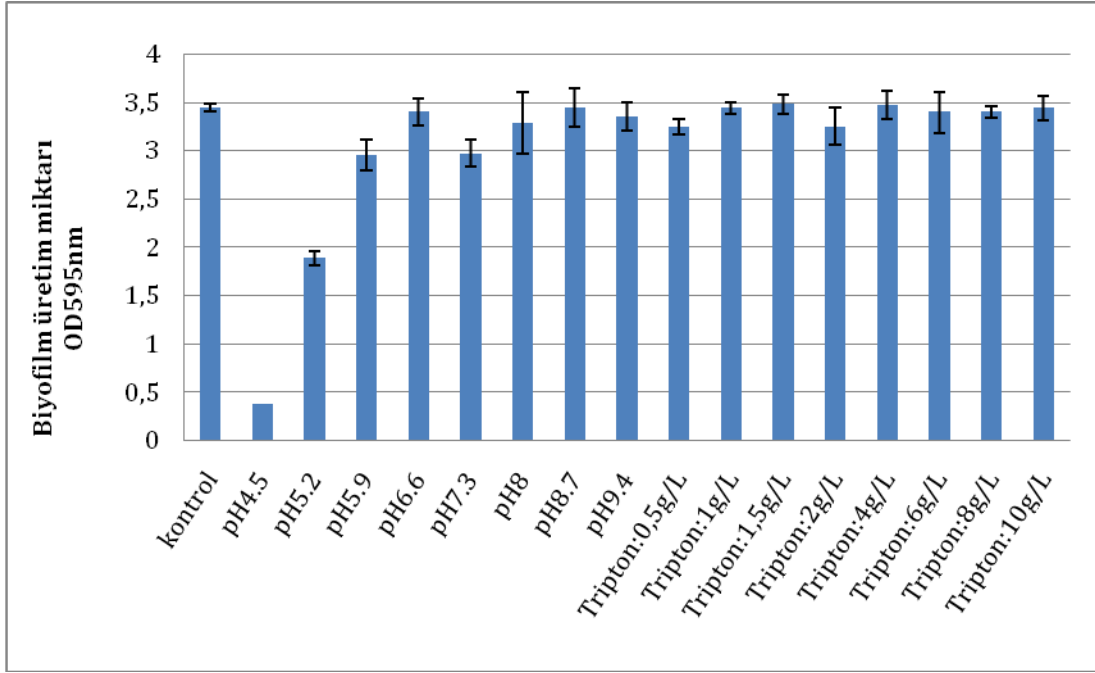
Önceki çalışmalarımız sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda kuvvetli biyofilm üretimi özelliği nedeni ile DMC18 suşu, ileride yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak suş olarak seçilmiştir. Farklı pH (4.5, 5.2, 5.9, 6.6 ve 7.3) ve tripton konsantrasyonlarının (2, 4, 6, 8 ve 10 g/L) yanı sıra, farklı sıcaklık (20, 25, 30, 35, 37 ve 40°C) koşullarının biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla mikrotitre plak yönteminden yararlanılmıştır (136).

Denemeler sonucunda biyofilm oluşumu için optimum inkübasyon sıcaklık değeri 20°C olarak belirlenmiştir. 37°C ve 40°C inkübasyon sıcaklıklarında biyofilm üretimi gerçekleşmemiştir. Biyofilm üretimi bakımından ideal pH değeri 6.6 olarak saptanmıştır. pH 4.5'ta ise biyofilm üretimi gerçekleşmemiştir. Son olarak 2g/L üzerindeki tripton konsantrasyonlarının, DMC18 suşunun biyofilm üretimi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Şekil 5.7)



Şekil 5.7. *S. Virchow* DMC18 suşunun biyofilm üretim özelliği üzerinde farklı çevresel koşullarının etkisi.

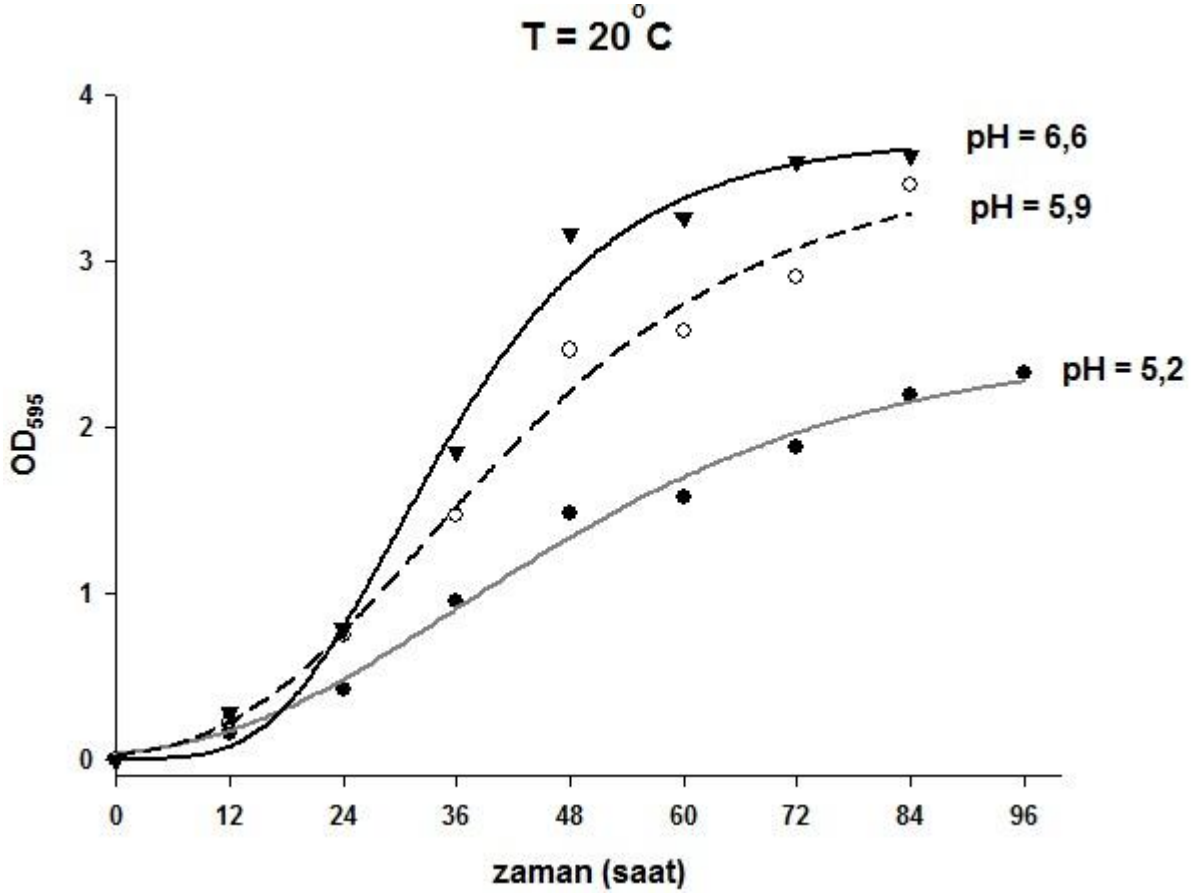
Tripton konsantrasyonunun ve pH değerlerinin biyofilm üretimi etkisini daha detaylı bir şekilde araştırmak için, çalışmaya pH 8, 8.7 ve 9.4 değerleri yanında, 0.5, 1 ve 1.5 g/L tripton konsantrasyonları da ilave edilmiştir. Bu denemeler sonucunda da söz konusu pH değerlerinin ve tripton konsantrasyonlarının DMC18 suşunun biyofilm üretim düzeyini istatistiki açılarından önemli kabul edecek düzeyde değiştirmedeği belirlenmiştir (Şekil 5.8).



Şekil 5.8. *S. Virchow* DMC18 suşunun biyofilm üretim özelliği üzerinde farklı pH değerleri ve tripton konsantrasyonlarının etkisi.

5.5. Farklı pH ve Sıcaklık Koşullarında *S. Virchow* Suşunun Polistiren Yüzeyde Biyofilm Üretim Düzeylerinin Matematiksel Modellerinin Tespiti

Bu çalışmada *S. Virchow* DMC18 suşunun biyofilm üretim miktarları farklı sıcaklık ve pH değerlerinde elde edilmiştir. Biyofilm miktar belirlenmesi yukarıda da açıklanan mikrotitre plak yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçların istatistik analizleri sonrasında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Sabit sıcaklık (20°C) ve değişken pH ve inkübasyon sürelerinin biyofilm üretim miktarına etkisi Gompertz denkleminde uygulandığında (Şekil 5.9 ve Çizelge 5.2) pH arttıkça (pH 5.2-6.6) zamana bağlı olarak biyofilm üretim miktarının arttığı belirlenmiştir [pH değerleri arttıkça modifiye Gompertz denkleminin parametreleri de (a , μ_m ve λ) artmaktadır].

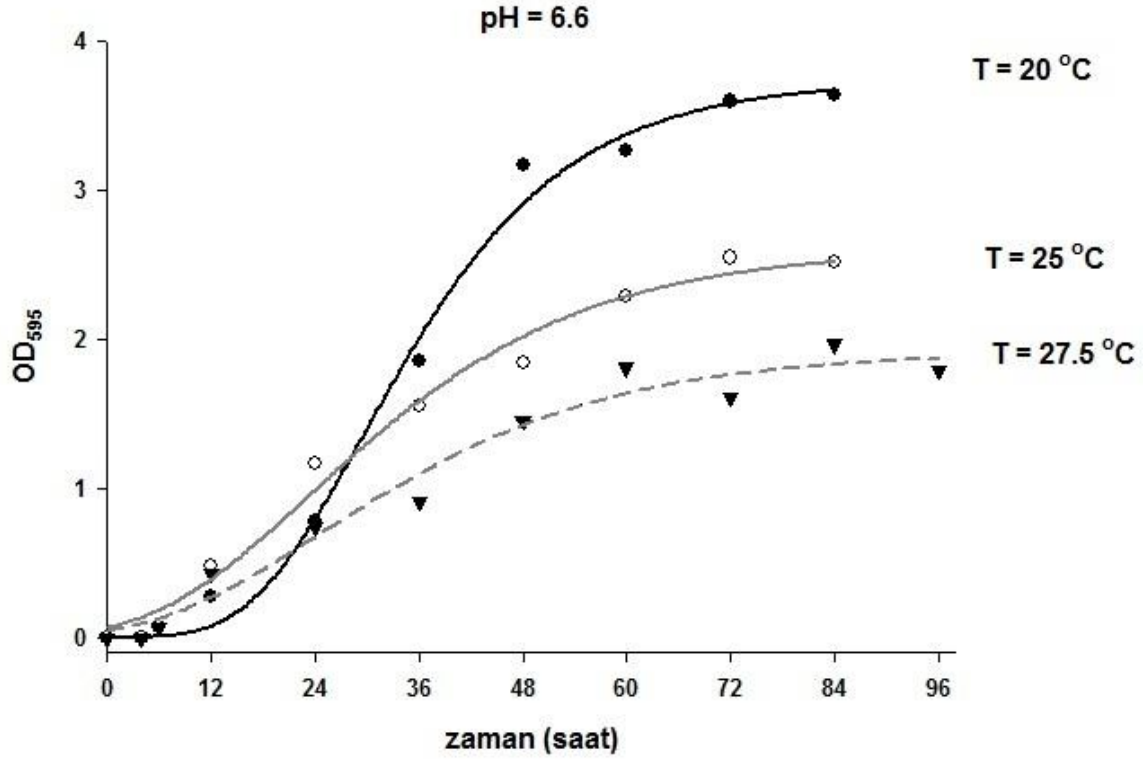


Şekil 5.9. Sabit sıcaklık (20 °C) ve üç farklı pH değerinde (5.2, 5.9 ve 6.6) *S. Virchow* DMC18 suşunun zamana bağlı biyofilm üretimi için Gompertz denkleminin uygulanması.

Çizelge 5.2. *S. Virchow* DMC18 suşunun farklı koşullar altında (sıcaklık ve pH) biyofilm oluşumu modeli için kullanılan belirtme katsayısı (R^2_{adj}) ve ortalama karesel hata (OKH) değerleri.

Sıcaklık °C	pH	R^2_{adj}	OKH
20	5.2	0.99	0.009
25		0.99	0.009
27.5		0.90	0.04
20	5.9	0.98	0.03
25		0.98	0.02
27.5		0.95	0.02
20	6.6	0.99	0.03
25		0.98	0.02
27.5		0.97	0.02

Sabit pH (pH 6.6) ve değişken sıcaklık ve inkübasyon sürelerinin biyofilm üretim miktarına etkisi Gompertz denkleminde uygulandığında, inkübasyon sıcaklığı azaldıkça zamana bağlı olarak biyofilm üretim miktarının arttığı belirlenmiştir (Şekil 5.10). Burada inkübasyon sıcaklığı arttıkça modifiye Gompertz denkleminin değerlerinde de (a , μ_m ve λ) azalma görülmektedir.



Şekil 5.10. Sabit pH değerinde (pH 6.6) ve üç farklı sıcaklıkta *S. Virchow*, DMC18 suşunun zamana bağlı biyofilm üretimi için modifiye Gompertz denkleminin uygulanması.

Daha önce açıklanan 13. Denklem, modifiye Gompertz denkleminin parametrelerinin (a , μ_m ve λ) sıcaklık (T) ve pH'a bağlılığını açıklamak için kullanılarak, a , μ_m ve λ değerleri için aşağıdaki ikincil modeller elde edilmiştir (Çizelge 5.3 ve denklem 14, 15, 16).

Çizelge 5.3. İkincil model uygulamasında kullanılan değişkenler.

Birincil modelin değişkenleri	İkincil modelin Katsayıları	R^2_{adj}	OKH	
A (OD)	a_0	7.5 ± 0.7	0.88	0.08
	a_1	-0.34 ± 0.05		
	a_2	0		
	a_3	0		
	a_4	0		
	a_5	0.02 ± 0.007		
μ_m (OD·h ⁻¹)	a_0	-0.76 ± 0.23	0.87	7.2×10^{-5}
	a_1	0.029 ± 0.009		
	a_2	0		
	a_3	0.16 ± 0.04		
	a_4	0		
	a_5	-0.006 ± 0.002		
λ (h)	a_0	0	0.81	3.6
	a_1	0		
	a_2	-0.025 ± 0.004		
	a_3	6.5 ± 1.4		
	a_4	-0.43 ± 0.10		
	a_5	0		

R^2_{adj} (belirleme katsayısı), OKH (Ortalama karesel hata)

$$a(T, pH) = (7.54 \pm 0.72^x) + (-0.34pH \pm 0.05^x) + (0.0211T \cdot pH \pm 0.007^x) \quad (14)$$

Burada $R^2 = 0.91$, OKH = 0.076 ve x standart hatadır.

$$\mu(T, pH) = (-0.76 \pm 0.23^x) + (0.029T \pm 0.0094^x) + (0.16pH \pm 0.04^x) + (-0.006T \cdot pH \pm 0.0016^x) \quad (15)$$

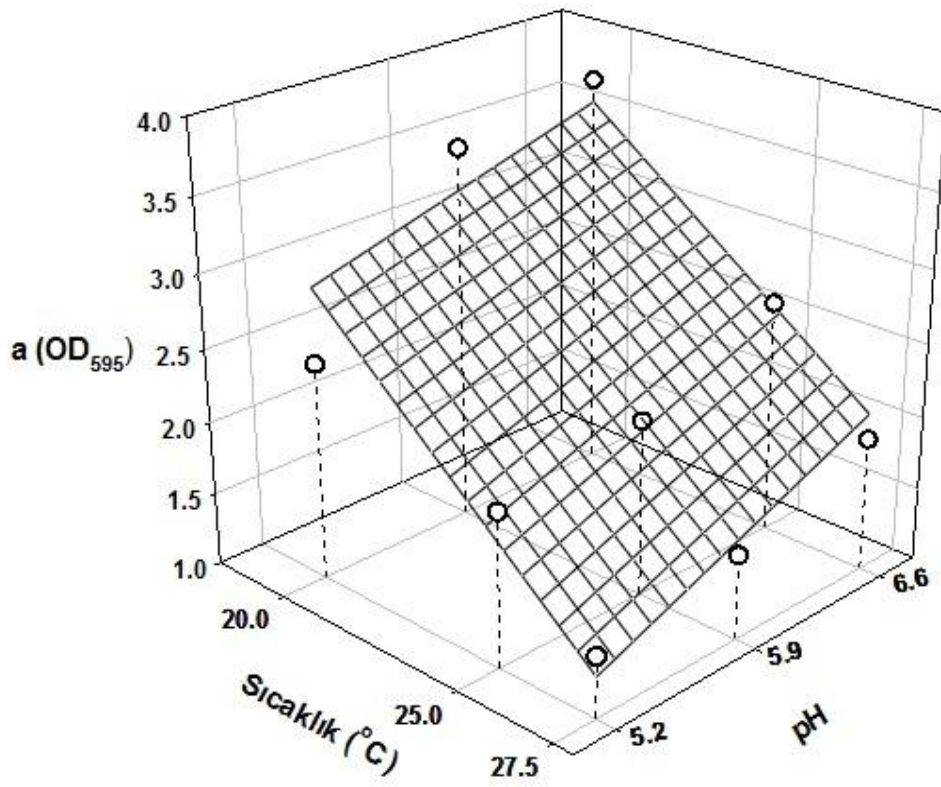
Burada $R^2 = 0.92$, MSE = 7.2×10^{-5} ve x standart hatadır.

$$\lambda(T, pH) = (-0.025T^2 \pm 0.004^x) + (6.46pH \pm 1.44^x) + (-0.43pH^2 \pm 0.10^x) \quad (16)$$

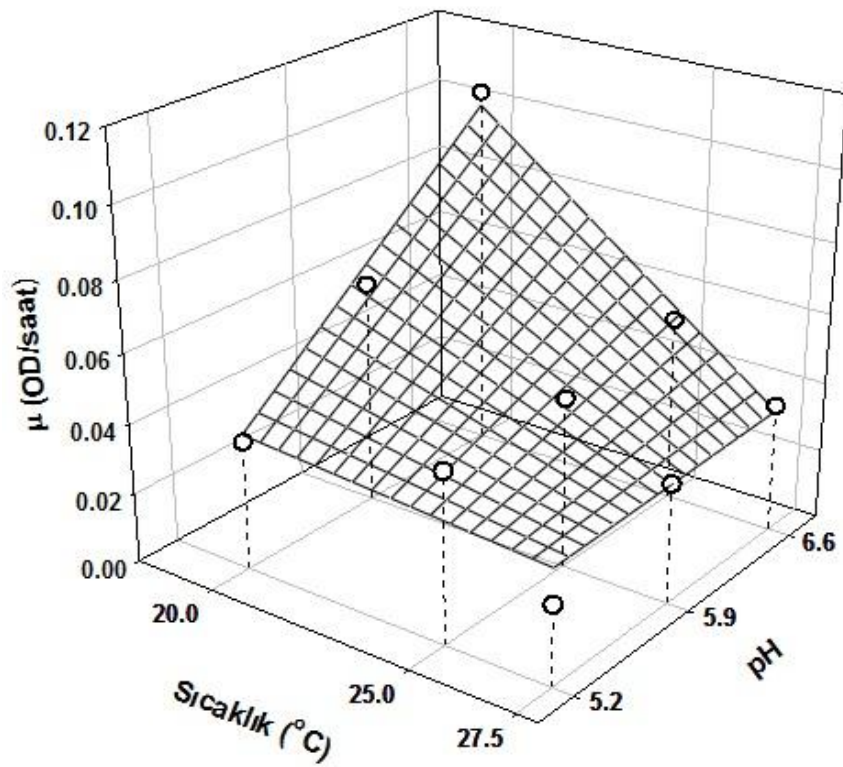
Burada $R^2 = 0.86$, MSE = 3.63 ve x standart hatadır.

Şekil 5.11'de oluşturulan 14. 15. ve 16. denklemlerin üç boyutlu yüzeyleri örneklenmektedir.

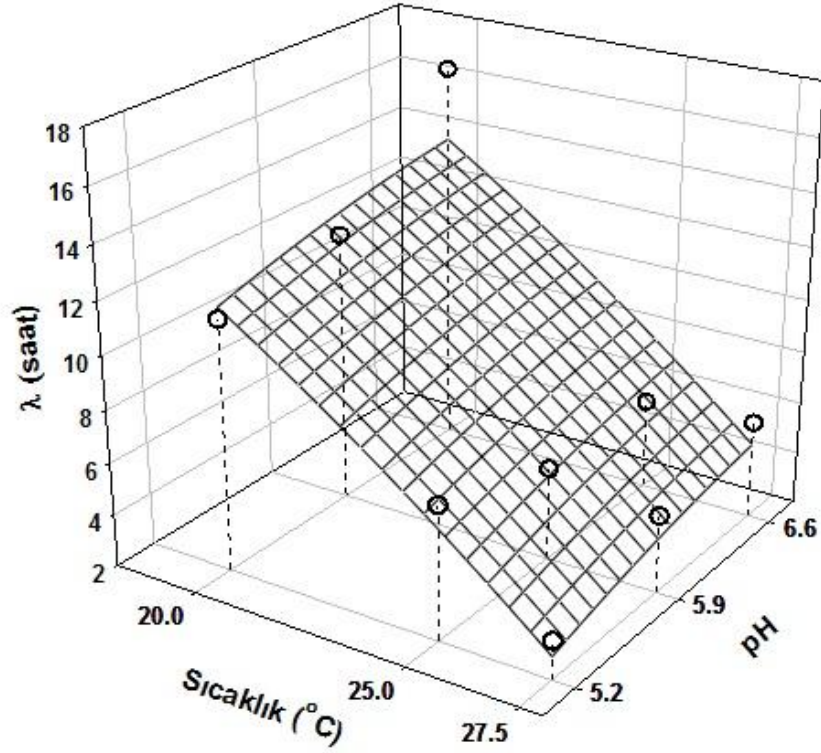
(a)



(b)



(c)



Şekil 5.11. a (a), μ (b) ve λ (c) parametreleri için ikincil modelinin (Denklem 13) üç boyutlu yüzeyleri.

Şekil 5.11 (a)'da görüldüğü gibi sıcaklık düştüğünde, a değerinde her zaman artış meydana gelmektedir. Bunun tersine pH değeri arttıkça a değeri artmaktadır.

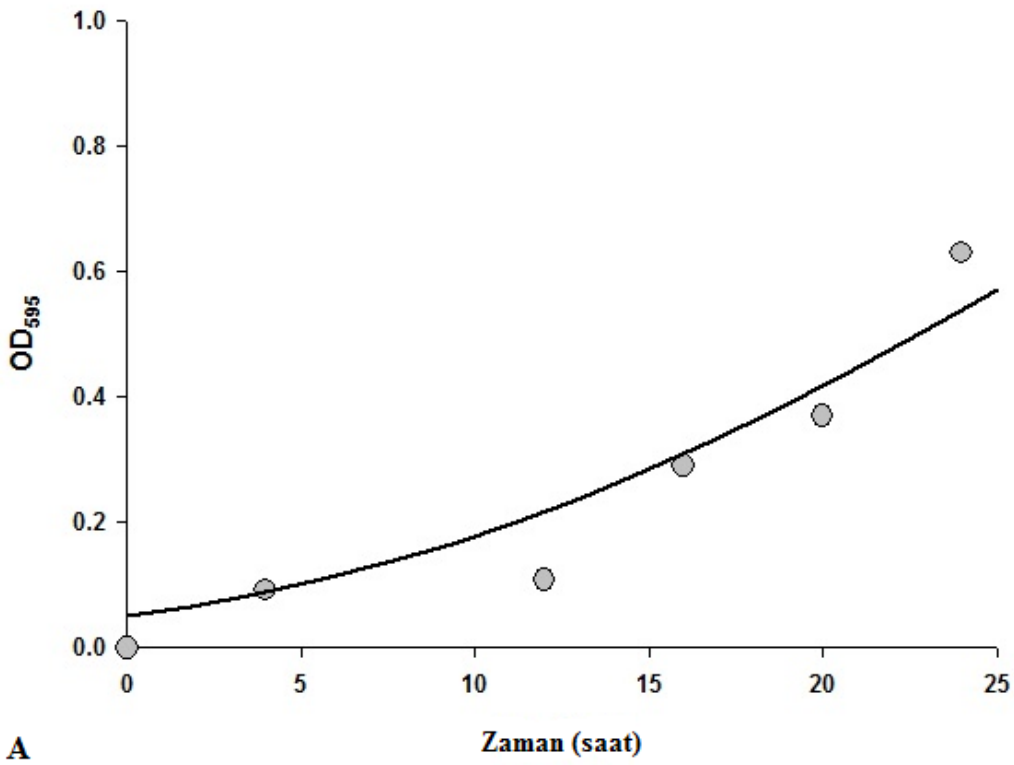
Şekil 5.11 (b) grafiği sıcaklık düştükçe μ değerinin arttığını, bunun aksine pH değeri arttıkça μ değerinin azaldığını ifade etmektedir.

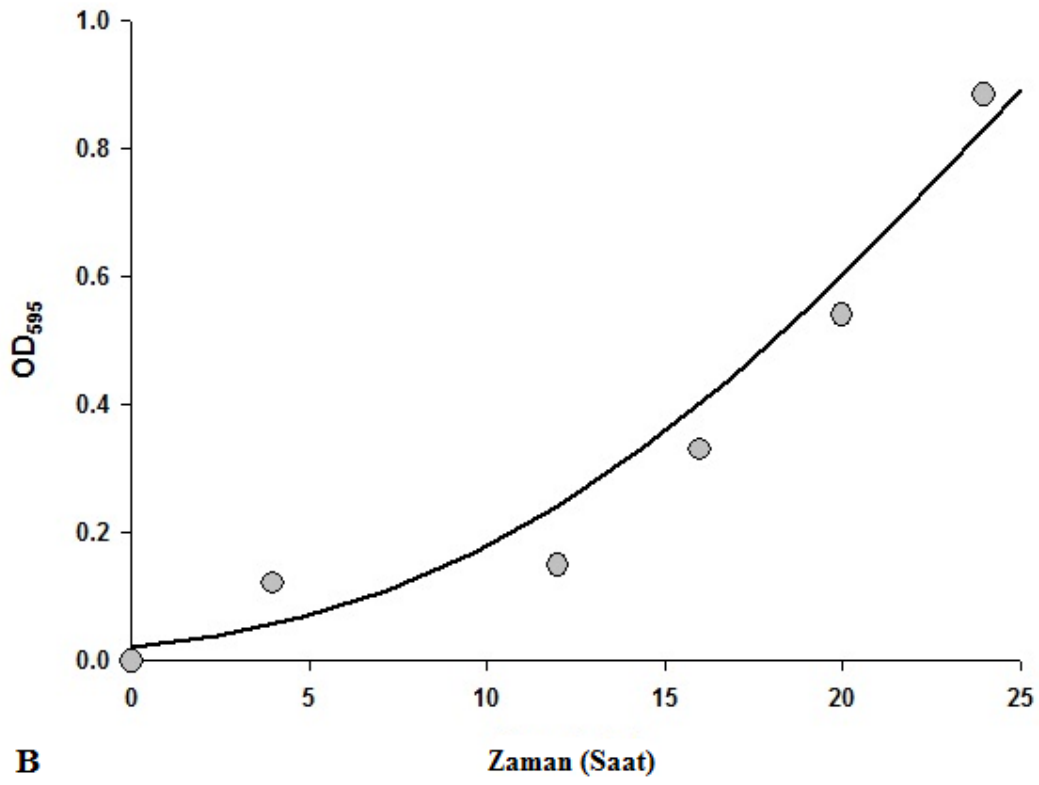
Sıcaklık arttıkça λ değerinde azalma meydana gelmektedir (Şekil 5.11a). Bu sonuç pH artışında da saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; a ve μ değerlerinin sıcaklık ve pH ile doğru orantılı, λ değerinin ise ters orantılı olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. İkincil modelden elde edilen tüm sonuçlar birincil modelden elde edilen sonuçları doğrulamaktadır.

5.5.1. Modelin tahmin çalışmalarının yapılması

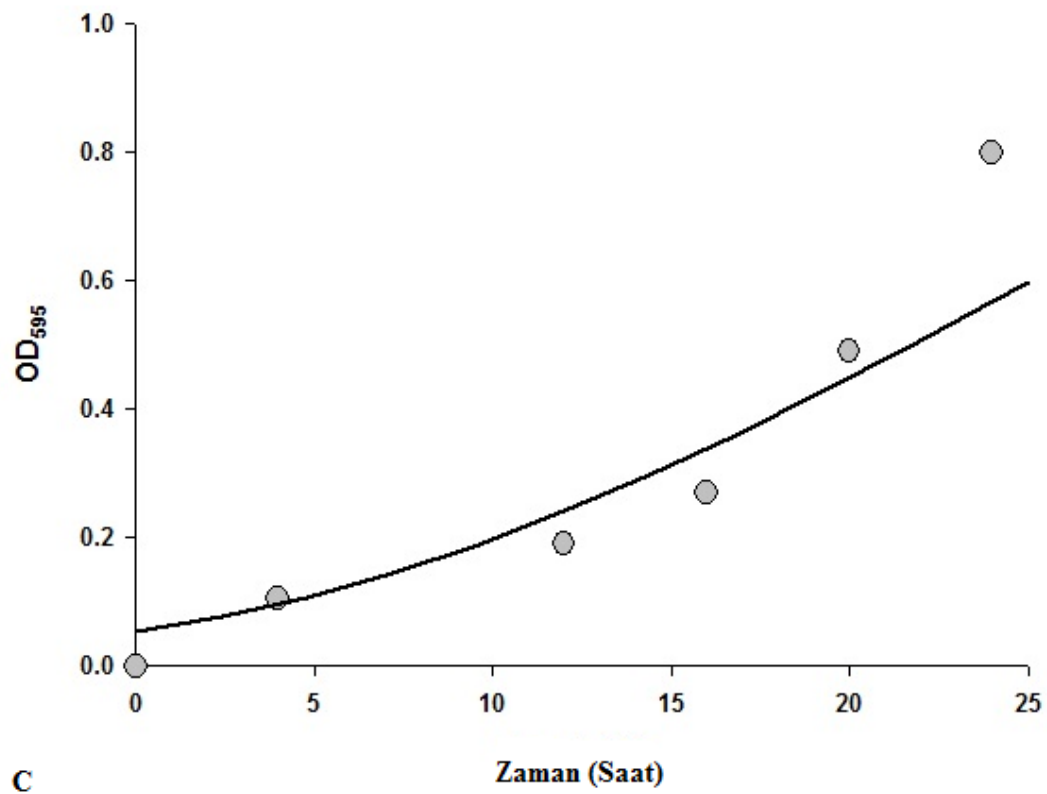
S. Virchow DMC18 suşunun farklı sıcaklık ve pH koşullarında elde edilen biyofilm üretim miktarları, modifiye edilmiş Gompertz denkleminde tabi tutularak birincil ve ikincil

Matematiksel model oluşturulduktan sonra, oluşturulan modelin çalışıp çalışmadığını test etmek amacıyla belirli ara sıcaklık (23°C ve 26°C) ve ara pH (5.3 ve 6.3) değerleri kullanılarak ilk 24 saat zaman diliminde *S. Virchow* DMC18 suşunun biyofilm üretim miktarları mikrotitre plak yöntemi kullanarak saptanmıştır (136). Elde edilen değerler istatistik analizine tabi tutularak oluşturulan modelin doğruluğu araştırılmıştır (Şekil 5.12). Grafikler ve doğrusal olmayan bağlantılar SigmaPlot 2000 versiyon 12.00 kullanılarak elde edilmiştir (Chicago, IL, USA).

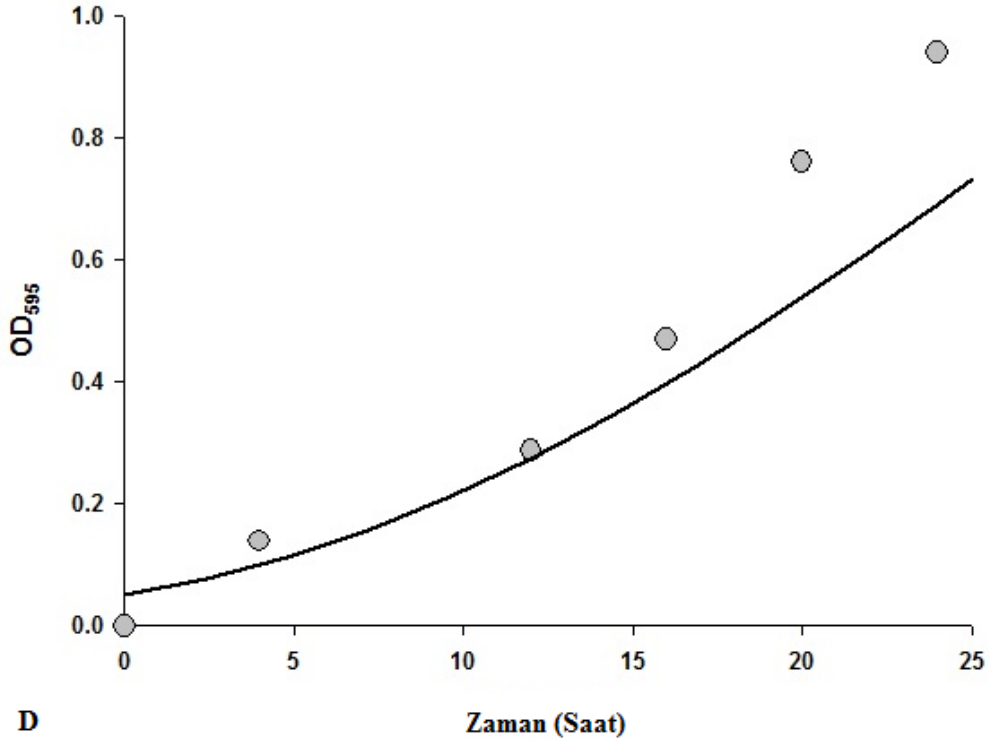




B



C



Şekil 5.12. *S. Virchow* DMC18 suşunun biyofilm üretim modelinin, 24 saat inkübasyon süresi için tahmini. 23°C, pH 5.3 (A), 23°C, pH 6.3 (B), 26°C, pH 5.3 (C), 26°C, pH 6.3 (D).

İkincil modelin λ değerlerine bakıldığında, *S. Virchow* suşunun biyofilm üretiminin hızlandığı zamanın ilk 24 saatin altında gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 5.11). Elde edilen bu sonuç doğrultusunda oluşturulan modelin tahmin çalışmaları, ilk 24 saat için uygulanmıştır. Biyofilm üretim modelinin tahmin noktaları, yapmış olduğumuz modelin verdiği eğri doğrultusunda ortaya çıkmıştır (Şekil 5.12). Bu sonuçlar çıkarılan matematiksel modelin uygulanabilirliğini kanıtlamaktadır.

5.6. *S. Virchow* DMC18 suşunun Farklı pH ve Sıcaklık Koşullarında Ürettiği Pelikül Yapısının Özellikleri

10 günlük inkübasyon sonunda test tüplerinde oluşan pelikül yapılarının belirlenmesinin yanı sıra; pelikülün elastik, kırılman ve rijit özellik göstermesi, sıvı-hava ara fazında oluşan halka yapısı, besiyerinin bulanıklığı ve tüp tabanında çökelti birikimi gibi özellikler de incelenmiştir (Çizelge 5.4). Farklı sıcaklıklarda oluşan pelikül yapıları morfolojik olarak incelendiğinde, 20 ve 25°C' de oluşan peliküllerin manyetik karıştırma işlemine direnç gösterdiği, 30°C de oluşan peliküllerin ise son derece kırılman oldukları tespit edilmiştir

(Çizelge 5.4). Teste tabi tutulan *S. Virchow* DMC18 suşu rdar morfortipine sahip olmasına rağmen, 30 °C’ de oluşan peliküllerde *Salmonella*’da rapor edilen bdar morfortipinin özelliği belirlenmiştir.

Biyofilm yapılarında ince agregatif fimbriya ve selüloz bulunduran bakteriler (rdar morfortipi), sıvı kültürlerde sıvı-hava arafazının hemen altında, çözülmesi son derece güç biyofilmler oluştururken, ekzopolisakkarit olarak yalnızca selüloz sentezleyen bakterilerin (bdar) sıvı-hava arafazındaki biyofilmleri gevşek bir yapı gösterir (65).

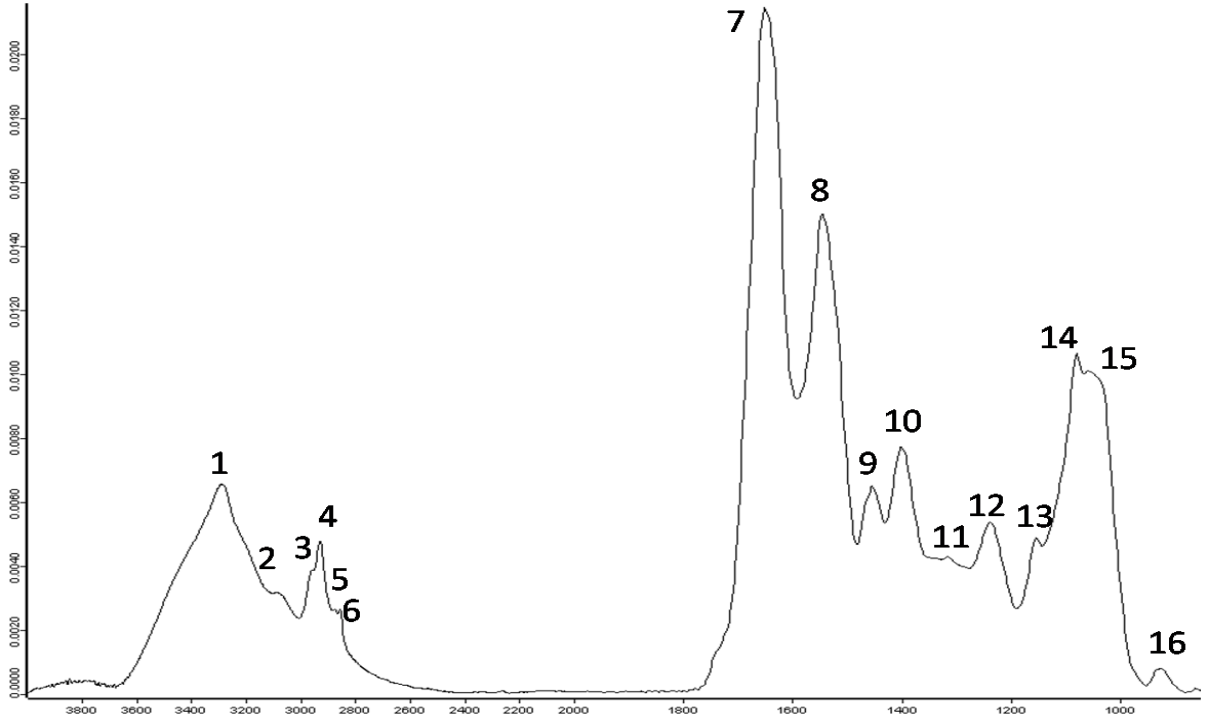
DMC18 suşunda 30°C ‘de oluşan pelikülün beklenen özellikleri göstermemesi; yapısında *Salmonella* biyofilmlerinin önemli bileşeni olan selülozun hiç sentezlenmediği veya az sentezlendiğine işaret etmektedir.

Çizelge 5.4. *S. Virchow* DMC18 suşunun değişik sıcaklıklarda oluşturduğu pelikül yapılarının özellikleri

		Pelikül varlığı	Pelikül yapısı	Halka yapısı	Dipte pelet birikimi	Besiyerindeki bulanıklık
20 °C	pH5.2	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
	pH5.9	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
	pH6.6	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
25 °C	pH5.2	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
	pH5.9	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
	pH6.6	+	Rijit	Var-İnce	+	Az
30 °C	pH5.2	+	Kırılgan	Yok	+	Çok
	pH5.9	+	Kırılgan	Yok	+	Çok
	pH6.6	+	Kırılgan	Yok	+	Çok

5.6.1. *S. Virchow* DMC18 suşunun pelikül yapısının FTIR yöntemiyle incelenmesi

S. Virchow DMC18 suşunun peliküllerinin FTIR çalışması sonucunda elde edilen spektrumlarında 16 absorpsiyon piki tespit edilmiştir (Şekil 5.13). Belirlenen piklerin, literatür bilgileri ışığında (139, 140, 141, 142, 143) yapılan yorumlamalar ile hangi bağlardan ve moleküllerden kaynaklandıkları saptanmıştır (Çizelge 5.5).



Şekil 5.13. Pelikül örneklerinden elde edilen, orta kızılötesi bölgedeki FTIR absorbans pikleri.

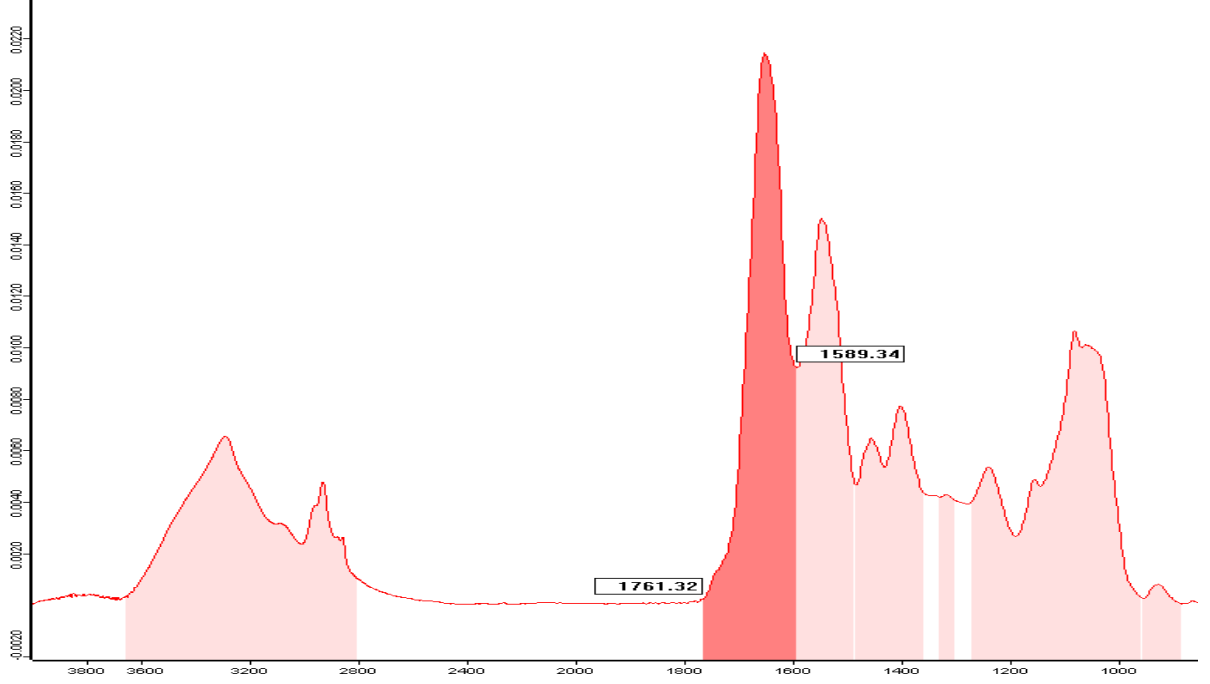
Çizelge 5.5. Çalışmamızda belirlenen absorpsiyon piklerinin tanımlanması.

Pik Numarası	Dalgasayısı (cm⁻¹)	Bağ tanımı	İlgili organik bileşen
1	3295	Amide A; baskın olarak N–H gerilme	Baskın olarak protein
2	3084	Amide B; C–N, N–H gerilme	Protein
3	2958	CH ₃ asimetric gerilme	Lipit
4	2927	CH ₂ asimetric gerilme	Lipit
5	2873	CH ₃ simetric gerilme	Protein
6	2854	CH ₂ simetric gerilme	Lipit
7	1646	Amide I; 80% C=O gerilme, 10% N–H bükülme, 10% C–N gerilme	Protein
8	1541	Amide II; 60% N–H bükülme, 40% C–N gerilme	Protein
9	1452	CH ₂ bükülme	Lipit
10	1398	COO ⁻ simetric gerilme	Yağ asidi
11	1314	C–N gerilme	Protein
12	1236	PO ₂ ⁻ asimetric gerilme	Nükleik asitler, fosforillenmiş proteinler ve fosfolipitler
13	1151	C–O gerilme	Karbonhidrat, nükleik asit
14	1077	C–N ⁺ –C gerilme	Nükleik asit
15	1046	C–O gerilme, karbonhidrat gruplarının C–OH bükülmesi ile birlikte C–O bükülmesi	Oligosakkarit, polisakkarit
16	925	C–N ⁺ –C gerilme	Nükleik asit

Çizelge 5.6 'da, farklı sıcaklık grupları için istatistiksel analizlerde kullanılan pik alanları ve Amid I pikine olan oranlarının ortalamaları verilmiştir. Sıcaklık gruplarının ortalama değerleri, ilgili sıcaklıkla denenen tüm pH tekrar örneklerinin ortalamaları alınarak elde edilmiştir. Alan değerleri, ilgili piklerin integrasyonu ile, OPUS programında hesaplanmıştır (Şekil 5.14).

Çizelge 5.6. Farklı sıcaklık gruplarının ortalama pik alanı değerleri ve Amid I pikine oranlanmış değerleri.

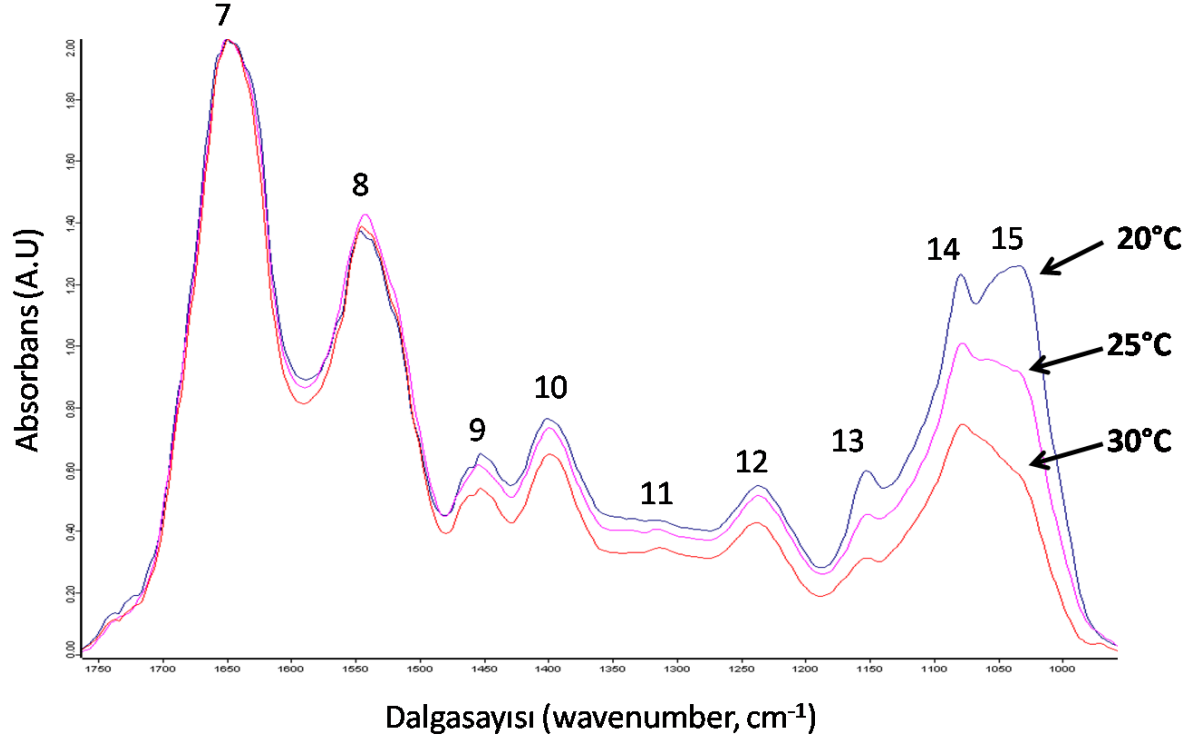
Pik No.	20 C		25 C		30 C	
	Pik alanı	Amid I'e oranı	Pik alanı	Amid I'e oranı	Pik alanı	Amid I'e oranı
1	2,08	1,29	2,10	1,15	1,98	1,15
2	0,29	0,18	0,35	0,19	0,30	0,18
3	0,17	0,11	0,17	0,09	0,19	0,11
4	0,27	0,17	0,26	0,14	0,24	0,14
5	0,06	0,04	0,08	0,04	0,06	0,04
6	0,11	0,07	0,12	0,07	0,11	0,07
7	1,62	1,58	1,83	1,45	1,70	1,43
8	1,04	0,64	1,28	0,69	1,19	0,70
9	0,29	0,18	0,32	0,17	0,26	0,15
10	0,46	0,28	0,51	0,28	0,42	0,25
11	0,12	0,07	0,13	0,07	0,11	0,06
12	0,38	0,23	0,42	0,23	0,32	0,19
13	0,23	0,14	0,19	0,11	0,13	0,08
14	0,57	0,35	0,63	0,34	0,45	0,26
15	0,82	0,51	0,69	0,37	0,43	0,25
16	0,04	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02



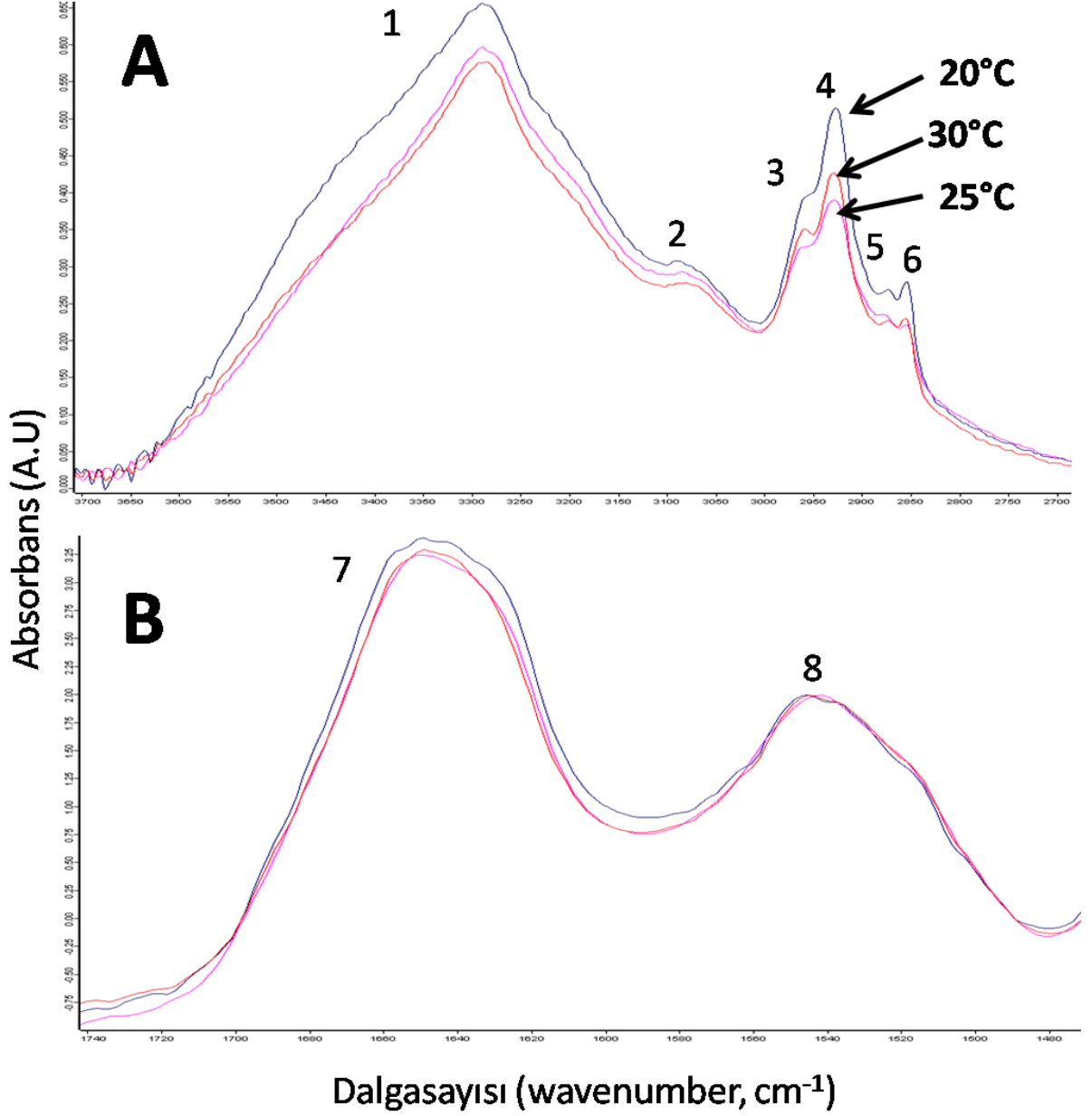
Şekil 5.14. OPUS programında gerçekleştirilen integrasyon alan hesaplamasına örnek.

Şekil 5.15 ve 5.16’ da farklı sıcaklıklara ait ortalama spektrumlar üst üste koyularak aradaki farklılıklar gösterilmiştir. 20°C, 25°C ve 30°C inkübasyon sıcaklıklarında elde edilen peliküllerin spektrum piklerine bakıldığında, istatistiki (ANOVA) analizde de anlamlı çıkan ($P < 0.05$) 4., 7., 13., 14., 15., ve 16 piklerde farklılık saptanmıştır (Şekil 5.17). Özellikle 15. pik, 20°C spektrumunda bariz şekilde görünürken, 25°C’ de azalmış ve 30°C’ de yok olmuştur (Şekil 5.15). 15. pik bölgesinin polisakkarit bölgesi olması önem taşımaktadır.

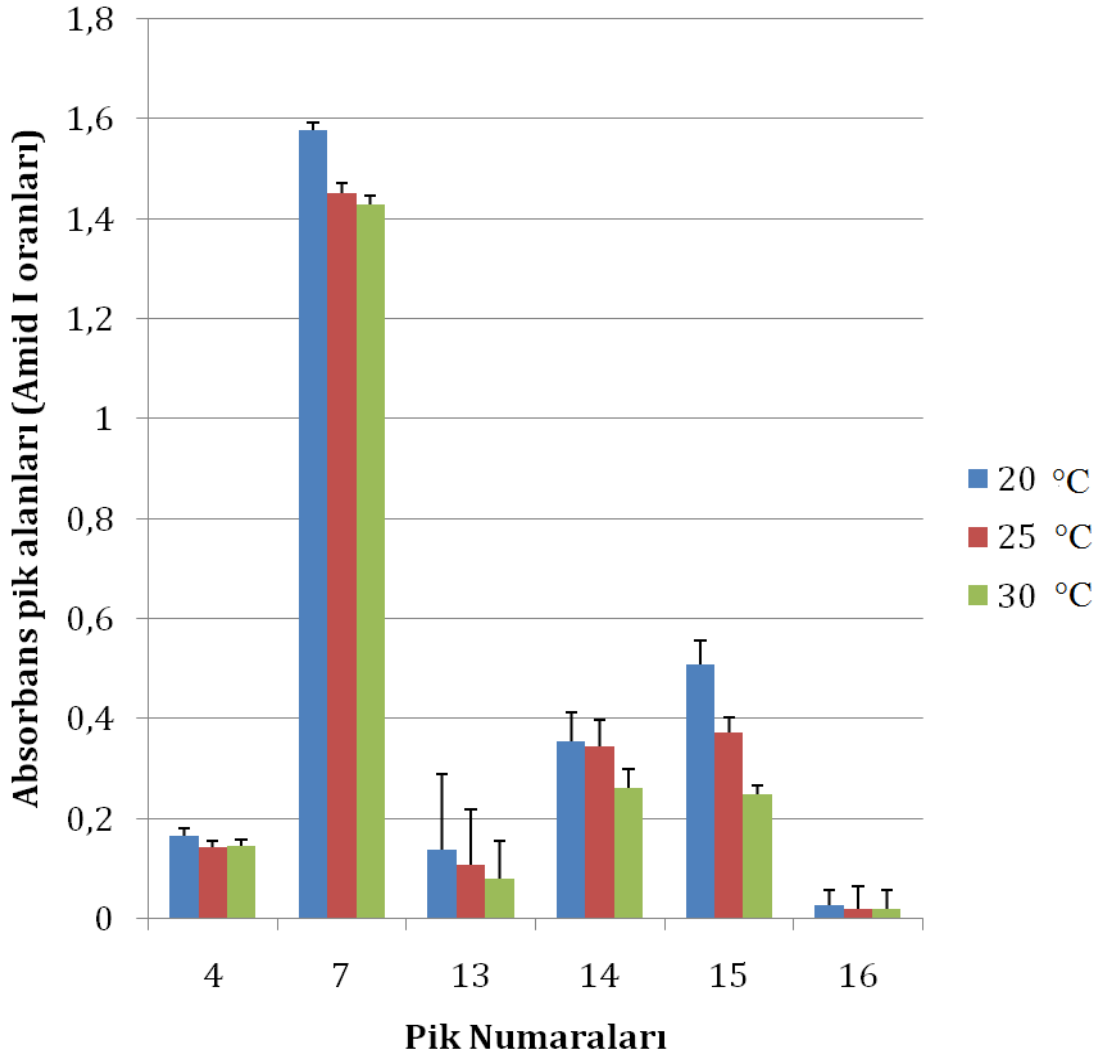
Salmonella’da selüloz biyosentezi ve ince agregatif fimbriya (Tafi) sentezi sıklıkla birlikte gerçekleşmektedir. İnce agregatif fimbriyalar selülozun oluşturduğu elastik ve stabil bağların aksine, hücreler arasında katı ve kırılabilir bağlar kurar. 30 °C’ de oluşan pelikülün son derece kırılabilir bir yapıda olması ve incelenen FTIR spektrumunda polisakkarit pikinin çıkmaması, 30°C’ de oluşan pelikülün yapısında, 20°C ve 25°C’ de oluşan pelikülde var olan selülozun sentezlenmediği veya az sentezlendiği düşüncesini kuvvetlendirmektedir (Şekil 5.16 ve Şekil 5.17).



Şekil 5.15. 20°C, 25°C ve 30°C gruplarının 1750-1000 cm⁻¹ arasındaki karşılaştırmalı FTIR absorbanans spektrumları. Spektrumlar, ilgili sıcaklıklarda denenen farklı pH koşullarından elde edilen spektrumların ortalamaları alınarak elde edilmiştir. Normalizasyon Amid I pikine göre (7 numaralı pik) yapılmıştır.



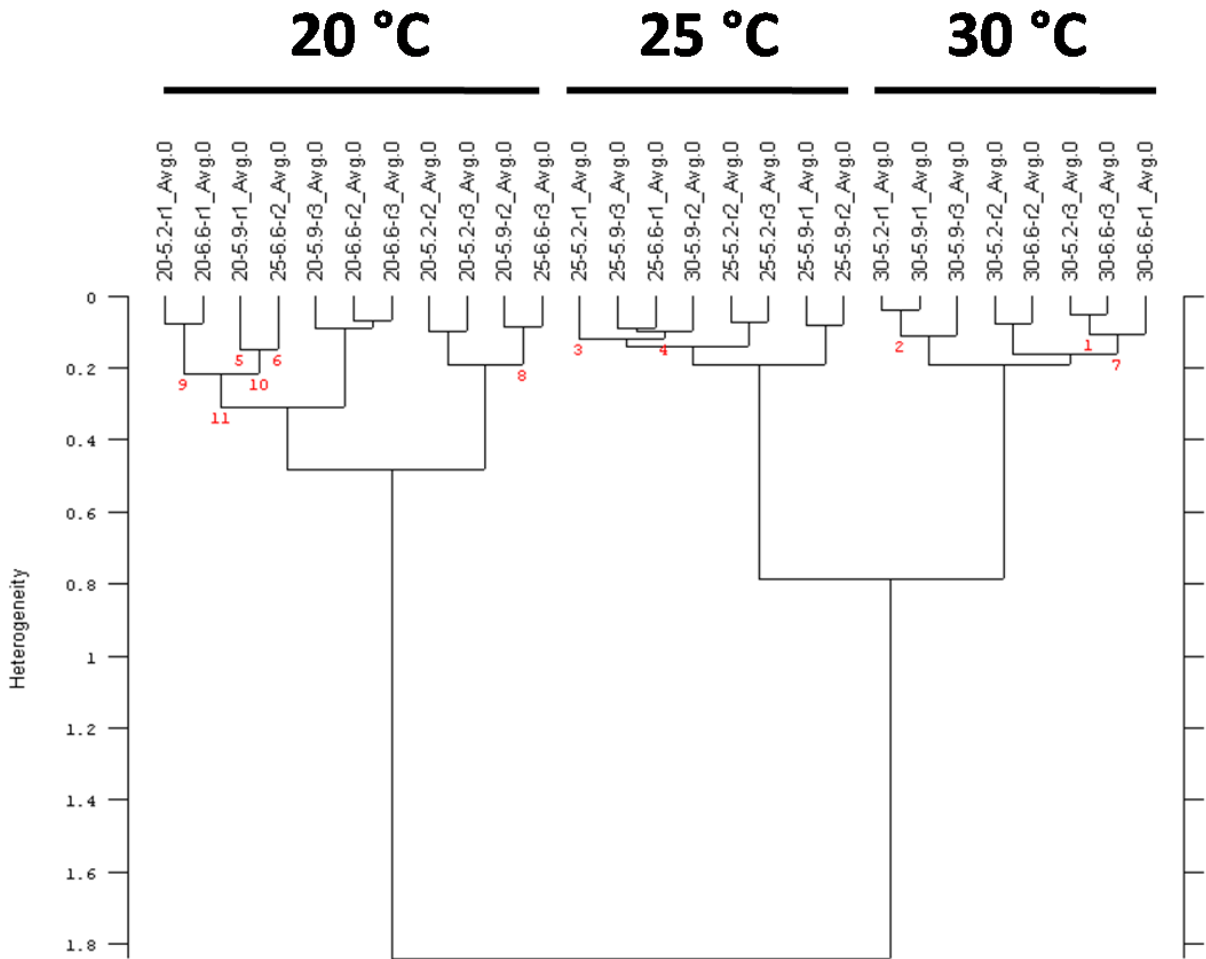
Şekil 5.16. A: 20, 25 ve 30°C gruplarının 3700-2700 cm⁻¹ arasındaki karşılaştırmalı FTIR absorbans spektrumları. Spektrumlar, ilgili sıcaklıklarda denenilen farklı pH koşullarından elde edilen spektrumların ortalamaları alınarak elde edilmiştir. Normalizasyon Amid I pikine göre (7 numaralı pik) yapılmıştır. **B:** 20, 25 ve 30°C gruplarının 7 numaralı pik olan Amid I piki için karşılaştırmalı FTIR absorbans spektrumları. Normalizasyon Amid II pikine göre (8 numaralı pik) yapılmıştır.



Şekil 5.17. 20°C, 25°C ve 30°C gruplarının karşılaştırmalı FTIR absorbans spektrumlarının pik alanlarına göre ANOVA analizi ($P < 0.05$) sonuçları.

7. pik bölgesi protein bölge olması ve sıcaklıklar arasında anlamlı bir farklılık (Şekil 5.17) göstermesi sebebiyle, bu farklılığın *Salmonella* biyofilminde önemli bileşen olarak bilinen kıvrımlı fimbriyadan kaynaklandığı düşünülmüştür. 7. pik bölgesine bakıldığında (Çizelge 5.6) sıcaklık arttıkça söz konusu pikin alanında da miktarsal olarak azalma meydana geldiği görülmektedir.

Spektrumlarından elde edilen piklerin integrasyon alan hesaplamaları (Şekil 5.14) OPUS programında yapıldıktan sonra elde edilen veriler (ortalamaları Çizelge 5.6' da verilmiştir) çok değişkenli kümeleme analizine tabi tutulmuştur. Şekil 5.18' den de anlaşıldığı üzere sıcaklık faktörüne bağlı olarak gruplar üç ayrı kümede homojen bir şekilde yer alırken, pH faktörüne bağlı olarak gruplar homojen bir dağılım göstermemiştir. Yapılan ANOVA analizinin sonuçları da bu bulguları doğrulamaktadır. Zira 20°C inkübasyon sıcaklığında pH 5.2 ile pH 5.9 grupları arasında sadece 5. Pikte (P<0.026), 25°C inkübasyon sıcaklığında pH 5.2 ile pH 5.9 grupları arasında (P<0.049) ve pH 5.9 ile pH 6.6 grupları arasında (P<0.013) 6. pikte anlamlı bir fark belirlenmiştir. 30°C için ise herhangi bir anlamlı pik saptanmamıştır.



Şekil 5.18. 1750-1000 cm^{-1} arasındaki bölgeye göre yapılan kümeleme analizi.

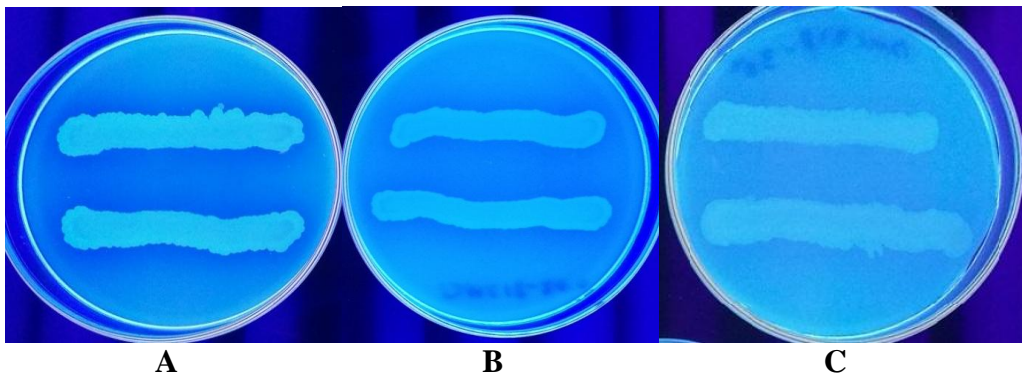
Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; sıcaklık, pH 'ya göre pelikül (biyofilm) oluşumunda daha baskın bir çevresel faktör olarak öne çıkmıştır. Sıcaklık pelikülün

kimyasal yapısını ciddi derecede etkilemektedir. Şekil 5.17'den de anlaşıldığı üzere, sıcaklık artıka pelikülün yapısında bulunan protein (7. pik), polisakkarit (15. pik), lipit (4. pik) ve nükleik asitlerin (16. Pik ve 13. pik) miktarlarında anlamlı bir şekilde ($P<0.05$) azalma meydana gelmektedir.

5.7. Farklı İnkübasyon Sıcaklıklarının Selüloz Üretimi Üzerine Etkisi

S. Virchow DMC18 suşunun farklı inkübasyon sıcaklıklarında (20°C , 25°C ve 30°C) selüloz üretim özelliklerini araştırmak amacıyla kalkoflor denemesi tasarlanmıştır. Bu nedenle tüm deneyler sırasında kullanılan DMC18 numaralı suş $\text{LB}^{-\text{NaCl}}$ sıvı besiyerisinde %1 lik ekim yaparak 37°C ' de çalkalamalı koşullarda 18 saat inkübe edilmiştir. Daha önce de anlatıldığı gibi aktif kültürlerden kalkoflor (selüloz indikatörü) içeren $\text{LB}^{-\text{NaCl}}$ katı besiyerlerine öze yardımıyla ekim yapılmış ve bu ortamlar 20°C , 25°C ve 30°C ' de 8 gün süresince inkübasyon bırakılmıştır (64). 8. gün sonunda üreme hatları 366 nm UV ışık altında incelenerek, selüloz üretim özellikleri, kalkofloru bağlamak suretiyle floresans ışımaya verip vermemelerine göre değerlendirilmiştir (Şekil 5.19).

Şekil 5.19'tan da anlaşıldığı üzere 366 nm UV ışık altında incelenen petripler 20°C 'de kuvetli ve 25°C 'de zayıf bir floresans ışımaya sergilerken, 30°C için mat bir görüntü elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar 30°C 'de *Salmonella*'nın biyofilm matriksinin önemli bileşeni olan selülozun sentezlenmediğini ve bu sebepten dolayı pelikül denemesinde kırılğan bir yapı oluşturduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 5.19. *S. Virchow* DMC18 suşunun farklı inkübasyon sıcaklıklarında selüloz üretimi [(A, 20°C), (B, 25°C) ve (C, 30°C)].

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye kökenli *S. Virchow* suşları ile yürütülen biyofilm morfotip analizleri, bu suşlarda yaygın morfotipin “rdar” olduğu gösterilmiştir. Zira incelenen 16 suştan sadece biri “bdar”, diğer 15 adeti ise “rdar” biyofilm morfotipinde bulunmuştur. “rdar” ve “bdar” morfotiplerinin ortak özelliği biyofilm matriksinin ana bileşeni olarak kıvrımlı fimbriya içermeleridir. “rdar” morfotipinin matriksinde kıvrımlı fimbriya yanında selüloz da bulunurken, “bdar” morfotipinin matriksinde yalnız kıvrımlı fimbriya yer almakta, selüloz bulunmamaktadır (77).

Kıvrımlı fimbriya, *Salmonella* cinsinin de dahil olduğu *Enterobacteriaceae* familyası üyelerinin ortak bir yüzey yapısı olduğu için, bu bakterilerin ürettiği biyofilm matrikslerinin de ana bileşeni olarak tespit edilmesi doğaldır. Kıvrımlı fimbriyanın (ince agregatif fimbriya) *Enterobacteriaceae* üyelerinin; memeli ve bitki hücrelerinin yanı sıra, cam, plastik ve paslanmaz çelik gibi inert yüzeylerde tutunması ve biyofilm yapılarını oluşturmasında ilk basamak olan adezyona önemli ölçüde katkıda bulunduğu uzun zamandır bilinmektedir (82, 144). Diğer yandan *Salmonella* biyo-film-leri içerisindeki selülozun, biyofilm yapılarının elastikiyetini ve dolayısı ile stres ajanlarına karşı stabilitesini artırdığı değişik araştırmacılar tarafından saptanmıştır (85, 145).

Özetle “rdar” morfotipteki biyo-film-lerde kıvrımlı fimbriya tutunmanın ve biyofilm oluşumunun, selüloz ise yapısal stabilite ve kararlılığı temel unsurlarıdır. Yalnız selüloz (pdar) ya da yalnız kıvrımlı fimbriya (bdar) içeren biyo-film-lerin içerisinde bulunan bakterilerin çevresel stres koşullarına, antibiyotiklere ve dezenfektanlara direnç yanında, immün sistemin yanıtlarından korunmada da, rdar morfotipindeki biyo-film-lerin içindeki bakterilere oranla çok daha düşük seviyede bir yetenek içerdikleri belirlenmiştir (144, 145). Bu nedenle *Salmonella* enfeksiyonlarında temel biyofilm morfotipi olarak “rdar” esas alınmaktadır. Çalışmamızda da *S. Virchow* suşlarında ana biyofilm morfotipi olarak “rdar” morfotipinin belirlenmesi, Türkiye kökenli bu suşların yüksek düzeyde enfektif ajanlar olduğuna işaret etmektedir. Özellikle tavukçuluk endüstrisi açısından büyük önem taşıyan bu suşlarda yürütülecek mücadelede, “rdar” morfotipinin esas alınması ve antibiyofilm ajanların etkinliğinin bu morfotipe göre tespit edilmesi gerekmektedir. Agar ortamlarında *S. Virchow* suşlarının biyofilm morfotipleri belirlendikten sonra, elde edilen verilerin doğrulanması amacıyla, bu bakterilerin sıvı besiyerisinde sıvı-hava fazında oluşturdukları pelikül yapılarının karakteristikleri de araştırılmıştır. Bu denemelerden elde

edilen veriler, agar üzerinde gerçekleştirilen biyofilm morfotipi çalışmaları ile tam bir uyum göstermiştir. Yapısında sadece kıvrımlı fimbriya bulunduran *S. Virchow* DMC33 (bdar morfotipinde) pelikül yapısı, karıştırma ve çalkalama gibi fiziksel etkilerle kolay bir şekilde dağılmıştır. Diğer yandan “rdar” morfotipinde bulunan diğer 15 *S. Virchow* suşunun pelikül yapıları karıştırma ve çalkalama uygulamalarına yüksek düzeyde direnç göstermiştir. “bdar” morfotipinin oluşturduğu pelikül yapısının söz konusu işlemlere karşı dayanıksız oluşu, matriks ana bileşeni olarak yalnız kıvrımlı fimbriyayı içermesinden kaynaklanmaktadır. Zira agregatif ve elastisitesi düşük bir protein polimeri olan bu fimbriya, biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilerken, tek başına bulunduğu biyofilmin ve pelikülün fiziksel ve kimyasal etkilere karşı direncini düşürmektedir. Ancak biyofilm ve dolayısı ile pelikül yapısına agregatif fimbriyanın yanında selülozun da katılması, olumsuz çevresel koşullarında stabiliteyi yüksek düzeyde artırmaktadır (13, 64, 85, 146, 147, 148, 149, 150). Biyofilm ve pelikül çalışmalarının nihai doğrulanması, kalkaflor bağlanma denemeleri sonucunda gerçekleştirilmiştir. Bu denemeler sonucunda da sadece *S. Virchow* DMC33 suşunda kalkaflor bağlanmasının gerçekleşmediği saptanmıştır.

Salmonella suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin zamana bağlı değişimi; bu bakterilerin biyofilm üretme kapasitelerinin, biyofilm yapılarının ve tutundukları yüzeyin özelliklerine bağlıdır. Biyofilm yapılarının detaylı analizinde ve bu yapılar ile mücadelede, olgun biyofilm oluşma zamanlarının kritik bir önemi vardır. Zira özellikle biyofilm eradikasyonu amacı ile seçilecek antimikrobiyal ajanların, deneysel etkinlikleri, olgun ve en yüksek düzeyde üretilmiş biyofilmlere karşı denenerak belirlenmelidir (66, 128, 129, 130, 131). Bu durumda ancak gerçek bir biyofilm mücadele ajanının tespiti mümkün olabilir. Ayrıca biyofilm üretiminin optimum zamanının belirlenmesi, biyofilm üretimi için doğru tahminlerin yapılmasını ve klinik ve endüstriyel süreçlerde kullanılacak matematiksel modellerin geliştirilmesini mümkün kılar. Bu amaçla yürütülen çalışmamızda Türkiye kökenli tüm *S. Virchow* suşlarının polistiren yüzeylerde optimum biyofilm üretme zamanının 72 saat olduğu belirlenmiştir. 72 saat sonucunda tayin edilen biyofilm miktarları, Türkiye kökenli suşların tümünün güçlü biyofilm üreticileri olduğunu da göstermiştir. Çalışmamızdaki kontrol suş *S. Typhimurium* SL1344’ de olduğu gibi, bazı *Salmonella* suşları için aynı koşullarda biyofilm üretim miktarı ve optimum biyofilm üretim süreci farklılık gösterebilmektedir. Bu farklılığın temel kaynağını, suşlar arasında değişiklik gösteren genetik ifade programlarının oluşturduğu öngörülmektedir (115, 126, 126). *S. Virchow* suşlarında tanımlanan optimum biyofilm üretim düzeyinin, genetik ifade

zamanı ile ilişkisinin araştırılması literatür verilerinde yer alan bu öngörüye kesinlik kazandıracak ve biyofilm yapılarının regülasyonuna önemli katkılarda bulunacaktır. *Salmonella* suşlarının biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturması üzerinde etkili diğer ana unsurlar; ortamda bulunan temel besin maddeleri, ortam pH'sı ve çevresel sıcaklıktır (inkübasyon sıcaklığı). Özellikle biyofilm üretiminin matematiksel modeli, tahmini ve buna bağlı olarak etkin mücadele stratejilerinin tayin edilmesi düşünülüyor ise, bu parametrelerin tayin edilmesi bir zorunluluktur (12, 15, 16, 24, 152). *Salmonella* suşlarında besinsel ve diğer çevresel etkilerin incelendiği çalışmalarda birbiri ile çelişen sonuçlar alınmıştır. Bazı suşlarda ideal inkübasyon sıcaklığı 20-22°C olarak belirlenirken bazı suşlar için bu değer 28-30°C olarak saptanmıştır (153, 154, 155). Aynı şekilde biyofilm oluşumu için gerekli optimum pH düzeylerinde de literatürde farklı bulgular mevcuttur. Bazı çalışmalarda biyofilm üretim için optimum ortam pH'sı 6,6 civarında tanımlanırken, daha ağırlıklı olarak söz konusu pH değerinin 6 ve 7 olduğu yönünde çalışma sonuçları literatürde yer almaktadır (113, 154, 156). Bunların aksine azot kaynağı olarak *Salmonella* üreme ortamlarına artan konsantrasyonlarda tripton ilavesinin, biyofilm üretimini artırdığına yönelik veriler birçok çalışmada ortaktır (115, 157, 158). Bizim çalışmamızda *S. Virchow* DMC18 suşu için bu değerler; 20°C inkübasyon sıcaklığı, 72 saat inkübasyon süresi, pH 6.6 ve 0.5 g/L tripton konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda da olduğu gibi, bu konuda yapılan araştırmaların sonuçlarının büyük oranda farklılık göstermesinin ana nedenlerini; kullanılan suşların coğrafik ve genetik farklılıkları ve deneysel modellerin çeşitliliği olarak özetlemek mümkündür. Kaynağı ne olursa olsun bu farklılıklar, *Salmonella* biyofilmleri ile mücadelede lokal stratejilerin geliştirilmesinin zorunluluğuna işaret etmektedir. Yukarıda özetlenen ve *S. Virchow* DMC18 suşu ile yürütülen deneysel çalışmalardan elde edilen veriler modifiye edilmiş Gompertz denkleminde uygulandığında, söz konusu denklemin (Birincil denklem), uygulanan değişkenler ışığında biyofilm oluşumunun modellenmesinde kullanılabileceği saptanmıştır. Bugüne kadar değişik araştırmacılar modifiye Gompertz denklemini kullanarak *Salmonella* suşlarında biyofilm üretim eğilimini (λ) hesaplamıştır. Ancak bu çalışmalarda, bizim çalışmamızdan farklı olarak biyofilm üretimi için sadece tek bir zaman dilimi kullanılmıştır (115, 124, 125). Tek zaman diliminde farklı parametrelerin biyofilm üretimi üzerinde etkisinin araştırıldığı çalışma verileri, biyofilm üretiminin modellenmesinde çoğu durumda yetersiz kalmaktadır (126, 155). Bizim çalışmamızda ise, *S. Virchow* DMC18 suşunun biyofilm oluşturma kapasitesini bir model olarak tanımlamak amacı ile 3 farklı

sıcaklık ve pH değeri için 96 saat süresince biyofilm üretim düzeyleri belirlenmiştir. Tripton konsantrasyonu biyofilm üzerinde kritik bir parametre olarak tespit edilmediği için model oluşturmada dikkate alınmamıştır. Deneysel veriler ışığında geliştirilen birincil modelden sonra, üç boyutlu olarak oluşturulan ikincil modelde de aynı sonuçlara ulaşılmıştır. İkincil modelde de sıcaklık arttıkça azami biyofilm miktarı (a), azami biyofilm oluşturma hızı (μ_m) ve biyofilmin oluşmaya başladığı zamanın (λ) olumsuz yönde etkilendiği saptanmıştır. Bunun aksine ortam pH'sı arttıkça (pH 6.6 değerine kadar) söz konusu parametrelerin biyofilm üretim kapasitesi açısından olumlu yönde etkilendiği belirlenmiştir.

Oluşturulan modellerin biyofilm üretiminin tahmini kapasitesini test etmek için, çalışmanın devamında, ikincil model kullanılarak birincil modelin a , μ_m ve λ parametrelerinin, inkübasyon sıcaklığına (23 °C ve 26 °C) ve ortam pH'sına (pH 5.3 ve 6.3) bağlı değişimi tanımlanmıştır. *S. Virchow* suşlarının oluşturduğu biyofilmler ile mücadelede en kritik evrenin, bu çalışmada elde edilen veriler ışığında, biyofilm oluşumunun hızlanmaya başladığı zaman (λ) olduğunu söylemek olasıdır. Zira bu evreden sonra biyofilm üretimi çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Biyofilm üretiminde λ evresine geçilmeden sonra yapılacak sanitasyon ve dezenfeksiyon gibi işlemler, biyofilm oluşumunu engellemek için çoğu durumda yeterlidir (126). Ancak olgun biyofilmlerin eradikasyonu söz konusu yöntemlerde mümkün değildir (6). *S. Virchow* DMC18 suşunda biyofilm oluşumunun hızlandığı zaman, ilk 24 saatin altında gerçekleştiği için, modelin tahmin çalışmaları 24 saatlik inkübasyon süresi esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar da, oluşturulan matematiksel modeller ile uygunluk göstermiştir. Tüm bu bulgular literatür verileri ile beraber yorumlandığında oluşturulan modelin, *Salmonella* suşlarının biyofilm üretiminin klinik ve endüstriyel süreçlerde tahmininde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu *Salmonella* biyofilmlerinin oluşumunun engellenmesi ve eradikasyonu çalışmalarına yeni bulgular ve ivme kazandıracak önemli bir gelişmedir.

Tez çalışmasının son aşamasında gerçekleştirilen FTIR analizleri, *Salmonella* pelikül yapılarının çevresel faktörlere bağlı olarak kimyasal bileşenlerinin değiştiğini kanıtlamıştır. Özellikle inkübasyon sıcaklığının artışına paralel olarak protein, karbonhidrat ve nükleik asit piklerinde gözlenen düşmeler ya da karbonhidrat pikinin tespit edilmemesi, çevresel etkilerin biyofilm morfoloğinin ya da pelikül yapısının değişimine yol açtığını kanıtlamaktadır. Kıvrımlı fimbriya (Protein), selüloz (Karbonhidrat) ve DNA (Nükleik asit) miktarının biyofilm matriksinde bulunması, biyofilm üretimi miktarını ve üretilen

biyofilmin stabilitesini belirleyen ana unsurlardır. Daha önce de ifade edildiği gibi kıvrımlı fimbriya hücre-hücre ve hücre-yüzey adezyonunda, selüloz üretilen biyofilmin stabilitesinde ve DNA ise biyofilm matriksinde hücrelerin tutulması ve bakteri komünitesinin oluşturulmasında etkin rol oynamaktadır (65, 70, 71, 73, 162, 163). FTIR analizlerinden elde edilen bu bulgular, özellikle *Salmonella* suşlarının sıvı-hava ara fazında oluşturduğu biyofilm yapılarının (pelikül) oluşumunun engellenmesi ve eradikasyonu çalışmalarına yeni bir yaklaşım getirecektir.

KAYNAKLAR

1. Popoff MY, Le Minor LE. Genus XXXIII *Salmonella*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2005;2: 764-787.
2. Threlfall EJ. Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections. Bacteriology. 2005;1398-1434.
3. Kim W, Surette MG. Swarming populations of *Salmonella* represents a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance. Biological Procedures. 2003;5:189-196.
4. Voetsch A, Thomas C, Van Gilder J, Angulo F, Monica J, Farley M. The Emerging Infections Program FoodNet Working Group, FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal *Salmonella* Infections in the United States. Clinical Infectious Diseases. 2004;38(3);127–34.
5. Suar M, Jantsch J, Hapfelmeier S, Kremer M, Stallmach T, Barrow PA. Virulence of broad and narrow-host-range *Salmonella enterica* serovars in the streptomycin-pretreated mouse model. Infection and Immunology. 2006;74(1);632–644.
6. Shi X, Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends in Food Science and Technology. 2009;20:407–13.
7. Joseph B, Otta SK, Kraunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers, International Journal of Food Microbiology. 2001;64:367-372.
8. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappinscott HM. Microbial biofilms. Annual Review of Microbiology. 1995;49:711-745.
9. Jessen B, Lammert C. Biofilm and disinfection in meat processing plants. International Biodeterioration and Biodegradation. 2003;51:265-269.
10. Hohmann EL. Non-typhoidal salmonellosis. Clinical Infectious Diseases. 2001;32:263–9.
11. European Center for Disease Control. Update on outbreak of *Salmonella* Agona in Ireland and other EU countries. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/Pages/Salmonellosis_Outbreak_in_Ireland.aspx. 2010; Accessed Apr 12.

12. Hood SK, Zottola EA. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*. 1997;37:145–53.
13. Römling U, Rohde M. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiology Letters*. 1999;180:91-102.
14. Römling U, Rohde M, Olsen A, Normark S, Reinkoster J. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*. 2000; 36:10–23.
15. Sinde E, Carballo J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*. 2000;17:439–47.
16. Gerstel U, Römling U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella Typhimurium*. *Environmental Microbiology*. 2001;3: 638–48.
17. Chandy JP, Angles ML, Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay. *Water Research*. 2001;35: 2677-82.
18. Chmielewski RAN, Frank JF, Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003;2: 22–32.
19. Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT- Food Science and Technology*. 2010; 43:573–83.
20. Møretrø T, Vestby LK, Nesse LL, Hannevik S, Kotlarz K, Langsrud S. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;106:1005-1012.
21. Gilbert P, McBain AJ, Rickard AH. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2003;51:245–8.
22. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2:95-108.
23. Kaufman ME, Pulsed-field gel electrophoresis. *Molecular Bacteriology*. 1998; 33-50.
24. White AP, Gibson DL, Kim W, Kay WW, Surette MG. Thin agregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*, *Journal of Bacteriology*. 2006;188:3219-3227.

25. Giannella RA. *Salmonella*. In: Baron S, editor. Med Microbiol [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2013 Jul 29]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>.
26. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. J Clin Microbiol. 2000;38(7):2465–7.
27. Crump JA., Griffin PM, Angulo FJ. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. Clin Infect Dis. 2002;35:859-865.
28. Kathryn Cross, <http://www.ifr.ac.uk/> Gıda Araştırma Enstitüsü.
29. Atlas RM, Bartha R. Microbial Ecology. 4th edition, Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, CA, USA
30. Potera C. Studying slime. Environ Health Perspect. . 1997; 106(12):A604-A606.
31. Henrici AT. Studies of freshwater bacteria. J Bacteriol. 1933; 25:2132
32. Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* I Infection in Cystic fibrosis. APMIS. 1977; 262(Suppl):1-96.
33. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. Sci Am. 1978; 238(1):86-95.
34. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, DasguptaM, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol. 1987;41:435-464.
35. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. J Bacteriol. 1994;176(8):2137-2142.
36. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1994; 284(5418):1318–1322.
37. Costerton JW. Replacement of acute planctonic by chronic biofilm diseases. In: Eckey C(ed) The biofilm primer. Springer, New York. 2007
38. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev. 2000;64(4):847-67. Review.
39. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002;8(9):881-90. Review.

40. Bothwell MR, Smith AL, Phillips T. Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003 Nov;129(5):599-60.
41. Bayles KW. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(9):721-726.
42. Kirketerp-Møller K, Jensen PO, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2717-2722.
43. Palmer R Jr, White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol.* 1997;5:435-440.
44. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Biofilm_Formation.jpg
45. Mittelman MW. Adhesion to biomaterials. In: Fletcher M (ed) *Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity.* Wiley-Liss New York. 1996; 89-127.
46. Loeb GI, Neihof RA. Marine conditioning films. *Adv Chem Ser.* 1975;145:319-335.
47. Chamberlain AHL. The role of adsorbed layers in bacterial adhesion. In: Melo LF, Bott TR, Fletcher M, Capdeville B (eds) *Biofilms-science and technology.* Kluwer Academic Dordrecht. 1992;59-67.
48. Marshall KC, Stout R, Mitchell R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J Gen Microbiol.* 1971;68:337-348.
49. Baier RE. Substrate influence on adhesion of microorganisms and their resultant new surface properties. In: Bitton G, Marshall KC (eds) *Adsorption of microorganisms to surfaces.* Wiley New York. 1980;59-104.
50. Rittle KH, Helmstetter CE, Meyer AE, Baier RE. *Escherichia coli* retention on solid surfaces as functions of substratum surface energy and cell growth phase. *Biofouling.* 1990;2:121-130.
51. Marsh PD. Dental plaque. In: Lappin-Scott HM, Costerton JW (eds) *Microbial biofilms.* Cambridge University Press Cambridge. 1995;282-300.
52. Characklis WG, McFeters GA, Marshall KC. Physiological ecology of biofilm systems. In: Characklis WG, Marshall KC (eds) *Biofilms.* Wiley New York. 1990a;341-393.

53. Pringle JH, Fletcher M. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 1993;45:811-817.
54. Bendinger B, Rijnaarts HHM, Altendorf K, Zehnder AJB. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:3973-3977.
55. Percival SL, Thomas JG. *Helicobacter pylori* prevalence and transmission and role of biofilms. *Water Health.* 2009;7(3):469–477.
56. Poulsen LV. 1999. Microbial biofilm in food processing. *Lebensm Wiss u Techn.*1999;32 (6):321-326.
57. Rosenberg M, Perry A, Bayer EA, Gutnick DL, Rosenberg E, Ofek I. Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane. *Infect Immun.* 1981;33: 29-33.
58. Gündüz GT, Tuncel G. Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2006;89 (3-4):329-336.
59. Blenkinsopp SA, Costerton JW. Understanding bacterial biofilms. *Trends Biotechnol.* 1991; 9:138–143.
60. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol.*1998;42: 9–27.
61. Hallam NB, West JR, Forster CF, Simms J. 2001. The potential for biofilm growth in water distribution systems *Wat Res,* 2001;35:4063-4071.
62. Starkey M, Gray KA, Chang SI, Parsek M. 2004. The EPS matrix of bacterial biofilms. 2004; ASM Pres: 174-191..
63. Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiol.* 2005;13;20-26.
64. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology.* 2001;39(6);1452-1463.
65. Römling U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol:* 2002;153:pp. 205-212.

66. Aparna MS, Yadav S. Biofilms: Microbes and diseases. *Braz J Infect Dis.* 2008;12:pp. 526-530.
67. Ma L, Conover HLu, Parsek MR, Bayles K, Woznizk DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* 2009; 5:e1000354.
68. Collinson SK, Emody L, Muller KH, Trust TJ, Kay WW. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol.* 1991 Aug;173(15):4773–81.
69. Muller KH, Collinson SK, Trust TJ, Kay WW. TypeI fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol.* 1991 Aug; 173(15): 4765–72.
70. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002;295:1487.
71. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* 2006;59:1114–1128.
72. Harmsen M, Lappann M, Knøchel S, Molin S. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:2271–2279
73. Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, et al. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol.* 2008;8:173.
74. Jayaraman A, Cheng ET, Earthman JC, Wood TK. Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1997;18: 396–401.
75. Collinson S, Doig P, Doran J, Clouthier S, Trust T, Kay W. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J. Bacteriol.* 1993;175:12–18.
76. Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsen A, Normark S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 1995;18:661–70.
77. Römling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta W, Normark S. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol.* 1998;180:722–31.

78. Collinson S, Clouthier S, Doran J, Banser P, Kay W. *Salmonella enteritidis* *agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J. Bacteriol.* 1996;178:662–67.
79. Hammar M, Bian Z, Normark S. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:6562–66.
80. Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science.* 2002; 295:851-85.
81. White AP, Collinson S, Banser P, Gibson D, Paetzel M. Structure and characterization of AgfB from *Salmonella enteritidis* thin aggregative fimbriae. *J. Mol. Biol.* 2001;311:735–49.
82. Barnhart MM, Chapman MR. Curli Biogenesis and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006;60:131–47.
83. Loferer H, Hammar M, Normark S. Availability of the fiber subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. *Mol. Microbiol.* 1997;26:11–23.
84. Robinson LS, Ashman EM, Hultgren SJ, Chapman MR. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol. Microbiol.* 2006;59:870-81.
85. Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo J, Gamazo et al. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology.* 2002;43(3):793-808.
86. Römling U. Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2005;1.62(11);1234-1246.
87. Ogasawara H, Yamamoto K, Ishihama A. Role of the Biofilm Master Regulator CsgD in Cross-Regulation between Biofilm Formation and Flagellar Synthesis. *J Bacteriol.* 2011;15:193(10):2587–97.
88. Grantcharova N, Peters V, Monteiro C, Zakikhany K, Römling U. Bistable Expression of CsgD in Biofilm Development of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 2010;15.192(2):456–66.
89. Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev.* 1979;43(4):496-518.
90. Eberhard A, Widrig CA, McBath P, Schineller JB. Analogs of the autoinducer of bioluminescence in *Vibrio fischeri*. *Arch Microbiol.* 1986;146(1):35-40.

91. Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004; 28:261–289.
92. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998;280:295–298.
93. Fuqua, C, Greenberg EP. Listening in on bacteria acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology*. 2002;3:685–695.
94. Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*. 2005;1:27–33.
95. Surette MG, Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:1639-1644.
96. <http://cyberpizzas.wordpress.com/>
97. Beck von Bodman S, Farrand SK. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Journal of Bacteriology*. 1995;177:5000–5008.
98. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*. 2005;13:34–40.
99. White AP, Gibson DL, Kim W, Kay WW, Surette MG. Thin Aggregative Fimbriae and Cellulose Enhance Long-Term Survival and Persistence of *Salmonella*. *J Bacteriol*. 2006;188(9):3219–27.
100. Vestby LK, Møretro T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*. 2009;5:1-6.
101. Karunakaran E, Mukherjee J, Ramalingam B, Biggs CA. “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011; 90:1869–1881.
102. Nilsson RE, Ross T, Bowman JP. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2011;150:14–24.
103. Smirnova, TA, Didenko LV, Azizbekyan RR, Romanova YM. Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Microbiology*. 2010;79:413–423.

104. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*. 2010;109:1117–1131.
105. Brandl MT. Fitness of Human Enteric Pathogens on Plants and Implications for Food Safety1. *Annu Rev Phytopathol*. 2006;44(1):367–92.
106. Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS. Biofilm formation and interaction with the surface of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect Immun*. 2002;70:2640-2649.
107. Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK. Molecular interactions in biofilms. *Chem and Bio*. 2002;9:859-871.
108. Hammer BK, Bassler BL. Quorum sensing controls biofilms formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 2003;50:101-114.
109. Martino PD, Fursy R, Bret L, Sunfararaju B, Philips RS. Indole can act as an extracellular signal regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Can J Microbiol*. 2003;49:443-449.
110. Wolfe AJ, Chang DE, Walker JD, Seitz-Partridge JE, Vidaurri MD, Lange CF, et al. Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Mol Microbiol*. 2003;48:977-988.
111. Tischler, A.D. and Camilli, A. 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol*, Vol. 53; pp. 857-869.
112. Stepanović S, Ćirković I, Ranin L, Švabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*. 2004;38:428–432.
113. Giaouris E, Chorianopoulos N, Nychas GJE. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *Journal of Food Protection*. 2005;68:2149–2154.
114. Xu H, Zou Y, Lee HY, Ahn J. Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. *Journal of Food Science*. 2010;75:M580–M585.
115. Speranza B, Corbo MR, Sinigaglia M. Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. *Journal of Food Science*. 2011;76: M12–M16.

116. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Salmonella biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Research International. 2012;45:502–531.
117. GERSTEL U, Römling U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella Typhimurium*. Environmental Microbiology. 2001;3:638–48.
118. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol. 1998;30(2):285–93.
119. Mireles JR, Toguchi A, Harshey RM. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. J Bacteriol. 2001;183:5848-5854.
120. Boddicker JD, Ledebner NA, Jagnow J, Jones BD, Clegg S. Differential binding to and biofilm formation on HEp-2 cells by Salmonella enterica Serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the *fimH* gene of the *fim* gene cluster. Mol Microbiol. 2002;45(5):1255–65.
121. Doyle ME, Glass KA. Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality, and Human Health. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2010;9(1):44-56.
122. O’Toole G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol, Vol. 54; pp. 49-79.
123. Wang, Q, Zhang T. Review of mathematical models for biofilms. Solid State Communications. 2010;150:21–22.
124. Mai T, Conner D. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. Int J Food Microbiol. 2007;120:282-286.
125. Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludı D, Diorio V, Vergara A, Conter M. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. J Appl Microbiol. 2008;104:1552-1561.
126. Karaca B, Buzrul S, Tato V, Akçelik N, Akçelik M. Modeling and predicting the biofilm formation of different *Salmonella* strains. J Food Safety. 2013;33:503-508.
127. Römling U, Bokranz W, Rabsch W, Zogaj X, Nimtz M, Tschäpe H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in Salmonella serovars important in human disease. Int J Med Microbiol. 2003;293(4):273–85.

128. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates; a quantitative model for the adherence *staphylococci* to medical devices. *J Clin Microbiology*. 1985;22:996-1006.
129. Deighton MA, Balkau B. Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(11):2442-2447.
130. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 2000;40(2):175-179.
131. Ramage G, Walle KV, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(9):2475-2479.
132. Gibson AM, Bratchell N, Roberts TA. Predicting microbial growth: Growth responses of *Salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *Int J Food Microbiol*. 1988;6:155–178.
133. Buchanan RL, Phillips JG. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Protect*. 1990;53:370–376.
134. Zwietering MH, Jongenburger FM, Roubouts M, van't Riet K. Modelling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56:1875–1881.
135. Zwietering MH, De Koos JT, Hasenack BE, De Wit JC, Vant Riet K. Modeling bacterial growth as a function of temperature. *Appl Environ Microbiol*. 1991;57:1094-1101-5.
136. Woodward MJ, Sojka M, Sprigings KA, Humphrey TJ. The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *J Med Microbiol*. 2000;49(5):481–7.
137. <http://biyokure.org>
138. Olsén A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*. 1989; 338:652-655.

139. Schmitt J, Flemming HC. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1998;41:1-11.
140. Severcan F, Toyran N, Kaptan N, Turan B. Fourier transform infrared study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the C–H region. *Talanta*. 2000;53:55-59.
141. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman I. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2008;43:134-179.
142. Severcan F, Bozkurt O, Gurbanov R, Gorgulu G. FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. *J Biophoton*. 2010;3:621-631.
143. Severcan F, Akkas SB, Turker S, Yucel R. Methodological Approaches from Experimental to Computational Analysis in Vibrational Spectroscopy and Microspectroscopy. In Severcan F, Haris PI, eds. *Vibrational Spectroscopy in Diagnosis and Screening*. Amsterdam: IOS Press, 2012;12-52.
144. Cegelski L, Pinkner JS, Hammer ND, Cusumano CK, Hung CS, Chorell E, et al. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chemical Biology*. 2009;5:913-919.
145. Gonzalez-Escobedo G, Gunn JS. Identification of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Genes Regulated during Biofilm Formation on Cholesterol Gallstone Surfaces. *Infect Immun*. 2013;81(10):3770–80.
146. Rainey PB, Travisano M. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature*. 1998;394:69-72.
147. Yildiz FH, Schoolnik GK. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *PNAS*. 1999;96(7):4028-4033.
148. Anriany YA, Weiner RM, Johnson JA, De Rezende C.E, Joseph S.W. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Displays a Rugose Phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(9):4048-4056.
149. Spiers AJ, Kahn SG, Bohannon J, Travisano M, Rainey PB. Adaptive Divergence in Experimental Populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and Phenotypic Bases of Wrinkly Spreader Fitness. *Genetics*. 2002;161:33-46.
150. Scher K, Romling U, Yaron S. Effect of Heat, Acidification, and Chlorination on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells in a Biofilm Formed at the Air-Liquid Interface. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(3):1163-1168.

151. Castelijns GAA, Van Der Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T. Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling J Bioadhesion Biofilm Res.* 2012;28:51-63.
152. Solomon EB, Niemira BA, Sapers GM, Annous BA. Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *J Food Protect.* 2005;68:906–912.
153. Stepanovic S, Cirkovic I, Mijac V, Svabic-Vlahovic M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol.* 2003;20:339-343.
154. Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, Bellon-Fontaine MN, Hebraud M. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:728–737.
155. Nguyen HDN, Yang YS, Yuk HG. Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT Food Sci Technol.* 2014;55:383-388.
156. Lianou A, Koutsoumanis KP. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology.* 2012;16:171–178.
157. Niemira BA, Solomon EB. Sensitivity of Planktonic and Biofilm-Associated *Salmonella* spp. to Ionizing Radiation. *Applied And Environmental Microbiology.* 2005;75:2732–2736.
158. Díez-García M, Capita R, Alonso-Calleja C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology.* 2012;1-8.
159. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002;295:1487.
160. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol.* 2006;59:1114–1128.

161. Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, et al. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol.* 2008;8:173.
162. Conover MS, Mishra M, Deora R. Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS ONE.* 2011;6:16861.
163. Zhao J, Wang Q, Li M, Heijstra BD, Wang S, Liang Q, et al. *Escherichia coli* toxin gene *hipA* affects biofilm formation and DNA release. *Microbiology.* 2013;159:633-640.

EKLER

Ek1: FTIR sonuçlarından elde edilen farklı sıcaklık gruplarına ait pik alanı değerleri.

Dalgasayısı	3295	3084	2958	2927	2873	2854	1646	1541	1452	1398	1314	1236	1151	1077	1046	925
Pik Nu.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
20-5.2-r1	1,735	0,306	0,185	0,256	0,074	0,130	1,426	0,906	0,236	0,396	0,071	0,296	0,127	0,496	0,672	0,028
20-5.2-r2	2,738	0,317	0,193	0,303	0,080	0,138	1,891	1,282	0,408	0,650	0,107	0,621	0,414	0,756	1,114	0,042
20-5.2-r3	2,295	0,265	0,189	0,270	0,073	0,129	1,514	1,120	0,319	0,530	0,139	0,500	0,325	0,618	0,826	0,053
20-5.9-r1	1,961	0,192	0,164	0,261	0,046	0,081	1,475	0,872	0,243	0,338	0,113	0,272	0,156	0,438	0,600	0,049
20-5.9-r2	2,435	0,349	0,236	0,335	0,064	0,132	2,115	1,435	0,447	0,644	0,188	0,560	0,288	0,764	1,022	0,060
20-5.9-r3	2,019	0,247	0,138	0,228	0,053	0,082	1,464	0,781	0,211	0,357	0,104	0,272	0,172	0,489	0,713	0,050
20-6.6-r1	2,606	0,456	0,208	0,382	0,073	0,160	2,012	1,340	0,340	0,534	0,137	0,298	0,210	0,667	1,002	0,037
20-6.6-r2	1,668	0,248	0,120	0,213	0,051	0,077	1,554	1,021	0,263	0,425	0,115	0,379	0,213	0,567	0,847	0,030
20-6.6-r3	1,300	0,159	0,122	0,170	0,043	0,062	1,079	0,639	0,170	0,268	0,073	0,223	0,121	0,400	0,576	0,028
25-5.2-r1	2,656	0,362	0,206	0,265	0,103	0,150	2,482	1,743	0,479	0,651	0,245	0,588	0,267	0,841	0,941	0,039
25-5.2-r2	1,983	0,253	0,172	0,195	0,067	0,100	1,728	1,174	0,322	0,470	0,126	0,445	0,203	0,603	0,604	0,041
25-5.2-r3	2,040	0,303	0,139	0,199	0,061	0,110	1,341	0,905	0,203	0,410	0,097	0,387	0,176	0,504	0,523	0,023
25-5.9-r1	1,582	0,259	0,138	0,205	0,051	0,077	1,654	1,059	0,241	0,409	0,095	0,286	0,150	0,493	0,523	0,026
25-5.9-r2	1,025	0,187	0,092	0,172	0,021	0,054	1,210	0,833	0,205	0,348	0,078	0,234	0,095	0,370	0,373	0,027
25-5.9-r3	2,359	0,485	0,196	0,339	0,106	0,127	2,245	1,628	0,421	0,685	0,168	0,503	0,237	0,801	0,824	0,032
25-6.6-r1	2,183	0,407	0,193	0,262	0,079	0,146	2,019	1,582	0,394	0,646	0,190	0,535	0,261	0,769	0,772	0,033
25-6.6-r2	2,471	0,441	0,218	0,317	0,085	0,144	1,891	1,142	0,250	0,350	0,059	0,216	0,086	0,500	0,659	0,029
25-6.6-r3	2,564	0,488	0,169	0,342	0,111	0,160	1,935	1,429	0,375	0,601	0,182	0,583	0,279	0,808	0,984	0,032

Ek1devamı: FTIR sonuçlarından elde edilen farklı sıcaklık gruplarına ait pik alanı değerleri.

Dalgasayısı	3295	3084	2958	2927	2873	2854	1646	1541	1452	1398	1314	1236	1151	1077	1046	925
Pik Nu.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
30-5.2-r1	1,618	0,203	0,166	0,237	0,042	0,091	1,361	0,889	0,188	0,298	0,068	0,213	0,082	0,374	0,275	0,042
30-5.2-r2	2,379	0,408	0,262	0,333	0,087	0,138	2,049	1,469	0,320	0,502	0,089	0,282	0,119	0,470	0,426	0,030
30-5.2-r3	3,166	0,498	0,242	0,350	0,072	0,148	2,755	1,922	0,432	0,632	0,178	0,524	0,208	0,729	0,689	0,018
30-5.9-r1	1,183	0,173	0,118	0,173	0,032	0,073	1,092	0,721	0,156	0,229	0,047	0,189	0,081	0,261	0,257	0,032
30-5.9-r2	2,447	0,401	0,222	0,263	0,107	0,165	1,955	1,442	0,340	0,543	0,157	0,564	0,208	0,671	0,707	0,026
30-5.9-r3	1,514	0,230	0,131	0,185	0,037	0,074	1,406	0,946	0,215	0,300	0,068	0,203	0,085	0,300	0,315	0,020
30-6.6-r1	1,471	0,252	0,153	0,172	0,028	0,100	1,348	1,002	0,226	0,410	0,106	0,295	0,143	0,390	0,378	0,024
30-6.6-r2	1,295	0,190	0,130	0,172	0,045	0,076	1,174	0,884	0,180	0,325	0,077	0,234	0,093	0,299	0,232	0,022
30-6.6-r3	2,713	0,387	0,242	0,286	0,102	0,139	2,160	1,477	0,316	0,559	0,175	0,404	0,177	0,596	0,532	0,025

Ek2: FTIR sonuçlarından elde edilen farklı sıcaklık gruplarına ait pik alanı değerlerin ortalaması.

Dalgasayısı	3295	3084	2958	2927	2873	2854	1646	1541	1452	1398	1314	1236	1151	1077	1046	925
Pik Nu.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
20-5.2	2,256	0,296	0,189	0,276	0,076	0,132	1,610	1,103	0,321	0,525	0,106	0,472	0,289	0,623	0,871	0,041
20-5.9	2,138	0,263	0,179	0,275	0,054	0,098	1,685	1,029	0,300	0,446	0,135	0,368	0,205	0,564	0,778	0,053
20-6.6	1,858	0,288	0,150	0,255	0,056	0,100	1,548	1,000	0,258	0,409	0,108	0,300	0,181	0,545	0,808	0,032
25-5.2	2,226	0,306	0,172	0,220	0,077	0,120	1,850	1,274	0,335	0,510	0,156	0,473	0,215	0,649	0,689	0,034
25-5.9	1,655	0,310	0,142	0,239	0,059	0,086	1,703	1,173	0,289	0,481	0,114	0,341	0,161	0,555	0,573	0,028
25-6.6	2,406	0,445	0,193	0,307	0,092	0,150	1,948	1,384	0,340	0,532	0,144	0,445	0,209	0,692	0,805	0,031
30-5.2	2,388	0,370	0,223	0,307	0,067	0,126	2,055	1,427	0,313	0,477	0,112	0,340	0,136	0,524	0,463	0,030
30-5.9	1,715	0,268	0,157	0,207	0,059	0,104	1,484	1,036	0,237	0,357	0,091	0,319	0,125	0,411	0,426	0,026
30-6.6	1,826	0,276	0,175	0,210	0,058	0,105	1,561	1,121	0,241	0,431	0,119	0,311	0,138	0,428	0,381	0,024

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mohammad Nima ARIAFAR

Doğum Yeri: İran

Doğum Tarihi: 21.09.1980

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce, Türkçe, Farsça

Eğitim Durumu

Lise: Razi Lisesi, 1996-2000

Lisans: Arak Üniversitesi, Fen Fakültesi, Mikrobiyoloji Bölümü, 2001-2005

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2008-2010

Doktora: Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 2010-2015

Yayınlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

Diani M, Gunay Esiyok O, **Ariafar M.N**, Yuksek F.N, Gunes Altuntas E, Akcelik N. The interactions between esp, fsr, geIE genes and biofilm formation and pfge analysis of clinical Enterococcus faecium strains. African Journal of Microbiology Research. 2013; Vol. 8(2):129-137.

Uluslararası Kongrelerde basılan Bildiriler:

O. Gunay Esiyok, N. Yuksel, M. Diani, **M.N. Badali**, N, Akcelik. "Determination of genetic diversity among vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and identification of virulence genes by polymerase chain reactions (PCR)". 24rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain, 2014.

M.N. Badali, N. Igci, M. Diani, M. Akcelik, N. Akcelik. "Investigation of the effect of different temperature and acidic conditions on biofilm structure of *Salmonella enterica* serotype Virchow by FTIR spectroscopy". 24rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona, Spain, 2014.

M.N. Badali, M. Diani, N. Taskale Karatug, N. Akçelik, M. Akçelik. “Biofilm producing ability of *Salmonella enterica* serotype Virchow, isolated from Turkey.”, 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 2013.

M. Diani, Ö. Günay, **M.N. Badali**, F.N. Yüksel, B. Buyer, E. Gunes Altuntas, N. Akçelik. “Difference in biofilm producing ability between rectal, urine and blood *Enterococcal* isolates from Turkey.”, 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 2013.

E. Günes Altuntas, M. Diani, **M.N. Badali**, B. Yener İlçe, N. Akçelik, M. Akçelik. “Comparison of two different evaluation methods for biofilm formation of bacteria isolated from teeth” 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin, Germany, 2013.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

M. N. Ariafar, E. Güneş Altuntaş, B.Yener İlçe, M. Diani, N. Akçelik “Kekik ve yeşil çay ekstraktinin biyofilm oluşturan ve dişlerden izole edilmiş olan *streptococcus* spp. Üzerindeki etkisi” Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara, Türkiye, 2013.

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

Modeling and predicting the biofilm formation of *salmonella* virchow with respect to temperature and pH (Under Review).