

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Salmonella BİYOFİLMLERİ ÜZERİNE DEZENFEKTANLARIN ETKİSİ

Veli Tato

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Mustafa Akçelik

Temmuz

2014

ETİK BEYAN

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

Veli Tato

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Mustafa AKGELİK danışmanlığında Veli TA TO tarafından hazırlanan bu çalışma 25.07.2014 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

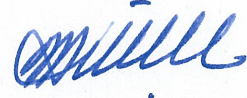
Başkan: Prof. Dr. YAVUZ BEYATLI
(Gazi Üniversitesi - Fen Fakültesi)

İmza:



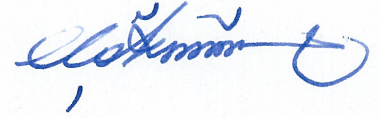
Üye: Prof. Dr. Mustafa AKGELİK
(Ankara Üniversitesi - Fen Fakültesi)

İmza:



Üye: Prof. Dr. CUMHUR ŞÖKMÜŞ
(Ankara Üniversitesi - Fen Fakültesi)

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Salmonella BİYOFİMLERİ ÜZERİNE DEZENFEKTANLARIN ETKİSİ

Veli Tato

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışmada; gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan dezenfektanların *S. Typhimurium*, *S. Infantis* ve *S. Roughform* suşlarının farklı morfotipteki biyofilmleri üzerine olan etkileri saptanmıştır. Dezenfektan olarak etanol, sodyum hipoklorit, klorhekzidin diglukonat, etilendiamintetraasetik asit, sitrik asit ve hidrojen peroksit kullanılmıştır. Dezenfektanlar farklı konsantrasyon ve sürelerde (1 ve 5 dakika) uygulanmıştır. Biyofilm morfotip duyarlılık farklılıklarını ortaya koymak için galvanizli paslanmaz çelik yüzey kullanılırken, dezenfektanların biyoması temizlemedeki etkinliklerini ortaya koymak için mikrotitre plaka tekniği kullanılmıştır. Bu suşlar tarafından oluşturulan rdar, bdar ve pdar morfotipli biyofilmlerin hidrojen peroksit hariç diğer beş dezenfektana karşı duyarlılıklarında önemli bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca etanol, klorhekzidin diglukonat ve sodyum hipoklorit diğer dezenfektanlara göre farklı morfotipteki bu biyofilmlerin % 100'ünü yok etmiştir. Etanol fikse etme özelliği olduğu için microtiter plate tekniğinde kullanılmamıştır. Kullanılan dezenfektanların dezenfeksiyon ve biyoması çıkarma özelliklerinin paralel olmadığı görülmüştür. Klorhekzidin diglukonat bütün suşların biyofilmlerini %100 yok ederken, biyoması çıkarmada aynı etkiyi gösterememiştir. Dezenfekte etme ve biyoması çıkarma özelliğini bir arada bulunduran en etkili dezenfektan sodyum hipoklorit olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak kullanılan dezenfektanın hem dezenfekte etme hem de biyoması çıkarma özelliklerini bir arada bulundurması etkili bir sanitasyon sürecine katkı sağlayacaktır.

2014, 82 sayfa

Anahtar kelimeler: *Salmonella*, biyofilm, dezenfektan, galvanizli paslanmaz çelik, mikrotitre plaka, biyofilm morfotipi

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

EFFECT OF DISINFECTANTS On *Salmonella* BIOFILMS

Veli Tato

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, the effects of disinfectants commonly used in food industry on different morphotype biofilms of *S. Typhimurium*, *S. Infantis* and *S. subsp. Roughform* are determined. Ethanol, sodium hypochloride, chlorheksidine digluconade, etilendiamintetraasetik acid, citric acid and hydrogen peroxide have been used as disinfectants. They have been applied in different concentrations and different times (1 to 5 minutes). While galvanized stainless steel surface has been used in order to show the dissimilarities of biofilm morphotype sensitivity, microtiter plate technique has been used in order to show the effectiveness of disinfectants on sanitizing biomass. It has been observed that there is no significant difference in the sensitivity of those rdar, bdar and pdar morphotyped biofilms towards these five disinfectants except hydrogen peroxide. Also, ethanol, chlorheksidine digluconade and sodium hypochloride have abolished 100 % of these different morphotyped biofilms when compared to other disinfectants. It has been observed that the disinfection qualities and abilities of those disinfectants to extract the biomass are not parallel to each other. Chlorheksidine digluconade has abolished 100 % of all the biofilms while it has not succeeded in extracting the biomass. The most effective disinfectant on sanitizing and extracting the biomass has been the sodium hypochloride. As a result, bearing both the disinfection and biomass-extracting features of a disinfectant will contribute to an effective sanitation process.

2014, 82 pages

Key Words: *Salmonella*, biofilm, disinfectant, galvanized stainless steel, microtiter plate, biofilm morphotype

TEŐEKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana emek veren, güler yüzünü ve engin bilgisini esirgemeyen sevgili danışman hocam Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü);

Hoşgörü ve bilgisiyle bana destek olan sevgili hocam Yard. Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü);

Yardıma her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan ve bana destek veren değerli arkadaşım Arş. Gör. Başar KARACA'ya (Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü);

Çalışmalarına olan katkılarının yanı sıra gösterdikleri dostluktan ötürü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı ve Biyoteknoloji Enstitüsü Çalışanlarına;

İş yerinde bana sağladığı her türlü destekten dolayı sevgili çalışma arkadaşım Erhan CENGİZ'e;

Bugünlere gelmemi sağlayan, beni her durumda destekleyen ve yanımda olan sevgili eşim ve oğluma;

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	I
ONAY	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
SİMGELER DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Biyofilmlerin Önemi	4
2.2. <i>Salmonella</i> 'da Biyofilm Oluşumu	7
2.3. <i>Salmonella</i> 'da Biyofilm Oluşumunda Rol Oynayan Moleküler Yapılar.....	9
2.3.1. <i>csgD</i>	10
2.3.2 <i>rpoS</i> ve <i>crl</i>	11
2.3.3 c-di-GMP (çevrimsel diguanilat monofosfat).....	12
2.3.4 BarA/SirA ve Csr Sistemi.....	13
2.3.5 PhoPQ–RstA.....	13
2.3.6 Rcs Sistemi	14
2.3.7 Yeter sayı algılama	14
2.4. <i>Salmonella</i> Biyofilmlerinin Bileşenleri	15
2.5. <i>Salmonella</i> Biyofilmlerinin Dirençlilik Mekanizması.....	19
2.6. Dezenfektanlar	21
3. GEREKÇE VE AMAC	24
4. MATERYAL VE YÖNTEM	26
4.1. Materyal	26
4.1.1 Bakteriler	26
4.1.2 Dezenfektanlar	26
4.1.3 Besiyerleri.....	27
4.1.4 Çözeltiler.....	28
4.2. Yöntem	29
4.2.1 Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde <i>Salmonella</i> suşlarının biyofilm morfolojilerinin belirlenmesi.....	29
4.2.2 Farklı morfolojiye biyofilm üreten <i>salmonella</i> suşlarının galvenizli paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde optimum biyofilm oluşturma sürelerinin belirlenmesi	29

4.2.3 <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlar üzerinde oluşturduğu ‘rdar’, ‘bdar’ ve ‘pdar’ morfortipindeki biyofilmleri üzerine dezenfektanların etkinliğinin belirlenmesi.....	30
4.2.4 <i>Salmonella</i> suşlarının Mikrotitre plaklarında biyofilm oluşturma özelliklerinin tanımlanması	31
4.2.5 <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaklarında oluşturduğu biyomas üzerine dezenfektanların etkisinin belirlenmesi	32
4.2.6 İstatistiksel analiz.....	33
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	34
5.1. <i>Salmonella</i> Suşlarının Biyofilm Morfortiplerinin Belirlenmesi	34
5.2. Farklı Morfortipte Biyofilm Üreten <i>Salmonella</i> Suşlarının Galvenizli Paslanmaz Çelik Yüzeyler Üzerinde Optimum Biyofilm Oluşturma Sürelerinin Belirlenmesi.....	35
5.3. <i>Salmonella</i> Suşlarının Galvanizli Paslanmaz Çelik Kuponlarda Oluşturduğu Biyofilmleri Üzerine Dezenfektanların Etkisi.....	37
5.4. Mikrotitre Plaklarında (poliestiren) <i>Salmonella</i> Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özellikleri.....	50
5.5. <i>Salmonella</i> Suşlarının Mikrotitre Plaklarında Oluşturduğu Biyofilmler Üzerine Dezenfektanların Etkisi	51
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	58
<u>KAYNAKLAR.....</u>	62
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	81
<u>EK-1</u>	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Salmonella</i> 'nın galvanizli paslanmaz çelik yüzey üzerindeki çeşitli biyofilmlerinin TEM mikrografı	6
Şekil 2.2. Calgary biyofilm sistemi içinde geliştirilen üç günlük <i>Salmonella</i> biyofilmlerinin TEM görüntüsü	6
Şekil 2.3. Gıda ile temas halinde olan yüzeylerde biyofilm oluşum aşamaları.....	8
Şekil 2.4. <i>Salmonella</i> 'da biyofilm oluşumunda görev alan kompleks genetik ağın şematikgösterimi.....	10
Şekil 2.5. <i>Salmonella</i> 'da “rdar” ve “bdar” biyofilm morfotipleri. A-C (rdar), B-D (bdar)	18
Şekil 2.6. Karışık biyofilmlerin konfokal mikroskop görüntüsü.....	21
Şekil 5.1. <i>Salmonella</i> suşları arasında tanımlanan üç farklı biyofilm morfotipi: a. Rdar morfotipi (SL1344 kodlu suş, <i>S. Typhimurium</i>) b. Rdar morfotipi (DMC4 kodlu suş, <i>S. Typhimurium</i>) c. Bdar morfotipi (DMC12 kodlu suş, <i>S. Infantis</i>) d. Pdar morfotipi (DMC13 kodlu suş, <i>S. Roughness</i>)	34
Şekil 5.2. <i>S. Typhimurium</i> (SL1344) suşunun galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliğinin zamana bağlı değişimi.....	35
Şekil 5.3. <i>S. Typhimurium</i> (DMC4) suşunun galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliğinin zamana bağlı değişimi.....	36
Şekil 5.4. <i>S. Infantis</i> (DMC12) suşunun galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliğinin zamana bağlı değişimi.....	36
Şekil 5.5. <i>S. Roughform</i> (DMC13) suşunun galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliğinin zamana bağlı değişimi.....	37
Şekil 5.6. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan sitrik asitin (CA) etkisi	39
Şekil 5.7. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan EDTA 'nın etkisi ..	40
Şekil 5.8. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan hidrojen peroksitin (H_2O_2) etkisi.....	41
Şekil 5.9. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan etanolün etkisi.....	42
Şekil 5.10. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan NaOCl'in etkisi ..	43
Şekil 5.11. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan klorheksidin diğlukatın etkisi.....	44
Şekil 5.12. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan sitrik asitin (CA) etkisi	45
Şekil 5.13. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan EDTA 'nın etkisi .	46
Şekil 5.14. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan hidrojen peroksitin (H_2O_2) etkisi	47
Şekil 5.15. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan etanolün etkisi ...	48
Şekil 5.16. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan sodyum hipokloritin (NaOCl) etkisi.....	49

Şekil 5.17. <i>Salmonella</i> suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan klorhekzidin diglukonatın (KHDGL) etkisi.....	50
Şekil 5.18. <i>Salmonella</i> suşlarının optimum koşullarda ürettikleri biyofilm biyomasları....	51
Şekil 5.19. <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaka (poliestiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan sitrik asitin (CA) etkisi ...	52
Şekil 5.20. <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaka (poliestiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan sitrik asitin (CA) etkisi ..	52
Şekil 5.21. <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaka (poliestiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan EDTA'nın etkisi	53
Şekil 5.22. <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaka (poliestiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan EDTA'nın etkisi	53
Şekil 5.23. <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaka (poliestiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan hidrojen peroksit'in (H ₂ O ₂) etkisi.....	54
Şekil 5.24. <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaka (poliestiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan hidrojen peroksit'in (H ₂ O ₂) etkisi.....	55
Şekil 5.25. <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaka (poliestiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan sodyum hipokloritin (NaOCl) etkisi.....	55
Şekil 5.26. <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaka (poliestiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan sodyum hipokloritin (NaOCl) etkisi.....	56
Şekil 5.27. <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaka (poliestiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan klorhekzidin diglukonat'ın (KHDGL) etkisi	56
Şekil 5.28. <i>Salmonella</i> suşlarının mikrotitre plaka (poliestiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan klorhekzidin diglukonat'ın (KHDGL) etkisi	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan <i>Salmonella</i> suşları.....	26
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan dezenfektanların stok konsantrasyonları	27
Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan dezenfektanların konsantrasyonları	38

SİMGELER DİZİNİ

AHL	N-asetilhomoserin lakton
AI-2	Autoinducer-2
AI-3	Autoinducer-3
ATM	Adezyon test besiyeri
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
Aw	Su aktivitesi
bdar	Kahverengi, kuru ve pürüzlü
CV	Kristal viyole
CR	Kongo kırmızısı
cm	Santimetre
CA	Sitrik asit
°C	Celcius
dH ₂ O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Gram
HBV	Hepatit B virüsü
HIV	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KHDGL	Klorhekzidin diglukonat
LPS	Lipopolisakkarit
LB	Luria Bertani
MHB	Mueller-Hinton Broth
mRNA	Mesajcı RNA
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
NaOCL	Sodyum hipoklorit
NaOH	Sodyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
OD	Optik yoğunluk
PVC	Polivinil klorür
pdar	Pembe, kuru ve pürüzlü
rdar	Kırmızı, kuru ve pürüzlü
RNA	Ribonükleikasit
rpm	Dakikadaki rotar
SF	Serum fizyolojik
saw	Düz ve beyaz
SBAM	Düz, kahverengi ve mukoid
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu
UV	Ultra viyole
QS	Quorum sensing

1. GİRİŞ

Salmonella, adını bulucusu olan Dr. Daniel Salmon'dan alan Gram-negatif, çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob, *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir cinstir. *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere iki tür içermektedir. *S. Enterica* türü ise; *S. enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonaei*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica* olarak adlandırılan altı alt türe ayrılmıştır (Brenner vd. 2000). Bu alt türün üyelerinin çoğunun insanlar için patojenik nitelikte olduğu ve genellikle sıcak kanlı (poikilotermik) hayvanların bağırsak sisteminde bulunduğu bilinmektedir (Popoff vd. 2005, Threlfall vd. 2005).

Salmonella cinsi, konakçı dışındaki çeşitli çevrelerde üreyebilen bakteri türlerini içermektedir. Bu cinsin üyeleri üremeleri için sodyum klorüre ihtiyaç duymazlar. Fakat % 0.4 ile % 4 oranında sodyum klorür varlığında üreyebilirler. Birçok *Salmonella* serotipi 5-47 °C arasındaki sıcaklıklarda üreme yeteneğindedir. İdeal üreme sıcaklıkları 35-37 °C arasındadır; ancak bazı üyeler 2-4 °C gibi düşük sıcaklıklarda ve 54 °C gibi yüksek sıcaklıklarda üreyebilmektedir (Gray ve Fedorka-Cray 2002). *Salmonella*, pH 4 ila pH 9 gibi geniş bir pH aralığında üreyebilir. Üremeleri için optimum pH değerleri 6,5 ile 7,5 arasındadır. Ayrıca çok düşük su aktivitesinde yaşamlarını sürdürebilme yeteneğindedirler.

S. Typhimurium, *S. Enteritidis*, *S. Typhi* ve *S. Paratyphi* A, B, C'nin insanlarda *Salmonella* enfeksiyonlarına neden olan serotiplerin % 99'unu oluşturduğu saptanmıştır (Suzuki 1994, Stock ve Wiedemann 2000, Angelillo vd. 2000). İnsan salmonellozu iki klinik özellikle tanımlanmaktadır. Birincisi, *S. Typhi* ve *S. Paratyphi* A, B, C'nin neden olduğu enterik ateştir. Bu enfeksiyonlar, genellikle hayvan rezervuarlarına gereksinim duymaksızın insandan insana bulaşabilmektedir. İkincisi, hayvanlarda bulunan diğer serotiplerin yol açtığı ve tifoya neden olmayan salmonellozdur (van Duijkeren ve Houwers 2000). Hindistan, Kuzey-doğu Asya, Kuzey ve Orta Amerika ve Afrika'da *S. Wien*, *S. Typhimurium*, *S. Johannesburg* ve *S. Oranienburg*, İngiltere, Avrupa ve Amerika'da ise *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow* ve *S. Hadar* salgına sebep olan önemli serotipler olarak belirlenmiştir. Özellikle *S. Virchow* ve *S. Enteritidis* tavuk ve tavuk ürünlerinden, *S. Hadar* hindi, *S. Typhimurium* ise sığır, domuz, tavuk ve koyunlardan izole edilmektedir (Escartin vd. 2000, Threlfall 2002).

S. Typhi tifoid ateşe neden olurken, *S. Paratyphi A, B ve C* paratifoid ateşe neden olur. Paratifoidin mortalitesi, tifoid ateşe nispeten daha azdır. Her iki serotipde insan patojenidir. Enfeksiyon, genellikle insan atıkları ile kontamine olmuş gıda ve suların tüketilmesiyle meydana gelir. Son yıllarda özellikle Güneydoğu Asya, Hindistan, Pakistan ve Orta Doğu gibi pek çok bölgeden antibiyotik dirençli suşlar yaygın bir şekilde izole edilmektedir (Scherer ve Miller 2001).

Tifoid olmayan salmonelloza ya da gastroenterite 150 çeşit *Salmonella* serotipinin neden olabileceği bilinmektedir. ABD 'de en yaygın serotiplerin başında *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* gelmektedir. Enfeksiyon, genellikle insan atıkları yerine hayvan atıkları ile kontamine olmuş gıda ve suların tüketilmesiyle meydana gelmektedir. Örneğin, diğer gıda kaynaklı salmonelloza kıyasla iki kat daha fazla hastaneye yatışla sonuçlanan ve çoklu ilaç direnci gösteren *S. Typhimurium* DT104'nın ortaya çıkmasının, kontamine sığır eti ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Gray ve Fedorka-Cray 2002, Yousef ve Carlstrom 2003).

Salmonella'nın gıda ve gıda işleme yüzeylerine tutunabilme özelliği gösteren patojen bir mikroorganizma olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Mafu vd. 1991, Korber vd. 1997, Wong 1998). Gıda işlemede kullanılan makineler, boru hatları, işleme yüzeyleri ve tanklar patojen mikroorganizmaların tutunabilmesi için oldukça riskli yüzeylerdir. Gıda işleme yüzeylerindeki mikrobiyal kolonizasyonun gıda bozulmaları ve gıda ilişkili hastalıkların yayılmasında etkin bir rol oynadığı saptanmıştır (Bower vd. 1996).

Salmonella, abiyotik ve biyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneği sayesinde uzun süre canlılığını muhafaza edebilmektedir. Biyofilmler, gen ifadesine, büyüme hızına ve çevresel şartlara bağlı olarak farklı fenotipler içeren ve mikroorganizmaların kendi ürettiği hücre dışı polimerik bileşenlerin (EPS) içine gömülü olan hücrelerin oluşturduğu yapılar olarak tanımlanmıştır (Donlan ve Costerton 2002).

Salmonella gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan paslanmaz çelik ve polistiren gibi abiyotik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturabilmektedir (Asséré vd. 2008, Kim ve Wei 2009, Møretrø vd. 2009, Chorianopoulos vd. 2010, Iibuchi vd. 2010). *Salmonella*'nın abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneği bu bakterinin konakçı dışındaki çevrelerde hayatta kalmasına ve yeni konakçılara geçişine imkan tanımaktadır. Bu durum

özellikle gıda endüstrisi başta olmak üzere birçok alanda ürün kayıplarına ve sağlık sorunlarına yol açmaktadır.

Patojen mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmler bakteriyi dış stres faktörlerine karşı önemli derecede korumaktadır (Wong vd. 2010). Bu mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmleri yok etmek için pek çok yöntem kullanılmaktadır. Biyofilmlerle mücadele kullanılan bu yöntemlerden biride dezenfektan kullanımıdır. Dezenfektanlar, patojen mikroorganizmaları kontrol altına almak için uzun zamandan beri kullanılan kimyasal ajanlardır (McDonnell ve Russell 1999).

Salmonella ve biyofilmlerine ilişkin söz konusu verilerin ışığında tasarlanan bu tez kapsamında; *Salmonella* suşlarının oluşturduğu biyofilm yapılarının tanımlanması, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bazı dezenfektanların çeşitli abiyotik yüzeylerde *Salmonella* biyofilmlerinin eradikasyonundaki etkinliklerinin tanımlanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Biyofilmlerin Önemi

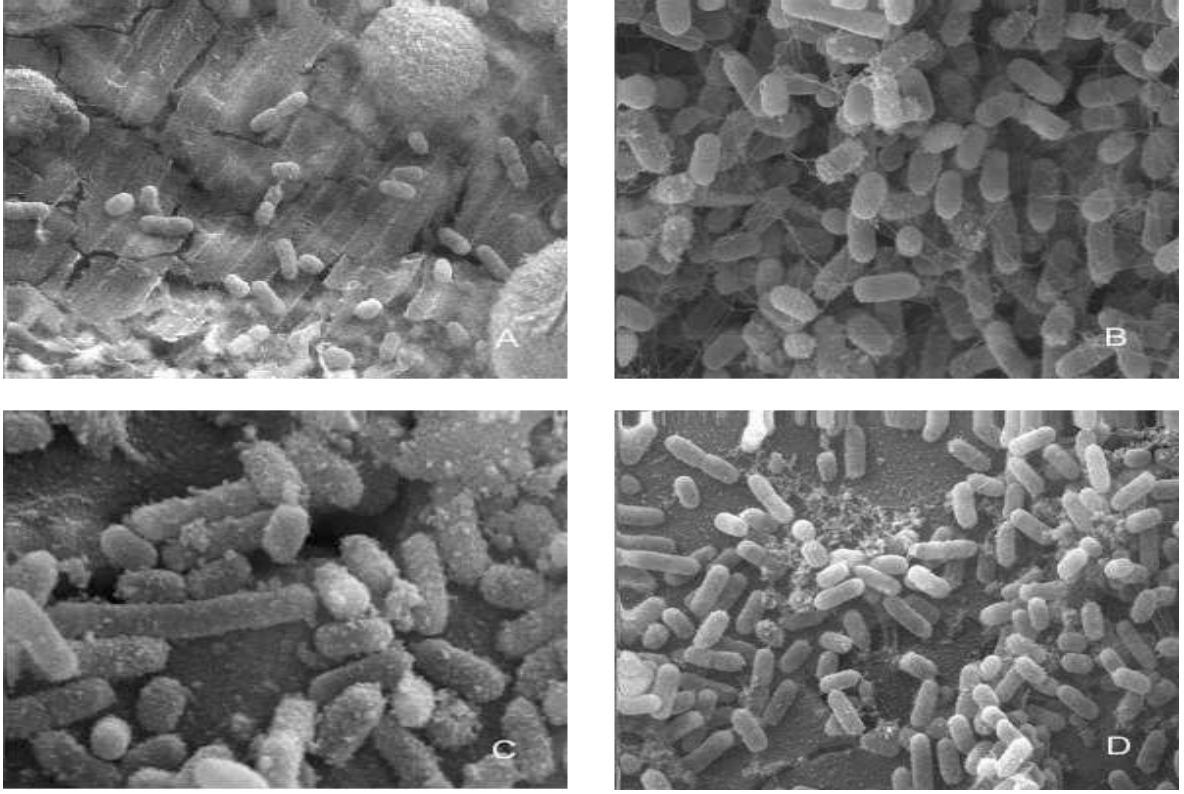
Mikrobiyoloji tarihinin önemli bir bölümünde mikroorganizmaların gelişim fizyolojisi; enerji, karbon kaynağı ve büyüme faktörleri bakımından zengin besiyerleri kullanılmak suretiyle, planktonik olarak tanımlanmıştır. Sıvı ortamda geliştirilen bakterilerin gösterdikleri özellikleri ile ilgili bu geleneksel görüş, patojenik mikroorganizmalarla çalışmak ve mikrobiyal fizyolojinin bazı şaşırtıcı yönlerine ışık tutması bakımından önemlidir. Ancak planktonik olarak geliştirilen saf kültürler mikroorganizmaların doğada var olması gereken şeklini çok nadir olarak yansıtmaktadır. Zira mikroorganizmaların doğal ortamlarında yapılan doğrudan gözlemler, mikroorganizmaların planktonik halden ziyade bir yüzeye tutunmuş ve biyofilm içine gömülü olan mikrobiyal topluluktan oluştuğunu göstermektedir (Costerton vd. 1995, Kolter ve Greenberg 2006, Verstraeten vd. 2008). Bu teori üzerindeki veriler, mikroorganizmaların % 99.9'dan çoğunun yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturarak ürediğini ve çoğunun sucul ortamlardan geldiğini doğrulamaktadır (James vd. 1995, Wuertz vd. 2004, Moons vd. 2009).

Bakterilerin doğal ortamlarının çok karmaşık ve dinamik olduğu bilinmektedir. Ancak bu karmaşıklık, laboratuvar şartları altında tek bir bakterinin kültürü oluşturulduğu zaman taklit edilemez. Bakteriler doğal ortamlarında çoğu kez birbirlerine yakın olan farklı türlerle birlikte bulunmaktadır (Wimpenny vd. 2000). Türler arasındaki metabolik ve uzaysal etkileşimler, çok türlü biyofilmlerin organizasyonuna ve değişken yapıları ortamların oluşmasına katkı sağlamaktadır (Tolker-Nielsen ve Molin 2000, Goller ve Romeo 2008). Hücreler arası iletişimin ve türler arası bu etkileşimin, hücrelerin antimikrobiyallere karşı direnç göstermesi yanında hücrelerin tutunması ve biyofilmden hücrelerin ayrılmasında da önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Burmølle vd. 2006, Irie ve Parsek 2008, Nadell vd. 2008, Annous vd. 2009, Remis vd. 2010). Ayrıca farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, karışık türlerin oluşturdukları biyofilmlerin tek türün oluşturduğu biyofilmlere göre daha stabil ve antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençli olduğu saptanmıştır (Jones ve Bradshaw 1997, Prouty vd. 2002, Girenavar vd. 2008, Soni vd. 2008, Chorianopoulos vd. 2010).

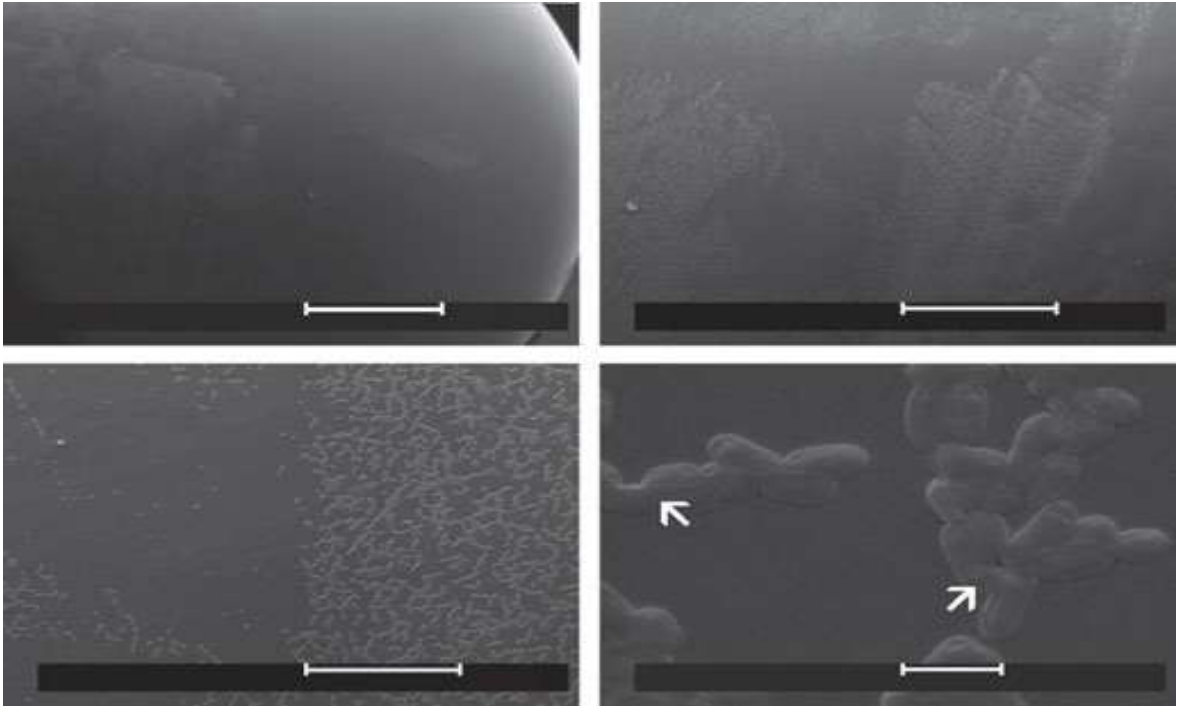
Bakterinin, biyofilmin anahtar bileşenlerinden biri olan hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) oluşan matriksin içine yerleşmesinin, bakteriye hem koruyucu hem de homeostasis açısından bir çok avantaj sağladığı bilinmektedir (Flemming ve Wingender 2010). Örneğin; biyofilmlerdeki hücrelerin, onların planktonik formlarına nispeten antimikrobiyal ajanlara karşı daha çok dirençli olduğu saptanmıştır (Mah ve O'Toole 2001, Gilbert vd. 2002). Biyofilm matriksinin doğası ve biyofilm içindeki mikroorganizmalarının fizyolojik özellikleri, antimikrobiyal ajanlar (antibiyotiklere, dezenfektanlara ve germisitlere) yanında fagositlere karşı da yüksek bir direnç göstererek, bakterinin canlı konakta kalıcılık özelliğini artırmaktadır (Cos vd. 2010).

Biyofilmlerin doğal sucul ortamlardan başka birçok çevrede (canlı dokular, medikal aletler ve endüstriyel sistemler) oluşabildiği saptanmıştır (Hall-Stoodley vd. 2004, Ramesh vd. 2002) (Şekil 2.1). Örneğin; *Salmonella* bakterisinin kauçuk (Arnold ve Yates 2009), plastik (Wong vd. 2009) (Şekil 2.2), çimento (Joseph vd. 2001), cam (Prouty ve Gunn 2003), galvanizli paslanmaz çelik (Ramesh vd. 2002) ve paslanmaz çelik (Giaouris ve Nychas 2006, Moretro vd. 2009) gibi yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturabildiği belirlenmiştir. Ayrıca günlük yaşamda da birçok yerde (dış yüzeyleri, çiçek vazoları ve su boru hatları vb.) bakterinin bu yaşam şekline rastlanılmaktadır (Marsh 2005, Wimpenny 2009). Bu yüzeyler üzerinde oluşan biyofilmler, patojen mikroorganizmaları antimikrobiyallere karşı koruyarak halk sağlığı ve ekonomik açıdan ciddi sorunlara yol açmaktadır.

Biyofilmler birçok tıbbi malzeme (yapay kalça, kontak lens, katater vb.) üzerinde de oluşabilir. Buna bağlı enfeksiyonlar çoğu durumda ancak bu malzemelerin ortadan kaldırılması ile önlenabilmektedir. Bundan ötürü hasta travması ve tedavi maliyeti artmaktadır. Örneğin; hastane enfeksiyonlarının % 65'inden biyofilmlerin sorumlu olduğu ve biyofilm temelli enfeksiyonların tedavisinde yıllık bir milyar dolar harcandığı tahmin edilmektedir (Costerton vd. 1995, Potera 1999). Ayrıca yakın zamanlarda yapılan çalışmalar da biyofilme bağlı enfeksiyonların oranının % 80' e çıktığı saptanmıştır (Davies 2003, Hall-Stoodley ve Stoodley 2009). Akciğerlerde kistik fibrozis hastalığına, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilmlerin neden olması biyofilme bağlı enfeksiyonlara örnek olarak verilebilir. Biyofilmlerin içine gömülü olan bakterilerin neden olduğu bu kronik enfeksiyon çoğu kez tedavi edilemez ve enfeksiyon kistik fibrozis hastalarının ölümü ile sonuçlanır (Bjarnsholt vd. 2009, Hassett vd. 2010).



Şekil 2.1 *Salmonella*'nın galvanizli paslanmaz çelik yüzey üzerindeki çeşitli biyofilmlerinin TEM mikrografi (Ramesh vd. 2002)



Şekil 2.2 Calgary biyofilm sistemi içinde geliştirilen üç günlük *Salmonella* biyofilmlerinin TEM görüntüsü (Wong vd. 2009)

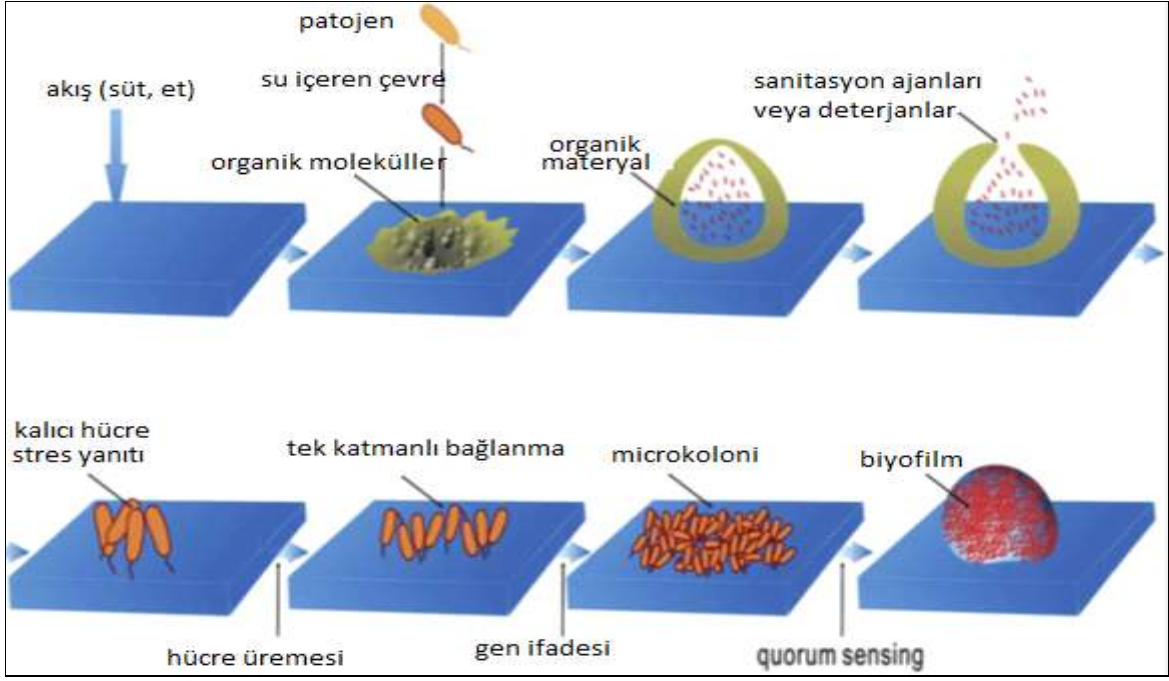
Uygun olmayan temizleme koşulları ve suyun varlığı patojenik mikrororganizmaların da

bulunduğu biyofilmlerin gelişmesine katkı sağlamaktadır. Kontamine yüzeylerden gıdalar geçtiğinde ya da kontamine ekipmanlardan oluşan aerosol nedeniyle biyofilm yapısından ayrılan parçalar çarpaz kontaminasyonlara neden olmaktadır. Şu anda gerçek gıda işleme ortamlarında *Salmonella*'nın varlığı ile ilgili sınırlı bilgiler bulunmaktadır. Bununla birlikte laboratuvar şartlarında, *Salmonella*'nın çeşitli gıda temaslı yüzeylere kolayca tutunabildiğini ve kolayca biyofilm oluşturduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır (Oliveira vd. 2006, Giaouris ve Nychas 2006, Chia vd. 2009, Rodrigues vd. 2011). Yapılan çalışmalarda, gıda endüstrisinde oluşan biyofilmlerin, gıda bozulması nedeniyle ekonomik kayıplara ve ciddi hijyenik problemlere yol açan inatçı kontaminasyonlara neden olabileceği gösterilmiştir (Zottola ve Sasahara 1994, Ganesh Kumar ve Anand 1998, Lindsay ve von Holy 2006, Brooks ve Flint 2008).

Özetle biyofilmler gıda sanayisinde ve konakçı infeksiyonu sırasında karşılaşılan stres koşullarında bakterilerin hayatta kalmasını önemli oranda artırmaktadır. Gıda temas yüzeylerinin zayıf sanitasyonunun özellikle *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* bakterilerinin neden olduğu gıda kaynaklı hastalıkların yayılmasında önemli bir faktör olduğu saptanmıştır. Gıda işleme ortamlarında oluşan biyofilmler, gıda bozulmalarına ve hastalıkların yayılmasına neden olan mikrobiyal kontaminasyon için kalıcı kaynak oluşturmaktadır (Zottola ve Sasahara 1994, Brooks ve Flint 2008). Biyofilm esaslı kontaminasyonlar bu nedenle tüm dünyada büyük bir dikkatle izlenmekte ve etkin önlemler alınmaya çalışılmaktadır (Shi ve Zhu 2009).

2.2 *Salmonella*'da Biyofilm Oluşumu

Bakterilerin biyofilm yapılarına yöneliminde dört önemli nedenin bulunduğu inanılmaktadır. Bunlar: 1. zararlı ortamlardan korunma, 2. ortaklaşmanın faydalarından yararlanma, 3. zengin besin alanlarına ulaşma, 4. yeni genetik özellikler kazanma olarak tanımlanmaktadır (Davey ve O'Toole 2000, Molin ve Tolker-Nielsen 2003). Biyofilm oluşum sürecinin bakterilerin bir yüzey üzerindeki planktonik formlarını değişime zorlayan hücre dışı sinyalleri algıladığı zaman başladığı bilinmektedir. Bu hücre dışı sinyaller, bakterilerin belirli aşamalardan (tutunma, çoğalma ve olgunlaşma) geçerek olgun biyofilm oluşturmasına neden olur (Shia ve Zhua 2009) (Şekil 2.3) .



Şekil 2.3 Gıda ile temas halinde olan yüzeylerde biyofilm oluşum aşamaları (Shi ve Zhu 2009)

Biyofilm oluşumunda ilk aşama tutunmadır. Bakteriyeel tutunmanın; bakterinin gelişme ortamı, hareket, hücrelerin gelişim fazı, pH, sıcaklık, tutunulan yüzeyin özellikleri ve tipi, organik maddelerin varlığı, temas zamanı, hücre dışı polimerik madde üretimi ve hücreler arası iletişimden etkilendiği saptanmıştır (Chandy ve Angles 2001, Chmielewski ve Frank 2003, Shi ve Zhu 2009, Simões vd. 2010). Bakteri hücre zarfı ile katı yüzeyler arasındaki ilk etkileşimler kimyasal ve fiziksel etkileşimlerdir. Bu ilk etkileşimler bakteri ve tutunulan yüzeyin fiziksel ve kimyasal özelliklerinden etkilenmektedir. Bunun yanında bakteri ve yüzey arasındaki ilk etkileşimde biyofilm hücrelerinde, planktonik hücrelerden farklı olarak pek çok genin regüle edildiği belirlenmiştir (Donlan 2002, Sauer 2003). Örneğin; *S. Typhimurium*'un planktonik hücreler ile karşılaştırıldığında, biyofilm şartları altında genomunun % 10' nun (433gen) farklı şekilde ifade edildiği saptanmıştır (Hamilton vd. 2009). Diğer yandan *Salmonella*'nın hidrofobitesi yüksek olan yüzeylere daha etkin bir şekilde tutunduğu ve yüzeyin hidrofobitesi azaldıkça dezenfektanların biyofilm üzerine olan etkinliğinin arttığı belirlenmiştir (Sinde ve Carballo 2000).

Biyofilm oluşumunda ikinci aşama mikrokoloni oluşumudur. Bakteri gelişme yüzeyine tutunduktan sonra, gelişme şartları uygunsa mikrokoloni oluşumu başlar. Mikrokoloni oluşumuna matriks üretimi eşlik eder. Matriksin tutunma ve bazı çevresel uyarılara (osmotik basınç, pH, sıcaklık vb.) yanıt olarak oluştuğu bilinmektedir. Doğal sistemler

içindeki bakteriler ile yapılan çalışmalar; toplanmada, hücreler arası iletişim ve çevrede bulunan planktonik hücrelerin de rol oynadığını göstermiştir (Chmielewski ve Frank 2003). Asil Homoserin Lakton (AHL) ve diğer yeter sayı algılama moleküllerinin *P. aeruginosa*'nın tipik biyofilm yapısının oluşmasını regüle ettiği saptanmıştır (Pesci vd. 1999). Ayrıca tutunma ve mikrokoloni oluşumunda görev alan genetik faktörlerin mikroorganizmaya göre farklılık gösterdiği uzun zamandan beri bilinmektedir (Heilmann 1996).

Biyofilm gelişim süreçlerinde en son aşama olgun biyofilm yapılarının oluşumudur. Bu süreç biyofilm olgunlaşması olarak adlandırılmaktadır. Olgun biyofilmelerin tek tabakalı veya EPS ile birlikte tutulan yakın paketlenmiş mikrokoloniler halinde olabileceği belirlenmiştir (Chmielewski ve Frank 2003). Olgunlaşmada yeter sayı algılama ve buna bağlı genetik ifade önemli bir rol oynamaktadır (Shi ve Zhu 2009).

2.3 *Salmonella*'da Biyofilm Oluşumunda Rol Oynayan Moleküler Elemanlar

Salmonella biyofilmlerinin yapısal bileşenleri karmaşık bir genetik ağ tarafından düzenlenmektedir (Steenackers vd. 2012) (Şekil 2.4). Biyofilm oluşumunda görev alan genetik faktörlerin mikroorganizmaya bağlı olarak değişiklik gösterebileceği saptanmıştır (Heilmann 1996).

morfortipin oluşumunda) ve bu adhezif yapının özgül ve kısa aralıklı olarak hücre hücre etkileşimi sağladığı saptanmıştır (Römling vd. 2000).

Biyokimyasal kanıtlar; selüloz biyosentezinin *csgD*'ye bağımlı olmasının yanında, *csgD*'den bağımsız olabileceğine de işaret etmektedir. Hastalıkla ilişkili olan bir *S. Enteritidis* suşunun *csgD*'den ayrı olarak selüloz ürettiği belirlenmiştir (Römling vd. 2003). *Salmonella*'da biyofilm bileşeni olarak önemli bir rol sergileyen selüloz, bakteriyel selüloz sentez operonu olan *bcsABZC* ve selüloz biyosentezinin aktivatörü olan *adrA* operonunun ifadeleriyle düzenlenir. CsgD, selüloz biyosentezini dolaylı bir şekilde *adrA* aracılığıyla yapar. c-di-GMP'nin üretimini uyarılması *adrA* tarafından gerçekleştirilir ve c-di-GMP *bcsB* alt ünitesine bağlanıp, selüloz üretimini başlatır. Selüloz kompleksi *bcsA* ve *bcsB* tarafından oluşturulurken, *bcsZ* selüloz vazifesi görür (Solano vd. 2002, Romling 2005).

O-Ag-kapsülünün, *csgD* tarafından düzenlenen bir diğer matriks bileşeni olduğu bilinmektedir (White vd. 2003, Gibson vd. 2006). *csgD* geninde meydana gelen bir mutasyonun, biyofilm oluşumunu engellediği ve agar üzerinde "saw" (pürüzsüz ve beyaz) morfortipli koloni oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Römling vd. 2000). Steenackers vd. (2012) tarafından *csgD* geninin ifadesinin farklı çevresel uyaranlar (sıcaklık, osmolarite, oksijen yoğunluğu, besin ve pH), farklı transkripsiyonel regülatörler (OmpR, CrI, RpoS, MlrA, CpxR, H-NS ve IHF) ve ikincil mesajcı c-di-GMP tarafından uyarıldığı tespit edilmiştir. Bu kompleks düzenleme, genetik ağda iyi bir uyuma ve çevresel değişikliklere karşı çabuk ve daha iyi bir yanıtın oluşmasına olanak vermektedir. *csgD*'nin transkripsiyonun düşük sıcaklık, düşük osmolarite, geç eksponensiyel ve erken statik gelişim şartları altında maksimum olduğu, bunun yanında mikroaerofilik ve aerobik şartların sırasıyla zengin ve minimal ortam içinde bu maksimal ifadeyi indüklediği belirlenmiştir (Gerstel ve Römling 2001). Özetle *csgD* geni, majör biyofilm bileşenlerinin ifadesini düzenleyen önemli bir biyofilm regülatörüdür.

2.3.2 *rpoS* ve *crI*

rpoS ve *crI* *Salmonella*'da biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde rol oynayan diğer iki önemli düzenleyicidir. *rpoS* geni tarafından kodlanan sigma faktörünün (σ S) genel stres

yanıtı ve gelişimin durma fazında hayatta kalmada önemli rol oynayan genlerin transkripsiyonunu düzenlediği tespit edilmiştir (Hengge-Aronis 2002). Hamilton vd. (2009) *S. Typhimurium* tarafından kauçuk yüzeyler üzerinde oluşturulan biyofilm içindeki hücrelerde *rpoS* regülununun daha çok ifade edildiği saptanmıştır. Bununla uyumlu olarak *rpoS*'nin transkripsiyonunun *csgD* mutantlara göre doğal tiplerde üç kat daha çok ifade edildiği gösterilmiştir (White vd. 2010). Rdar koloni gelişimi sırasında *rpoS*'nin ifadesinin 3 ile 7 gün arasında maksimum olduğu ve 47 gün sonra bile *rpoS*'nin ifadesinin devam ettiği tespit edilmiştir (White vd. 2006). *S. Typhimurium rpoS* mutantların agar üzerinde oluşturduğu biyofilmin morfolojinin değiştiği ve bazı yüzeylere (cam, poliestiren ve yonca) tutunmanın bozulduğu, model sistemler kullanılarak kanıtlanmıştır (Römling vd. 2003, Prouty ve Gunn 2003, Barak vd. 2005, Hamilton vd. 2009). Aşamalı olarak biyofilm oluşumuna neden olan düzenleyiciler içindeki *rpoS*'nin rolünü gösteren bir diğer çalışmada, hastalıkla ilişkili olan *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis rpoS* mutantlarının, sırasıyla “saw” ve “bdar” (kahverengi, kuru ve pürüzlü) morfoloji bir biyofilm sergilediği gösterilmiştir (Römling vd. 2003). “Rdar” morfolojinin düzenlenmesinde rol oynayan *csgD*'nin transkripsiyonunun *rpoS*'nin ifadesinin maksimum olduğu durumlarda en yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir (Gerstel ve Römling 2001, Römling vd. 1998, White vd. 2006). Bir *rpoS* mutantın bir *csgD* mutantta göre *csgBAC* ve *adrA* ifadesi üzerine daha yüksek bir etkiye sahip olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır (Robbe-Saule vd. 2006). Ek olarak *rpoS*'nin *mrlA*'nın ifadesini olumlu yönde etkilediği ve biyofilm oluşumu ile ilgili olan hareket genlerinin aktivasyonuna katıldığı da belirlenmiştir (Brown vd. 2001, Adams vd. 2001).

S. Typhimurium ATCC14028 suşuyla yapılan deneyde *crl* proteininin “rdar” oluşumu için gerekli olduğu saptanmıştır (Robbe-Saule vd. 2006). Steenackers vd. (2012) tarafından yürütülen çalışmalarda; *crl*'nin fonksiyonunu, *rpoS* ile beraber yerine getirdiği ve *csgB*, *bcsA*, *csgD* ve *adrA*'nın maksimum ifadesi için bu genin gerekli olduğu belirlenmiştir.

2.3.3 c-di-GMP (çevrimsel diguanilat monofosfat)

Farklı araştırmacılar c-di-GMP'nin, hareket, virülanslık, çok hücreli davranışlarda ikincil mesajcı ve selülöz üretiminde allosterik kontrol faktörü olarak görev gördüğünü saptamıştır (Ross vd. 1987, Lamprokostopoulou vd. 2010). Ayrıca bu bileşiğin hücre dışı

sinyallere yanıt olarak üretildiği de bilinmektedir (Hengge 2009). Genellikle çok yüksek c-di-GMP seviyesinin hareket ve virülans özellikleri baskıladığı ve hücre dışı matriks üretimini uyararak sesil yaşım formunu kolaylaştırdığı belirlenmiştir (Simm vd. 2004, Jenal ve Malone 2006, Kader vd. 2006, Römling ve Amikam 2006, Hengge 2009, Lamprokostopoulou vd. 2010). Yapılan bir diğer çalışma c-di-GMP'nin AdrA'ya bağlı olarak selülöz biyosentezinde görev alan *bcs* genleri ve dolayısıyla biyofilm oluşumu üzerine olumlu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Simm vd. 2004). Yüksek c-di-GMP konsantrasyonlarının ise CsgD ve CsgA transkripsiyonel ve post transkripsiyonel ifadesini yükselterek kıvrımlı fimbriya biyosentezini arttırdığı saptanmıştır (Kader vd. 2006, Simm vd. 2007). AdrA'nın hücrel olarak yüksek seviyede c-di-GMP üretilmesi üzerine büyük bir etkisi olmasına rağmen, *csgD* aktivasyonuna küçük ölçüde katkısı olduğu tespit edilmiştir (Kader 2006).

2.3.4 BarA/SirA ve Csr Sistemi

BarA/SirA iki bileşenli sistemin *Salmonella*'da hareket, virülens ve biyofilm oluşumuna katılan global bir düzenleyici sistem olduğu saptanmıştır (Ahmer vd. 1998, Teplitski vd. 2003, Teplitski vd. 2006, Jonas vd. 2010). Teplitski vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada *flhDC* mutantlarının biyofilm üretim kapasitelerinin arttığı, ancak *csrB*, *csrC*, *sirA* ve *fimI* mutantlarının plastik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturamadığı örneklenmiştir. Ayrıca bu araştırmacılar SirA ve Csr sisteminin flagella ve tip I fimbriya yapısal genlerin ifadesi üzerine düzenleyici bir rolünün olduğunu belirlemiştir. Flagella ve tip I fimbriya üretimi, biyofilm oluşumunun düzenlenmesine sırasıyla negatif ve pozitif yönde katkıda bulunmaktadır.

2.3.5 PhoPQ–RstA

PhoPQ sistemi, iç mebrana yerleşmiş sensor kinaz (PhoQ) ve stoplazmik yanıt regülatöründen (PhoP) oluşan iki bileşenli bir sistemdir (Kato ve Groisman 2008). PhoP'nin LPS modifikasyonu, magnezyum transferi, epitel hücrelerine invazyon ve makrofajlar içinde hayatta kalmada görev olan birden çok genin ifadesini kontrol ettiği saptanmıştır (Kato ve Groisman 2008, Charles vd. 2009). Steenackers ve ark. (2012) *phoP*'nin aktif olmadığı mutantların, doğal tiplere göre cam lameller üzerinde bozulmuş

bir biyofilm yapısı oluşturduğunu tanımlamıştır. Adams ve ark. (2001) PhoP'nin aktivasyonunun flagellin protein seviyelerinde ve üçüncü sınıf hareket genlerinin (fliC) transkripsiyonunda bir azalmaya neden olduğunu tespit etmiştir. Bu veriler PhoPQ sisteminin *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumunu baskıladığına işaret etmektedir.

Rst, RstA/RstB iki bileşenli sistemden oluşan bir yanıt regülatörüdür. Choi vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, PhoP'nin RpoS'nin parçalanmasını uyaran bir protein olan RstA'yı aktive ettiği belirlenmiştir. İleri düzeyde analizler, RstA'nın *bapA*'nın ifadesinde etkilediğini ve *E. Coli* içinde RstA'nın yüksek düzeyde salgılanmasının, *csqD*'nin ifadesini azalttığını göstermiştir (Cabeza vd. 2007, OgaOgasawara vd. 2007). Ayrıca RstA'nın çok fazla miktarda ifade edilmesinin, poliestiren yüzeyler üzerindeki biyofilm oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir (Cabeza vd. 2007).

2.3.6 Rcs Sistemi

Fosfor değişiminde görev alan Rcs sistemi; sensör kinaz RcsC, fosfor transferine aracılık yapan RcsD, transkripsiyonel düzenleyici RcsB ve transkripsiyonel ko-regülatör RcsA sisteminden oluşmaktadır (Clarke 2010). Bu sistemin yüksek ozmolarite, hücre zarı stresi ve bazı proteinlerin yüksek düzeyde salgılanması aracılığıyla aktive edildiği saptanmıştır (Mariscotti ve Garcia-del Portillo 2009). Rcs sisteminin aktivasyonunun kolonik asit ve kapsül üretimi için gerekli olan genlerin ekspresyonunu aktive ederken, flagellar sentez ve virülens genlerini baskıladığı belirlenmiştir (Majdalani ve Gottesman 2005, Wang 2007). Bu bulgular Rcs sisteminin biyofilm içindeki sesil yaşamı desteklediğine işaret etmektedir.

2.3.7 Yeter sayı algılama

Yeter sayı algılama ya da hücreler arası haberleşme, bakterilerin kendi populasyon yoğunluğuna duyarlı olmasını ve yanıt vermesini sağlayan bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Waters ve Bassler 2005). Bakterilerin patojenite, hareket, sporulasyon, biyolümines ışık ve antimikrobiyal ürünlerin üretimi gibi çeşitli fizyolojik olayları düzenlemek için yeter sayı algılama iletişim sistemini kullandığı bilinmektedir (Miller ve Bassler 2001). Steenackers ve ark. (2012) açıl-homoserin lakton (AHL), otoindükleyici 2 (AI-2), otoindükleyici 3(AI-3) olmak üzere, üç adet yeter sayı algılama sistemi bileşeni tanımlamıştır.

Salmonella'nın diğerk bakterit türleri tarafından üretilen AHL'ye cevap vermek için LuxR ailesinin bir transkripsiyon faktörü olan SidA'yı ürettiğı saptanmıştır (Dyszal vd. 2010, Smith vd. 2011). *Salmonella* biyofilmleri ile SidA arasında direk bir bağlantı belirlenememesine rağmen, SidA'nın aktive ettiğı genlerin fonksiyonları aracılığıyla, bu genin biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğru ileri sürülmüştür (Ahmer vd. 1998, Smith ve Ahmer 2003). Örneğın; SidA tarafından aktive edilen *Rck*'nin *Salmonella*'nın epitel hücrelerine ve ekstraselüler matriks proteinlerine tutunmasını arttırdığı saptanmıştır (Heffernan vd. 1992, Crago ve Koronakis 1999).

Salmonella yeter sayı algılama sisteminin ikinci elemanı olan AI-2'nin sentezi için LuxS enzimini kullanmaktadır (Surette 1999, De Keersmaecker vd. 2006). Lsr ve Rbs transport sistemlerinin AI-2'nin algılanması ve içeri alınmasında görev yaptığı tespit edilmiştir (Jesudhasan vd. 2010). Yapılan bazı çalışmalarda, LuxS'de meydana gelen mutasyonların safra taşı üzerinde az ve dağınık biyofilm oluşumuna, polisitiren yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumunun bozulmasına ayrıca hareket ve biyofilm oluşumunda görev alan genlerin ifadesinin azalmasına neden olduğu saptanmıştır (Prouty vd. 2002, Jesudhasan vd. 2010). Son çalışmalarda *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumunun ve biyofilm fenotiplerinin, LuxS'ın kendisi yerine bir sRNA molekülü olan MicA'ya bağlı olduğu fikri öne sürülmüştür (Steenackers ve ark. (2012).

Salmonella'nın üçüncü yeter sayı algılama elemanı, iki bileşenli PreA/B sisteminden meydana gelmektedir (Merighi vd. 2006, Bearson ve Bearson 2008, Moreira vd. 2010). PmrCAB, PmrA ve PhoP'nin düzenlediğı genler (*yibD*, *udg*, *cptA* , *pagP* ve *preA*'nın çevresindeki lokal bölgedeki genler) PreA/B'nin hedefleri olarak tanımlanmışlardır (Merighi vd. 2006, Merighi vd. 2009). PreA/B mutantlarında hareketin önemli ölçüde azalmasından dolayı, bu sistemin harekette de önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Bearson ve Bearson 2008, Bearson ve Bearson 2010). Bu mutantlarda ayrıca biyofilm üretiminde de önemli düzeyde azalmaların tespit edilmesi, söz konusu sistemin biyofilm oluşumunda etkin olduğuna işaret etmiştir (Bearson ve Bearson 2008).

2.4 *Salmonella* Biyofilmlerinin Bileşenleri

Salmonella biyofilmlerinin hücre dışı matriksi, kullanılan besiyeri ve bakterinin bulunduğu

ortama göre çeşitlilik gösterir. Biyofilm matriksi protein parçacıkları, ekzopolisakkarit ve yağ asitlerinden meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalar; biyofilm içindeki protein parçacıklarının kıvrımlı fimbriya, BapA ve SiiE proteinlerinden, matriksinin ise selülöz, kolonik asit, O-antijenik kapsül (O-Ag-kapsülü), kapsüler polisakkarit ve lipopolisakkaritten meydana geldiğini göstermiştir (Römling 1998, Zogaj 2001, Latasa vd. 2005, de Rezende vd. 2005, Gibson vd. 2006, Anriany 2006).

Kıvrımlı fimbriyanın (*csgBAC-csgDEFG* tarafından kodlanmaktadır); oldukça toplu, kollara ayrılmayan, hareket, invazyon, kolonizasyon ve kalıcılıkta önemli olan hücre yüzeyi proteini olduğu bilinmektedir (Barnhart ve Chapman 2006). Kıvrımlı fimbriyanın hücre ile yüzey arasındaki ilk etkileşimde ve sonradan da hücreler arası etkileşimde önemli olduğu, ayrıca CsgA ve CsgB alt ünitelerinin beta zincirlerinin hidrofobik boyalar ile bağlanması sonucu tipik ‘rdar’ morfoloji biyofilmlerin tanımlanmasına katkıda bulunduğu saptanmıştır (Collinson vd. 1996, Römling vd. 1998, White vd. 2003, Gibson vd. 2006). Kıvrımlı fimbriyanın epitel hücrelerine tutunma ve biyofilm oluşturmada, merkezi metabolizmada, hücre canlılıkta, antibiyotik dirençliliği ve kolonik asit biosentezinde önemli rolü olduğunu gösteren bir çok çalışma yapılmıştır (Boddicker vd. 2002, Reisner vd. 2003, Ledebøer vd. 2006). Biyofilm oluşumu için fimbriyanın önemi kullanılan test ortamı ile büyük ölçüde bağlantılıdır. Bazı fimbriyal operonlardaki (*fim*, *csg*, *lpf* ve *pef*) mutasyonların safra taşı üzerindeki biyofilm oluşumunu etkilemediği saptanmıştır (Prouty vd. 2002).

S. Enteritidis'de, büyüklüğü 386 kDa olan prolin ve threonine zengin BapA proteininin biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Cucarella vd. 2001, Latasa vd. 2005). Bu protein ‘rdar’ morfoloji biyofilmlerin ikinci önemli bileşenidir. BapA bakteriyel kolonizasyonda ve sıvı-hava arafazında pelikül oluşumunda etkin bir rol oynamaktadır (Latasa vd. 2005). Ayrıca BapA ve SiiE proteinlerinin, *Salmonella* bakterisinin invazyonunda da önemli rol oynadığı saptanmıştır (Latasa vd. 2005, Morgan vd. 2004).

Flagella bakteriyel hareketin ana unsurudur. Ancak biyofilm oluşumu sırasında farklı görevler üstlenmektedir. Flagella bakteriyel kolonizasyonda etkin iken biyofilm oluşumunu baskılamaktadır (Verstraeten vd. 2008). Solano ve ark. (2002) *S. Enteritidis*'in flagellasız mutantlarında biyofilm oluşumunun indüklendiğini saptamıştır. Diğer çalışmalarda ise flagellanın farklı yüzeylerde biyofilm üretimi üzerinde farklı etkilerinin

bulunduğu tespit edilmiştir (Römling ve Rohde 1999, Kim ve Wei 2009).

Selülöz, biyofilm yapısında bulunan bir β -1-4-D-glukoz polimeri olan ve *bcsABZC–bcsEFG* genleri tarafından kodlanan önemli bir ekzopolisakkarittir. Klasik ‘‘rdar’’ morfoloji oluşmasında önemli olan selülözün hücreler arası etkileşimi desteklediği saptanmıştır (Römling vd. 2000, Solano vd. 2002). Ayrıca selülözün *S. Typhimurium*’un epitel hücreleri üzerinde biyofilm oluşturmada kritik bir role sahip olduğu da belirlenmiştir (Solano vd. 2002, Ledeböer vd. 2006).

Kolonik asit, bir kapsül ekstraselüler polisakkarittir. Kolonik asit üretemeyen mutantlarla (*wcaM*, *wcaA* ve *wza*) yapılan deneylerde; tavuk bağırsak epitelinde biyofilm olgunlaşmasında görülen eksiklik ve Hep-2 hücreleri yüzeyinde görülen ince biyofilm yapısı, kolonik asitin geniş üç boyutlu biyofilm yapısının oluşmasında önemli olduğunu kanıtlamıştır (Ledeböer ve Jones 2005, Ledeböer vd. 2006). Benzer şekilde kolonik asitin *E.coli* bakterisinde kompleks üç boyutlu biyofilm yapısının oluşumunda önemli olduğu da belirlenmiştir (Danese vd. 2000).

Anyonik O antijeni kapsülü, EPS’yi oluşturan bir başka bileşendir (Gibson vd. 2006). Bu kapsülün 2300’den fazla tekrar eden tetrasakkarit birimlerinden meydana geldiği ve lipid çıkıntı ile membrana bağlı olduğu saptanmıştır (Snyder vd. 2006). Söz konusu yapının kurumaya karşı tolerans sağladığı, çok hücreli davranışta ve agar üzerinde biyofilm oluşturmada önemli olmadığı ancak çevresel kalıcılıkta kritik rol oynadığı belirlenmiştir (Gibson vd. 2006).

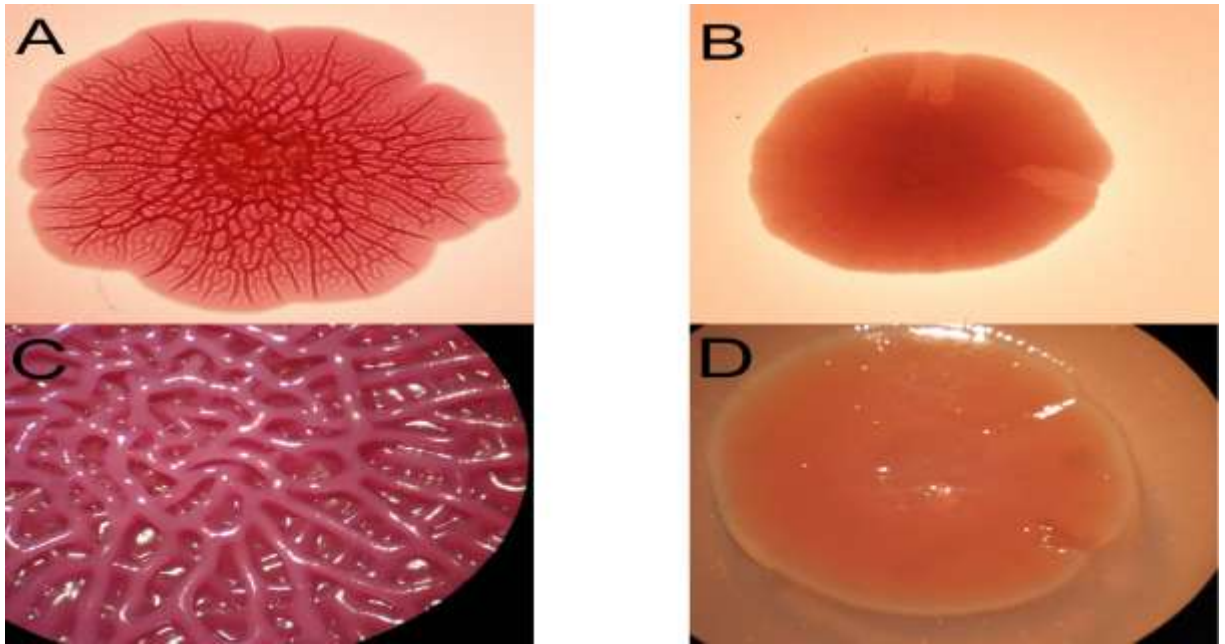
Yağ asitleri ve lipopolisakkaritler biyofilmlerin diğer önemli bileşenleridir. Yağ asitlerinin farklılığı (doymuş yada doymamış yağ asitleri gibi) *S. Enteritidis* suşlarının ‘‘rdar’’ morfoloji biyofilmlerin ifadesinde kritik bir önem taşımaktadır (Gibson vd. 2006). Mireles ve ark. (2001) *S. Typhimurium* LT2 LPS mutantlarının doğal tiplerle aynı miktarda biyofilm oluşturduğunu, fakat cam yüzeye tutunamadıklarını saptamıştır. Kim ve Wei (2009) dağınık bir LPS profili gösteren *rfaA* mutantlarında; ‘‘rdar’’ ifadesinin, pelikül oluşumunun, et ve gıda suyu içindeki PVC üzerinde biyofilm oluşturma kapasitesinin, paslanmaz çelik ve cam üzerinde biyofilm üretiminin bozulduğunu belirlemiştir.

Salmonella biyofilmleri, matriks bileşenleri temel alınarak ‘‘rdar’’ (kırmızı, kuru ve

pürüzlü), “bdar” (kahverengi, kuru ve pürüzlü) ve “pdar” (pembe, kuru ve pürüzlü) olmak üzere üç farklı gruba ayrılmıştır. Biyofilm oluşturmeyen fenotip ise, “saw” (düz ve beyaz) olarak tanımlanmaktadır (Römling 1998, Römling 2003).

Kıvrımlı fimbriya ve selülöz, Kongo kırmızısı içeren ortamda birlikte ifade edildiği zaman “rdar” (kırmızı, kuru ve pürüzlü) morfotipli biyofilmler üretilmektedir (Şekil 2.5.) (Römling 2005). Vestby vd. (2009) tarafından yürütülen bir çalışmada, farklı orjinli (gıda, insan ve referans koleksiyonu) serotiplerin (*S. Agona*, *S. Montevideo*, *S. Senftenberg* ve *S. Typhimurium*) % 74’ünün “rdar” morfotipli biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Bu veriler “rdar” morfotipin diğer morfotiplere göre daha baskın olduğunu göstermektedir. White vd. (2006) “rdar” morfotipli biyofilmlerin, *Salmonella*’yı kurumaya ve sodyum hipoklorite karşı dirençli hale getirdiğini ve *Salmonella*’nın konakçılar arasında yayılmasında önemli rol oynadığını belirlemiştir.

Kongo kırmızılı ortamda sadece kıvrımlı fimbriya ifade edildiği zaman “bdar” morfotipli biyofilmlerin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 2.5.b) (Römling 1998, Römling 2003). “Bdar” morfotipli biyofilmlerin dezenfektanlara karşı “rdar” morfotiple aynı direnci gösterdiği belirlenirken, “rdar” morfotipli biyofilmlerin kuruma ve besin eksikliği stresine karşı daha uzun yaşadığı saptanmıştır (Vestby vd. 2009). Kıvrımlı fimbriyanın ayrıca çevresel kalıcılıktada önemli bir rol oynadığı da gösterilmiştir (White 2006).



Şekil 2.5 *Salmonella*’da “rdar” ve “bdar” biyofilm morfotipleri. A-C (rdar), B-D (bdar) (Vestby vd. 2009)

Kongo kırmızılı ortamda sadece selülöz ifade edildiği zaman ise, ‘’pdar’’ morfotipli biyofilmler üretilmektedir (Römling 1998, Römling 2003). Selülözün bir çok canlı türünde farklı amaçlar için üretildiği bilinmektedir. Örneğin; bitkiler hücre duvarının bir bileşeni olarak selülözü üretirken, bakteriler kimyasal ve mekanik koruma sağlamak amacıyla bu bileşiği üretmektedir (Matthysse vd. 1981).

2.5 *Salmonella* Biyofilmlerinin Dirençlilik Mekanizması

Biyofilm içine gömülü olan hücrelerin, serbest haldeki formlarından farklı bir fenotiple ifade edildiği ve biyositlere karşı yüksek düzeyde dirençlilik özelliği gösterdikleri tanımlanmıştır (Nett vd. 2008, Smith ve Hunter 2008, Wong vd. 2010). Tabak vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada; biyofilm içerisindeki hücrelerin, planktonik hücrelerin ve biyofilmden ayrılan hücrelerin antimikrobiyallere karşı farklı duyarlılık gösterdiği saptanmıştır. Biyofilm içerisindeki hücreler dezenfektanlara karşı yüksek bir dirençlilik gösterirken, söz konusu hücrelerin, planktonik hale dönüştüğünde bu özelliği kaybettikleri belirlenmiştir (Russell 1999).

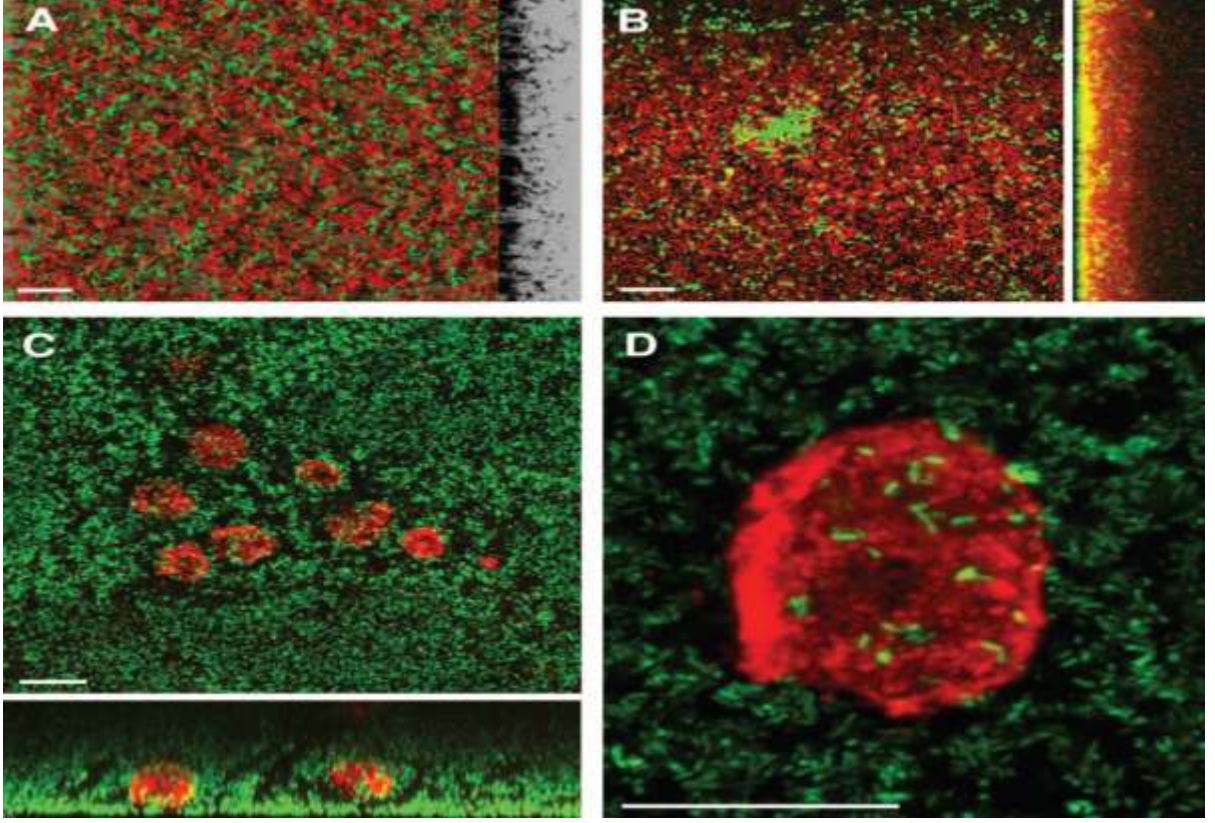
Biyofilm matriksi, antimikrobiyallerin biyofilm içindeki bakterilere nüfusunu engelleyerek bir bariyer görevi görmektedir. Biyositler genellikle yüksek derecede reaktif kimyasal moleküller olduğundan, ortamda var olan organik maddeler (nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinler) bu moleküllerin difüzyonunu engellemektedir (Lambert ve Johnston 2001). Biyofilm bileşenlerinin soğurma ve reaksiyona girme özellikleri antimikrobiyallerin biyofilm içindeki bakterilere nüfus etmesini önleyen ana unsurdur. *Klebsiella pneumoniae* ve *P. aeruginosa* karışık biyofilmleri üzerine klor uygulandığı zaman başlangıçtaki sıvının sadece % 20’sinin biyofilme nüfuz ettiği saptanmıştır (De Beer vd. 1994). Suci ve ark. (1994) kullandıkları bazı antibiyotiklerin steril yüzeyde difüzyonunun kolonize yüzeye göre daha çok olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca biyofilmlerin kalınlığına (tek ya da çok tabakalı oluşuna) göre, uygulanan biyositlerin hücrelere penetrasyon etkinliği değişmektedir (Cochran vd. 2000, Stewart vd. 2000, Stewart vd. 2001).

Dezenfeksiyon işlemi sırasında bir biyositin düşük miktarda kullanılması bu biyositin biyofilmin derin bölgelerine nüfuz etmesini kısıtlayabilir. Biyofilmlerin bu nedenle dezenfektanların öldürücü miktarlarına karşı direnç geliştirebildiği gösterilmiştir (Mechin

vd. 1999). Bakteri hücre kültüründe besin azalmaya başladığı zaman bakteri üremesi yavaşlar. Yavaş üremenin de antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (Tuomanen vd. 1986, Thien-Fah ve George 2001).

Biyofilmler lateral gen transferi aracılığıyla bir takım özelliklerini değiştirerek antimikrobiyallere karşı direnç geliştirebilmektedir (Kelly vd. 2009, Hannan vd. 2010). Zira biyofilm ortamları genetik aktarım için ideal ortamlardır (Ando vd. 2009, Nguyen vd. 2010). Driffield vd. (2008) *P. Aeruginosa* biyofilmlerinde mutasyon oranının, planktonik hücrelere göre 15 kat daha fazla olduğunu belirlemiştir. Yapılan bir diğer çalışma, biyofilmlerde farklı varyantların oluşmasının dirençli popülasyonların ortaya çıkmasına katkıda bulunduğunu kanıtlamıştır (Boles vd. 2004). Ayrıca oksidatif stresin biyofilm içindeki bakterileri mutasyona teşvik ederek biyositlere karşı dirençli fenotiplerin oluşmasına neden olduğu saptanmıştır (Boles ve Singh 2008).

Laboratuvarlarda tek türlü biyofilmler ile çalışılmasına rağmen, doğada bakteri biyofilmlerinin karışık halde olduğunu gösteren pek çok kanıt vardır (Şekil 2.6.) (Simoes vd. 2008, Burmolle vd. 2010). Bir deniz alginden izole edilen dört suşun biyofilm içindeki sinerjik etkileşimlerinden dolayı daha fazla biyomas oluşturdukları ve tek türden oluşan biyofilmlere oranla hidrojen peroksit daha fazla direnç gösterdikleri saptanmıştır (Burmolle vd. 2006). Farklı türler tarafından üretilen enzimler toksik bileşiklere karşı sinerjik bir etki sağlayabilir. Bu yüzden enzim üretmeyen türlere enzim tamamlama vasıtasıyla katkıda bulunmaktadır (Shu vd. 2003). Biyofilm içindeki bazı belirli türlerin mekansal düzenlenmesi ve onların üç boyutlu yapısının diğer türler için biyositlere karşı direnç sağladığı da saptanmıştır (Leriche vd. 2003).



Şekil 2.6. Karışık biyofilmlerin konfokal mikroskop görüntüsü (Bridier vd. 2011)

2.6 Dezenfektanlar

Dezenfektanlar, cansız nesnelere üzerinde bulunan patojenik mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan kimyasal ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Antibiyotikler hücrelerin metabolik süreçlerini ve kimyasal yapısını etkileyerek enfeksiyonları kontrol altına alan içilebilir spesifik ilaçlar iken, dezenfektanlar ilaç özelliği içermeyen ve etkinlik gösteren ajanlardır (Meyer ve Cookson 2010). Dezenfektanların etki biçimi, içerdiği biyositeye bağlıdır. Biyositler mikroorganizmaların üremelerini durduran (-statik) ya da onları öldüren (-sidal) ajanlardır (McDonnell ve Russell 1999). Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde dezenfektanların hedef yapıları, hücre duvarı, dış membran, stoplazmik membran, fonksiyonel ve yapısal proteinler, DNA, RNA ve diğer stoplazmik bileşenler olarak belirlenmiştir (Bridier 2011).

Bir çok alkolün antimikrobiyal aktivitesi olduğu bilinmektedir. Etil alkol, izopropil alkol ve n-propanol çok yaygın bir şekilde dezenfektan olarak kullanılmaktadır (Morton 1983). Alkoller vejetatif bakteriler, mikobakteriler, virüsler ve mantarlar dahil olmak üzere geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite gösterirler. Alkollerin sporları yok etmediği fakat spor

oluşumunu engellediği ve bu etkinin geri dönüşümlü olduğu tespit edilmiştir (Trujillo ve Laible 1970, Yasuda-Yasuki vd. 1978). Alkoller sporosidal etkilerinin olmamasından dolayı sterilizasyon için pek tercih edilmemektedir. Fakat sert yüzeylerin dezenfeksiyonunda ve deri antiseptisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Düşük konsantrasyonları koruyucu ya da bir başka biyositin etkisini artırmak için kullanılmaktadır. Genellikle izopropil alkol bakterilere karşı etki gösterirken, etil alkolün virüslere karşı etkili olduğu saptanmıştır (Klein ve Deforest 1983). Alkollerin antimikrobiyal aktivitelerinin % 50 konsantrasyonun altında düşükken, % 60 ve % 90'da optimum olduğu bildirilmiştir (McDonnell ve Russell 1999). Alkollerin membran ve proteinlerin denatürasyonu ile birlikte metabolizmayı durdurarak etki gösterdiği bilinmektedir (Morton 1983, Larson ve Morton 1991).

Klorheksidin diglukonat; koruyucu, dezenfektan ve antiseptik ürünlerde (el ve ağız yıkama ürünlerinde) yaygın olarak kullanılmaktadır. Klorheksidin diglukonat genellikle geniş spektrumlu etkisi ve irritasyonunun az olması nedeniyle tercih edilmektedir. Bazı spesifik ürünler için irritasyon etkisi tanımlanmıştır (Gardner ve Gray 1991, Rosenberg 1976). Klorheksidin'in etkisinin pH'a bağlı olduğu ve organik madde varlığında önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Russell ve Day 1993). Ayrıca klorheksidin diglukonat konsantrasyonu da antimikrobiyal etkinlikte kritik bir önem taşımaktadır (Hugo ve Longworth 1964, Hugo ve Longworth 1966). Bu biyositin düşük konsantrasyonu stoplazma membranının bütünlüğünü etkilerken, yüksek konsantrasyonunun stoplazmanın pıhtılaşması, protein ve nükleik asit yapısının bozulmasına neden olduğu saptanmıştır (Ranganathan 1996). Bunun yanında klor heksidin'in yüksek konsantrasyonu intraselüler bileşiklerde ve dolayısı ile sitoplazmada koagülasyona neden olmaktadır (Hugo ve Longworth 1966). Bu ajanın yarı geçirgen zara zarar vererek bakteri içine geçtiği ve bakterinin ölümüne neden olduğu belirlenmiştir (Russell ve Hugo 1988).

Hidrojen peroksit dezenfeksiyon, asepsi ve sterilizasyon için çok yaygın kullanılan bir biyosittir. Renksiz olan bu biyositin ticari olarak % 3'den % 90'na kadar konsantrasyonları mevcuttur. Zararsız ürünler olarak kabul edilen bu ürün, su ve oksijene hızlı şekilde parçalandığı için çevre dostu olarak kabul edilmektedir. Saf solüsyonları ne kadar kararlı olsa da çoğu çözeltileri stabilizatör içermektedir. Genellikle Gram pozitif bakterilere daha yüksek etki göstermektedir. Zira Gram negatif bakterilerde bulunan katalaz ve diğer peroksidazlar, bu organizmaların hidrojen peroksitin düşük konsantrasyonuna olan

toleransını artırmaktadır (McDonnell ve Russell 1999). Hidrojen peroksit geniş spektrumlu (örn: virüs, bakteri, maya ve bakteri sporları) etki göstermektedir (Block 1991). Bakteri sporları üzerine etki etmeleri için yüksek konsantrasyonun (% 10 ve % 30) ve uzun bir temas uygulaması gerekmektedir (Russell 1991). Hücresel bileşenlere saldırı için gerekli olan serbest hidroksil radikallerinin oluşmasını sağlayarak bir oksidan olarak görev görmesinin yanısıra, sülfhidril ve çift bağları da hedef olarak kullanabilmektedir (Block 1991).

Klor bazlı bileşikler, antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılan en önemli ajanlardır (Kemp 1998). Klor konsantrasyonu artıkça, bu bileşiklerin organik maddeler tarafından inaktivasyonunun düştüğü ve su içinde hipoklorik asit (HOCl) ile denge kuran Na^+ ve OCl^- iyonlarına ayrıştığı bilinmektedir (Bloomfield 1996). Ayrıca bu halojenlerin DNA (DNA sentezinin inhibisyonu ya da DNA zinciri kırıkları) üzerine etkisinin yanında oksitleyici (tiyol gruplarının oksidasyonu) özelliklerinin olduğu da saptanmıştır (McDonnell ve Russell 1999). Klor salan ajanlar yüksek derecede oksitleme özelliğine sahip olduğu için proteinlerin hücresel işlevlerinin bozulmasına yol açarlar. İyonize olmamış hipokloritlerin dış mebrana penetrasyonda bir artış olmasına rağmen, düşük pH'da bu ajanın oksitleme özelliği en yüksek düzeye ulaşır (McDonnell ve Russell 1999).

Asitik dezenfektanların (EDTA ve CA) nükleik asitlerin bağlarını yıkararak ve proteinleri presipite ederek etki gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca ortamın pH'ını değiştirerek ortamı mikroorganizmalar için uygun olmayan hale getirmektedirler (Gorman ve Scott 2004, Levinson ve Jawetz 2004).

3. GEREKÇE ve AMAÇ

Bu araştırmada temel amaç; etanol (C₂H₅OH), klorhekzidin diġlukonat (KHDGL), sodyum hipoklorit (NaOCl), sitrik asit (CA), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) gibi ticari dezenfektanların *Salmonella* biyofilmleri üzerindeki etkinliğinin saptanmasıdır.

Salmonella, başta gıda endüstrisi olmak üzere birçok endüstriyel üretim sürecinde kullanılan cam, plastik, kauçuk ve elik yüzeylere tutunma ve biyofilm oluşturma yeteneğindedir. Bu yüzeylerde tutunma ve mikrobiyal kolonizasyon gerçekleştikten sonra salgılanan hücre dışı polimerik madde (EPS), kolonileri çevrelemekte ve biyofilm yapıları oluşturulmaktadır (Moons vd. 2009). Tek hücreli, bağımsız üreme formlarından çok, içerdikleri su kanalları ve fonksiyonel farklılaşma gösteren hücreler nedeniyle çok hücreli üreme formlarına benzeyen biyofilm yapıları, doğada neredeyse her koşulda oluşabilmektedir (Prouty vd. 2002, Chorianoopoulos vd. 2010). Endüstriyel üretim süreçlerinde biyofilm kontaminasyonları sıklıkla taşıyıcı boru sistemlerinde, gıdaların temas ettiği yüzeylerde ve zeminlerde gerçekleşmektedir (Brooks ve Flint 2008, Cos vd. 2010).

Olgun biyofilm yapılarında özellikle hücre dışı polimerik maddenin yoğun bir şekilde salgılanması, biyofilmi meydana getiren bakterileri stres koşullarına, dezenfektanlara ya da diğer sanitasyon ajanlarına karşı yüksek düzeyde dirençli hale getirmektedir. Dolayısı ile endüstride kullanılan rutin temizleme ve sanitasyon işlemleri biyofilm yapılarının eliminasyonunda yeterli olmamaktadır. Bu nedenlerle *Salmonella* biyofilmleri tüm dünyada gıda bozulmalarının ve gıda kökenli hastalıkların temel kaynağını oluşurmaktadır (Shi ve Zhu 2009, Pui vd. 2011).

Yukarıda özetlenen literatür verileri, *Salmonella* biyofilm yapılarının neden olduğu endüstriyel kontaminasyonların önlenmesinin ekonomik açıdan olduğu kadar tıbbi açıdan da büyük bir önem taşıdığına işaret etmektedir. Bu temel gerekçe doğrultusunda tasarlanan Yüksek Lisans tez çalışmasında; Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarının oluşturduğu biyofilmlerin yapısal tanısı gerçekleştirildikten sonra, dezenfeksiyon ajanlarının bu yapılar üzerindeki etkin konsantrasyonları belirlenerek, biyofilm yapılarının endüstriyel süreçlerde

yarattığı sorunların çözümüne katkı sağlanması hedeflenmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Materyal

4.1.1 Bakteriler

Çalışmada kullanılan Türkiye gıda kaynaklı *Salmonella* suşları, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edildi. Çalışmada serotiplendirmesi ve biyofilm morfoloji tanımlanmış SL1344, DMC4, DMC12 ve DMC13 kodlu suşlar kullanıldı (Çizelge 4.1.). *Salmonella* suşları LB broth ortamında 37 °C'de 18 saat süreyle geliştirildi ve % 60 gliserol içeren LB broth besiyeri ile 1:1 (hacim/hacim) oranında karıştırılarak 1,5mL'lik steril mikrofij tüplerinde -20 °C'de saklandı.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan *Salmonella* suşları

Suş Kodu	Serovaryete
SL1344	<i>S. Typhimurium</i>
DMC 4	<i>S. Typhimurium</i>
DMC 12	<i>S. Infantis</i>
DMC 13	<i>S. Roughform</i>

4.1.2 Dezenfektanlar

Bu çalışmada, dezenfektan olarak etanol (C₂H₅OH), klorhekzidin diglukonat (KHDGL), sodyum hipoklorit (NaOCl), sitrik asit (CA), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) kullanılmıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan dezenfektanların stok konsantrasyonu

	<u>Alkol</u>	<u>Klor salan ajan</u>	<u>Peroksijen</u>	<u>Biguanid</u>	<u>Asitler</u>	
Dezenfektanlar	C ₂ H ₅ OH	NaOCl	H ₂ O ₂	KHDGL	EDTA	CA
Etiket konsantrasyonu	% 100	% 10	% 35	% 20	% 99	% 99

4.1.3 Besiyerleri

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck, Germany)

İçerik	g/L
Tripton	10 g
Maya ekstraktı	5 g
Sodyum klorid	10 g
Agar	15 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanır. Broth besiyeri cam tüplere dağıtıldıktan, katı besiyeri ise agar ilavesinden sonra, otoklavda (121 °C / 15 dakika) sterilize edilir. Katı besiyerleri 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra petrilere dökülür.

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (NaCl'siz)

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

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanır. Broth besiyeri cam tüplere dağıtıldıktan, katı besiyeri ise agar ilavesinden sonra, otoklavda (121 °C / 15 dakika) sterilize edilir. Katı besiyerleri 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra petrilere dökülür.

Kongo Kırmızısı İçeren (40 µg/mL) Luria Bertani (LB) Agar (NaCl'siz)

İçerik	g/L
Trypton (Fluka,France)	10 g
Maya ekstraktı (Merck, Germany)	5 g
Kongo kırmızısı (Sigma-Aldrich, USA)	0,0 4 g
Agar (Merck,Germany)	15 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Sterilizasyondan 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 steril edilir. Katı besiyerleri 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra petrilere dökülür.

4.1.4 Çözeltiler

SF (Serum Fizyolojik)	g/L
NaCl	8,5 g
dH2O	1000 MI

Sterilizasyon işlemi 121 °C'de 15 dakika süre ile yapılır.

Glasiyel asetik asit (% 33)	100 mL
Metanol (% 95)	100 mL

Evrensel nötralizan çözeltisi	g/L
Saponin	20 g
Tween-80	10 g
MHB	1000 mL

Sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanır. Şişeye koyulduktan sonra otoklavda (121 °C / 15 dakika) sterilize edilir.

Surfaktan çözeltisi	g/L
L-histidin	50 g
L-sistin	50 g
Azaltılmış-glutasyon	100 g
dH2O	1000 ml

Sterilizasyon için 0.20 µm por çaplı filtreden geçirildi.

4.2 Yöntem

4.2.1 Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde *Salmonella* suşlarının biyofilm morfoloğlarının belirlenmesi

SI1344 kodlu *Salmonella* suşu -20 °C stoğundan alınarak 5'er mL'lik LB broth besiyerlerine % 1 inokülasyon oranıyla aktarıldı ve bir gece (18 saat) çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra aktif kültürden % 1 oranında alınan inokulum 5 mL'lik NaCl'siz LB broth ortamına (LB wo/NaCl; baktotripton 10 g/L, maya özütü 5 g/L) aktarıldı ve suş 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (Römling vd. 1998). İnkübasyondan sonra daha önceden hazırlanmış, biyofilm matriksinin bileşenleri için indikatör özellik gösteren Kongo kırmızısını (40 µg/mL) içeren NaCl'siz LB agar besiyerine aktif kültürden damlatıldı (5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50µL). Petri daha sonra 20 °C'de en az 8 gün süreyle inkübasyona bırakıldı. Petri kapları stereo mikroskopunda (Leica, Germany) görsel olarak incelendi. Çalışma 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Morfotip; biyofilmin matriksinde kıvrımlı fimbriya ve selüloz varsa rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü), yalnızca kıvrımlı fimbriya varsa bdar (kahverengi, kuru ve pürüzlü) ve selüloz varsa pdar (pembe, kuru ve pürüzlü) olmak üzere kategorize edildi (Vestby vd. 2009).

4.2.2 Farklı morfortipte biyofilm üreten *salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde optimum biyofilm oluşturma sürelerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan galvanizli paslanmaz çelik kuponlar (2,5cm - 0,8cm - 0,1cm) (Ostim, Ankara) başlangıçta bir gece % 70 lik etanol içerisinde bekletildi. % 70 lik etanolde bir gece bekletilen kuponlar daha sonra 30 dakika süresince deterjanlı suya daldırıldı ve bu

süreç içerisinde kupon yüzeyleri ajite edilerek yıkandı. Deterjanlı sudan çıkartılan kuponlar, musluk suyundan geçirildikten sonra üç kez distile suyla yıkayıp, kurumaya bırakıldı. En son aşamada içinde 3.5ml LBwo/NaCl bulunan tüplere dikey olarak konulan kuponlar otoklavda (121 °C / 15 dakika) sterilize edildi.. S11344, DMC4, DMC12 ve DMC13 kodlu *salmonella* suşları –20 °C stoğundan alınarak 5'er mL'lik LB broth besiyerlerine % 1 inokülasyon oranıyla aktarıldı ve bir gece (18 saat) çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra aktif kültürlerden % 1 oranında alınan inokülumlar 5'er mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarına (LB wo/NaCl; baktotripton 10 g/L, maya özütü 5 g/L) aktarıldı ve suşlar 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (Römling vd. 1998). İnkübasyondan sonra geliştirilen aktif kültürler LBwo/NaCl ile 0.2 OD düzeyine kadar seyreltildi (Shimadzu spektrofotometer, Japan). Hesaplamalar yapılarak içinde 3.5ml LBwo/NaCl ile kuponlar bulunan steril tüplere içinde en son hücre sayısı 1×10^7 cfu/ml olacak şekilde aktif kültürden aktarıldı ve 1, 3, 5 ve 7 gün için 20 °C'de statik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Her inkübasyondan sonra kuponlar aseptik koşullarda alınarak steril distile su ile yıkandı ve planktonik haldeki hücreler uzaklaştırıldı. Yıkama işleminden sonra kuponlar, içinde 4.5 ml serum fizyolojik ve 6 adet cam bilye (r : 3 mm) bulunan tüplere aktarıldı. Tüp içerikleri en yüksek devirde 45 saniye karıştırıldı (IKA Genius Vortex 3, Germany). Bakteri hücrelerini saymak için test tüplerinden seri dilüsyonlar yapıldı. Dilüsyonlardan 100'er µL alınarak LB agar bulunduran petrilere yayma ekim yapıldı. Bu ortamlar 18 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Son aşamada uygun sayıda koloni bulunduran plaklar seçilip sayımlar gerçekleştirildi (Giaouris vd. 2005).

4.2.3 *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlar üzerinde oluşturduğu rdar, bdar ve pdar morfolojisindeki biyofilmleri üzerine dezenfektanların etkinliğinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan galvanizli paslanmaz çelik kuponlar (2,5cm - 0,8cm - 0,1cm) (Ostim, Ankara) başlangıçta bir gece % 70 lik etanol içerisinde bekletildi. % 70 lik etanolde bir gece bekletilen kuponlar daha sonra 30 dakika süresince deterjanlı suya daldırıldı ve bu süreç içerisinde kupon yüzeyleri ajite edilerek yıkandı. Deterjanlı sudan çıkartılan kuponlar, musluk suyundan geçirildikten sonra üç kez distile suyla yıkayıp, kurumaya bırakıldı. En son aşamada İçinde 3.5ml LBwo/NaCl bulunan tüplere dikey olarak konulan kuponlar otoklavda (121 °C / 15 dakika) sterilize edildi. S11344, DMC4, DMC12 ve DMC13 kodlu *Salmonella* suşları –20 °C stoğundan alınarak 5'er mL'lik LB broth

besiyerlerine % 1 inokülasyon oranıyla aktarıldı ve bir gece (18 saat) çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra aktif kültürlerden % 1 oranında alınan inokülumlar 5'er mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarına (LB wo/NaCl; baktotripton 10 g/L, maya özütü 5 g/L) aktarıldı ve suşlar 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (Römling vd. 1998). İnkübasyondan sonra geliştirilen aktif kültürler LBwo/NaCl ile 0.2 OD düzeyine kadar seyreltildi (Shimadzu spektrophotometer, Japan). Hesaplamalar yapılarak içinde 3.5ml LBwo/NaCl ile kuponlar bulunan steril tüplere içinde en son hücre 1×10^7 cfu/ml olacak şekilde inokülasyon yapıldı. Tüm suşlar için, 20 °C'de üç günlük optimum inkübasyon süresi uygulandı. İnkübasyon sonunda kuponlar aseptik koşullar altında forseple alınarak 3 defa steril distile su ile yıkandı. Daha sonra steril kabin içinde 15 dakika süreyle kurutuldu ve kuponlar içinde 15 mL dezenfektan bulunan petrilere aktarıldı. Uygun muamele süresinden sonra alınan kuponlar içinde 20 mL evrensel nötralizan bulunan petrilere alındı. Kontrol kuponları dezenfektanla muamele edilmeden direk içinde 20 mL evrensel nötralizan bulunan petrilere aktarıldı. Buradan alınan kuponlar steril distile su ile üç defa yıkandıktan sonra içinde steril 4.5ml serum fizyolojik bulunan tüplere aktarıldı. Tüp içerikleri en yüksek devirde 45 saniye karıştırıldı (IKA Genius Vortex 3, Germany). Bakteri hücrelerini saymak için cam boncukla karıştırma aşamasından sonra test tüplerinde seri dilüsyonlar yapıldı. Dilüsyonlardan 100'er µL alınarak LB agar bulunan petrilere yayma ekim yapıldı. Bu ortamlar 18 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra uygun sayıda koloni bulunduran plaklar seçilip sayım yapıldı (Giaouris vd. 2005).

4.2.4 *Salmonella* suşlarının Mikrotitre plaklarında biyofilm oluşturma özelliklerinin tanımlanması

Salmonella suşları -20 °C stoğundan alınarak 5'er mL'lik LB broth besiyerlerine % 1 inokülasyon oranıyla aktarıldı ve bir gece (18 saat) çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra aktif kültürlerden % 1 oranında alınan inokülumlar 5'er mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarına (LB wo/NaCl; baktotripton 10 g/L, maya özütü 5 g/L) aktarıldı ve suşlar 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (Römling vd. 1998). İnkübasyondan sonra geliştirilen aktif kültürler tuz içermeyen LB broth ile 0.2 OD düzeyine kadar seyreltildi (Shimadzu spektrophotometer, Japan). Daha sonra 0.2 OD'ye ayarlanmış stoktan 130 µL alınarak mikrotitre plaklarındaki kuyucuklara aktarıldı. Plaklar SL1344 için 20 °C'de 24 saat,

DMC4, DMC12 ve DMC13 için ise 20 °C'de 72 saat statik koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra mikrotitre plak kuyucuklarındaki süspansiyon otomatik pipetle çekilerek atıldı. Üç defa steril serum fizyolojik ile yıkama gerçekleştirildi. Yıkama işleminden sonra % 95'lik metanolden 140 µL kuyucuklara aktarıldı ve 15 dk beklendi. Bu işlemden sonra metanol uzaklaştırıldı ve 140 µL kristal viyole (CV) yarım saat süreyle uygulandı. CV steril distile su ile üç defa yıkanarak uzaklaştırıldı. glasiyel asetik asit (% 33) 15 dk uygulanarak boya çözüldü ve 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi.

4.2.5 *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaklarında oluşturduğu biyomas üzerine dezenfektanların etkisinin belirlenmesi

Salmonella suşları -20 °C stoğundan alınarak 5'er mL'lik LB broth besiyerlerine % 1 inokülasyon oranıyla aktarıldı ve bir gece (18 saat) çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra aktif kültürlerden % 1 oranında alınan inokülumlar 5'er mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarına (LB wo/NaCl; baktotripton 10 g/L, maya özütü 5 g/L) aktarıldı ve suşlar 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (Römling vd. 1998). İnkübasyondan sonra geliştirilen aktif kültürler LBwo/NaCl ile 0.2 OD düzeyine kadar seyreltildi (Shimadzu spektrophotometer, Japan). Daha sonra 0.2 OD'ye ayarlanmış stoktan 130 µL alınarak mikrotitre plak kuyucuklarına aktarıldı. Tüm suşlar optimum biyofilm oluşturma süresi belirlenen süre çerçevesinde (SL1344 için 1 gün, DMC4, DMC12 ve DMC13 için 3 gün) statik koşullarda 20 °C 'de inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde mikrotitre plak kuyucukları içindeki süspansiyon otomatik pipet yardımıyla boşaltıldı. Kuyucuklar steril serum fizyolojik ile üç defa yıkandı ve steril kabinde kurutuldu. Kurutma işleminden sonra kuyulara 150 µL dezenfektan ilave edildi. Mumale süresi sonunda dezenfektan çözeltileri otomatik pipetle çekilerek geri alındı ve 150 µL evrensel nötralizan aktarıldı. Nötralizan çözelti geri alındıktan sonra kuyucuklar üç kez steril fizyolojik su ile yıkandı ve üzerine metanol (% 95) ilave edilerek 15dk bekletildi. 15 dk bitiminde metanol uzaklaştırıldı ve ortama 140 µL kristal viyole aktarılarak 30dk tutuldu. Kristal viyole 3 kez distile su yıkaması yapılarak uzaklaştırıldı ve son aşamada glasiyel asetik asit (% 33) 15 dk süreyle uygulanarak tutunan boya çözüldü. Spektrofotometrik ölçümler 595 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

4.2.6 İstatistiksel analiz

Galvanizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde suşların Optimum biyofilm oluşturma süreleri belirlenirken deneyler farklı günlerde üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Suşların mikrotitre plaka üzerindeki biyofilm üretimi, farklı günlerde üç paralelli ve üç tekrarlı olarak yapılan deneyler sonrasında değerlendirildi. Dezenfektanların uygulanması deneylerinde galvanizli paslanmaz çelik için her deney farklı günlerde ve taze çözünmüş solüsyonlarla üç kez tekrar edildi. Mikrotitre plak tekniği ise farklı günlerde ve taze çözünmüş solüsyonlarla her bir deney için üç paralelli ve üç tekrarlı olarak yapıldı. Grafiklerin oluşturulmasında ve hesaplamalarda microsoft excel versiyon 10 kullanıldı. Veriler SPSS versiyon 18 ile tek yönlü varyans analizi yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

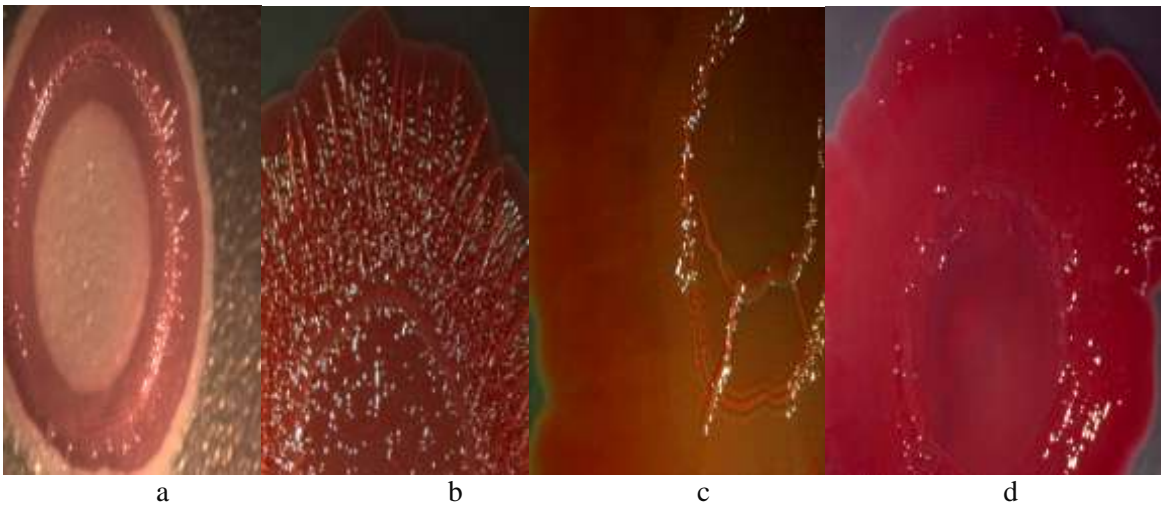
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 *Salmonella* Suşlarının Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi

Biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi için çalışılan *Salmonella* suşları, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı'ndan temin edilmiş olup, serotip tanıları Avşaroğlu vd. (2007) tarafından gerçekleştirilmiştir.

Salmonella suşlarının biyofilm morfotipleri Kongo kırmızısı içeren NaCl'siz LB agar ortamında tanımlanmıştır. Bu ortamda kırmızı, kuru ve pürüzlü koloni oluşturan suşların biyofilm morfolojisi "rdar" (kıvrımlı fimbriya ve selülöz içerenler), kahverengi, kuru ve pürüzlü koloni oluşturan suşların biyofilm morfolojisi "bdar" (yalnız kıvrımlı fimbriya içerenler), pembe, kuru ve pürüzlü koloni oluşturan suşların biyofilm morfolojisi "pdar" (yalnız selülöz içerenler) ve düz ve ıslak koloni oluşturan suşların biyofilm morfolojisi ise "saw" (selülöz ve kıvrımlı fimbriya içermeyenler) olarak sınıflandırılmaktadır (Vestby vd. 2009).

Denemeler sonucunda SL1344 ve DMC4 kodlu *Salmonella* suşlarının rdar, DMC12 kodlu *Salmonella* suşunun bdar ve DMC13 kodlu *Salmonella* suşunun ise pdar morfolojisinde biyofilm ürettiği belirlenmiştir (Şekil 5.1.). Bu sonuçlar Karaca (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışma ile tam bir uyum göstermektedir.



Şekil 5.1. *Salmonella* suşlarında tanımlanan üç farklı biyofilm morfotipi: **a.** "Rdar" morfotipi (SL1344 kodlu suş, *S. Typimurium*) **b.** "Rdar" morfotipi (DMC4 kodlu suş, *S. Typimurium*) **c.** "Bdar" morfotipi (DMC12 kodlu suş, *S. Infantis*) **d.** "Pdar" morfotipi (DMC13 kodlu suş, *S. Roughness*)

5.2 Farklı Morfotipte Biyofilm Üreten *Salmonella* Suşlarının Galvenizli Paslanmaz Çelik Yüzeyler Üzerinde Optimum Biyofilm Oluşturma Sürelerinin Belirlenmesi

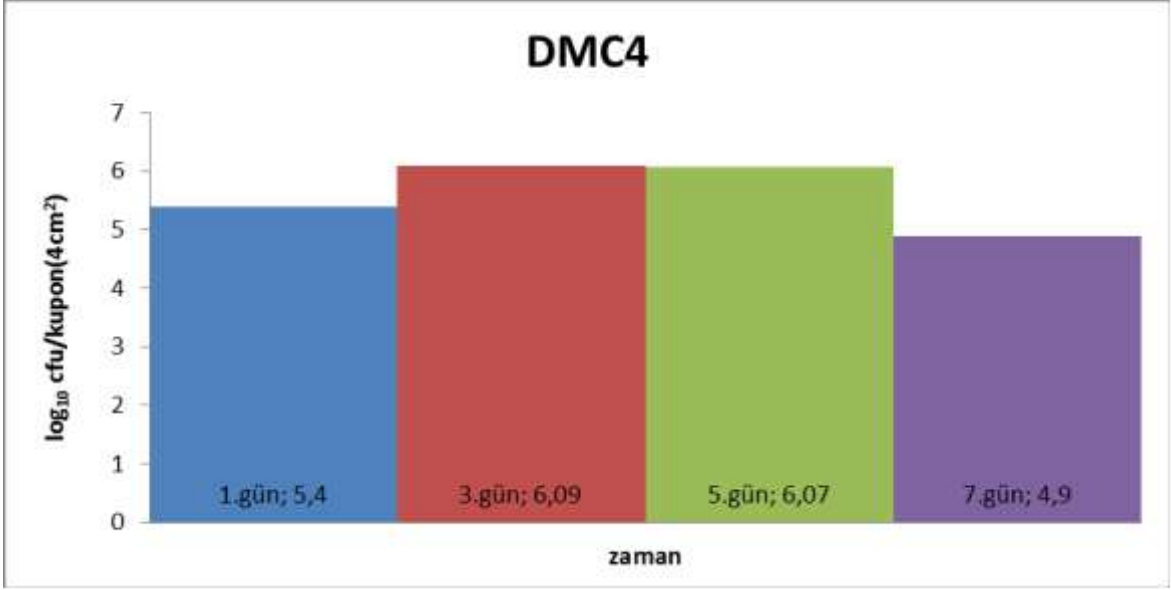
Deneysel üç tekrarlı olarak yürütülmüştür ve üç tekrarın ortalaması alınarak veriler \log_{10} tabanına çevrilmiştir. Bu hesaplamalar sonunda SL1344, DMC4, DMC12 ve DMC13 suşlarının optimum biyofilm oluşturma süreleri belirlenmiştir.

SL1344 suşu için, birinci günden üçüncü günün sonuna kadar biyofilm içindeki hücre sayısında artış meydana gelirken, üçüncü günden sonra biyofilm içindeki hücrelerin sayısı azalmıştır. Beş ve yedi günlük biyofilmler içindeki canlı hücre sayısında önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). SL1344 suşu için çalışılan laboratuvar koşulları altında galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde en iyi biyofilm oluşturma süresi üç gün olarak belirlenmiştir (Şekil 5.2.).



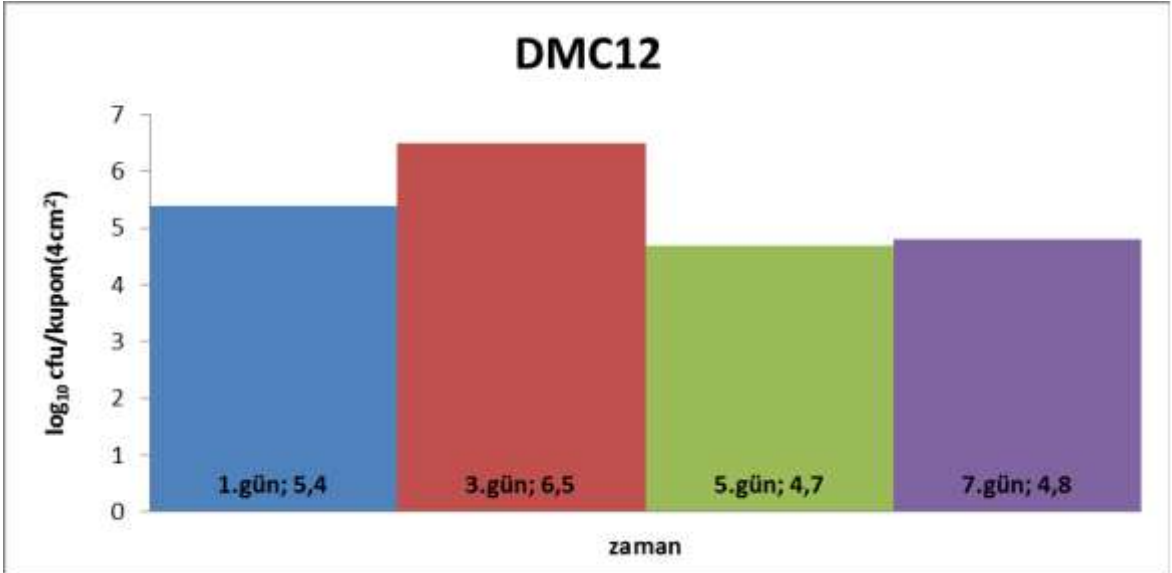
Şekil 5.2. *S. Typhimurium* SL1344 suşunun galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliğinin zamana bağlı değişimi

DMC4 suşu için, beşinci günden sonra biyofilm içindeki canlı hücrelerin sayısında azalma görülürken, üç ve beş günlük biyofilmleri içindeki canlı hücre sayıları arasında önemli bir farklılık olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$). Bu suş için çalışılan laboratuvar koşulları altında optimum biyofilm oluşturma süresi, üç ve beş günlük biyofilmleri arasında önemli bir farklılık olmaması nedeni ile, üç gün olarak belirlenmiştir (Şekil 5.3.).



Şekil 5.3. *S. Typhimurium* DMC4 suşunun galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliğinin zamana bağlı değişimi

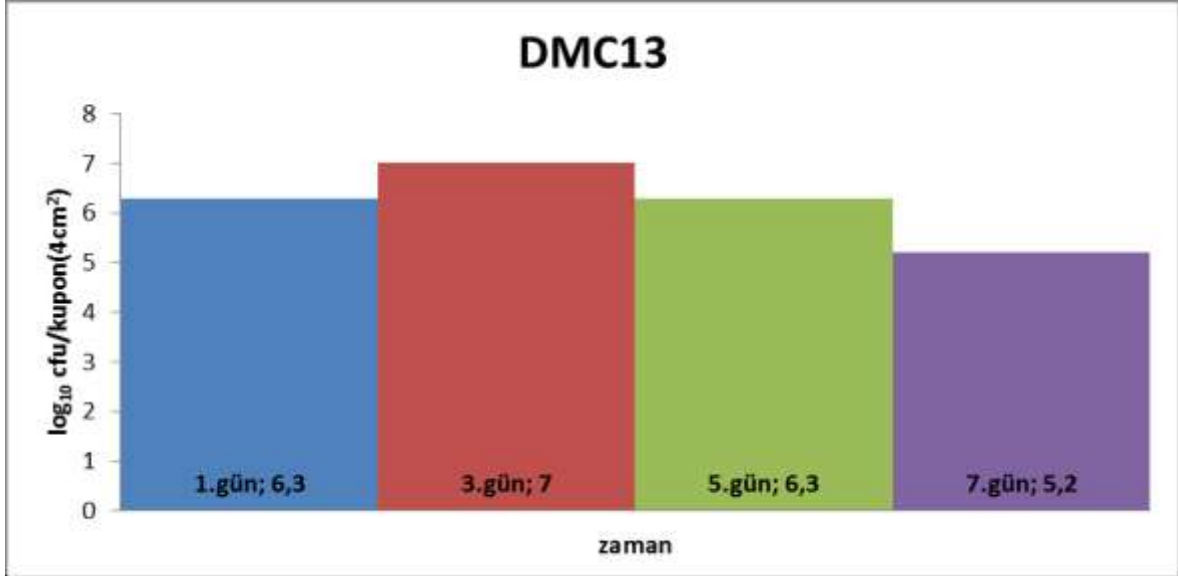
DMC12 suşunda biyofilm içindeki canlı hücre sayısı 3. gün sonuna kadar artmış, ancak 5. gün sonunda azalmıştır. Yedi günlük biyofilmler içindeki canlı hücre sayısında ise önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$). Bu nedenle söz konusu suş için çalışılan laboratuvar koşulları altında galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde optimum biyofilm oluşturma süresi üç gün olarak belirlenmiştir (Şekil 5.4.).



Şekil 5.4. *S. Infantis* DMC12 suşunun galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliğinin zamana bağlı değişimi

DMC13 suşu için, birinci günden sonra biyofilm içinde bulunan canlı hücre sayısında

artma yaşanırken, üçüncü günden sonra düzenli olarak bir azalma görülmüştür. Bu suş için çalışılan laboratuvar koşulları altında galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde optimum biyofilm oluşturma süresi üç gün olarak belirlenmiştir (Şekil 5.5.).



Şekil 5.5. *S. Roughform* DMC13 suşunun galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliğinin zamana bağlı değişimi

Sonuç olarak çalışmada kullanılan bütün suşların, biyofilm morfoloji farklılıklarına rağmen, galvenizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde optimum biyofilm oluşturma süreleri üç gün olarak belirlenmiştir. Ayrıca üç günlük biyofilmlerin içinde bulunan canlı hücre sayılarının birbirine yakın olduğu da tespit edilmiştir.

5.3 *Salmonella* Suşlarının Galvenizli Paslanmaz Çelik Kuponlarda Oluşturduğu Biyofilmler Üzerine Dezenfektanların Etkisi

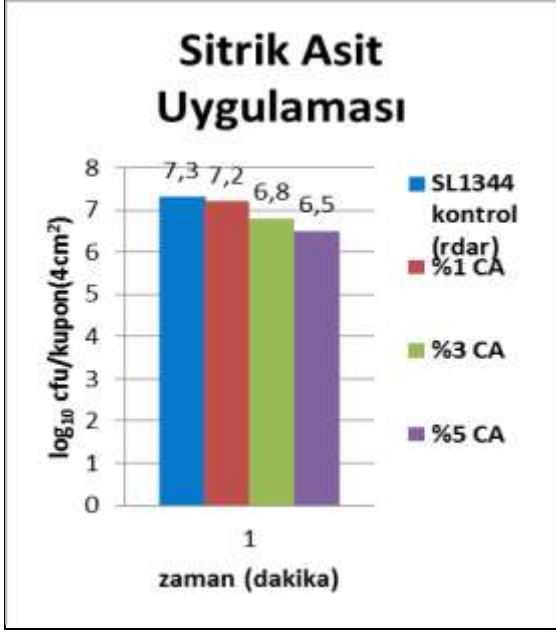
Çalışmada kullanılan dezenfektanların, önerilen konsantrasyonları yanında ek konsantrasyonları da kullanılmıştır (Çizelge 5.1.). Benzalkonium klorit ve kuaterner amonyum bileşiği yasaklanmasından dolayı çalışmadan çıkarılmıştır. Dezenfektanlar deneysel ve endüstriyel süreçlerde yaygın olarak kullanılan sürelerde, 1 ve 5 dakika boyunca muamele edilmiştir. Çalışmalar farklı günlerde taze hazırlanmış solusyonlarla üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Üç tekrarın aritmetik ortalaması alınarak log₁₀ tabanına çevrilmiş ve kupon başına (4 cm²) düşen bakteri sayısı cfu (koloni oluşturma birimi) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 5.1. Çalışmada kullanılan dezenfektanların konsantrasyonları

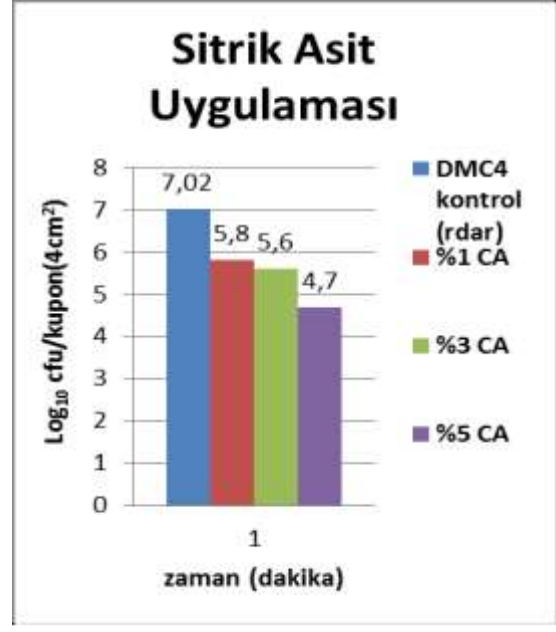
Dezenfektanlar	dilüsyonlu konsantrasyonları
<u>Etanol (C₂H₅OH)</u>	%40, %50, %60
<u>Sodyum hipoklorit (NaOCl)</u>	%0.1, %0.5, %1
<u>Klorhekzidin diglukonat (KHDGL)</u>	%0.5, %1, %3
<u>Hidrojen peroksit (H₂O₂)</u>	%5, %10, %15
<u>Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)</u>	%3, %5, %10
<u>Sitrik asit (CA)</u>	%1, %3, %5

Galvanizli çelik, paslanmaya ve aşınmaya karşı dirençli olduğundan gıda endüstrisinde özellikle tercih edilmektedir. Örneğin; soğutma kulelerinde ve kümes hayvanlarının taşınmasında kullanılan araçların yüzeylerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wagner ve Little 1993). Bu nedenlerden dolayı dezenfektanların bakterisidal etkilerini değerlendirmede galvanizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde geliştirilen biyofilmler kullanılmıştır ve dezenfektanların bakterisidal etkinliği belirlenirken biyofilm içinde bulunan bakterilerin sayılarındaki azalmalar esas alınmıştır.

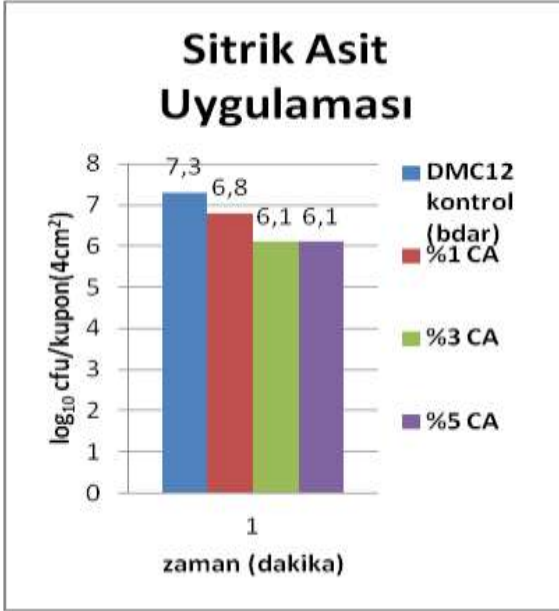
Sitrik asitin bir dakika boyunca üç farklı biyofilm morfoloji üzerine olan etkileri incelendiğinde; biyofilm içerisindeki bakteri sayısında en çok azalma DMC4 suşunda belirlenirken, diğer suşlarda birbirine yakın azalmaların meydana geldiği tespit edilmiştir. Tüm suşlarda en etkin sitrik asit konsantrasyonu % 5 olarak tanımlanmıştır (Şekil 5.6.). Özellikle DMC4 suşunda tanımlanan biyofilm içindeki canlı hücre sayısında düşme (2 log değeri üzerinde) bu kimyasalın, diğer dezenfektanlarla kombine edilerek kullanılabilmesine işaret etmektedir.



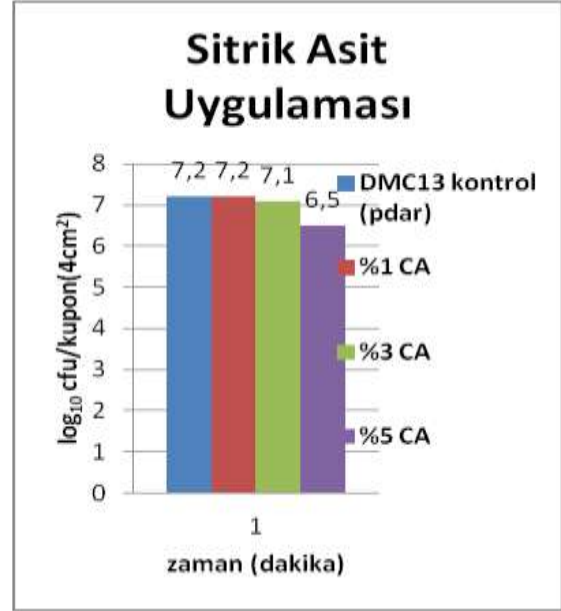
a



b



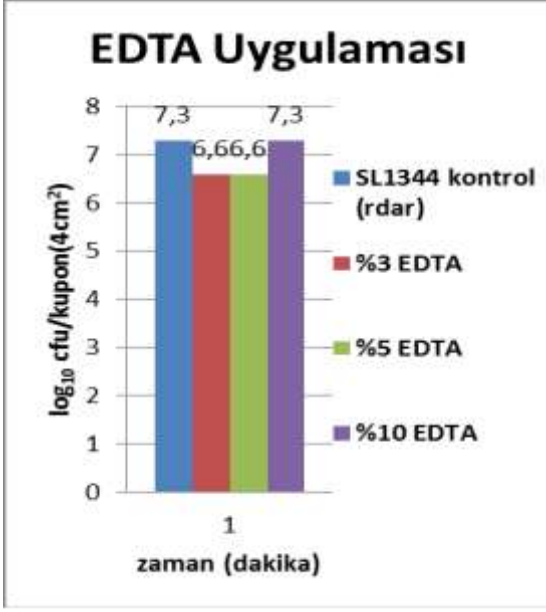
c



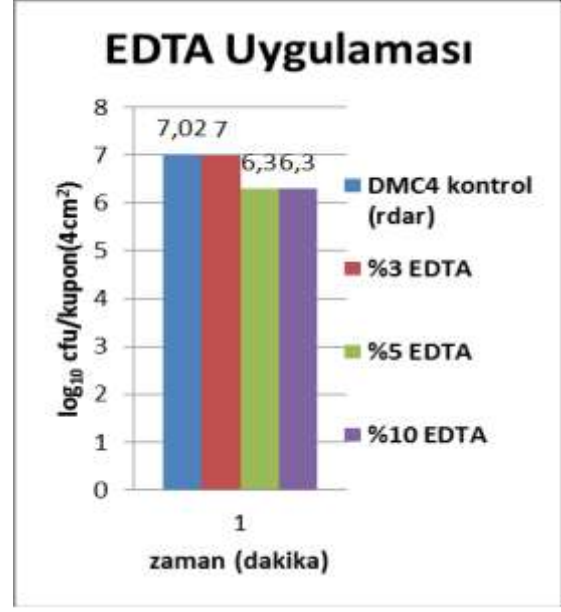
d

Şekil 5.6. *Salmonella* suşlarının galvanizli çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan sitrik asitin (CA) etkisi

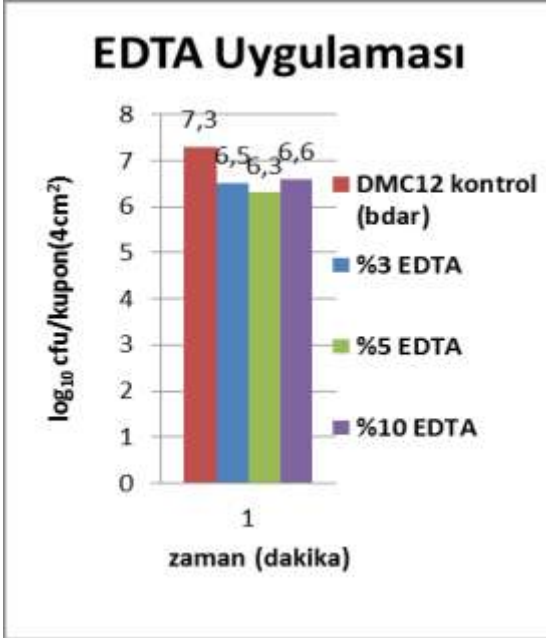
1dk süresince yapılan EDTA uygulaması sonucunda, biyofilm morfotipleri arasında istatistiki açıdan önemli bir farklılık meydana gelmemiştir. Ayrıca tüm suşlarda üç farklı EDTA konsantrasyonunda biyofilm içerisindeki canlı hücre sayısında, uygulamada dikkate alınacak düşmeler (en fazla 1 log) gerçekleşmemiştir (Şekil 5.7.).



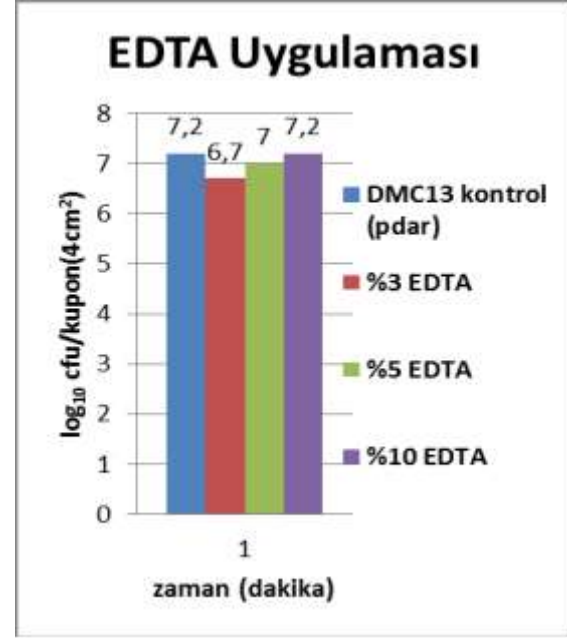
a



b



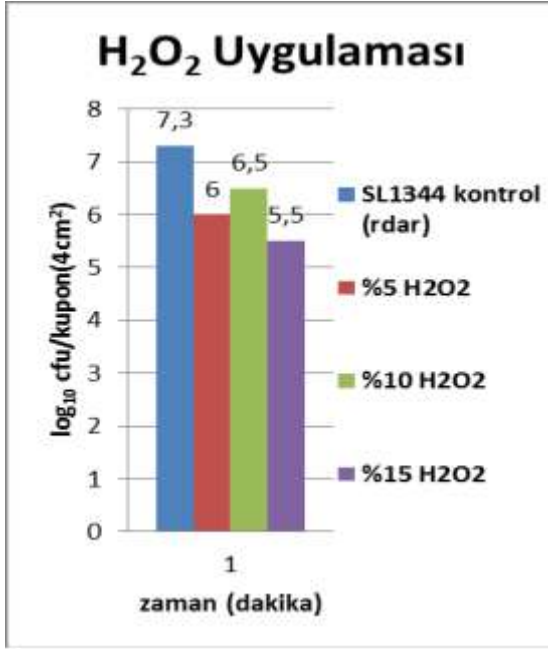
c



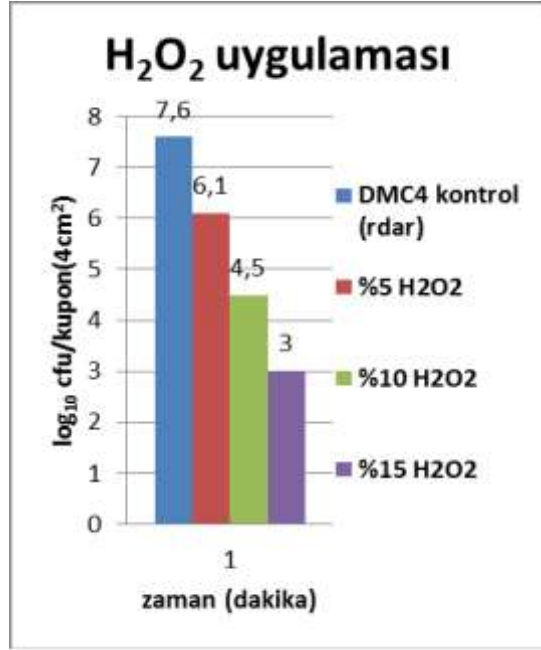
d

Şekil 5.7. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan EDTA'nın etkisi

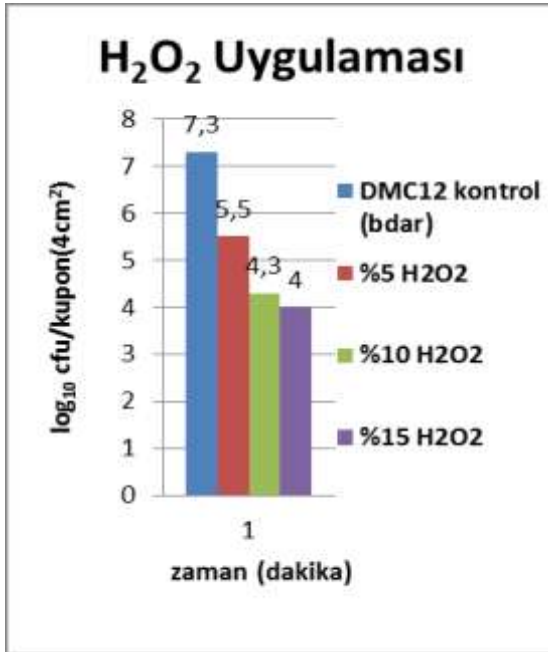
Hidrojen peroksitin bir dakika süresince uygulandığı biyofilmlerde, canlı bakteri sayılarında tüm konsantrasyonlar için en önemli azalmalar DMC4, DMC12 ve DMC13 suşlarında tespit edilmiştir. SL1344'de ise, en etkin konsantrasyonda (% 15) biyofilm yapısındaki bakteri sayısında log 2 düzeyinde bir azalma meydana gelmiştir (Şekil 5.8.)



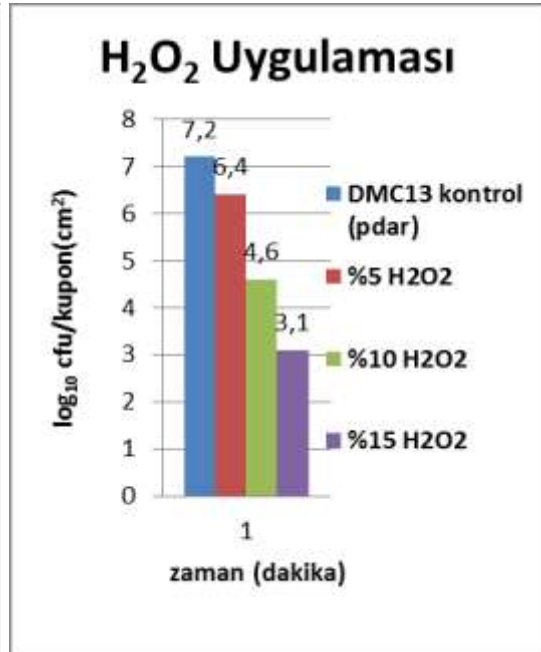
a



b



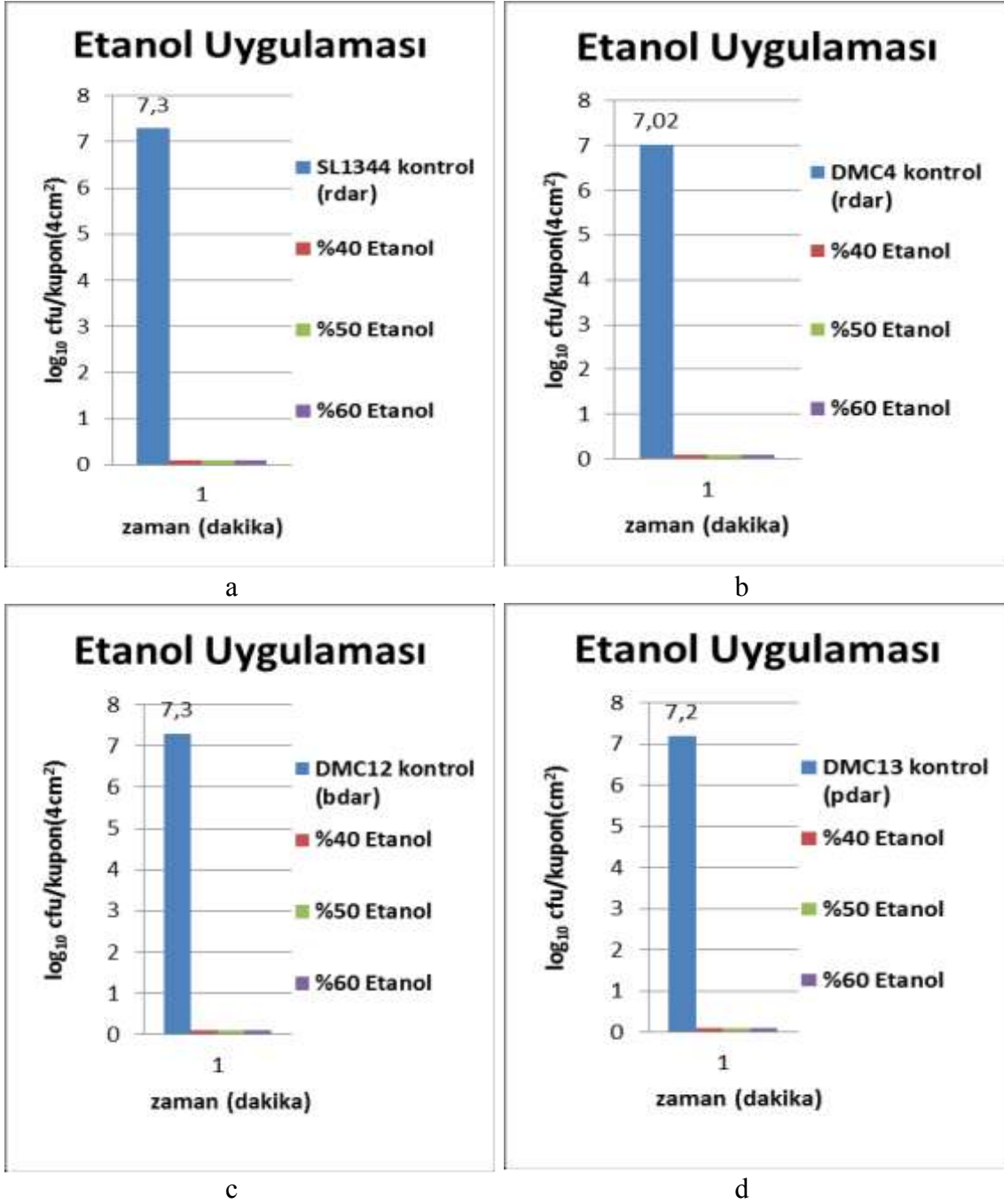
c



d

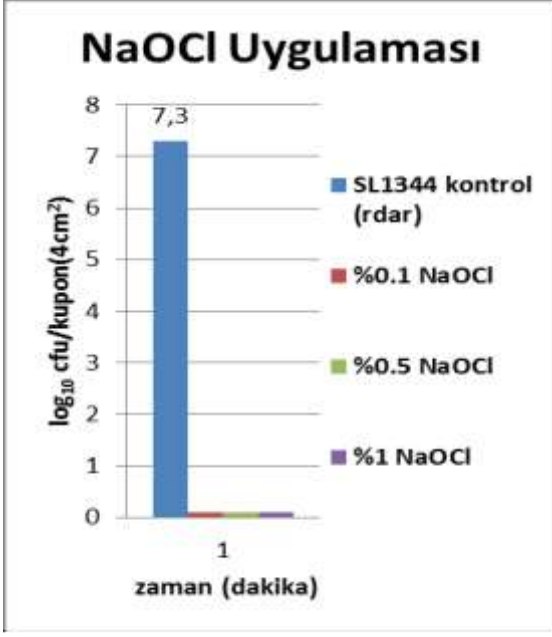
Şekil 5.8. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan hidrojen peroksitin (H₂O₂) etkisi

Bir dakika süre ile denenen tüm Etanol konsantrasyonlarında, bütün suşların biyofilm yapısı içerisindeki bakterilerin tamamının öldüğü saptanmıştır (Şekil 5.9.).

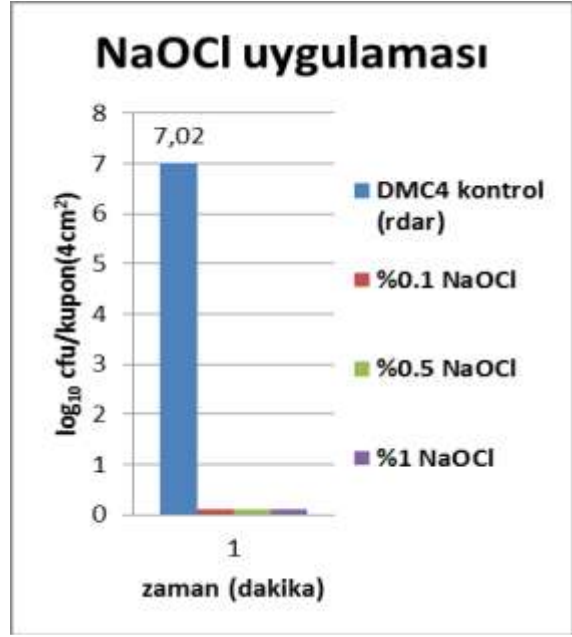


Şekil 5.9. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük kuponlarda biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan etanolün etkisi

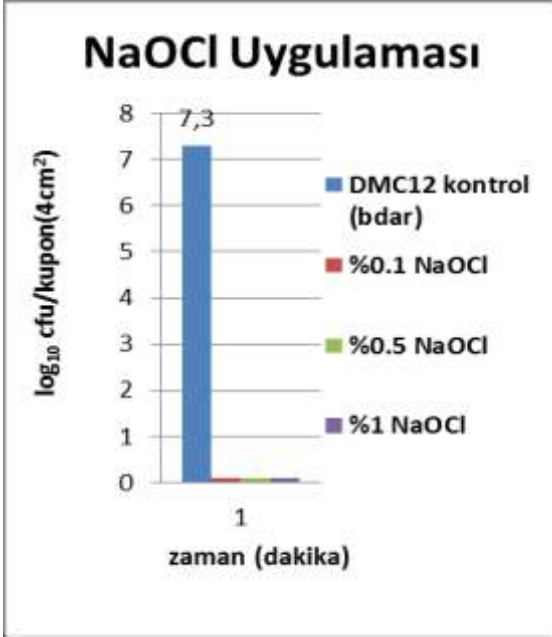
Sodyum hipoklorit ve klorhekzidin diglukonat da, etanol uygulamasında olduğu gibi, denemeye alınan tüm konsantrasyonlarda biyofilm yapısındaki hücrelerin tamamının ölümüne yol açmıştır (Şekil 5.10. ve Şekil 5.11.).



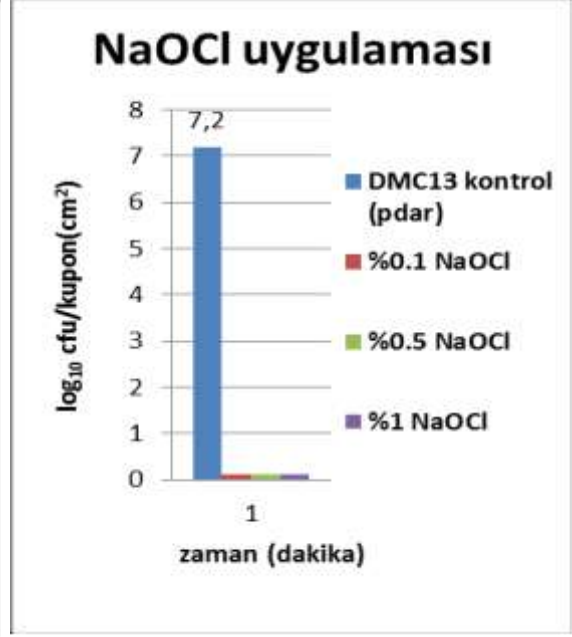
a



b

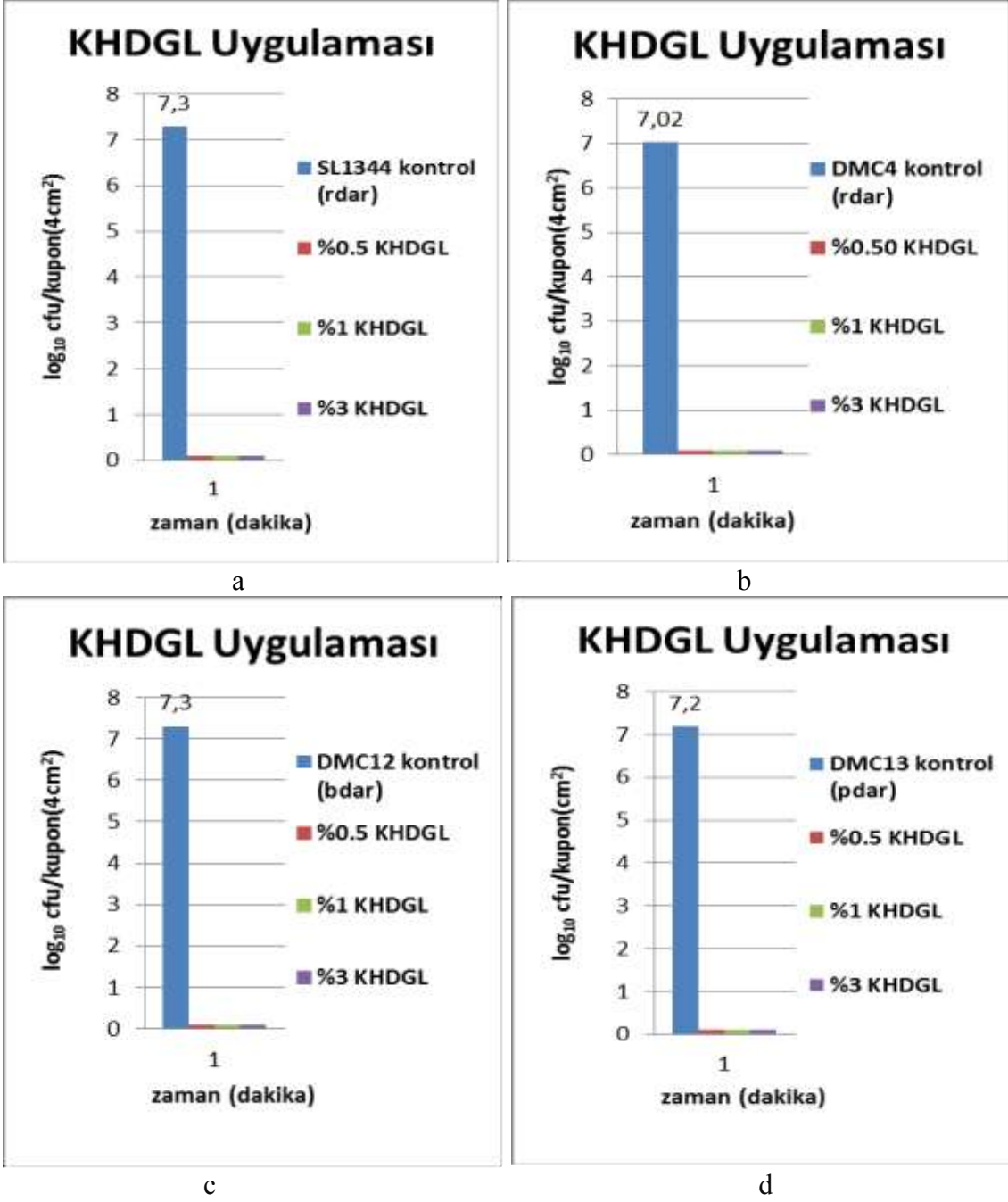


c



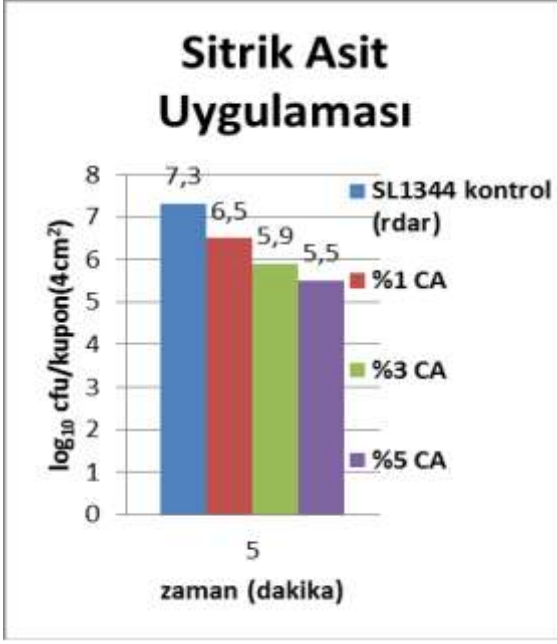
d

Şekil 5.10. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan sodyum hipokloritin (NaOCl) etkisi

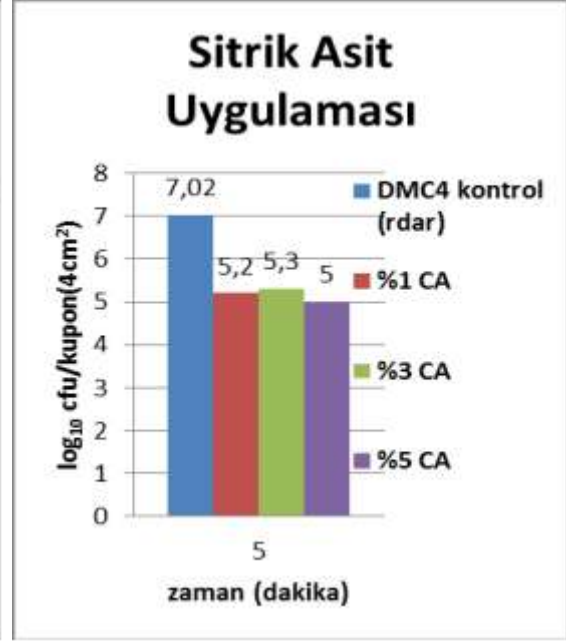


Şekil 5.11. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan klorheksidin diglukonatın (KHDGL) etkisi

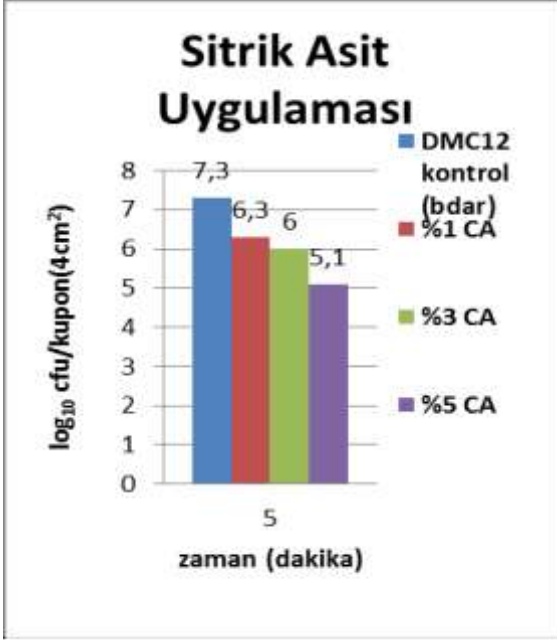
Sitrik asitin beş dakika boyunca üç farklı biyofilm morfolotipi üzerine olan etkileri incelendiğinde, en dirençli suş pdar morfolotipli DMC13 suşu olarak tanımlanmıştır. Diğer suşlarda bütün konsantrasyonlarda biyofilm içindeki canlı bakteri sayılarında, kontrol gruplarına göre istatistiki açıdan anlamlı düşüşler belirlenmiştir (Şekil 5.12).



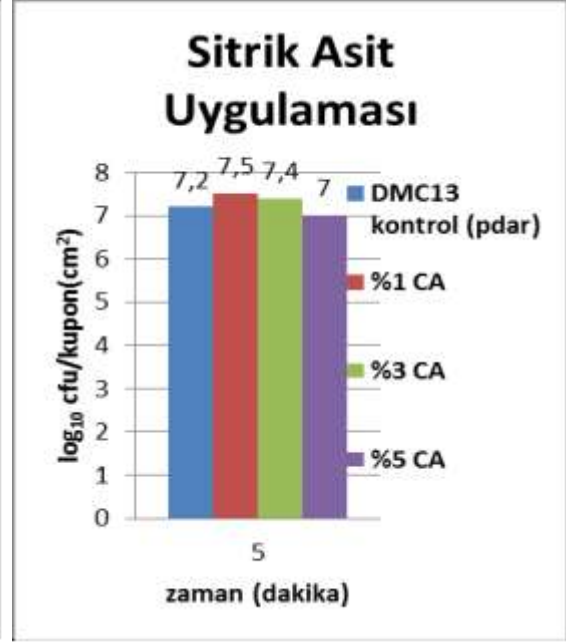
a



b



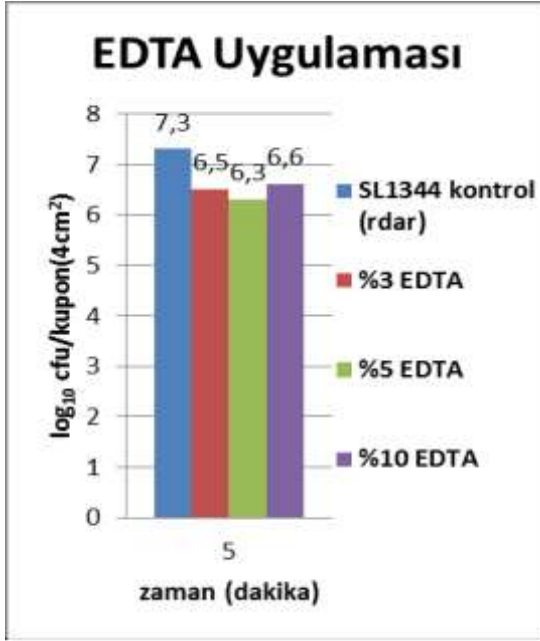
c



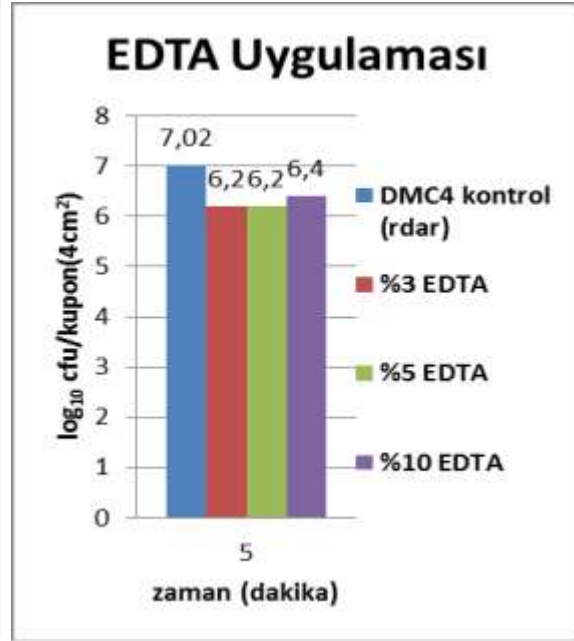
d

Şekil 5.12. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan sitrik asitin (CA) etkisi

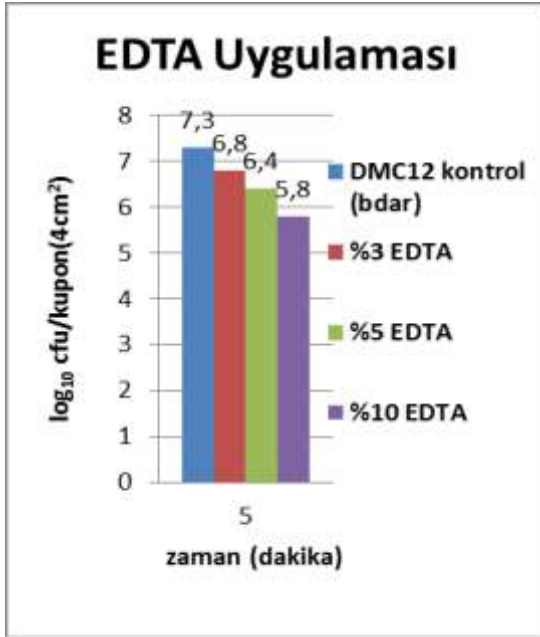
EDTA uygulama süresinin 5 dk'ya çıkarılması durumunda, biyofilm yapısındaki canlı hücre sayısında düşük düzeyde ($< \log 2$) azalmalar belirlenmiştir. Bu uygulamada artan EDTA konsantrasyonundan en yüksek düzeyde etkilenen biyofilm yapısı bdar (DMC12) olarak tanımlanmıştır (Şekil 5.13.).



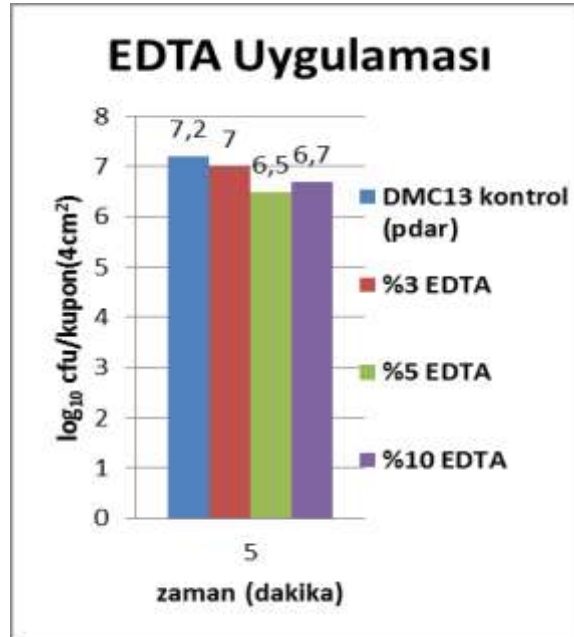
a



b



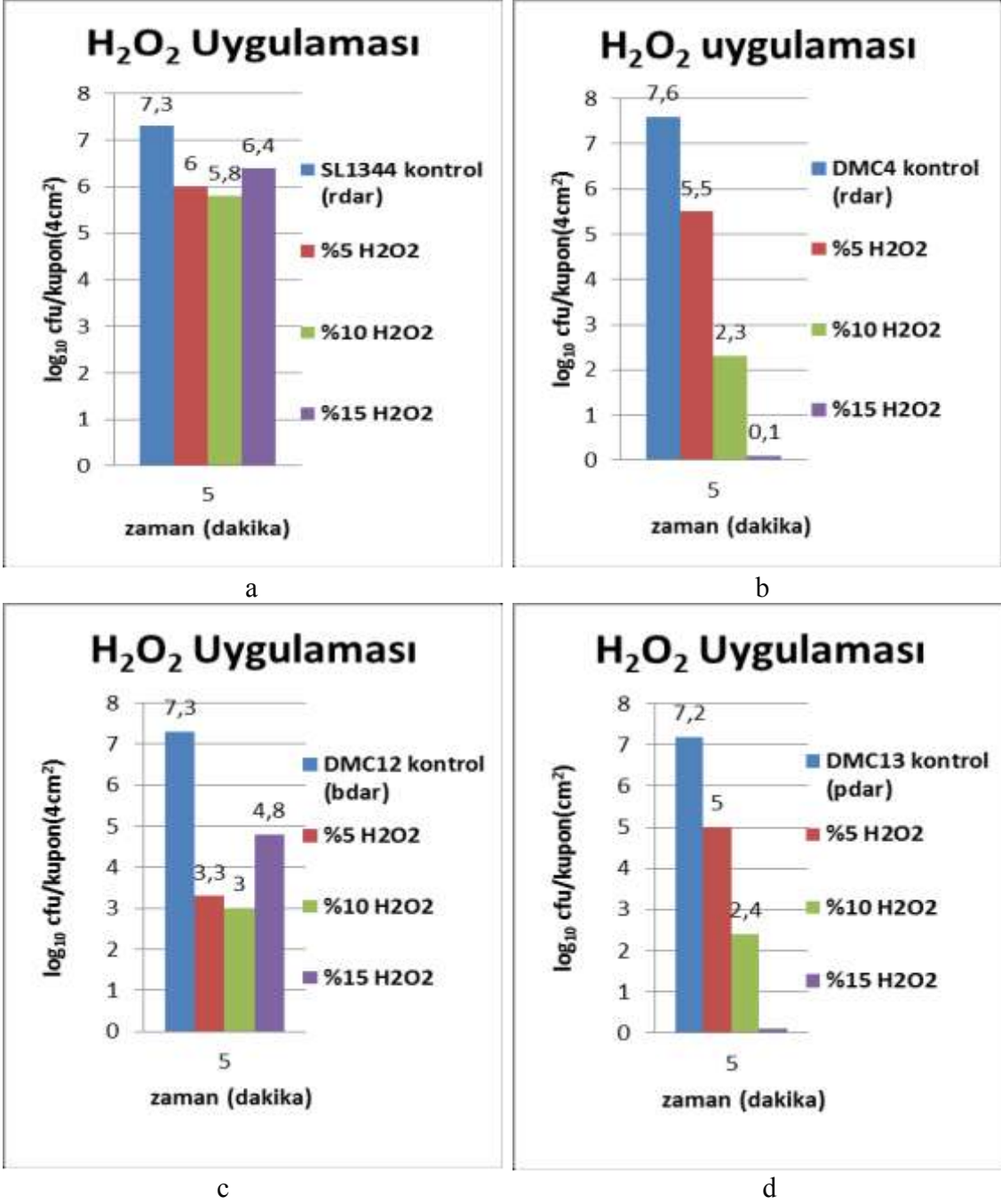
c



d

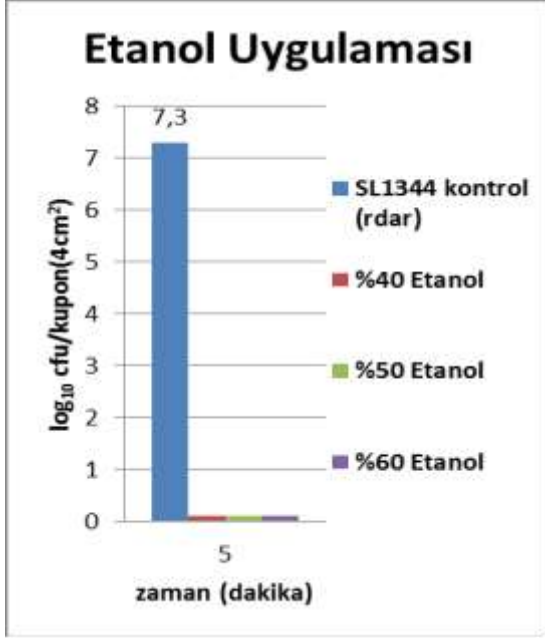
Şekil 5.13. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük kuponlarda üzerine beş dakika süresince uygulanan EDTA'nın etkisi

Hidrojen peroksit'in 5 dk süresince uygulanan % 15'lik konsantrasyonunun DMC4 ve DMC13 suşlarında biyofilm yapılarını eradike ettiği belirlenmiştir. Bu uygulama süresince SL1344 suşunun oluşturduğu biyofilm, diğer suşların biyofilmlerinden daha yüksek düzeyde dirençli bulunmuştur (Şekil 5.14.).

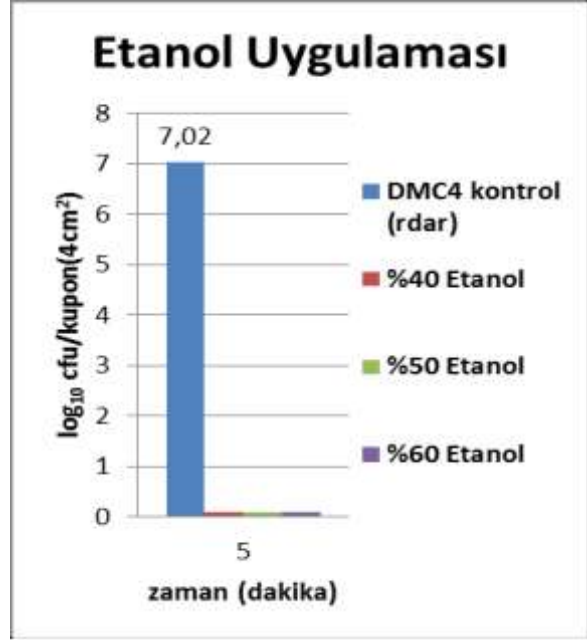


Şekil 5.14. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan hidrojen peroksitin (H₂O₂) etkisi

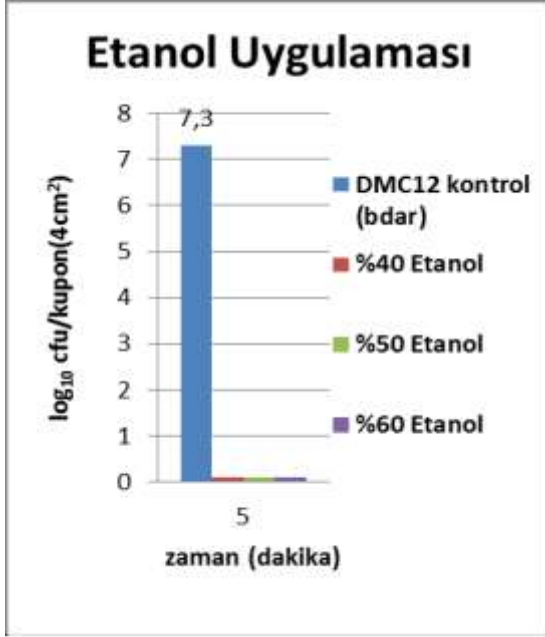
Beş dakika uygulama süresinde; etanol, sodyum hipoklorit ve klorhekzidin diglukonat'ın denenen tüm konsantrasyonları tüm suşların galvanizli çelik kuponlar üzerinde oluşturduğu biyofilm yapılarının eradikasyonuna yol açmıştır (Şekil 5.15, Şekil 5.16. ve Şekil 5.17.).



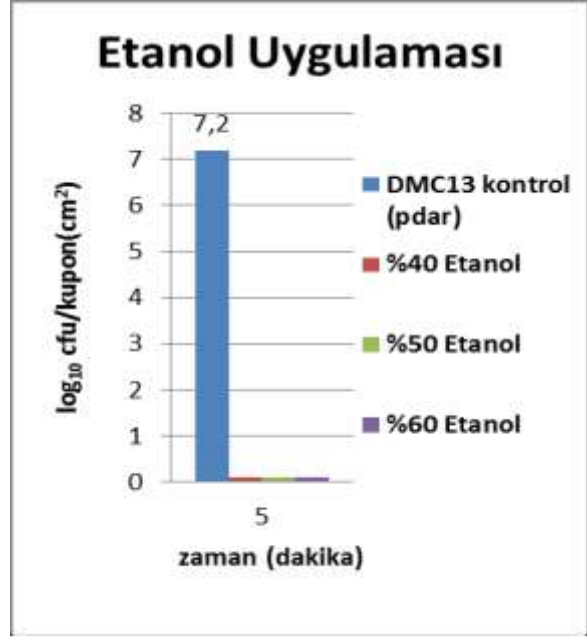
a



b

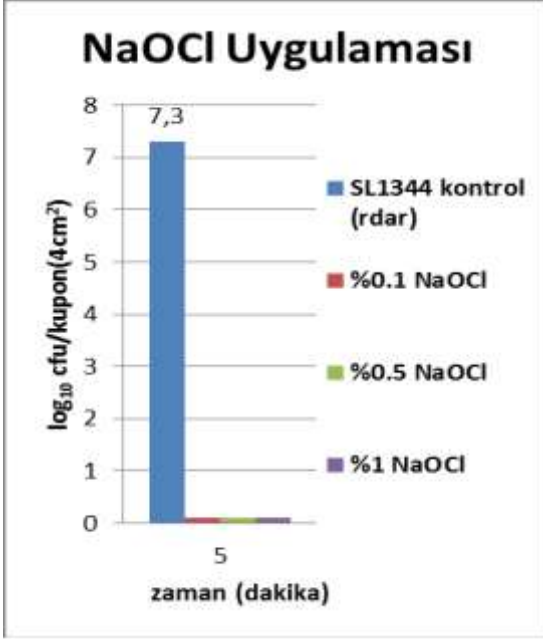


c

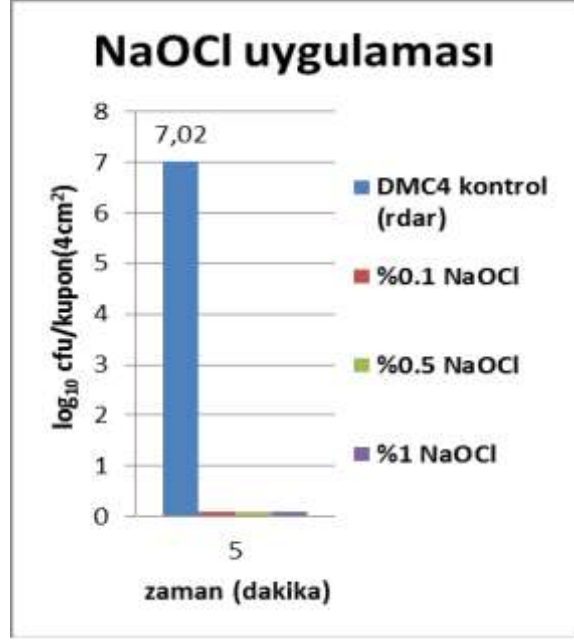


d

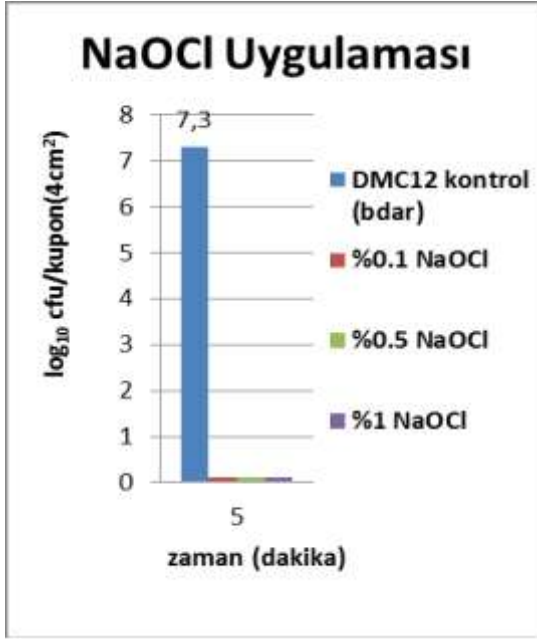
Şekil 5.15. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan etanolün etkisi



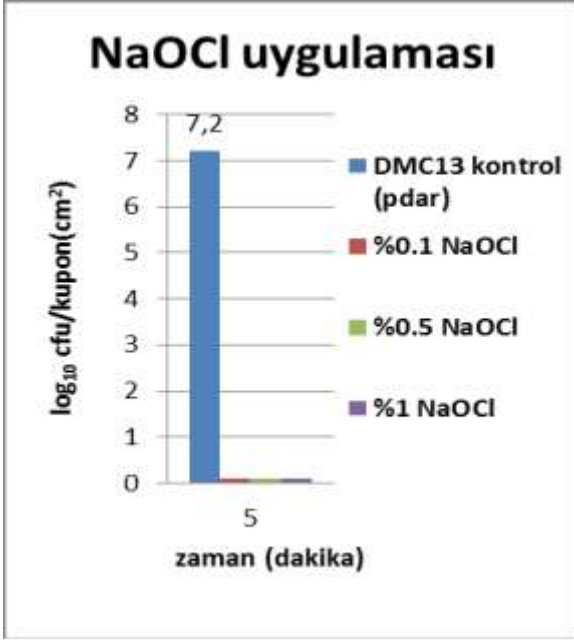
a



b

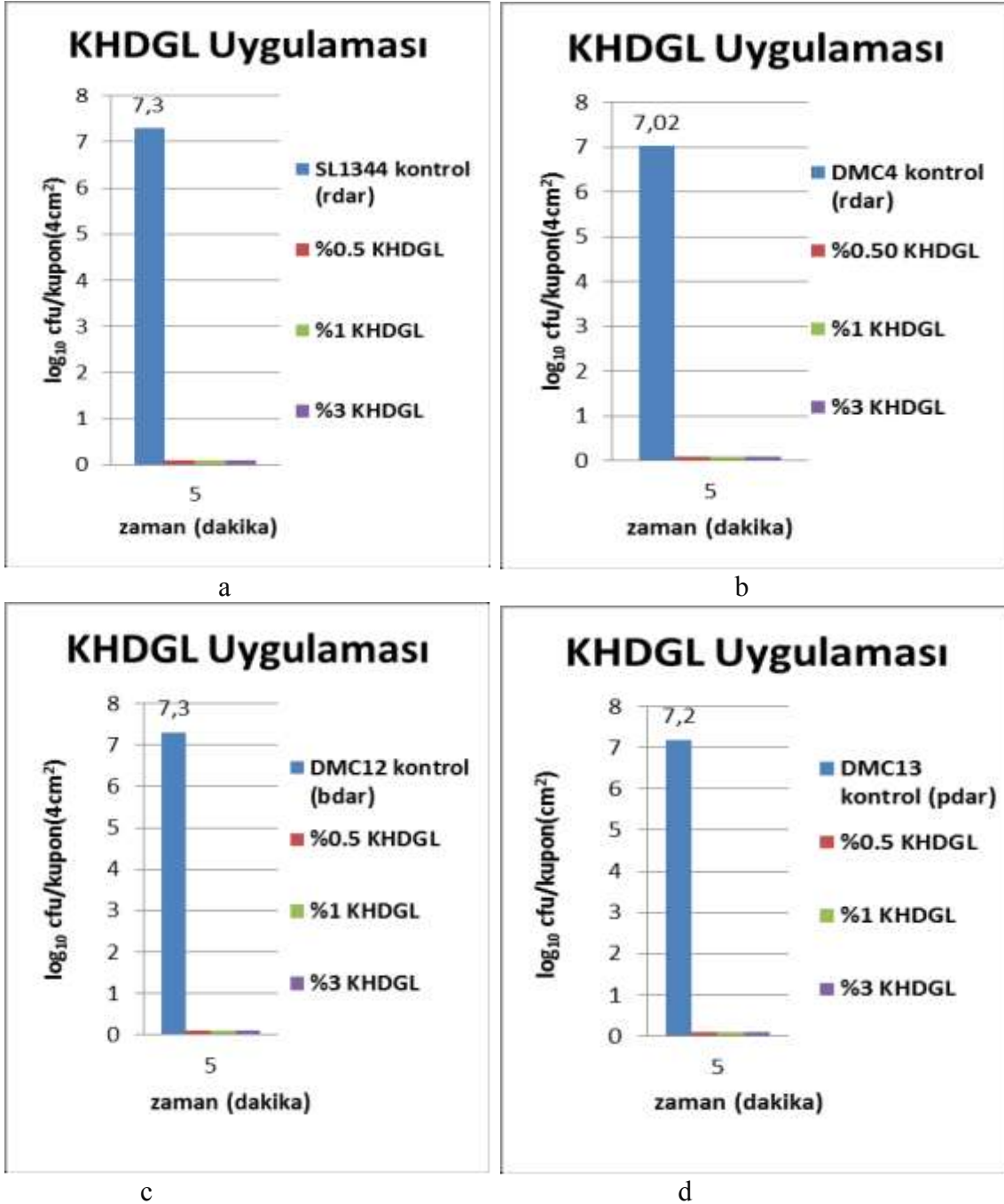


c



d

Şekil 5.16. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan sodyum hipokloritin (NaOCl) etkisi



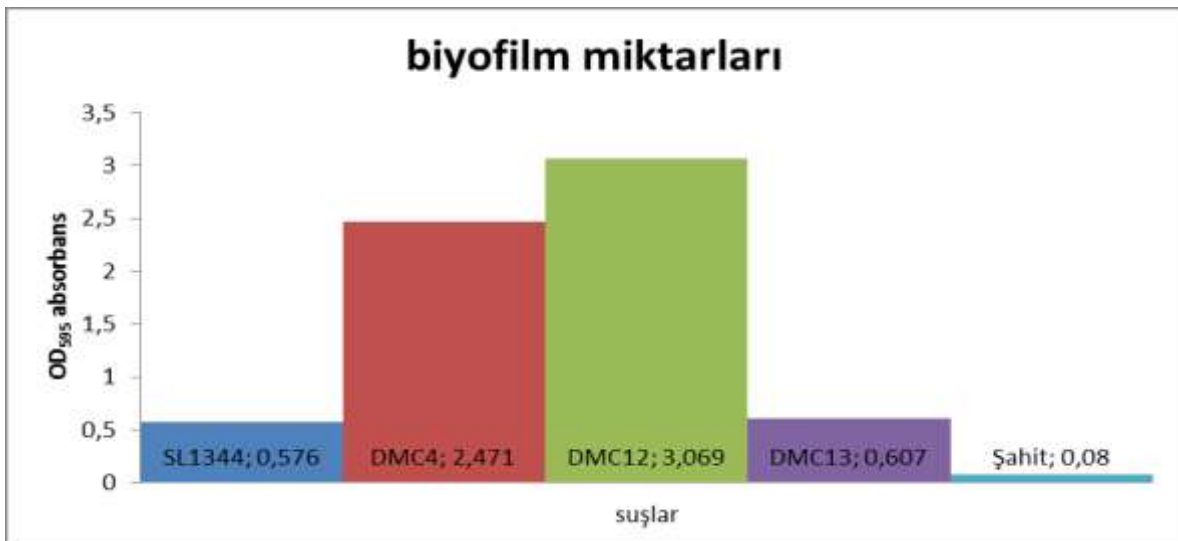
Şekil 5.17. *Salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik kuponlarda geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan klorheksidin diglukonatın (KHDGL) etkisi

5.4 Mikrotitre Plaklarında (polisitiren) *Salmonella* Suşlarının Biyofilm Oluşturma Özellikleri

Daha önce optimum biyofilm üretme süreleri tanımlanan suşlar, bu sürelerde (SL1344 için 1 gün, DMC4, DMC12 ve DMC13 için 3 gün) 20 °C’de inkübe edilerek üretilmiştir. Bu süreler sonunda gelişme ortamlarının OD₅₉₅’teki absorbansları temel alınarak suşlar biyofilm oluşturma yönünden değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme Stepanovic vd. (2000)

tarafından belirlenen kriterlere göre yapılmıştır. Bu kriterlere göre suşlar; $OD \leq OD_C$ ise hiç biyofilm üretmiyor, $OD_C < OD \leq 2OD_C$ zayıf biyofilm üreticisi, $2OD_C < OD \leq 4OD_C$ orta düzey biyofilm üreticisi, $4OD_C < OD$ ise güçlü biyofilm üreticisi olarak sınıflandırılmıştır. OD_C mikrotitre plaklarındaki boş kuyuların ölçüm ortalamasını, OD ise biyofilm üretiminin olduğu yani bakteri inokülümünün mevcut olduğu kuyuların ölçüm ortalamasını ifade etmektedir.

Bu kriterler doğrultusunda yürütülen denemeler sonucunda, denenen tüm suşların güçlü biyofilm üreticileri olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.18.).



Şekil 5.18. *Salmonella* suşlarının optimum koşullarda ürettikleri biyofilm biyomasları

5.5 *Salmonella* Suşlarının Mikrotitre Plaklarında (polisitiren) Oluşturduğu Biyofilmler Üzerine Dezenfektanların Etkisi

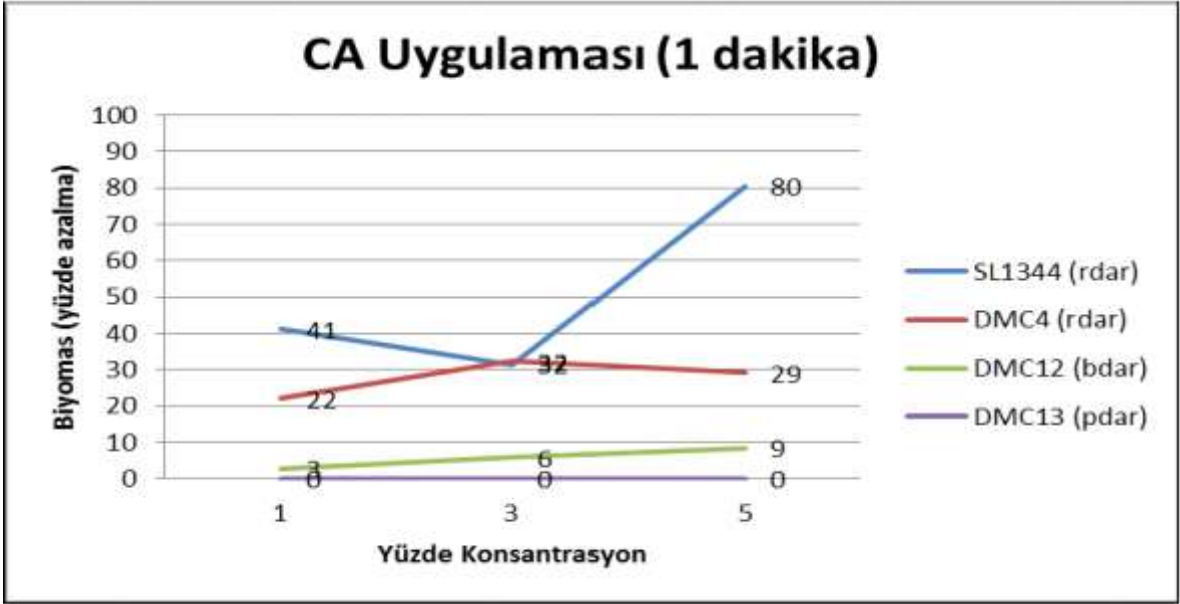
Biyositlerin biyomas üzerine olan etkilerini belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

Yüzde azalma _____

B boş kuyuların ortalama absorbansını, C kontrol kuyularının ortalama absorbansını, T dezenfektanlarla muamele edilen kuyuların ortalama absorbansını göstermektedir (Pitts vd. 2003).

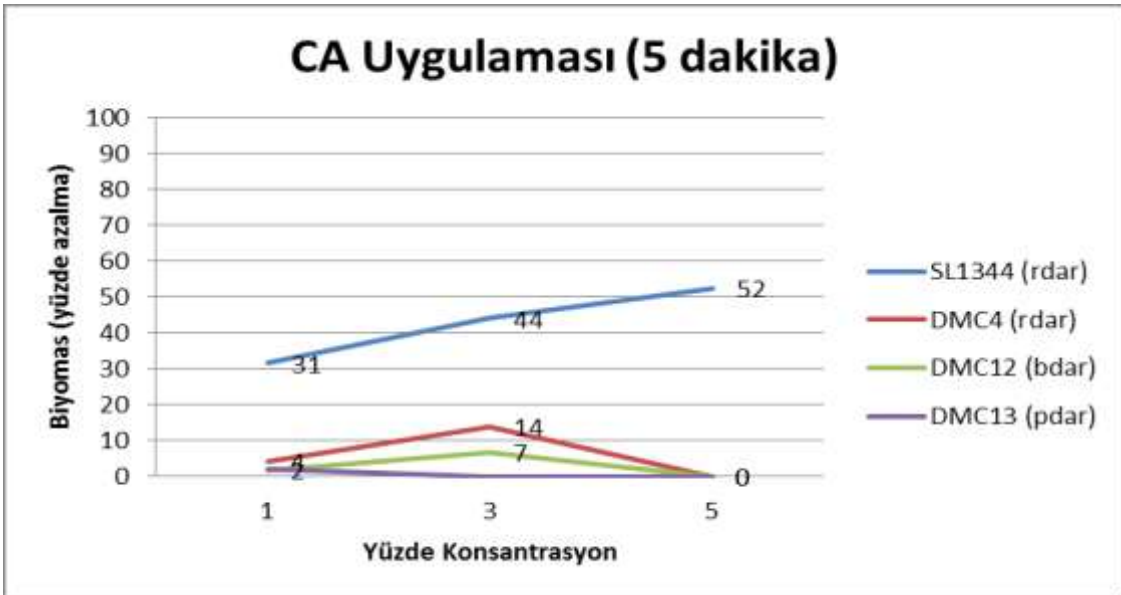
Bir dakika Sitrik asit uygulaması DMC13 (pdar biyofilm) suşunun oluşturduğu biyomas üzerine etkili bulunmamıştır. Bu sürede sitrik asitin % 5 konsantrasyonu SL1344 (rdar biyofilm) üzerinde % 80 düzeyine ulaşan bir biyomas düşüşüne neden olmuştur (Şekil

5.19.). Bir dakika süresince sitrik asitin konsantrasyon artışının ise, SL1344 suşu dışında diğer suşlar üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.



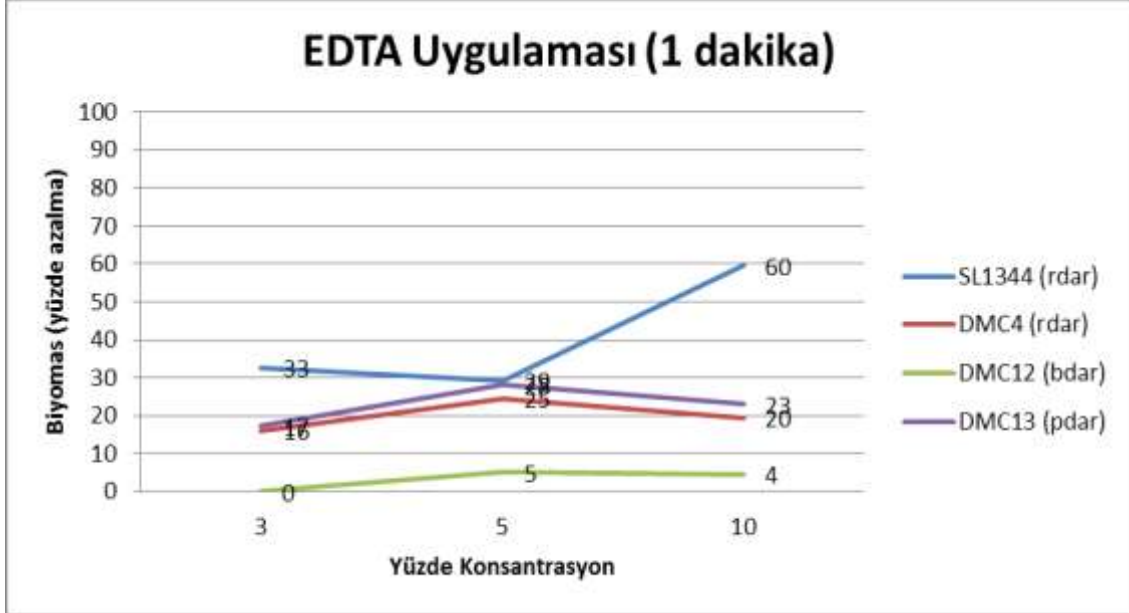
Şekil 5.19. *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaka (polisitiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan sitrik asitin (CA) etkisi

Beş dakika süresince uygulanan sitrik asitin % 5 konsantrasyonu SL1344 (rdar biyofilm) üzerinde % 52 düzeyine ulaşan bir biyomas düşüşüne neden olmuştur (Şekil 5.20.). Ayrıca uygulama zamanı uzamasının, sitrik asitin uygulanan konsantrasyonlarında etkinliğini artırmadığı saptanmıştır.



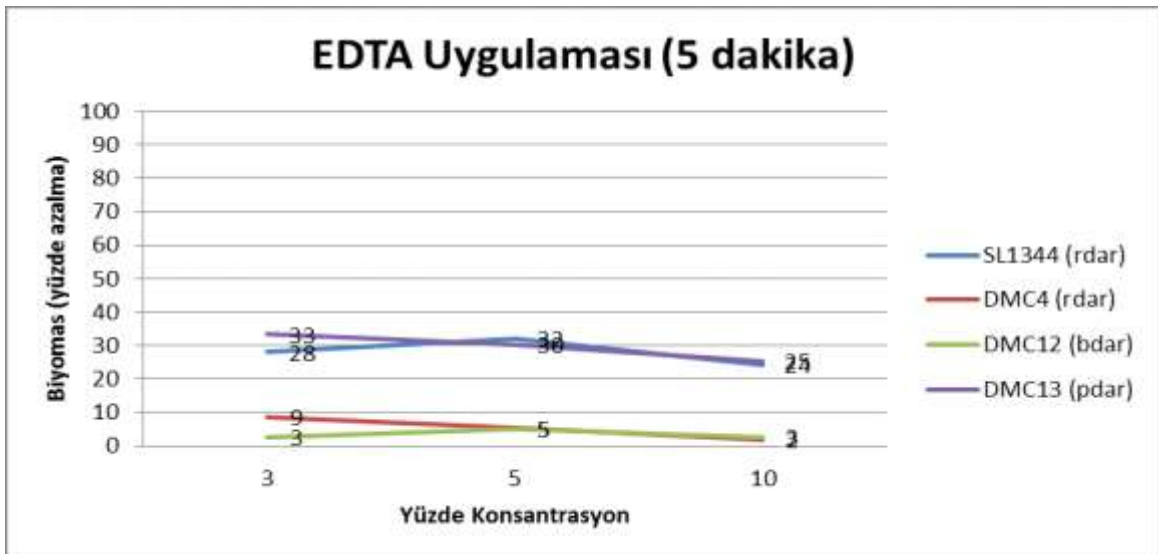
Şekil 5. 20. *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaka (polisitiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan sitrik asitin (CA) etkisi

Bir dakika süresince uygulanan EDTA'nın % 10 konsantrasyonu SL1344 üzerinde % 60 düzeyine kadar biyomas düşüşüne neden olmuştur (Şekil 5.21.). Bu süre içinde EDTA en az etkiyi DMC12 şuşunun oluşturduğu biyomas üzerine göstermiştir.



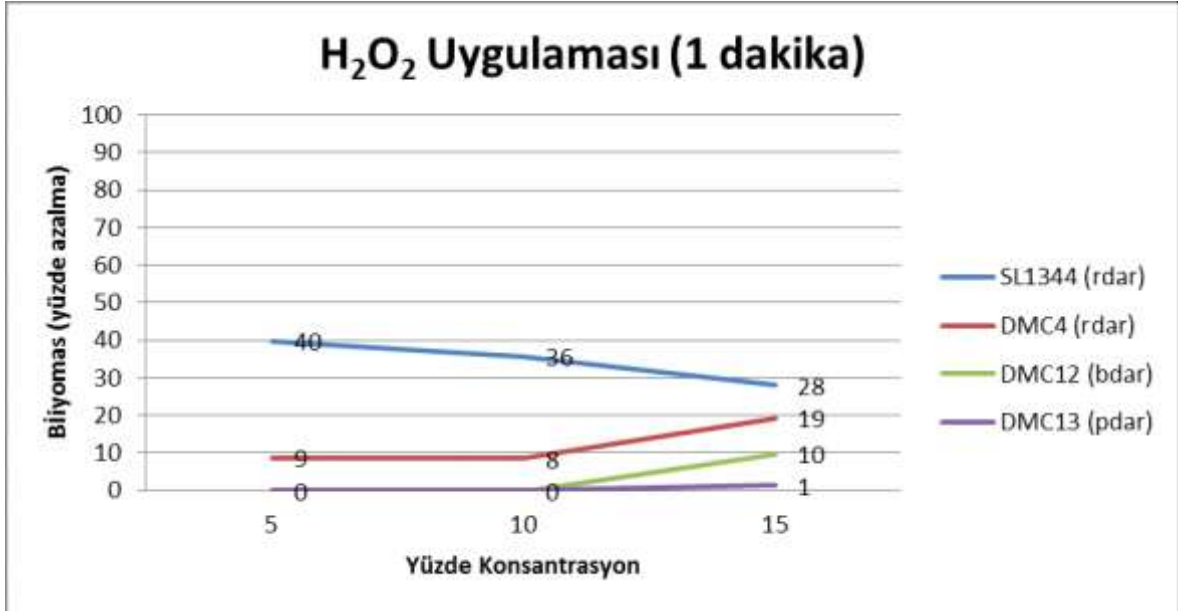
Şekil 5. 21. *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaka (polisitiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan EDTA'nın etkisi

Beş dakika süresince uygulanan EDTA, en yüksek etkiyi SL1344 ve DMC13 suşları tarafından oluşturulan biyomas üzerine göstermiştir. Ayrıca EDTA'nın % 10 konsantrasyonunun uygulama süresi 5 dk ya çıkarıldığında SL1344 suşunun biyoması üzerine olan etkinliğinde düşüş meydana gelmiştir (Şekil 5. 22.).



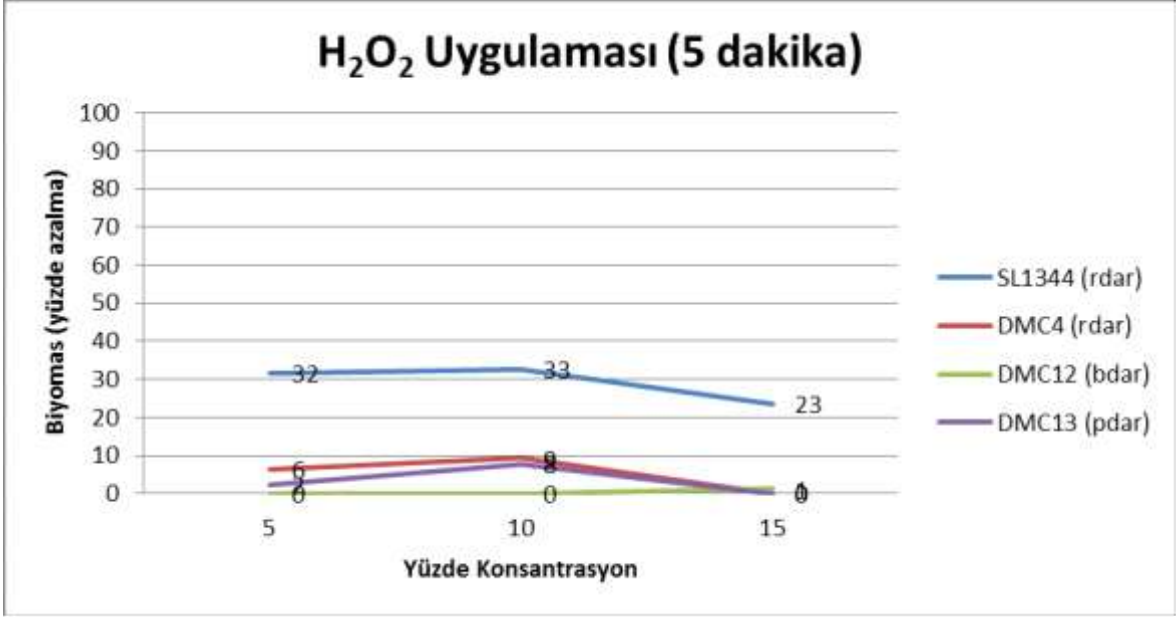
Şekil 5. 22. *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaka (polisitiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan EDTA'nın etkisi

Bir dakika süresince uygulanan hidrojen peroksit en fazla etkiyi % 5 konsantrasyonda % 40 azalmayla SL1344 suşunun biyoması üzerinde göstermiştir (Şekil 5.23.). Ayrıca bu süre içerisinde hidrojen peroksitin konsantrasyonunda meydana gelen artış, bu biyositin etkinliğinde belirgin bir artış meydana getirmemiştir.



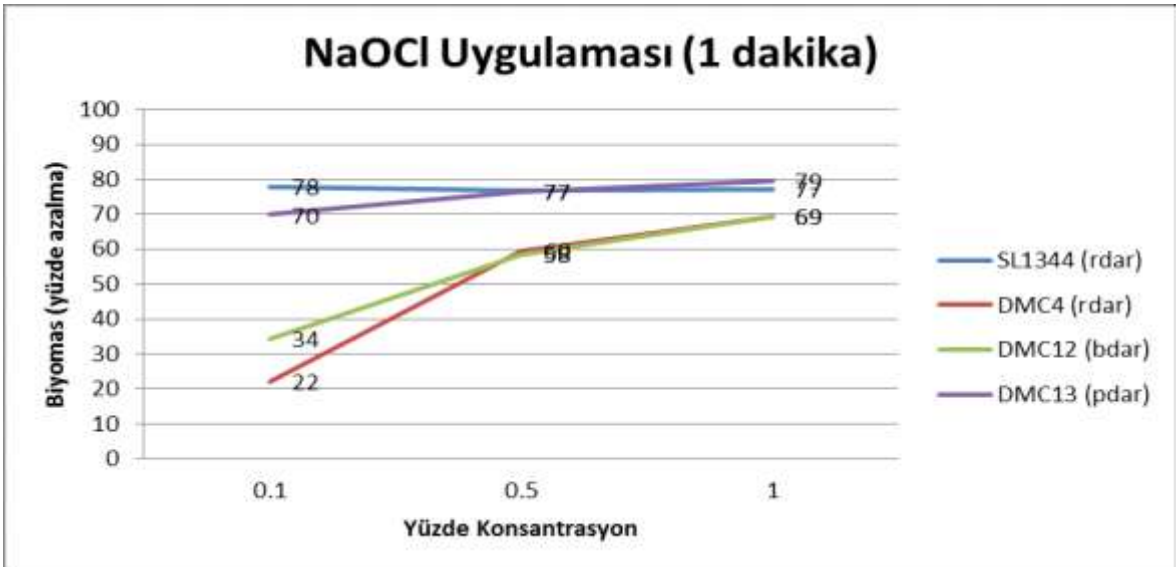
Şekil 5. 23. *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaka (polisitiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan hidrojen peroksit'in (H_2O_2) etkisi

Beş dakika süresince uygulanan hidrojen peroksit en yüksek etkiyi % 10 konsantrasyonda ve SL1344 suşu biyoması üzerinde (% 33 oranında azalma) göstermiştir (Şekil 5. 24.). Bunun yanında zaman artışı hidrojen peroksitin etkinliğinde belirgin bir artış meydana getirmemiştir.



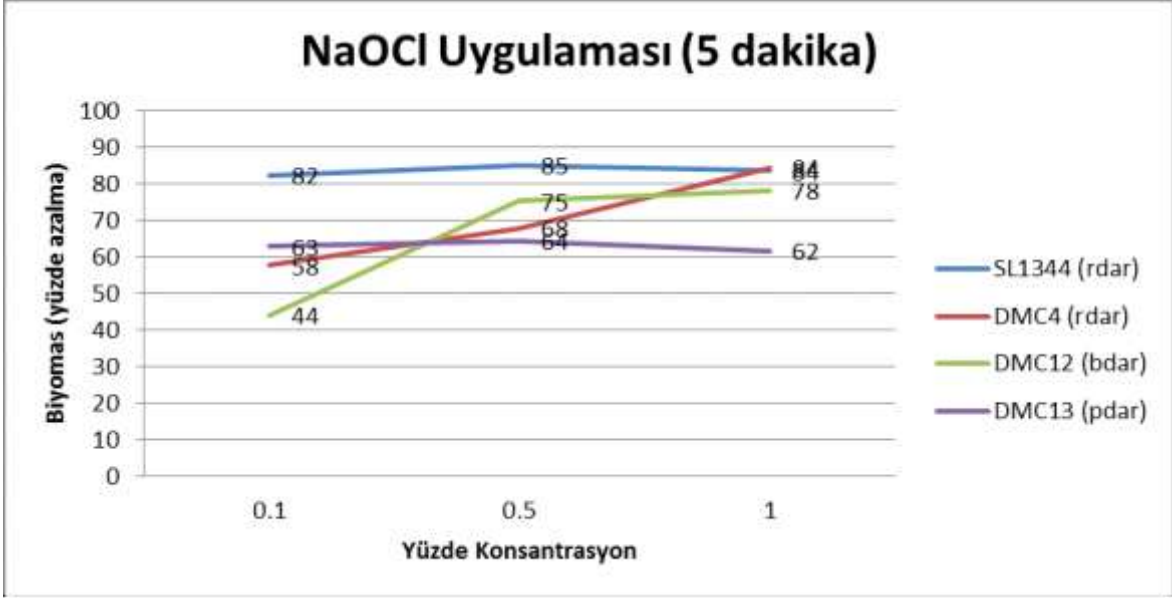
Şekil 5. 24. *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaka (polisitiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan hidrojen peroksit'in (H₂O₂) etkisi

Sodyum hipoklorit'in, bir dakika süresince, konsantrasyon artışının bu biyositin etkinliğinde belirgin bir artış meydana getirmiştir. Ayrıca bu süre içinde en büyük etkiyi % 1 konsantrasyonda % 79'luk azalmayla DMC13 suşunun biyoması üzerine göstermiştir (Şekil 5.25.).



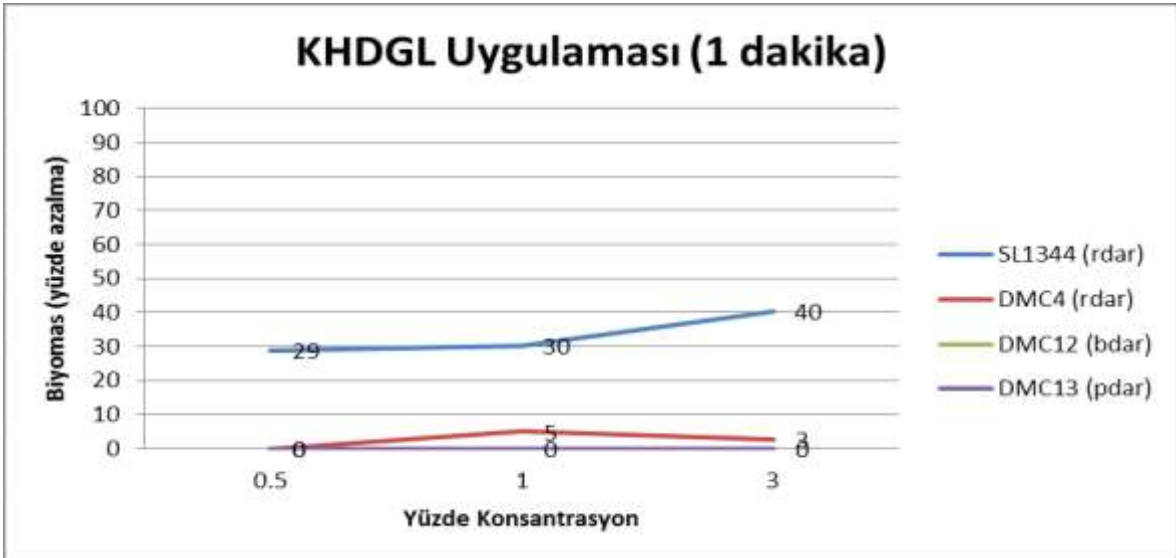
Şekil 5. 25. *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaka (polisitiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan sodyum hipokloritin (NaOCl) etkisi

Sodyum hipoklorit'in beş dakika uygulama süresince olan etkisine bakıldığı zaman, en yüksek etkiyi % 0.5 konsantrasyonda, SL1344 suşunun biyoması üzerinde gerçekleştiği (% 85 azalma) saptanmıştır (Şekil 5. 26.).



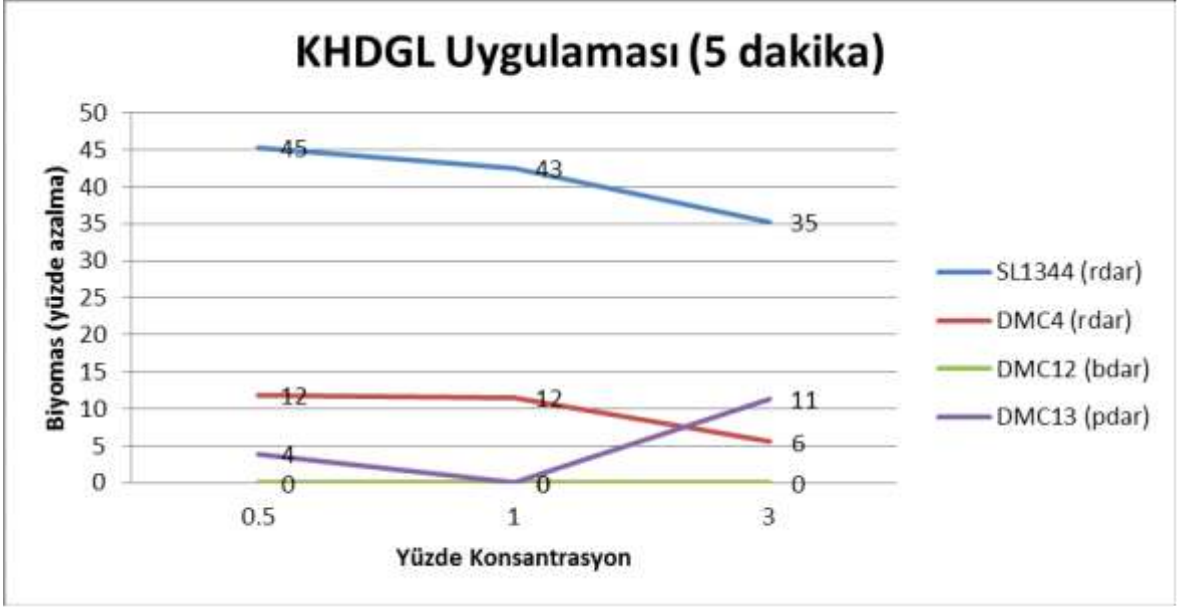
Şekil 5. 26. *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaka (polisitiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan sodyum hipokloritin (NaOCl) etkisi

Klorhekzidin diglukonat bir dakika süresince en az etkiyi DMC12 ve DMC13 suşlarının biyoması üzerine göstermiştir. Bu süre içerisinde en yüksek etkiyi % 3 konsantrasyonda ve SL1344 suşunun biyoması üzerinde gerçekleşmiştir (% 40 azalma) (Şekil 5.27.).



Şekil 5. 27. *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaka (polisitiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine bir dakika süresince uygulanan klorhekzidin diglukonat'ın (KHDGL) etkisi

Klorhekzidin diglukonat beş dakika uygulama süresi içerisinde en yüksek etkiyi % 0.5 konsantrasyonda ve SL1344 suşunun biyoması üzerine (% 45 azalma) göstermiştir (Şekil 5. 28.). Ayrıca denenen konsantrasyonlarda zaman artışının bu biyositin etkinliğini artırmadığı belirlenmiştir.



Şekil 5. 28. *Salmonella* suşlarının mikrotitre plaka (polisitiren) üzerinde geliştirilen biyofilmleri üzerine beş dakika süresince uygulanan klorheksidin diglukonat'ın (KHDGL) etkisi

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Doğada çok nadir olarak bulunduğu inanıldığı için ‘bdar’ ve ‘pdar’ morfotipli biyofilmler ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Fakat güncel araştırmalar ‘bdar’ morfotipli biyofilmlerin doğada zannedilenden daha yaygın olarak bulunduğunu ve ciddi kontaminasyonlara neden olduğunu göstermektedir (Nesse vd. 2005, Vestby vd. 2009, Karaca 2011). *Salmonella* tarafından oluşturulan biyofilmler en çok ‘rdar’ morfotipte tanımlanmaktadır. Bunun yanında ‘pdar’ ve ‘saw’ morfotiplere sahip biyofilm yapıları da örneklenmiştir (Solomon 2005, Vestby 2009). Bütün bu veriler, *Salmonella* suşlarının doğada farklı fenotipte biyofilm oluşturduğunu kanıtlamaktadır.

Biyofilm morfotipleri bakteriye bir çok avantaj sağlamaktadır. Örneğin; White vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada; rdar morfotipli biyofilmlerin, *Salmonella*’yı kurumaya karşı koruduğu ve sodyum hipoklorite olan dirençliliği önemli derecede yükselttiği, ayrıca *Salmonella*’nın konakçılar arasından yayılmasında önemli rol oynadığı saptanmıştır. Bir başka çalışmada ise; biyofilm matriksinin, özellikle selülöz ve kıvrımlı fimbriyanın, bakterinin gıda ortamlarında kalıcılığında önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Vestby 2009). Bu durum biyofilmlerle etkin bir mücadelenin geliştirilebilmesi için, bu fenotipik farklılıkların bakteriye sağladığı avantajların belirlenmesinin önemine işaret etmektedir. Bu tez çalışmasının amaçlarından biri antibiyofilm stratejilerinin yukarıda özetlenen gereksimin doğrultusunda belirlenmesidir. Bu nedenle çalışmamızda dezenfektanların bakterisidal etkilerini değerlendirmeden önce *Salmonella* suşlarının biyofilm morfotiplendirilmesi gerçekleştirilmiştir. SL1344 ve DMC4 kodlu *Salmonella* suşları rdar morfotipte biyofilm üretirken, DMC12 ve DMC13 kodlu *Salmonella* suşlarının sırasıyla bdar ve pdar morfotipli biyofilm ürettiği belirlenmiştir.

Dezenfektanların biyofilm yapıları üzerindeki etkilerini değerlendirmede, yeterli miktarda ve stabil biyofilm yapılarının kullanılması çok önemlidir. Çünkü biyofilmin miktarı ve stabilitesi artıca biyofilm içindeki bakterilerin dezenfektanlardan etkilenme olasılığı azalmaktadır. Örneğin kalın ve ince biyofilmlerin antimikrobiyal ajanlara karşı farklı bir direnç gösterdiği bilinmektedir. Kalın biyofilmlerin dezenfektanlara karşı bir bariyer görevi görerek dezenfektanların etkinliğini azaltmasının yanında, ince biyofilmlerin planktoniklerle karşılaştırıldığı zaman bazı dezenfektanlara karşı daha direçli olduğu da saptanmıştır (Cochran 2000). Bu nedenden dolayı yeterli miktarda ve daha stabil biyofilm

oluşturabilmek için bütün suşların optimum biyofilm oluşturma süreleri belirlenmiştir. Bütün suşların galvanizli paslanmaz çelik yüzey üzerinde optimum biyofilm oluşum süresi üç gün olarak belirlenirken, mikrotitre plaka üzerinde SL1344 (bir gün) hariç diğer suşlar için optimum biyofilm oluşturma süreleri aynı şekilde üç gün olarak saptanmıştır.

Paslanmaya ve korozyona karşı oldukça dirençli olduğu için, gıda endüstrisinde kullanılan soğutma kulelerinin ve kümes hayvanlarının taşınmasında kullanılan taşıma konteynirlerinin yüzeylerinde yaygın olarak galvanizli paslanmaz çelik kullanılmaktadır. Buralarda meydana gelen kontaminasyon hem sağlık hemde ekonomik açıdan büyük zararlara yol açabilir. Bu kontaminasyonun önüne geçmek için bu yüzeyin sanitasyonu kritik bir uygulamadır. Ayrıca fazla emek gerektirdiği için galvanizli paslanmaz çelik yüzeyler ile ilgili yapılan çalışmaların sınırlı olmasından dolayı, dezenfektanların bakterisidal etkilerini ortaya koyarken biyofilm oluşturma yüzeyi olarak bu yüzey tercih edilmiştir. Bunun yanında dezenfektanların biyomas üzerine olan etkilerini saptamak için ise, yine gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan polisitiren yüzey kullanılmıştır.

Farklı morfortipte biyofilm üreten tüm suşlar H₂O₂ hariç diğer dezenfektanlara karşı aynı toleransı göstermiştir. Bu sonuçlar Vestby vd. (2009) tarafından yapılan çalışmayla da paralellik göstermektedir. Hidrojen peroksit 5 dakika süresi içinde % 15 konsantrasyonda DMC4 (rdar biyofilm) ve DMC13 (pdar biyofilm) suşlarının biyofilmleri içindeki canlı hücrelerinin % 100' ünü eradike ederken, SL1344 (rdar biyofilm) ve DMC12 (bdar biyofilm) suşları için aynı etkiyi göstermemiştir. SL1344 ve DMC4 'ün aynı morfortipte biyofilm oluşturmalarına rağmen hidrojen peroksit olan dirençliliklerinin farklı olduğu görülmüştür. SL1344 ve DMC4 kodlu suşlar arasındaki bu farklılığa biyofilm incelik ve kalınlığı yanında orjin farklılığının da neden olabileceği düşünülmüştür (Cochran 2000, Vestby vd. 2009).

Etkili sanitasyonda dezenfektanların tipi de önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada NaOCl, etanol ve KHDGL kullanılan diğer dezenfektanlara göre daha etkili bulunmuştur. Örneğin; bir dakika uygulama süresince, % 0.1 NaOCl, % 40 etanol ve % 0.5 KHDGL galvanizli paslanmaz çelik kuponlar üzerinde geliştirilen biyofilm içerisindeki canlı bakterilerin % 100' ünü eradike etmiştir. Fakat Wong vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada *Salmonella*'nın pepler üzerinde geliştirilen üç günlük biyofilmleri üzerine bir dakika süresince %70' lik etanol, 50 mg/ml KHDGL ve 52.5 mg/ml NaOCl uyguladığı

zaman sırasıyla log 2.6, log 3.1 ve log 3.3'lük azalma belirlenmiştir. Bu iki çalışma arasındaki farkın, kullanılan yüzeyin farklı olmasından kaynaklandığı kuvvetli bir olasılıktır. Zira, paslanmaz çelik üzerinde üretilen *Salmonella* biyofilmlerinin plastik yüzey üzerinde üretilenlere göre dezenfektanlara karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Joseph et al. 2001). Yine çalışmamızda kullanılan Sitrik asit beş dakika süresi içerisinde % 5 konsantrasyonda *salmonella* suşlarının galvanizli paslanmaz çelik üzerinde üretilen biyofilmleri içerisindeki canlı bakteri sayısında log 2'lik azalma meydana getirirken, Wong vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada % 3.2'lik sitrik asitin beş dakika uygulama süresi içinde biyofilm içindeki bakterilerin % 100'ünü yok ettiği tespit edilmiştir. Çalışmalar arasındaki bu farklılık kullanılan yüzey ve biyofilm oluşturma şartlarına bağlıdır. Sonuç olarak bu tez çalışması, biyofilm morfoloji farklılığının bu çalışmada kullanılan dezenfektan konsantrasyonlarına karşı önemli bir direnç farklılığı sağlamasa da dezenfektanların etkinliklerinde biyofilm oluşma yüzeyinin önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca çalışma sonuçlarımız, gıda endüstrisinde kullanılan, galvanizli paslanmaz çelik yüzeylerin dezenfeksiyonunda etanol, KHDGL ve NaOCl kullanımının, ekonomi ve sağlık açısından önemli zararlara yol açan kontaminasyonlarla mücadelede ciddi katkılar sağlayacağına işaret etmektedir.

Dezenfektanların biyofilm eradikasyonu ve bakterisidal özelliklerinin paralel olmadığı araştırmamızda belirlenen bir diğer önemli noktadır. Örneğin; klor hekzidindiglukonat ve NaOCl galvanizli paslanmaz çelik üzerinde oluşturulan biyofilmler içindeki canlı bakterilerin sayısında logaritmik olarak % 100 azalmaya neden olurken, biyofilm eradikasyonunda aynı etkiyi gösterememiştir. Bu bulgular söz konusu biyositleri içeren dezenfektanları kullanmadan önce temizlik malzemelerinin kullanımının önemini göstermektedir. Sonuç olarak iyi bir biyosit biyofilm eradikasyonunu ve bakterisidal etkiyi bir arada göstermelidir. Çalışmamızda bu hedefe en yakın dezenfektan olarak sodyum hipoklorit saptanmıştır.

Dezenfektanların biyofilmler üzerine olan etkilerinin, bir çok faktör tarafından etkilendiği bilinmektedir. Bu durum yapılan bazı çalışmalar arasındaki çelişkiyi de açıklamaktadır. Dezenfektanların etkinliklerini ortaya koyarken bu faktörleri doğadakine daha yakın olarak ortaya koyacak yaklaşımlar geliştirilmelidir. Dezenfektanların tanımlanmasında kullanılan protokoller tam anlamıyla bu yaklaşımı yakalayamamıştır. Örneğin Calgary biyofilm sistemi (CBD) dezenfektanların biyofilm üzerine olan etkinliklerini araştırmada kullanılan

direk bir yöntemdir. Fakat bu sistemde kullanılan yüzey plastik olduğu için dezenfektanların etkinliğini etkileyen bir faktör olan biyofilm oluşma yüzeyini sadece tek tipte inceleme olanağı vermektedir. Aslında bu çalışmada bu yüzden pegler yerine galvanizli paslanmaz çelik yüzey tercih edilmiştir. Bunun dışında dezenfektanların biyofilmler üzerine olan etkinliğini araştırmada kullanılan bir diğer yaklaşım Avrupa yüzey testidir. Bu testte göre, canlı bakteri üzerine etkili dezenfeksiyon, log4 ten büyük azalma olarak tanımlanmaktadır. Fakat bu tez çalışmasında bazı dezenfektanların bu kriteri sağlasada, mikrotitre plak tekniğinde biyofilmlerin eradikasyonunda çok yetersiz oldukları belirlenmiştir. Ayrıca ticari olarak pazarlanan dezenfektanların değerlendirilmesinde çoğunlukla süspansiyon testi kullanılmaktadır. Bakteriler biyofilm yapısı içinde buldukları için bu yaklaşım da yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden dezenfektanların biyofilmler üzerine olan etkilerini daha doğru ortaya koyabilecek araçlara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak bu tez farklı morfotipte biyofilmlerin dezenfektanlara karşı sağladığı direnç farklılığını ortaya koymada ulusal düzeyde yapılan ilk çalışma olmasının yanında, ülkemizde gıda endüstrisinde patojen mikroorganizmalarla mücadelede de etkin dezenfektan politikasının belirlenmesinde yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

- Adams, P., Fowler, R., Kinsella, N., Howell, G., Farris, M., Coote, P., et al. 2001. Proteomic detection of PhoPQ- and acid-mediated repression of *Salmonella* motility. *Proteomics*, Vol.1(4); pp. 597–607.
- Ahmer, B. M., van Reeuwijk, J., Timmers, C. D., Valentine, P. J. and Heffron, F. 1998. *Salmonella* Typhimurium encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. *Journal of Bacteriology*, Vol.180(5); pp. 1185–1193.
- Allison, D. and Sutherland, I. 1987. The role of exopolysaccharide in adhesion of freshwater bacteria. *Journal Gen Microbiol.*, Vol.133; pp. 1319-27.
- Ando, T., Itakura, S., Uchii, K., Sobue, R. and Maeda, S. 2009. Horizontal transfer of non-conjugative plasmid in colony biofilm of *Escherichia coli* on food-based media. *World J Microbiol Biotechnol.*, Vol.25; pp. 1865–1869.
- Angelillo, I.F., Viggiani, N.M.A., Rizzo, L. and Bianco, A. 2000. Food handlers and foodborne diseases: Knowledge, attitudes, and reported behavior in Italy. *Journal of Food Protection*, Vol.63(3); pp. 381-385.
- Annous, B.A., Fratamico, P.M. and Smith, J.L. 2009. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *Journal of Food Science*, Vol.74(1); pp. 24-37.
- Anriany, Y., Sahu, S. N., Wessels, K. R., McCann, L. M. and Joseph, S. W. 2006. Alteration of the rugose phenotype in waaG and ddhC mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.72(7); pp. 5002–5012.
- Arnold, J.W. and Yates, I.E. 2009. Interventions for control of *Salmonella*: clearance of microbial growth from rubber picker fingers. *Poultry Science*, Vol.88(6); pp. 1292-1298.
- Asséré, A., Oulahal, N. and Carpentier, B. 2008. Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.104(6); pp. 1692-1702.
- Avsaroglu, D. 2007. Isolation, molecular characterization of food-borne drug resistant *Salmonella* spp. and detection of class I integrons. PhD Thesis, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, 153 p. Ankara.
- Barak, J. D., Gorski, L., Naraghi-Arani, P. and Charkowski, A. O. 2005. *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.71(10); pp. 5685–5691.
- Barnhart, M. M. and Chapman, M. R. 2006. Curli biogenesis and function. *Annual Review of Microbiology*, Vol.60; pp. 131–147.

- Bearson, B. L. and Bearson, S. M. 2008. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial Pathogenesis*, Vol.44(4); pp. 271–278.
- Bearson, B. L., Bearson, S. M., Lee, I. S. and Brunelle, B. W. 2010. The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium QseB response regulator negatively regulates bacterial motility and swine colonization in the absence of the QseC sensor kinase. *Microbial Pathogenesis*, Vol.48(6); pp. 214–219.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J.A., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B. and Ghigo, J.M. 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular Microbiology*, Vol.51(3); pp. 659-674.
- Benarde, M. A., Snow, W. B., Olivieri, V. P. and Davidson, B. 1967. Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. *Appl. Microbiol.*, Vol.15; pp. 257–265.
- Best, M., Springthorpe, V. S. and Sattar, S. A. 1994. Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: studies with a mixture of five types of micro-organisms. *Am. J. Infect. Control*, Vol.22; pp. 152–162.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Fiandaca, M. J., Pedersen, J., Hansen, C. R., Andersen, C. B., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatric Pulmonology*, 44(6), 547–558.
- Block, S. S. 1991. Peroxygen compounds, *In* S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*, pp. 167–181.
- Bloomfield, S. F. 1996. Chlorine and iodine formulations, *In* J. M. Ascenzi (ed.), *Handbook of disinfectants and antiseptics*.pp. 133–158.
- Boddicker, J. D., Ledebor, N. A., Jagnow, J., Jones, B. D. and Clegg, S. 2002. 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. *Molecular Microbiology*, Vol.45(5); pp. 1255–1265.
- Boles, B.R., Thoendel, M. and Singh, P.K. 2004. Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol.101; pp.16630–16635.
- Boles, B.R. and Singh, P.K. 2008. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol.105; pp. 12503–12508.
- Brand, M. T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, Vol.44; pp. 367-392.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R. and Swaminathan, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.38; pp. 2465-2467.

- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. and Dubois-Brissonnet, F. 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants. *Biofouling*, Vol.27(9); pp. 1017–1032.
- Brooks, J.D. and Flint, S.H. 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, Vol.43; pp. 2163-2176.
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C. and Landini, P. 2006. Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: Modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *Journal of Bacteriology*, Vol.188(6); pp. 2027–2037.
- Brooun, A. *et al.* 2000. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol.44; pp. 640–646.
- Brown, P. K., Dozois, C. M., Nickerson, C. A., Zuppardo, A., Terlonge, J. and Curtiss, R. 2001. MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, Vol.41(2); pp. 349–363.
- Burmolle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sorensen, S.J. and Kjelleberg, S. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol.*, Vol.72; pp. 3916–3923.
- Burmolle, M., Thomsen, T. R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homoe, P., *et al.* 2010. Biofilms in chronic infections—a matter of opportunity—monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Vol.59(3); pp. 324–336.
- Bush, L. E., Benson, L. M. and White, J. H. 1986. Pig skin as a test substrate for evaluating topical antimicrobial activity. *J. Clin. Microbiol.*, Vol.24; pp. 343–348.
- Cabeza, M. L., Aguirre, A., Soncini, F. C. and Vescovi, E. G. 2007. Induction of RpoS degradation by the two-component system regulator RstA in *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, Vol.189(20); pp. 7335–7342.
- Camper, A. K. and McFeters, G. A. 1979. Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.37; pp. 633– 641.
- Chandy, J.P. and Angles, M.L. 2001. Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay. *Water Res.*, Vol.35; pp. 2677–82.
- Charles, R. C., Harris, J. B., Chase, M. R., Lebrun, L. M., Sheikh, A., LaRocque, R. C., *et al.* 2009. Comparative proteomic analysis of the PhoP regulon in *Salmonella enterica* serovar Typhi versus Typhimurium. *PLoS ONE*, Vol.4(9); pp. 6994.
- Chia, T.W.R., Goulter, R.M., McMeekin, T., Dykes, G.A. and Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, Vol.26; pp. 853-859.

- Chirwa, N. T. and Herrington, M. B. 2003. CsgD, a regulator of curli and cellulose synthesis, also regulates serine hydroxymethyltransferase synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, Vol.149(2); pp. 525–535.
- Chmielewski, R.A.N. and Frank, J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr Rev Food Sci Food Safety*, Vol.2; pp. 22–32.
- Choi, E., Groisman, E. A. and Shin, D. 2009. Activated by different signals, the PhoP/PhoQ two-component system differentially regulates metal uptake. *Journal of Bacteriology*, Vol.191(23); pp. 7174–7181.
- Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Kourkoutas, Y. and Nychas, G.J. 2010. Inhibition of the early stage of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis biofilm development on stainless steel by cell-free supernatant of a *Hafnia alvei* culture. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.76(6); pp. 2018-2022.
- Clarke, D. J. 2010. The Rcs phosphorelay: More than just a two-component pathway. *Future Microbiology*, Vol.5(8), pp. 1173–1184.
- Cochran, W.L. *et al.* 2000. Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine. *J. Appl. Microbiol.* Vol.88; pp. 22–30.
- Collinson, S. K., Clouthier, S. C., Doran, J. L., Banser, P. A. and Kay, W. W. 1996. *Salmonella* enteritidis agfBAC operon encoding thin, aggregative fimbriae. *Journal of Bacteriology*, Vol.178(3); pp. 662–667.
- Cos, P., Toté, K., Horemans, T. and Maes, L. 2010. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy. *Current Pharmaceutical Design*, Vol.16(20); pp. 2279-2295.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D.R. and Lappinscott, H.M. 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 49; pp. 711-745.
- Crago, A. M. and Koronakis, V. 1999. Binding of extracellular matrix laminin to *Escherichia coli* expressing the *Salmonella* outer membrane proteins Rck and PagC. *FEMS Microbiology Letters*, Vol.176(2); pp. 495–501.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. and Penades, J. R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, Vol.183(9); pp. 2888–2896.
- Dagely, S., Dawes, E. A. and Morrison, G. A. 1950. Inhibition of growth of *Aerobacter aerogenes*: the mode of action of phenols, alcohols, acetone and ethyl acetate. *J. Bacteriol.* Vol.60; pp. 69–378.
- Danese, P. N., Pratt, L. A. and Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, Vol.182(12); pp. 3593–3596.

- Davey, M.E. and O'Toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol.64(4), pp. 847-867.
- Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews. Drug Discovery*, Vol.2(2); pp. 114–122.
- De Beer, D. *et al.* 1994 Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.60; pp. 4339–4344.
- De Keersmaecker, S. C., Sonck, K. and Vanderleyden, J. 2006. Let LuxS speak up in AI-2 signaling. *Trends in Microbiology*, Vol.14(3); pp. 114–119.
- De Rezende, C. E., Anriany, Y., Carr, L. E., Joseph, S. W. and Weiner, R. M. 2005. Capsular polysaccharide surrounds smooth and rugose types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.71(11); pp. 7345–7351.
- De Wulf, P., Kwon, O. and Lin, E. C. 1999. The CpxRA signal transduction system of *Escherichia coli*: Growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons. *Journal of Bacteriology*, Vol.181(21); pp. 6772–6778.
- Denyer, S. P. 1995. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* Vol.36; pp. 227–245.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol.15(2); pp. 167-193.
- Dorel, C., Lejeune, P. and Rodrigue, A. 2006. The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Research in Microbiology*, Vol.157(4); pp. 306–314.
- Driffield, K., Miller, K., Bostock, J.M., O'Neill, A.J. and Chopra, I. 2008. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother.*, Vol.61; pp. 1053–1056.
- Dukan, S. and D. Touati. 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J. Bacteriol.*, Vol.178; pp. 6145–6150.
- Dye, M. and G. C. Mead. 1972. The effect of chlorine on the viability of clostridial spores. *J. Food Technol.*, Vol.7; pp. 173–181.
- Dyzel, J. L., Smith, J. N., Lucas, D. E., Soares, J. A., Swearingen, M. C., Vross, M. A., et al. 2010. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium can detect acyl homoserine lactone production by *Yersinia enterocolitica* in mice. *Journal of Bacteriology*, Vol.192(1); pp. 29–37.
- Escartin, E.F., Lozano, J.S. and Garcia, O.R. 2000. Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *Int. J. Food Microbiology*, Vol.54(2); pp. 19-25.

- Evans, D.J. *et al.* 1991. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Expression of the SdiA regulon. *Journal of Bacteriology*, Vol.185(4); pp. 1357–1366.
- Fitzgerald, K. A., Davies, A. and Russell, A. D. 1989. Uptake of ¹⁴C-chlorhexidine diacetate to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and its release by azolectin. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol.60; pp. 327–332.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, Vol.8(9); pp. 623-633.
- Galán, J.E. 2008. Energizing type III secretion machines: what is the fuel? *Nat Struct Mol Biol*, Vol.15(2); pp. 127-8.
- Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N. and Koonin, E. V. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letters*, Vol.203(1); pp. 11–21.
- Ganesh Kumar, S. and Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.42; pp. 9-27.
- Garcia, B., Latasa, C., Solano, C., Garcia-del Portillo, F., Gamazo, C. and Lasa, I. 2004. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, Vol.54(1); pp. 264–277.
- Gardner, J. F. and Gray, K. G. 1991. Chlorhexidine, *In* S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*, pp. 251–270.
- Gerstel, U. and Römling, U. 2001. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. *Environmental Microbiology*, Vol.3(10); pp. 638–648.
- Gerstel, U., Park, C. and Römling, U. 2003. Complex regulation of csgD promoter activity by global regulatory proteins. *Molecular Microbiology*, Vol.49(3); pp. 639–654.
- Gerstel, U. and Römling, U. 2003. The csgD promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. *Research in Microbiology*, Vol.154(10); pp. 659–667.
- Gerstel, U., Kolb, A. and Römling, U. 2006. Regulatory components at the csgD promoter—Additional roles for OmpR and integration host factor and role of the 5' untranslated region. *FEMS Microbiology Letters*, Vol.261(1); pp. 109–117.
- Giaouris, E.D., Chorianopoulos, N. and Nychas, G.J.E. 2005. 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*, Vol.68(10); pp. 2149-2154.
- Giaouris, E.D. and Nychas, G.J.E. 2006. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*, Vol.23; pp. 747-752.

- Gibson, D. L., White, A. P., Snyder, S. D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., et al. 2006. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *Journal of Bacteriology*, Vol.188(22); pp. 7722–7730.
- Gibson, D.L., White, A.P., Rajotte, C.M. and Kay, W.W. 2007. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* enteritidis. *Microbiology*, Vol.153(4); pp. 1131-40.
- Gilbert, P., Allison, D.G. and McBain, A.J. 2002. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of Applied Microbiology*, Vol.92; pp. 98-110.
- Girenavar, B., Cepeda, M.L., Soni, K.A., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G.K., Pillai, S.D. and Patil, B.S. 2008. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.125; pp. 204-208.
- Goller, C.C. and Romeo, T. 2008. Environmental influences on biofilm development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol.322; pp. 37-66.
- Gorman, S. and Scott, E. 2004. “Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives” Denyer, SP., Hodges, NA., Gorman, SP., (Eds.) *Hugo and Russell’s Pharmaceutical Microbiology*, pp.285–305.
- Grantcharova, N., Peters, V., Monteiro, C., Zakikhany, K. and Römling, U. 2010. Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, Vol.192(2); pp. 456–466.
- Gray, J. T. and Fedorka-Cray, P. J. 2002. *Salmonella*. In Cliver, D. O. and Riemann, H. P. (Eds.). *Foodborne diseases*, pp. 55-68.
- Guillier, M., Gottesman, S. and Storz, G. 2006. Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes and Development*, Vol.20(17); pp. 2338–2348.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, Vol.2; pp. 95-108.
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, Vol.11(7); pp. 1034–1043.
- Hamilton, S., Bongaerts, R.J., Mulholland, F., Cochrane, B., Porter, J., Lucchini, S., Lappin-Scott, H.M. and Hinton, J.C. 2009. The transcriptional programme of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC Genomics*, Vol.10; pp. 599.
- Hanes, D. 2003. Nontyphoid *Salmonella*. *International handbook of foodborne pathogens*, pp. 137-149.

- Hannan, S., Ready, D., Jasni, A.S., Rogers, M., Pratten, J. and Roberts, A.P. 2010. Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, Vol.59; pp. 345–349.
- Hassett, D. J., Korfhagen, T. R., Irvin, R. T., Schurr, M. J., Sauer, K., Lau, G. W., et al. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: Insights into pathogenic processes and treatment strategies. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, Vol.14(2); pp. 117–130.
- Heffernan, E. J., Reed, S., Hackett, J., Fierer, J., Roudier, C. and Guiney, D. 1992. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by the *Salmonella* Typhimurium virulence plasmid gene rck. *Journal of Clinical Investigation*, Vol.90(3); pp. 953–964.
- Heilmann, C. 1996. Molecular basis of intracellular adhesion in the biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.*, Vol.20(5); pp.1083-1091.
- Hengge, R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol.66(3); pp. 373–395.
- Hengge, R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, Vol.7(4); pp. 263–273.
- Hiom, S. J., Furr, J. R., Russell, A. D. and Dickinson, J. R. 1992. Effects of chlorhexidine diacetate on *Candida albicans*, *C. glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Bacteriol.*, Vol.72; pp. 335–340.
- Hiom, S. J., Furr, J. R., Russell, A. D. and Dickinson, J. R. 1993. Effects of chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride on whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbios*, Vol.74; pp. 111–120.
- Hood, S. K. And Zottola, E. A. 1997. Adherence to stainless stain by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Food Microbiol*, Vol.37; pp. 145-153.
- Huang, K. J. and Igo, M. M. 1996. Identification of the bases in the ompF regulatory region, which interact with the transcription factor OmpR. *Journal of Molecular Biology*, Vol.262(5); pp. 615–628.
- Huang, C-T. *et al.* 1998. Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.64; pp. 1526–1531.
- Hugo, W. B. and Longworth, A. R. 1964. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J. Pharm. Pharmacol.* Vol.16; pp. 655–662.
- Hugo, W. B. and Longworth, A. R. 1966. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic content, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.* Vol.18; pp. 569–578.

- Iibuchi, R., Hara-Kudo, Y., Hasegawa, A. and Kumagai, S. 2010. Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. *Journal of Food Protection*, Vol.73(8); pp. 1506-1510.
- Jenal, U. and Malone, J. 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Review of Genetics*, Vol.40; pp. 385–407.
- Irie, Y. and Parsek, M.R. 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol.322; pp. 67-84.
- James, G.A., Beaudette, L. and Costerton, J.W. 1995. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, Vol.15; pp. 257-262.
- Jesudhasan, P. R., Cepeda, M. L., Widmer, K., Dowd, S. E., Soni, K. A., Hume, M. E., et al. 2010. Transcriptome analysis of genes controlled by luxS/autoinducer-2 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol.7(4); pp. 399–410.
- Jonas, K., Edwards, A. N., Ahmad, I., Romeo, T., Römling, U. and Melefors, O. 2010. Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella* Typhimurium. *Environmental Microbiology*, Vol.12(2); pp. 524–540.
- Jones, K. and Bradshaw, S.B. 1997. Synergism in biofilm formation between *Salmonella enteritidis* and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.82; pp. 663-668.
- Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.64(3); pp. 367-372.
- Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M. and Römling, U. 2006. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, Vol.60(3); pp. 602–616.
- Karacan, B. 2011. Türkiye’den izole edilen *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin tanımlanması. YÖK, 119 p. Web sitesi, www.yok.org. Erişim Tarihi: 04.05.2013
- Kato, A. and Groisman, E. A. 2008. The PhoQ/PhoP regulatory network of *Salmonella enterica*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol.631; pp. 7–21.
- Kelly, B.G., Vespermann, A. and Bolton, D.J. 2009. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food Chem Toxicol*, Vol.47; pp. 969–977.
- Kolter, R. & Greenberg, E.P. (2006). The superficial life of microbes. *Nature*, Vol.441(7091); pp. 300-302

- Kim, W. And Surette, M.G. 2003. Swarming populations of *Salmonella* represent a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance. *Biological Procedures Online*, Vol.5; pp. 189-196.
- Kim, S.H. and Wei, C.I. 2009. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium DT104 on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, Vol.72(9); pp. 1841-1847.
- Klein, M. and A. Deforest. 1983. Principles of viral inactivation. *In* S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization and preservation*, pp. 422–434.
- Korber, D.R., Choi, A., Wolfaardt, G.M., Ingham, S.C. and Caldwell, D.E. 1997. Substratum topography influences susceptibility of *Salmonella* enteritidis biofilms to trisodium phosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.63; pp. 3352–3358.
- Kulikovsky, A., Pankratz, H. S. and Sadoff, H. L. 1975. Ultrastructural and chemical changes in spores of *Bacillus cereus* after action of disinfectants. *J. Appl. Bacteriol.*, Vol.38; pp. 39–46.
- Lambert, R.J.W. and Johnston, M.D. 2001. The effect of interfering substances on the disinfection process: a mathematical model. *J Appl Microbiol.*, Vol.91; pp. 548–555.
- Lamprokostopoulou, A., Monteiro, C., Rhen, M. and Römling, U. 2010. Cyclic di-GMP signalling controls virulence properties of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium at the mucosal lining. *Environmental Microbiology*, Vol.12(1); pp. 40–53.
- Lapidot, A. and Yaron, S. 2009. Transfer of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium from contaminated irrigation water to parsley is dependent on curli and cellulose, the biofilm matrix components. *Journal of Food Protection*, Vol.72(3); pp. 618–623.
- Larson, E. L., and H. E. Morton. 1991. Alcohols, *In* S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*, pp. 191–203.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penades, J. R., et al. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, Vol.58(5); pp. 1322–1339.
- Lazazzera, B.A. 2005. Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, Vol.8(2); pp. 222-227.
- Ledeboer, N. A. and Jones, B. D. 2005. Exopolysaccharide sugars contribute to biofilm formation by *Salmonella* enterica serovar Typhimurium on HEp-2 cells and chicken intestinal epithelium. *Journal of Bacteriology*, Vol.187(9); pp. 3214–3226.
- Ledeboer, N. A., Frye, J. G., McClelland, M. and Jones, B. D. 2006. *Salmonella* enterica serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infection and Immunity*, Vol.74(6); pp. 3156–3169.

- Leriche, V., Briandet, R. and Carpentier, B. 2003. Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environmental Microbiology*, Vol.5(1); pp. 64–71.
- Levinson, W. and Jawetz E. 2004. *Medical Microbiology and Immunology*. Lange Medical Books, pp.89-92.
- Iibuchi, R., Hara-Kudo, Y., Hasegawa, A. and Kumagai, S. 2010. Survival of *Salmonella* on a polypropylene surface under dry conditions in relation to biofilm-formation capability. *Journal of Food Protection*, Vol.73(8); pp. 1506-1510.
- Lindsay, D. and von Holy, A. 2006. What food safety professionals should know about bacterial biofilms. *British Food Journal*, Vol.108(1); pp. 27-37.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J. and Savoie, L. 1991. Characterisation of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.57; pp. 1969-1973.
- Mah, T.F.C. and O’Toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, Vol.9(1); pp. 34-39.
- Majdalani, N. and Gottesman, S. 2005. The Rcs phosphorelay: A complex signal transduction system. *Annual Review of Microbiology*, Vol.59; pp. 379–405.
- Marsh, P.D. 2005. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *Journal of Clinical Periodontology*, Vol.32(6); pp. 7-15.
- Mariscotti, J. F. and Garcia-del Portillo, F. 2009. Genome expression analyses revealing the modulation of the *Salmonella* Rcs regulon by the attenuator IgaA. *Journal of Bacteriology*, Vol.191(6); pp. 1855–1867.
- Matthysse, A.G., Holmes, K.V. and Gurlitz, R.H. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *Journal Bacteriol*, Vol.145; pp. 583-595.
- McKenna, S. M. and Davies, K. J. A. 1988. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. *Biochem. J.* Vol.254; pp. 685–692.
- Mechin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. and Leveau, J.Y. 1999. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J Appl Microbiol.*, Vol.86; pp. 859–866.
- Merighi, M., Carroll-Portillo, A., Septer, A. N., Bhatiya, A. and Gunn, J. S. 2006. Role of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium two-component system PreA/PreB in modulating PmrA-regulated gene transcription. *Journal of Bacteriology*, Vol.188(1); pp. 141–149.

- Merighi, M., Septer, A. N., Carroll-Portillo, A., Bhatiya, A., Porwollik, S., McClelland, M., et al. 2009. Genome-wide analysis of the PreA/PreB (QseB/QseC) regulon of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiology*, Vol.9; pp. 42.
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, Vol.55; pp. 165-199.
- Mireles, J. R., Toguchi, A. and Harshey, R. M. 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, Vol.183(20); pp. 5848–5854.
- Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol.14; pp. 255-261.
- Momba, M.N.B. and Kaleni, P. 2002. Regrowth of survival indicator microorganisms on the surface of household container used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa. *Water Res*, Vol.36; pp. 3023-3028.
- Moons, P., Michiels, C.W. and Aertsen, A. 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol.35(3); pp. 157-168.
- Moreira, C. G., Weinshenker, D. and Sperandio, V. 2010. QseC mediates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence in vitro and in vivo. *Infection and Immunity*, Vol.78(3); pp. 914–926.
- Møretrø, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Storheim, S.E., Kotlarz, K. and Langsrud, S. 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.106(3); pp. 1005-1012.
- Morgan, E., Campbell, J. D., Rowe, S. C., Bispham, J., Stevens, M. P., Bowen, A. J., et al. 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, Vol.54(4); pp. 994–1010.
- Morton, H. E. 1983. Alcohols, *In* S. S. Bloch (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*, 3rd ed. Lea & Febiger, pp. 225–239.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Levin, S.A. and Foster, K.R. 2008. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology*, Vol.6(1); pp.14.
- Navarre, W. W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S. J., et al. 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science*, Vol.313(5784); pp. 236–238.
- Nett, J.E., Guite, K.M., Ringeisen, A., Holoyda, K.A. and Andes, D.R. 2008. Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, Vol.52; pp. 3411–3413.

- Nguyen, K.T., Piastro, K., Gray, T.A. and Derbyshire, K.M. 2010. Mycobacterial biofilms facilitate horizontal DNA transfer between strains of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal Bacteriol*, Vol.192; pp. 5134–5142.
- Ogasawara, H., Hasegawa, A., Kanda, E., Miki, T., Yamamoto, K. and Ishihama, A. 2007. Genomic selex search for target promoters under the control of the PhoQP-RstBA signal relay cascade. *Journal of Bacteriology*, Vol.189(13); pp. 4791–4799.
- Ogasawara, H., Yamada, K., Kori, A., Yamamoto, K. and Ishihama, A. 2010. Regulation of the *Escherichia coli* csgD promoter: Interplay between five transcription factors. *Microbiology*, Vol.156(8); pp. 2470–2483.
- Oliveira, K., Oliveira, T., Teixeira, P., Azeredo, J., Henriques, M. and Oliveira, R. 2006. Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella* Enteritidis serotypes to materials used in kitchens. *Journal of Food Protection*, Vol.69(10); pp. 2352-2356.
- Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P. and Iglewski, B.H. 1999. Quinolone signaling in the cell-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Nat Acad Sci.*, Vol.96(20); pp. 11229-34.
- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zelver, N. and Stewart, P.S. 2003. A microtiter plat screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods*, Vol.54; pp. 269 – 276.
- Popoff, M. Y. and Le Minor, L.E. 2005. Genus XXXIII *Salmonella*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol.2; pp. 764-787.
- Potera, C. 1999. Forging a link between biofilms and disease. *Science*, Vol.283; pp. 1837–1838
- Prouty, A. M., Schwesinger, W. H. and Gunn, J. S. 2002. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infection and Immunity*, Vol.70(5); pp. 2640–2649.
- Prouty, A. M. and Gunn, J. S. 2003. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity*, Vol.71(12); pp. 7154–7158.
- Pui, C. F. Wong, W. C. Chai, L. C. Tunung, R. Jeyaletchumi, P. Noor Hidayah, M. S. Ubong, A. Farinazleen, M. G. Cheah, Y.K. and Son, R. 2011. *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, Vol.18; pp. 465-473.
- Chmielewski, R.A.N. and Frank, J.F. 2003 , *Comprehensive reviews in food science and food safety*, Institute of Food Technologists, Vol.2; pp. 22-32.
- Ramesh, N., Joseph, S. W., Carr, L. E., Douglass, L. W. and Wheaton, F. W. 2002. Evaluation of Chemical Disinfectants for the Elimination of *Salmonella* Biofilms from Poultry Transport Containers. *Poultry Science*, Vol.81; pp. 904–910.
- Ranganathan, N. S. 1996. Chlorhexidine. *Handbook of disinfectants and antiseptics*. pp. 235–264.

- Remis, J.P., Costerton, J.W. and Auer, M. 2010. Biofilms: structures that may facilitate cell-cell interactions. *ISME Journal*, Vol.4(9); pp. 1085-1087.
- Reisner, A., Haagensen, J. A., Schembri, M. A., Zechner, E. L. and Molin, S. 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular Microbiology*, Vol.48(4); pp. 933–946.
- Robbe-Saule, V., Jaumouille, V., Prevost, M. C., Guadagnini, S., Talhouarne, C., Mathout, H., et al. 2006. Crl activates transcription initiation of RpoS-regulated genes involved in the multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, Vol.188(11); pp. 3983–3994.
- Robbe-Saule, V., Jaumouille, V., Prevost, M. C., Guadagnini, S., Talhouarne, C., Mathout, Rodriguez-Navarro, D. N., Dardanelli, M. S. and Ruiz-Sainz, J. E. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiology Letters*, Vol.272(2); pp. 127–136.
- Rodrigues, D., Teixeira, P., Oliveira, R. and Azeredo, J. 2011. *Salmonella enterica* Enteritidis biofilm formation and viability on regular and triclosan-impregnated bench cover materials. *Journal of Food Protection*, Vol.74(1); pp. 32-37.
- Rosenberg, A., Alatary, S. D. and Peterson, A. F. 1976. Safety and efficacy of the antiseptic chlorhexidine gluconate. *Surg. Gynecol. Obstet.* Vol.143; pp. 789– 792.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., et al. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, Vol.325(6101), pp. 279–281.
- Römling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K. and Normark, S. 1998. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular Microbiology*, Vol.28(2); pp. 249–264.
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D. and Normark, S. 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *Journal of Bacteriology*, Vol.180(3), pp. 722–731.
- Römling, U. and Rohde, M. 1999. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella* Typhimurium on the community level. *FEMS Microbiology Letters*, Vol.180(1); pp. 91–102.
- Römling, U., Rohde, M., Olsen, A., Normark, S. and Reinkoster, J. 2000. *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, Vol.36(1); pp. 10–23.
- Römling, U., Bokranz, W., Rabsch, W., Zogaj, X., Nimtz, M. and Tschape, H. 2003. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology*, Vol.293(4); pp. 273–285.

- Römling, U. 2005. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol.62(11); pp. 1234–1246.
- Römling, U. and Amikam, D. 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current Opinion in Microbiology*, Vol.9(2); pp. 218–228.
- Russell, A. D. and Hugo, W. B. 1988. Perturbation of homeostatic mechanisms in bacteria by pharmaceuticals, *J. Hosp. Infect.*, pp. 206–219.
- Russell, A. D. 1991. Chemical sporicidal and sporostatic agents. *J Hosp Infect.*, pp. 365–376.
- Russell, A. D., and M. J. Day. 1993. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J. Hosp. Infect.* Vol.25; pp. 229–238.
- Russell AD. 1999. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *J Hosp Infect.*, Vol. 43; pp. 57.
- Sauer, K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, Vol.4(6); pp. 219.
- Scherer, C. A. and Miller, S. I. 2001. Molecular pathogenesis of *Salmonella*. *Principles of bacterial pathogenesis*, pp. 265-316.
- Shemesh, M., Tam, A. and Steinberg, D. 2007. Differential gene expression profiling of *Streptococcus* mutants cultured under biofilm and planktonic conditions. *Microbiology*, Vol.153; pp. 1307-1317.
- Shia, X. and Zhua, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, Vol.20; pp. 407-413.
- Shu, M., Browngardt, C.M., Chen, Y.Y.M. and Burne, R.A. 2003. Role of urease enzymes in stability of a 10-species oral biofilm consortium cultivated in a constant-depth film fermenter. *Infect Immun*, Vol.71; pp. 7188–7192.
- Simões, M., Simões, L.C. and Vieira, M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT- Food Sci Technol*, Vol(43); pp. 573–83.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. and Römling, U. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology*, Vol.53(4); pp. 1123–1134.
- Simm, R., Lusch, A., Kader, A., Andersson, M. and Römling, U. 2007. Role of EAL containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, Vol.189(9); pp. 3613–3623.
- Sinde, E. and Carballo, J. 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, Vol.17; pp. 439-447.

- Smith, J. N. and Ahmer, B. M. 2003. Detection of other microbial species by *Salmonella*: Expression of the SdiA regulon. *Journal of Bacteriology*, Vol.185(4); pp. 1357–1366.
- Smith, K. and Hunter, I.S. 2008. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal Med Microbiol*, Vol.57; pp. 966–973.
- Smith, J. L., Fratamico, P. M. and Yan, X. 2011. Eavesdropping by Bacteria: The Role of SdiA in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Quorum Sensing. *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol.8(2); pp. 169–178.
- Snyder, D. S., Gibson, D., Heiss, C., Kay, W. and Azadi, P. 2006. Structure of a capsular polysaccharide isolated from *Salmonella enteritidis*. *Carbohydrate Research*, Vol.341(14); pp. 2388–2397.
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., et al. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: Critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, Vol.43(3); pp. 793–808.
- Solomon, E.B., Niemira, B.A., Sapers, G.M. and Annous, B.A. 2005. Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *Journal of Food Protection*, Vol.68(5); pp. 906-912.
- Soni, K.A., Jesudhasan, P.R., Cepeda, M., Williams, B., Hume, M., Russell, W.K., Jayaraman, A. and Pillai, S.D. 2008. Autoinducer AI-2 is involved in regulating a variety of cellular processes in *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol.5(2); pp. 147-153.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C.J. 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, Vol.45; pp. 502–531.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal Microbiol Methods*, Vol.40; pp. 175 – 179.
- Stewart, P.S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J.G., Lewandowski, Z., Ochsner, U.A. and Hassett, D.J. 2000. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, Vol.66; pp. 836– 838.
- Stewart, P.S., Rayner, J., Roe, F. and Rees, W.M. 2001. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *Journal Appl Microbiol*, Vol.91; pp. 525–532.
- Stock, I. and Wiedemann, B. 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol.16; pp. 211-217.
- Suar, M., Jantsch, J., Hapfelmeier, S., Kremer, M., Stallmach, T. and Barrow, P.A. 2006. Virulence of broad- and narrow-host-range *Salmonella enterica* serovars in the streptomycin-pretreated mouse model. *Infection and Immunology*, Vol.74(1); pp. 632-644.

- Suci, P.A. et al. 1994. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother*, Vol.38; pp. 2125–2133.
- Surette, M. G., Miller, M. B., and Bassler, B. L. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.96(4); pp. 1639–1644.
- Suzuki, S. 1994. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. *Int. J. Food Microbiology*, Vol.21(2); pp. 89-105.
- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Römling, U., Matthews, K. R., Chikindas, M. L., et al. 2007. Effect of triclosan on *Salmonella* Typhimurium at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, Vol.267(2); pp. 200–206.
- Teplitski, M., Goodier, R. I. and Ahmer, B. M. 2003. Pathways leading from BarA/SirA motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, Vol.185(24); 7257–7265.
- Teplitski, M., Al-Agely, A. and Ahmer, B. M. 2006. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, Vol.152(11); pp. 3411–3424.
- Teplitski, M., Goodier, R.I. and Ahmer, B.M. 2006. Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *Journal of Medicinal Microbiology*, Vol. 296; pp. 446-466.
- Thien-Fah, C. M. and George, A. O’Toole. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *trends in Microbiology*, Vol.9(1); pp. 35-39.
- Threlfall, E.J. 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food and water borne infections. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol.26; pp. 141-148.
- Threlfall, E. J. 2005. Topley and Wilson’s Microbiology and microbial infections. *Bacteriology*, pp. 1398-1434.
- Tolker-Nielsen, T. and Molin, S. 2000. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology*, Vol.40(2); pp. 75-84.
- Trujillo, R. and N. Laible. 1970. Reversible inhibition of spore germination by alcohols. *Appl. Microbiol*, Vol.20; pp. 620–623.
- Tuomanen, E. et al. 1986. The rate of killing of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J. Gen. Microbiol*, Vol.132; pp. 1297–1304.
- Tuomanen, E. et al.1986. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother*, Vol.30; pp. 521–527.

- van Duijkeren, E. and Houwers, D.J. 2000. A critical assessment of antimicrobial treatment in uncomplicated *Salmonella* enteritidis. *Veterinary Microbiology*, Vol.73; pp. 61-73.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., et al. 2008. Living on a surface: Swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, Vol.16(10); pp. 496–506.
- Vestby, L. K., Moretro, T., Ballance, S., Langsrud, S. and Nesse, L. L. 2009. Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. *BMC Veterinary Research*, Vol.5; pp. 43.
- Villar, F.W., Angulo, R.G., Tauxe, F.J. and Swaminathan, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.38; pp. 2465-2467.
- Wang, Q., Zhao, Y., McClelland, M. and Harshey, R. M. 2007. The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes. *Journal of Bacteriology*, Vol.189(23); pp. 8447–8457.
- Waters, C. M. and Bassler, B. L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol.21; pp. 319–346.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., and Hengge, R. 2006. Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, Vol.62(4); pp. 1014–1034.
- Wentland, E.J. *et al.* 1996. Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm. *Biotechnol. Prog.* Vol.12; pp. 316–321.
- White, A. P., Gibson, D. L., Collinson, S. K., Banser, P. A. and Kay, W. W. 2003. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella* enterica serovar enteritidis. *Journal of Bacteriology*, Vol.185(18); pp. 5398–5407.
- White, A. P. and Surette, M. G. 2006. Comparative genetics of the rdar morphotype in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, Vol.188(24); pp. 8395–8406.
- White, A. P., Gibson, D. L., Kim, W., Kay, W. W. and Surette, M. G. 2006. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, Vol.188(9); pp. 3219–3227.
- White, A. P., Weljie, A. M., Apel, D., Zhang, P., Shaykhutdinov, R., Vogel, H. J., et al. 2010. A global metabolic shift is linked to *Salmonella* multicellular development. *PLoS ONE*, Vol.5(7); e11814.
- Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S. and Greenberg, E.P. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, Vol.413(6858); pp. 860-864.
- Wimpenny, J., Manz, W. and Szewzyk, U. 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol.24; pp. 661-671.

- Wimpenny, J. 2009. Microbial metropolis. *Advances in Microbial Physiology*, Vol.56(5); pp. 29-84.
- Wong, A.C. 1998. Biofilms in food processing environments. *Journal of Dairy Science*, Vol.81; pp. 2765–2770.
- Wong, H.S., Townsend, K.M., Fenwick, S.G., Trengove, R. D. and O’Handley, R.M. 2010. Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella* Typhimurium biofilms to disinfectants. *Journal of Applied Microbiology*, Vol.108; pp. 2222– 2228.
- Wuertz, S., Okabe, S. and Hausner, M. 2004. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. *Water Science and Technology*, Vol.49; pp. 327-336.
- Yasuda-Yasuki, Y., Namiki-Kanie, S. and Hachisaka, Y. 1978. Inhibition of germination of *Bacillus subtilis* spores by alcohols. *Spores VII*. American Society for Microbiology, pp. 113–116.
- Yousef, A. E. and Carlstrom, C. 2003. *Salmonella*. *Food microbiology: A laboratory manual*, pp. 167-205.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Römling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, Vol. 39(6); pp. 1452–1463.
- Zottola, E.A. and Sasahara, K.C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, Vol.23; pp. 125-148.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Veli TATO

Doğum Yeri: TUNCELİ

Doğum Tarihi: 17. 06. 1982

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Elazığ Atatürk Lisesi (1999)

Lisans: Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

İş Tecrübesi

**Kurumu: Hacettepe Üniv. Hastaneleri
2006**

Görevi: Biyolog Başlangıç Yılı:

Yayınlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

1. Karaca, B., Buzrul, S., Tato, V., Akçelik, N. ve Akçelik, M. 2013. Modeling and predicting the biofilm formation of different *salmonella* strains. Journal of Food Safety, Vol.(24); pp. 503-508.

MODELING AND PREDICTING THE BIOFILM FORMATION OF DIFFERENT *SALMONELLA* STRAINS

BAŞAR KARACA¹, SENCER BUZRUL^{2,4}, VELİ TATO¹, NEFİSE AKÇELİK³ and MUSTAFA AKÇELİK¹

¹Department of Biology, Ankara University, Ankara, Turkey

²Tütün ve Alkol Piyasası Düzenleme Kurumu (TAPDK), 06520 Ankara, Turkey

³Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey

⁴Corresponding author:

TEL: +90-312-218-0438;

FAX: +90-312-218-0430;

EMAIL: sencer.buzrul@tapdk.gov.tr;

sencer.buzrul@gmail.com

Received for Publication July 14, 2013

Accepted for Publication September 24, 2013

doi: 10.1111/jfs.12082

ABSTRACT

Biofilm formations of 25 *Salmonella* strains belonging to 19 serotypes were monitored with respect to time at a constant temperature. Two (DMC8 and DMC73) out of 25 strains had low biofilm formation ability and were not included in the modeling study. One (SL1344) strain had awkward biofilm formation which could not be described by a mathematical model, whereas biofilm formation of three strains (DMC33, DMC85 and DMC93) could be described by an exponential model. The modified Gompertz equation with high adjusted determination coefficient (R^2_{adj}) and low mean square error values produced reasonable fits for the biofilm formation of 19 *Salmonella* strains. It was also possible to predict the biofilm formation of these strains at two different time values by use of the modified Gompertz equation. Although more studies should be carried out to evaluate different mathematical models under both iso- and nonisothermal conditions, this study reveals that describing and predicting the biofilm formation could be possible.

PRACTICAL APPLICATION

Many *Salmonella* strains are capable of adhering and forming biofilm on certain surfaces. Biofilm formed in food processing environments may lead to food spoilage or transmission of diseases. Therefore, it is of vital importance to understand the formation of biofilm on different surfaces. It could be possible to describe and predict the biofilm formation with respect to time by using common modeling techniques.

INTRODUCTION

Salmonella is a Gram-negative and rod-shaped microorganism that can grow at 7–48°C. Bacteria which are the members of *Salmonella* genus are facultatively anaerobic and these bacteria can adapt to several conditions such as acidic stress, low water activity, high temperature and survive for a long time (Kaufmann 1998; White *et al.* 2006). Many reports show that *Salmonella* is able to form biofilm on polymer, stainless steel and glass as well as biotic surfaces such as parsley, cantaloupe, alfalfa *et cetera*. (Mørseth *et al.* 2009).

Bacterial biofilms are described as bacterial communities that can be attached to abiotic or biotic surfaces and

enclosed with self-produced extracellular matrix substances (Costerton *et al.* 1995). The bacterial cells in biofilm embedded within a matrix structure are generally well protected due to chemical and physical barrier against various undesirable environmental conditions. Biofilms can accumulate several compounds and may cause many problems at both industrial and clinical sites (Mørseth *et al.* 2009). Biofilm cells are much more resistant to disinfectants and desiccation in comparison with planktonic counterparts (Matthysse *et al.* 1981; Zogaj *et al.* 2001). Biofilms on both biotic and abiotic surfaces can contaminate food and cause pathogenic reservoir. In view of bacterial contamination risks in food processing environments, foodborne infections may increase (Shi and Zhu 2009).

Salmonella contamination on food and food supplements pose a serious problem all over the world (Crump *et al.* 2002). It is also well known that Salmonellosis cases can be observed when parsley, coriander, cantaloup, unpasteurized orange juice, tomato and poultry products are consumed (Cook *et al.* 1998; Burnett and Beuchat 2000). At food manufacturing industries, although many investments against *Salmonella* contaminations, it was reported that some clones can survive under factory conditions for many years (Vestby *et al.* 2009). Furthermore, biofilms cannot be removed efficiently from the food processing surfaces with disinfectants and routine sanitation procedures (Ronner and Wong 1993; Møretro *et al.* 2003).

Salmonella cells in biofilm can survive and proliferate at undesirable environmental conditions which may explain the persistence of waterborne and foodborne Salmonellosis (Brandl 2006; Teplitski *et al.* 2006). There are a few reports that compares biofilm-forming abilities of *Salmonella* serotypes (Marin *et al.* 2009; Diez-Garcia *et al.* 2012), but to the best of authors' knowledge there is no study about the modeling and predicting the biofilm formation of different *Salmonella* strains. In the present study, it was aimed to describe biofilm formation of different *Salmonella* serotypes by use of a mathematical model and further to predict biofilm formation at different two different time values.

MATERIALS AND METHODS

Salmonella Strains and Culture Conditions

Twenty-five *Salmonella* strains belonging to 19 serotypes (provided by Prof. Dr. Mustafa Akçelik, Department of Biology, Ankara University) were used in this study (see Table 1). All strains were isolated from beef products in Turkey except for two of them (*Salmonella braenderup* and *S. typhimurium* SL1344). *Salmonella* strains were stored at -80°C in Luria Bertani broth (LB; Merck, Darmstadt, Germany). The culture was then inoculated into LB broth and incubated at 37°C for 18 h with shaking at 200 rpm. Inoculation was repeated at twice. LB without NaCl (LB without NaCl; bacto-tryptone 10 g/L [Fluka, St-Quentin-Fallavier, France], yeast extract 5 g/L [Merck]) was used to maintain optimum conditions for biofilm assays (Römling *et al.* 1998). After preparing appropriate cultures, all strains were inoculated to LB without NaCl medium for further experiments (Römling *et al.* 1998).

Microtiter Plate Assay

The microtiter plate assay was performed according to the method described by Woodward *et al.* (2000) with slight modifications of methods of Stepanovic *et al.* 2000 and Vestby *et al.* 2009. Briefly; the cultures were diluted in LB

TABLE 1. LIST OF *SALMONELLA* SEROTYPES USED IN THIS STUDY

Strain code	Serotype
DMC1	Group C1
DMC4	Typhimurium
DMC6	Virchow
DMC8	Enteritidis
DMC12	Infantis
DMC13	Roughform
DMC28	Enteritidis
DMC33	Virchow
DMC45	Thompson
DMC54	Rauform
DMC55	Senftenberg
DMC59	Agona
DMC63	Rauform
DMC66	Telaviv
DMC73	Kentucky
DMC78	Bispebjerg
DMC85	Kentucky
DMC87	Corvallis
DMC88	Montevideo
DMC89	Montevideo
DMC91	Anatum
DMC93	Salford
DMC99	Nchanga
DMC101	Braenderup
SL1344	Typhimurium

without NaCl broth and dilutions were adjusted spectrophotometrically (OD_{595}) to acquire 10^8 cfu/mL bacterial suspensions to provide same initial conditions for experiments (Shimadzu spectrophotometer, Kyoto, Japan). Adjusted bacterial suspensions were confirmed with plate count agar method and also *S. typhimurium* LT2 strain was used as a control. Thirty microliters of this suspension was transferred to each well of 96 well-polystyrene microtiter plates filled with 100 μL LB without NaCl broth, and then plates were incubated statically for 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 and 120 h at 20°C . Control wells were only filled with test broth. Following the incubation, plates were washed twice with sterile 0.85% NaCl solution to remove planktonic cells. The plates were allowed to dry at safety hood before addition of 130 μL of 98% methanol (Merck) and then were incubated for 10 min. The methanol was removed and plates were dried again. One hundred thirty of 1% crystal violet (Merck) was transferred into the wells and stained for 30 min. After staining, plates were washed under running tap water. Finally, 130 μL of 33% glacial acetic acid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was added to each well and bound dye was solubilized. The optical density of each well was measured at 595 nm (OD_{595}) using ELISA reader (Shimadzu). The result for each strain was calculated by subtracting the average OD_{595} value of the three replicates of

the control (LB without NaCl broth only) from the average OD₅₉₅ value of the eight replicates of sample. Experiments were performed in triplicate.

The Biofilm Formation Modeling and the Model Assessment

Modified Gompertz equation (Eq. 1) (Zwietering *et al.* 1990, 1991) was used to describe the biofilm formation (OD₅₉₅ versus time) of *Salmonella* strains:

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

where t is time; $y(t)$ is OD₅₉₅; e is $\exp(1)$; a is asymptotic value i.e., maximum biofilm concentration value reached; μ_m is the maximum biofilm formation rate and λ is the time of acceleration of biofilm formation.

According to this model, when $t \rightarrow \infty$, $y(t) \rightarrow a$ and when $t = 0$ $y(0) = a \cdot \exp \left[-\exp \left(\frac{\mu_m \cdot e}{a} \lambda + 1 \right) \right]$ but since almost always $y(0) = a \cdot \exp \left[-\exp \left(\frac{\mu_m \cdot e}{a} \lambda + 1 \right) \right] \approx 0$, one can assume that equation starts at the origin.

For the model assessment study, adjusted determination coefficient (R^2_{adj}) and mean square error (MSE) values were used to investigate the goodness-of-fit of the model. The parameters of the model were obtained by using SigmaPlot 2000 version 12.00 (Systat Software Inc., Chicago, IL).

RESULTS AND DISCUSSION

Biofilm formations of 25 *Salmonella* strains were monitored with respect to time at 20C. In general, biofilm formation increased up to 120 h but decreased thereafter (data not shown), therefore for modeling studies, data up to 120 h were used. Two strains (DMC8 and DMC73) had very low biofilm formation (Fig. 1) compared to other strains, hence these strains were not included in the modeling study. Biofilm formation of SL1344 cannot be described by a model; biofilm formation increased within 12 h and slight and sharp decreases observed at 24 and 48 h, respectively (Fig. 2). Biofilm formation of DMC33, DMC85 and DMC 93 could be described by an exponential growth model with three adjustable parameters (Fig. 3).

Biofilm formation of 19 *Salmonella* strains could be successfully described by use of the modified Gompertz equation (Eq. 1); Figure 4 shows the fit of Eq. (1) to biofilm formation of DMC13 and DMC28. Table 2 lists R^2_{adj} , MSE values and the parameters of Eq. (1) together with their standard errors. High R^2_{adj} and low MSE values indicated that the modified Gompertz equation (Eq. 1) produced good fits for these strains. Moreover, biologically meaning-

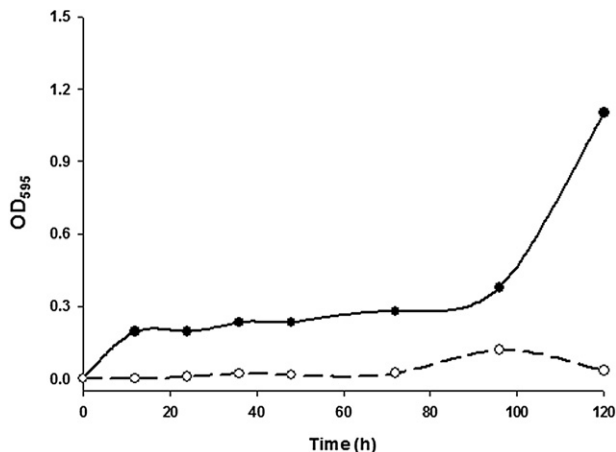


FIG. 1. TRENDS OF BIOFILM FORMATION OF DMC8 (SOLID LINES) AND DMC73 (DASHED LINES) AT 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 AND 120 h

ful parameters (a , μ_m and λ) could help to understand the biofilm formation tendency of *Salmonella* strains. For instance, DMC28 and DMC89 had the highest asymptotic values (a) indicating that these strains reached the highest biofilm concentration level at the end of 120 h. DMC89 had also the highest maximum biofilm formation rate (μ_m) whereas DMC13 had the lowest value which was 0.04 OD/h. Acceleration of biofilm formation of DMC12 started at 10.5 h while 34.8 h was needed for DMC63 (Table 2).

Among the parameters of the modified Gompertz equation, λ seems to be the most interesting one: since it denotes the time of acceleration of biofilm formation precautions such as cleaning and disinfection of the surface could be taken to avoid the biofilm formation before λ is reached. Speranza *et al.* (2011) also used Eq. (1) to describe biofilm concentration of *Salmonella* sp. ATCC 35664 and these

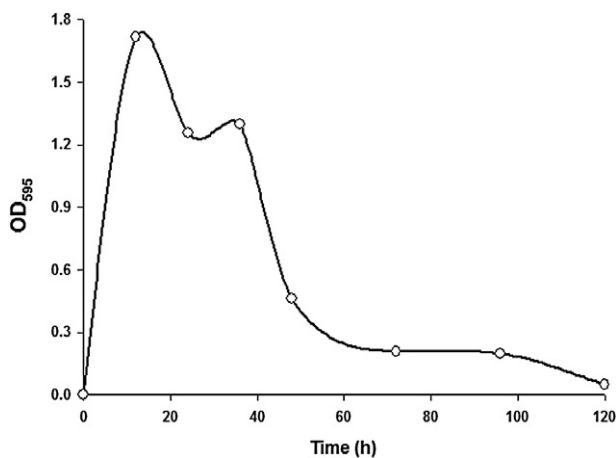


FIG. 2. TREND OF BIOFILM FORMATION OF SL1344 (SOLID LINES) AT 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 AND 120 h

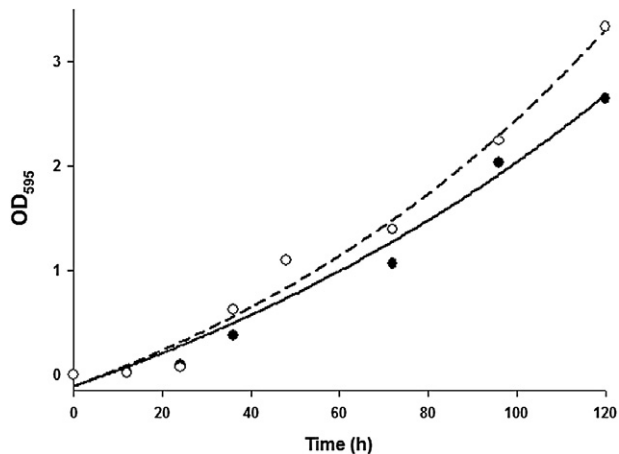


FIG. 3. FIT OF EXPONENTIAL GROWTH MODEL $[y(t) = l + b \cdot \exp(k \cdot t);$ WHERE t IS TIME; l , b AND k ARE THE MODEL PARAMETERS.] TO BIOFILM FORMATION DATA OF DMC33 (SOLID LINES) AND DMC93 (DASHED LINES) AT 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 AND 120 h

authors defined λ as aptitude to biofilm formation i.e., time necessary to start adhesion on the surface. However, adhesion had been observed for all the strains before their λ values were reached in this study.

It should be noted that the modified Gompertz equation (Eq. 1) is mostly used to describe microbial growth (Zwietering *et al.* 1990, 1991; van Impe *et al.* 1992; Yang *et al.* 2009). Nevertheless, since the sigmoid curves (S shaped) were observed in biofilm formation of *Salmonella* strains, it was also used in this study. Moreover, Eq. (1) is not the only option for describing the biofilm formation, the modified version of the logistic equation (Corradini and Peleg 2005) produced almost the same fit with Eq. (1) – not

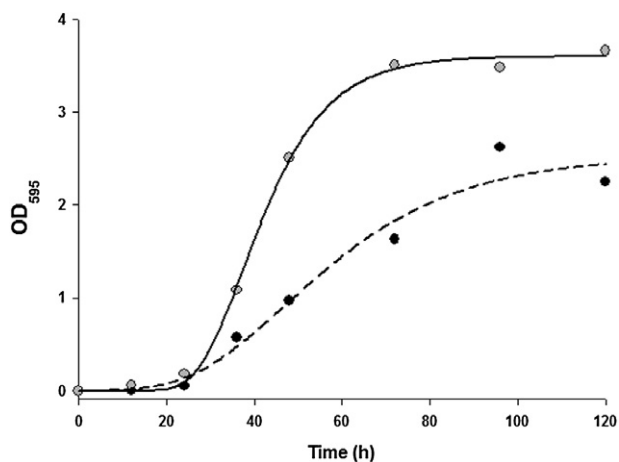


FIG. 4. FIT OF MODIFIED GOMPERTZ EQUATION (EQ. 1) TO BIOFILM FORMATION DATA OF DMC28 (SOLID LINES) AND DMC13 (DASHED LINES) AT 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 AND 120 h

TABLE 2. PARAMETERS OF EQ. (1) ± STANDARD ERRORS TOGETHER WITH ADJUSTED DETERMINATION COEFFICIENT (R^2_{adj}) AND MEAN SQUARE ERROR (MSE) VALUES OF EACH FIT

Strain	a (OD)	μ (OD/h)	λ (h)	R^2_{adj}	MSE
DMC1	3.15 ± 0.18	0.11 ± 0.03	23.0 ± 4.0	0.964	0.077
DMC4	3.49 ± 0.06	0.11 ± 0.008	20.2 ± 1.3	0.996	0.009
DMC6	3.24 ± 0.19	0.07 ± 0.02	18.6 ± 5.9	0.963	0.077
DMC12	3.30 ± 0.07	0.06 ± 0.004	10.5 ± 1.7	0.996	0.007
DMC13	2.53 ± 0.26	0.04 ± 0.01	25.4 ± 5.8	0.960	0.044
DMC28	3.60 ± 0.05	0.13 ± 0.01	27.1 ± 1.0	0.998	0.006
DMC45	3.24 ± 0.32	0.05 ± 0.02	15.7 ± 8.5	0.923	0.15
DMC54	3.00 ± 0.23	0.06 ± 0.01	24.5 ± 4.7	0.971	0.048
DMC55	3.33 ± 0.13	0.07 ± 0.009	30.7 ± 2.3	0.992	0.017
DMC59	2.82 ± 0.20	0.06 ± 0.01	19.8 ± 5.0	0.965	0.054
DMC63	3.36 ± 0.26	0.09 ± 0.03	34.8 ± 4.7	0.959	0.094
DMC66	2.97 ± 0.37	0.05 ± 0.01	15.6 ± 7.9	0.930	0.10
DMC78	3.45 ± 0.12	0.15 ± 0.03	26.7 ± 2.6	0.985	0.04
DMC87	3.41 ± 0.09	0.10 ± 0.01	19.7 ± 1.9	0.992	0.019
DMC88	3.38 ± 0.10	0.13 ± 0.02	14.5 ± 2.4	0.985	0.033
DMC89	3.59 ± 0.05	0.19 ± 0.02	13.5 ± 1.1	0.997	0.008
DMC91	3.22 ± 0.16	0.10 ± 0.02	19.9 ± 3.5	0.972	0.06
DMC99	3.46 ± 0.07	0.15 ± 0.02	24.4 ± 1.5	0.994	0.015
DMC101	3.29 ± 0.08	0.11 ± 0.01	24.8 ± 1.8	0.993	0.015

shown. Other models with at least three adjustable parameters could be alternatively used to describe the biofilm formation of *Salmonella* strains.

Since the modified Gompertz equation (Eq. 1) could be used to describe the biofilm formation of 19 *Salmonella* strains, two additional time data (60 and 84 h) were used to evaluate the predictive ability of the proposed model (Eq. 1). Figure 5 shows the model fits for DMC59 and DMC 88 together with the additional time data; the figure clearly indicates that prediction of biofilm formation of *Salmonella* could be possible. Support for this statement comes from Table 3 where residuals (observed – predicted) for each strain were listed. For only two strains (DMC6 and DMC63) poor predictions were observed at 60 h, residual values for the rest of the strains were less than or equal to 0.48. Good predictions (residual values were less than or equal to 0.43) were observed at 84 h for all strains (Table 3).

It should be also noted that the predictions were performed under constant temperature conditions (20C). It is likely to observe nonisothermal conditions in food processing environment. It could be also possible to predict biofilm formation under dynamic conditions similar to predicting microbial growth under changing temperatures by using Gompertz equation (see Gospavic *et al.* 2008 for example). Nevertheless, to the best of authors' knowledge, this type of modeling (describing and predicting the biofilm formation with a model) is done for the first time. As mentioned above, Speranza *et al.* (2011) also used Eq. (1) to describe biofilm concentration of *Salmonella*; however, there were no

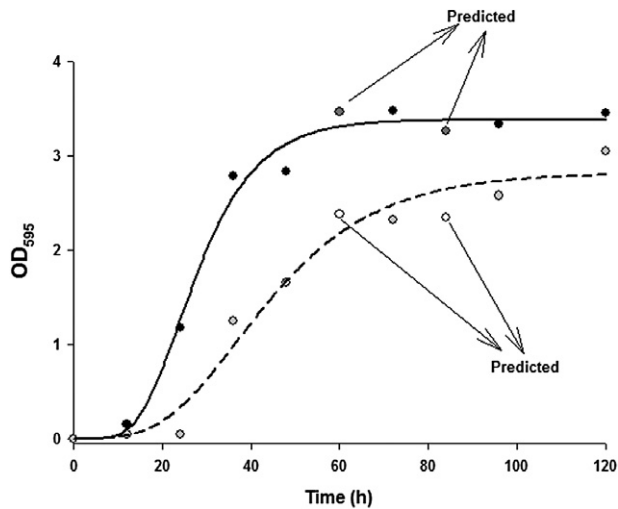


FIG. 5. FIT OF MODIFIED GOMPertz EQUATION (EQ. 1) TO BIOFILM FORMATION DATA OF DMC88 (SOLID LINES) AND DMC59 (DASHED LINES) AT 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 AND 120 h. DARK GREY AND WHITE CIRCLES WERE THE DATA POINTS AT 60 AND 84 h USED FOR THE PREDICTION FOR DMC88 AND DMC59, RESPECTIVELY

predictions in that study. Moreover, they used response surface methodology as the secondary modeling (defining the parameters of Eq. (1) with respect to temperature, pH and medium composition).

In conclusion, the results of the present study indicated that although it is possible to observe different biofilm formation abilities of different strains of *Salmonella* strains,

TABLE 3. RESIDUAL (OBSERVED – PREDICTED) VALUES OF BIOFILM FORMATION OF *SALMONELLA* STRAINS AT 60 AND 84 h

Strain	Residual	
	60 h	84 h
DMC1	-0.48	0.37
DMC4	-0.12	-0.25
DMC6	-0.96	-0.15
DMC12	-0.20	-0.14
DMC13	-0.05	0.23
DMC28	-0.22	-0.25
DMC45	0.16	-0.32
DMC54	0.26	-0.37
DMC55	0.41	0.08
DMC59	0.22	-0.29
DMC63	1.05	0.37
DMC66	0.24	-0.38
DMC78	-0.46	-0.31
DMC87	-0.12	-0.43
DMC88	0.17	-0.11
DMC89	-0.34	-0.17
DMC91	0.31	-0.16
DMC99	-0.34	0.12
DMC101	0.07	-0.23

mathematical models could be used to describe biofilm formation of *Salmonella* sp. Modeling could also be a powerful tool to predict the biofilm formation at various conditions.

REFERENCES

BRANDL, M.T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 367–392.

BURNETT, S.L. and BEUCHAT, L.R. 2000. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25, 281–287.

COOK, K.A., DOBBS, T.E., HLADY, W.G., WELLS, J.G., BARRETT, T.J., PUHR, N.D., LANCETTE, G.A., BODAGER, D.W., TOTH, B.L., GENESE, C.A., ET AL. 1998. Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice. *JAMA* 280, 1504–1509.

CORRADINI, M.G. and PELEG, M. 2005. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. *J. Appl. Microbiol.* 99, 187–200.

COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R. and LAPPINSCOTT, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.

CRUMP, J.A., GRIFFIN, P.M. and ANGULO, E.J. 2002. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clin. Infect. Dis.* 35, 859–865.

DIEZ-GARCIA, M., CAPITA, R. and ALONSO-CALLEJA, C. 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol.* 31, 173–180.

GOSPAVIC, R., KREYENSCHMIDT, J., BRUCKNER, S., POPOV, V. and HAQUE, N. 2008. Mathematical modelling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 290–297.

KAUFMANN, M.E. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol. Med. Mol. Bacteriol.* 15, 33–50.

MARIN, C., HERNANDIZ, A. and LAINEZ, M. 2009. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poult. Sci.* 88, 424–431.

MATTHYSSE, A.G., HOLMES, K.V. and GURLITZ, R.H. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J. Bacteriol.* 145, 583–595.

MØRETRØ, T., MIDTGAARD, E.S., NESSE, L.L. and LANGSRUD, S. 2003. Susceptibility of *Salmonella* isolated from fish feed factories to disinfectants and air-drying at surfaces. *Vet. Microbiol.* 94, 207–217.

MØRETRØ, T., VESTBY, L.K., NESSE, L.L., HANNEVIK, S., KOTLARZ, K. and LANGSRUD, S. 2009. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1005–1012.

- RONNER, A.B. and WONG, A.C.L. 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on stainless-steel and Buna-N Rubber. *J. Food Prot.* 56, 750–758.
- RÖMLING, U., SIERRALTA, W.D., ERIKSSON, K. and NORMARK, S. 1998. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.* 28, 249–264.
- SHI, X. and ZHU, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 407–413.
- SPERANZA, B., CORBO, M.R. and SINIGAGLIA, M. 2011. Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. *J. Food Sci.* 76, 12–16.
- STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B. and SVABIC-VLAHOVIC, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40, 175–179.
- TEPLITSKI, M., GOODIER, R.I. and AHMER, B.M. 2006. Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *J. Med. Microbiol.* 296, 446–466.
- VAN IMPE, J.F., NICOLAÏ, B.M., MARTENS, T., DE BAERDEMAEKER, J. and VANDEWALLE, J. 1992. Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2901–2909.
- VESTBY, L.K., MØRETRØ, T., LANGSRUD, S., HEIR, E. and NESSE, L.L. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Vet. Res.* 5, 1–6.
- WHITE, A.P., GIBSON, D.L., KIM, W., KAY, W.W. and SURETTE, M.G. 2006. Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 188, 3219–3227.
- WOODWARD, M.J., SOJKA, M., SPRIGINGS, K.A. and HUMPHREY, T.J. 2000. The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *J. Med. Microbiol.* 49, 481–487.
- YANG, Z.-Q., JIAO, X.-A., LI, P., PAN, Z.-M., HUANG, J.-L., GU, R.-X., FANG, W.M. and CHAO, G.X. 2009. Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature. *Food Microbiol.* 26, 606–614.
- ZOGAJ, X., NIMTZ, M., ROHDE, M., BOKRANZ, W. and RÖMLING, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39, 1452–1463.
- ZWIETERING, M.H., JONGENBURGER, I., ROMBOUTS, F.M. and VAN'T RIET, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–1881.
- ZWIETERING, M.H., DE KOOS, J.T., HASENACK, B.E., DE WIT, J.C. and VAN'T RIET, K. 1991. Modeling bacterial growth as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1094–1101.