

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***SALMONELLA*' DA BİYOFİLM OLUŞUMUNUN ENGELLENMESİ VE
SALMONELLA BİYOFİMLERİNİN ERADİKASYONUNDA ETKİN
STRATEJİLERİN BELİRLENMESİ**

Fatma Neslihan YÜKSEL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2017**

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

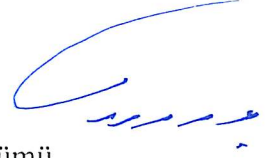
Fatma Neslihan YÜKSEL tarafından hazırlanan “*Salmonella*’ da Biyofilm Oluşumunun Engellenmesi ve *Salmonella* Biyofilmlerinin Eredikasyonunda Etkin Stratejilerin Belirlenmesi” adlı tez çalışması 26/09/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü



Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Yavuz BEYATLI
Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü



Üye : Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü



Üye : Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ
Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Rektörlüğü



Üye : Prof. Dr. Emine Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü



Üye : Doç. Dr. Yeşim SOYER
ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

26/09/2017



Fatma Neslihan YÜKSEL

ÖZET

Doktora Tezi

SALMONELLA' DA BİYOFİLM OLUŞUMUNUN ENGELLENMESİ VE *SALMONELLA* BİYOFİMLERİNİN ERADİKASYONUNDA ETKİN STRATEJİLERİN BELİRLENMESİ

Fatma Neslihan YÜKSEL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Gıdalarda ve gıda katkı maddelerinde *Salmonella* kontaminasyonu dünya genelinde büyük bir sorun teşkil etmekte ve bu durum hayvanlarda ve hayvansal gıdaları tüketen bireylerde *Salmonella* enfeksiyon riskini arttırmaktadır. *Salmonella* biyofilm yapılarının neden olduğu endüstriyel kontaminasyonların önlenmesi, hem ekonomik hem de tıbbi açıdan büyük bir önem taşımaktadır. Tez çalışmasında; dezenfektanlar, antibiyotikler ve gıda koruyucularının yanı sıra P22 bakteriyofajının, bakteriyosin nisin ile kombine kullanımıyla hem planktonik *Salmonella* hücreleri üzerine hem de *Salmonella* biyofilm oluşumuna ve eradikasyonuna etkinliği araştırılmıştır. MİK değerleri göz önüne alındığında, en etkili ajanların sitrik asit ve klorheksidin olduğu ve çok düşük konsantrasyonlarda dahi *Salmonella* suşlarının üremesini engellediği görülmüştür. Sinerji testleri (dama tahtası ve zaman-ölüm denemeleri), nisinin kullanılan antimikrobiyal ajanlar ile arasındaki etkinin sinerjik ve indiferans etki olduğunu göstermiştir. 'rdar' morfortipindeki suşların 20 °C'de optimum biyofilm ürettiği, 'bdar' morfortipindeki suşun ise 37 °C'de optimum biyofilm ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca suşların maksimum biyofilm üretim miktarları farklı inkübasyon süreleri sonunda saptanmıştır. Kullanılan hiçbir antibiyotik ve antibiyotik-nisin kombinasyonu *Salmonella* biyofilm yapılarını tamamen ortadan kaldıramazken, en fazla eradikasyon oranı (% 88) ampisilin-nisin kombinasyonundan elde edilmiştir. Genel olarak nisin ve antibiyotik kombinasyonuna EDTA'nın ilavesi ile biyofilm eradikasyon oranı artmıştır. Yüksek titrelerde kullanılan P22 fajının ve nisin-EDTA-P22 kombinasyonunun *S. Typhimurium*'un biyofilm oluşumu için bir kontrol stratejisi geliştirme potansiyeli olduğu belirlenmiştir. Çevresel koşulların ve nisinin biyofilm üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı denemede pH 5.5 değerinde ve % 0.5 NaCl konsantrasyonunda ilave edilen nisinin en yüksek düzeyde etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Tez kapsamında elde edilen birincil model sistem daha sonraki yapılacak olan çalışmalara ışık tutacak ve ülkemizde gıda endüstrisinde patojen mikroorganizmalarla mücadeleye etkin katkılar sağlayacaktır.

Eylül 2017, 183 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, Biyofilm, Eradikasyon, Matematiksel modelleme

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INHIBITION OF BIOFILM FORMATION IN SALMONELLA AND DETERMINATION OF EFFECTIVE STRATEGIES IN SALMONELLA BIOFILM ERADICATION

Fatma Neslihan YÜKSEL

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Salmonella contamination in food and food additives is a major problem globally and this increases the risk of *Salmonella* infection in animals and in individuals consuming animal feed. Prevention of industrial contamination caused by *Salmonella* biofilm structures is of great economic and medical importance. In the study, the effectiveness of disinfectants, antibiotics and food preservatives as well as P22 bacteriophage in combination with bacteriocin nisin on both planktonic *Salmonella* cells and *Salmonella* biofilm formation and eradication were investigated. As taking into consideration of MIC values, it was found that the most effective agents were citric acid and chlorhexidine and prevented the development of *Salmonella* strains even at very low concentrations. The synergy tests (checkerboard and time-kill assay) have shown that the effect between the antimicrobial agents and nisin is synergistic and indifferans effect. It was determined that the strains in the 'rdar' morphotype produced optimum biofilm at 20 °C, while the strains in the 'bdar' morphotype produced optimum biofilm at 37 °C. In addition, maximum biofilm production of strains were determined at different incubation times. The combination of antibiotic-nisin and antibiotics alone used does not completely remove the structures of the *Salmonella* biofilm while, the highest eradication rate (88 %) was obtained from the combination of ampicillin and nisin. Generally, the biofilm eradication rate is increased by the addition of EDTA to the combination of nisin and antibiotics. It has been determined that P22 phage used in high titers and the combination of nisin-EDTA-P22 has the potential to develop a control strategy for the biofilm formation of *S. Typhimurium*. The effects of environmental conditions in the presence of nisin on biofilm production were investigated and it was determined that most effective was at pH 5.5 and 0.5 % NaCl concentration. The primary model system obtained within the scope of the thesis will shed light on future work and will provide effective contributions to the fight against pathogenic microorganisms in the food industry in our country.

September 2017, 183 pages

Key Words: *Salmonella*, Biofilm, Eradication, Mathematical modelling

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü araştırma olanağı sağlayan, çalışmalarım yürütülmesinde yardımını ve katkısını esirgemeyen, her zaman bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü); araştırmalarım boyunca desteğini gördüğüm, fikirlerini aldığım eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü); doktora tez izleme komitemde ve tez jürimde yer alan, tezin başarıyla tamamlanabilmesi için görüş ve düşünceleri ile bana yol gösteren değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ (Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Rektörlüğü) ve Sayın Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'ya (Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü); laboratuvar ortamında bana yardımcı ve destek olan arkadaşlarım Neslihan TAŞKALE KARATUĞ ve Caner ÖZDEMİR'e katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca benim bugünlere gelmemde ellerinden gelen maddi ve manevi yardımı esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim babam Sezai YÜKSEL, annem Zerrin YÜKSEL ve kardeşim Yeşim YÜKSEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Fatma Neslihan YÜKSEL

Ankara, Eylül 2017

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 <i>Salmonella</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	4
2.2 Salmonellozis ve <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium.....	4
2.3 Bakteriyel Biyofilmler.....	6
2.3.1 Biyofilm oluşum basamakları.....	7
2.3.2 <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumu ve biyofilm matriksi kompozisyonları....	9
2.3.2.1 Kıvrımlı (curli) fimbriya.....	11
2.3.2.2 Selüloz.....	12
2.3.3 <i>Salmonella</i> biyofilmlerinde hücre-hücre etkileşimleri (quorum sensing).....	13
2.4 <i>Salmonella</i> Biyofilmlerinin Eradikasyonu.....	14
2.4.1 Klorheksidin diglukonat.....	14
2.4.2 EDTA.....	15
2.4.3 Sitrik asit.....	16
2.5 <i>Salmonella</i> Biyofilmlerinin Stress Faktörlerine Karşı Direnci.....	16
2.5.1 <i>Salmonella</i> biyofilmlerinin dezenfektanlara karşı direnci.....	17
2.5.2 <i>Salmonella</i> biyofilmlerinin antimikrobiyal direnci.....	18
2.5.3 Isı, pH ve NaCl'nin <i>Salmonella</i> biyofilmlerine etkisi.....	19
2.6 Bakteriyosinler ve Sınıflandırılması.....	20
2.6.1 Nisin.....	22
2.6.1.1 Nisinin yapısı.....	22

2.6.1.2 Nisinin fizikokimyasal özellikleri.....	23
2.6.1.3 Nisinin antimikrobiyal etki aralığı.....	24
2.6.1.4 Nisinin etki mekanizması.....	24
2.6.2 Nisinin gıda uygulamalarında kullanımı.....	25
2.6.3 Nisinin kombinasyon uygulamaları.....	26
2.7 Bakteriyofajlar ve Anti-biyofilm Aktiviteleri.....	29
2.7.1 Bakteriyofajların <i>Salmonella</i> ve <i>Salmonella</i> biyofilmleri üzerindeki etkileri.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1 Materyal.....	35
3.1.1 Bakteriler.....	35
3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler.....	35
3.1.3 Antimikrobiyal ajanlar.....	38
3.2 Yöntem.....	39
3.2.1 Antimikrobiyal ajanların planktonik <i>Salmonella</i> suşlarına etkinliğinin agar kuyu difüzyon yöntemi ile araştırılması.....	39
3.2.2 Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonunun (MBK) belirlenmesi.....	39
3.2.3 Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) ve fraksiyonel bakterisidal konsantrasyonunun (FBK) belirlenmesi.....	40
3.2.4 Antimikrobiyal ajanların etki sürelerinin zaman-ölüm denemeleri ile belirlenmesi.....	42
3.2.5 Polistiren üzerinde <i>in vitro</i> biyofilm oluşumunun incelenmesi.....	43
3.2.6 Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde <i>Salmonella</i> suşlarının biyofilm morfolojilerinin belirlenmesi.....	44
3.2.7 Kalkoflor bağlanma uygulaması.....	45
3.2.8 Sıvı besiyerlerinde pelikül oluşumu.....	45
3.2.9 <i>S. Typhimurium</i> ' da P22 faj lizatlarının hazırlanması ve faj titresinin yükseltilmesi.....	46
3.2.10 P22 bakteriyofajı, nisin ve EDTA'nın tek tek ve kombine kullanımı ile <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisinin belirlenmesi.....	47
3.2.11 Nisin, EDTA ve P22 bakteriyofajının ayrı ayrı ve kombine uygulanarak <i>S. Typhimurium</i> 14028 olgun biyofilmi üzerindeki eradikasyon etkilerinin belirlenmesi.....	48
3.2.12 Antimikrobiyal maddelerin minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyonlarının (MBEC) belirlenmesi.....	49
3.2.13 Antimikrobiyal ajanlar ile nisin kombinasyonlarının <i>S. Typhimurium</i> 14028 olgun biyofilmi üzerine etkisi.....	50

3.2.14 Farklı pH, NaCl değerlerinde ve sıcaklıklarda <i>Salmonella</i> suşlarının polistren üzerinde nisin ve EDTA kullanılarak biyofilm oluşumunun engellenmesi ve uygun biyofilmlerin eradikasyonu.....	51
3.3 İstatistiki Analizler ve Modelleme.....	52
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	53
4.1 Antimikrobiyal Ajanların Planktonik <i>Salmonella</i> Suşlarına Etkinliğinin Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi ile Araştırılması.....	53
4.2 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	56
4.3 Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu (FİK) ve Fraksiyonel Bakterisidal Konsantrasyonun (FBK) Belirlenmesi.....	59
4.3.1 Nisin ve EDTA' nın diğer antimikrobiyal ajanlar ile üçlü kombinasyonunun planktonik <i>Salmonella</i> suşlarına inhibisyon etkisinin araştırılması.....	65
4.4 Antimikrobiyal Ajanların ve Kombinasyonlarının Etki Sürelerinin Zaman-Ölüm Denemeleri ile Belirlenmesi.....	67
4.5 <i>Salmonella</i> Suşlarında Biyofilm Üretim Düzeylerinin Belirlenmesi.....	77
4.6 Kongo Kırmızısı İçeren LB Agar Besiyerlerinde <i>Salmonella</i> Suşlarının Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi.....	79
4.7 Selüloz Üretiminin Belirlenmesi.....	80
4.8 Sıvı Besiyerlerinde Pelikül Oluşumunun Belirlenmesi.....	81
4.9 Antimikrobiyal Maddelerin Minimal Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonunun (MBEC) Belirlenmesi.....	82
4.10 P22 Bakteriyofajlarının Nisin ve EDTA ile Kombine Kullanımı Sonucu <i>Salmonella</i> Suşlarının Biyofilm Yapılarına Etkisinin Belirlenmesi.....	87
4.10.1 P22 bakteriyofajının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	87
4.10.2 EDTA' nın <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	89
4.10.3 Nisinin <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	91
4.10.4 Nisinin, EDTA ve P22 bakteriyofajı ile ikili kombinasyonlarının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisinin belirlenmesi.....	94
4.10.5 Nisin, EDTA ve P22 kombinasyonlarının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisinin belirlenmesi.....	98
4.10.6 Nisin, EDTA ve P22 bakteriyofajının ayrı ayrı ve kombine uygulanarak <i>Salmonella</i> uygun biyofilmleri üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	100
4.11 Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinde Nisin ve EDTA Uygulaması Sonucu <i>Salmonella</i> Suşlarında Biyofilm Oluşumunun Engellenmesi ve Biyofilm Eradikasyonu.....	102
4.12 Farklı NaCl Konsantrasyonlarında <i>Salmonella</i> Suşlarının Nisin ve EDTA Kullanılarak Biyofilm Oluşumlarının Engellenmesi ve Eradikasyonu.....	107

4.13 P22 Bakteriyofajı, Nisin ve EDTA'nın Tek Başına ve Kombinasyonları Halinde Uygulanarak S. Typhimurium 14028 Suşunun Biyofilm Üretimi Üzerinde ve Eradikasyonuna Etkisinin Matematiksel Modellerinin Tespiti.....	112
4.14 Farklı pH Koşullarında Kullanılan Nisin ve EDTA Kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 Suşunun Biyofilm Üretimi Üzerine ve Eradikasyonuna Etkisinin Matematiksel Modellerinin Tespiti.....	126
4.15 Farklı NaCl Konsantrasyonlarında, Nisin ve EDTA Kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 Suşunun Biyofilm Üretimi Üzerine ve Eradikasyonuna Etkisinin Matematiksel Modellerinin Tespiti.....	130
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	134
KAYNAKLAR.....	156
ÖZGEÇMİŞ.....	181

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
kDA	Kilodalton
ml	Mililitre
mM	Milimolar

Kısaltmalar

ATP	Adenozin Trifosfat
CFU/mL	Mililitre'deki Toplam Bakteri Sayısı
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
eDNA	ekstraselüler DNA
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EPS	Ekstrasellüler Polimerik Matriks
HHP	Yüksek Hidrostatik Basınç
IU	İnternasyonal Ünite
LAB	Laktik Asit Bakterisi
LR	Logaritmik Azalma
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
MIK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
OD	Optik Dansite
PBS	Fosfatla tamponlanmış su
PFU/mL	Mililitre'deki Toplam Faj Plağı Sayısı
QS	Quorum Sensing (yeter sayı algılama)
TTSS	Tip III Salgı Sistemi
UV	Ultra Viyole
rdar	Kırmızı, kuru, pürüzlü
bdar	Kahverengi, kuru, pürüzlü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyofilm oluşumunun basamakları.....	8
Şekil 2.2 <i>S. Typhimurium</i> biyofilminin taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	10
Şekil 2.3 <i>csgD</i> operonu tarafından kodlanan kıvrımlı fimbriya ifadesinde CsgD'nin rolünün şematik bir gösterimi.....	12
Şekil 2.4 Nisin A ve Z varyantlarının yapısı.....	23
Şekil 2.5 Nisin etki mekanizmasının şematik görünümü.....	25
Şekil 2.6 Biyofilm içindeki fajların litik yaşam döngüleri.....	30
Şekil 2.7 Litik enfeksiyon döngüsündeki enzimler.....	32
Şekil 3.1 Antimikrobiyal ajan A ve B için MİK değerlerinin tespit edildiği A/B kombinasyonunun dama tahtası plağındaki çalışma formatı.....	42
Şekil 3.2 Tuzsuz LB ortamında 20 °C'de 8 günlük inkübasyon sonundaki pelikül oluşumu.....	46
Şekil 3.3 MBEC belirlemek amacıyla kullanılan 'Calgary Biofilm Device'.....	49
Şekil 4.1 Antimikrobiyal ajanların <i>Salmonella</i> suşlarına karşı etkinliklerinin agar kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmesi.....	53
Şekil 4.2 Antimikrobiyal ajanların varlığında oluşan inhibisyon zon çapı değerleri.....	55
Şekil 4.3 Antimikrobiyal ajanların <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşuna karşı etkinliği.....	58
Şekil 4.4 Antimikrobiyal ajanların <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşuna karşı etkinliği.....	58
Şekil 4.5 Antimikrobiyal ajanların <i>S. Enteritidis</i> DMC8 suşuna karşı etkinliği.....	59
Şekil 4.6 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun nisin ve EDTA kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	68
Şekil 4.7 <i>S. Typhimurium</i> SL1344 suşunun nisin ve EDTA kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	68
Şekil 4.8 <i>S. Enteritidis</i> DMC8 suşunun nisin ve EDTA kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	69
Şekil 4.9 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun nisin, EDTA ve sitrik asit (CA) kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	70
Şekil 4.10 <i>S. Typhimurium</i> SL1344 suşunun nisin, EDTA ve sitrik asit (CA) kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	70
Şekil 4.11 <i>S. Enteritidis</i> DMC8 suşunun nisin, EDTA ve sitrik asit (CA) kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	71
Şekil 4.12 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun nisin, EDTA ve klorheksidin diglukonat kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	72
Şekil 4.13 <i>S. Typhimurium</i> SL1344 suşunun nisin, EDTA ve klorheksidin diglukonat kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	72

Şekil 4.14 <i>S. Enteritidis</i> DMC8 suşunun nisin, EDTA ve klorheksidin diğlukonat kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	73
Şekil 4.15 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun nisin, EDTA ve streptomisin kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	74
Şekil 4.16 <i>S. Typhimurium</i> SL1344 suşunun nisin, EDTA ve streptomisin kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	74
Şekil 4.17 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun nisin, EDTA ve sülfanomid kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	75
Şekil 4.18 <i>S. Typhimurium</i> SL1344 suşunun nisin, EDTA ve sülfanomid kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	76
Şekil 4.19 <i>S. Enteritidis</i> DMC8 suşunun nisin, EDTA ve sülfanomid kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi.....	76
Şekil 4.20 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde ürettiği biyofilm miktarları	78
Şekil 4.21 <i>S. Typhimurium</i> SL1344 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde ürettiği biyofilm miktarları	78
Şekil 4.22 <i>S. Enteritidis</i> DMC8 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde ürettiği biyofilm miktarları	79
Şekil 4.23 <i>Salmonella</i> suşlarının biyofilm morfolojileri	80
Şekil 4.24 UV ışık altında florosan özellik gösteren selüloz (+) ve florosen özellik göstermeyen selüloz (-) örnekler	81
Şekil 4.25 <i>Salmonella</i> suşlarının tuzsuz LB ortamında 20 °C’de 8 günlük inkübasyon sonrası pelikül oluşturması	81
Şekil 4.26 İnkübasyon sonrası peg’lerde oluşan biyofilm yapıları	83
Şekil 4.27 P22 bakteriyofajı ile uygulama sonrası <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumunun inhibisyonunu gösteren örnek mikrotitre plaka	87
Şekil 4.28 P22 bakteriyofajının <i>S. Typhimurium</i> 14028 biyofilm oluşumuna etkisi.....	87
Şekil 4.29 P22 bakteriyofajının <i>S. Typhimurium</i> SL1344 biyofilm oluşumuna etkisi.....	88
Şekil 4.30 P22 bakteriyofajının <i>S. Enteritidis</i> DMC8 biyofilm oluşumuna etkisi.....	89
Şekil 4.31 EDTA’nın <i>S. Typhimurium</i> 14028 biyofilm oluşumuna etkisi.....	90
Şekil 4.32 EDTA’nın <i>S. Typhimurium</i> SL1344 biyofilm oluşumuna etkisi.....	90
Şekil 4.33 EDTA’nın <i>S. Enteritidis</i> DMC8 biyofilm oluşumuna etkisi.....	91
Şekil 4.34 Nisinin <i>S. Typhimurium</i> 14028 biyofilm oluşumuna etkisi.....	92
Şekil 4.35 Nisinin <i>S. Typhimurium</i> SL1344 biyofilm oluşumuna etkisi.....	93
Şekil 4.36 Nisinin <i>S. Enteritidis</i> DMC8 biyofilm oluşumuna etkisi.....	94
Şekil 4.37 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun 64 farklı nisin-EDTA konsantrasyonu ile muamele edilmesi sonucu biyofilm oluşumunu gösteren mikrotitre plakalar.....	95
Şekil 4.38 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun olgun biyofilmine nisinin etkisi.....	100
Şekil 4.39 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun olgun biyofilmine EDTA’nın etkisi	101

Şekil 4.40 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun olgun biyofilmine P22 bakteriyofajının etkisi.....	101
Şekil 4.41 Farklı inkübasyon sıcaklıklarında <i>Salmonella</i> suşlarının biyofilm üretim miktarları.....	103
Şekil 4.42 <i>Salmonella</i> suşlarının farklı pH değerlerindeki biyofilm oluşturma değerleri.....	104
Şekil 4.43 Nisinin farklı pH değerlerinde <i>S. Typhimurium</i> 14028 biyofilm oluşumuna etkisi.....	104
Şekil 4.44 Nisinin farklı pH değerlerinde <i>S. Typhimurium</i> SL1344 biyofilm oluşumuna etkisi.....	105
Şekil 4.45 Nisinin farklı pH değerlerinde <i>S. Enteritidis</i> DMC8 biyofilm oluşumuna etkisi.....	105
Şekil 4.46 <i>S. Typhimurium</i> 14028 olgun biyofilmi üzerine pH 5.5 ve nisinin eradikasyon etkisi.....	107
Şekil 4.47 <i>Salmonella</i> suşlarının farklı NaCl konsantrasyonlarında biyofilm oluşturma değerleri.....	108
Şekil 4.48 Nisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>S. Typhimurium</i> 14028 biyofilm oluşumuna etkisi.....	109
Şekil 4.49 Nisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>S. Typhimurium</i> SL1344 biyofilm oluşumuna etkisi.....	109
Şekil 4.50 Nisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında <i>S. Enteritidis</i> DMC8 biyofilm oluşumuna etkisi.....	110
Şekil 4.51 <i>S. Typhimurium</i> 14028 olgun biyofilmi üzerine % 0.5 NaCl ve nisinin eradikasyon etkisi.....	111
Şekil 4.52 24 saat sonunda P22 fajının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi..	113
Şekil 4.53 48 saat sonunda P22 fajının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi..	113
Şekil 4.54 72 saat sonunda P22 fajının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi..	114
Şekil 4.55 96 saat sonunda P22 fajının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi..	114
Şekil 4.56 Olgun biyofilmin yüzde azalmasının P22 konsantrasyonuna göre değişimi.....	115
Şekil 4.57 24 saat sonunda EDTA'nın <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi...	116
Şekil 4.58 48 saat sonunda EDTA'nın <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi...	116
Şekil 4.59 72 saat sonunda EDTA'nın <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi...	117
Şekil 4.60 96 saat sonunda EDTA'nın <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi...	117
Şekil 4.61 Olgun biyofilmin yüzde azalmasının EDTA konsantrasyonuna göre değişimi.....	118
Şekil 4.62 24 saat sonunda nisinin <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	119
Şekil 4.63 48 saat sonunda nisinin <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	119
Şekil 4.64 72 saat sonunda nisinin <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	120
Şekil 4.65 96 saat sonunda nisinin <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	120
Şekil 4.66 Olgun biyofilmin yüzde azalmasının nisin konsantrasyonuna göre değişimi.....	121

Şekil 4.67 24 saat sonunda nisin ve EDTA'nın <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	122
Şekil 4.68 48 saat sonunda nisin ve EDTA'nın <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	122
Şekil 4.69 72 saat sonunda nisin ve EDTA'nın <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	123
Şekil 4.70 96 saat sonunda nisin ve EDTA'nın <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	123
Şekil 4.71 Olgun biyofilmin yüzde azalmasının [OD ₅₉₅ (% azalma)] Nisin (C _{Nisin}) ve EDTA (C _{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı değişiminin modellenmesi.....	124
Şekil 4.72 Olgun biyofilmin yüzde azalmasının [OD ₅₉₅ (% azalma)] Nisin (C _{Nisin}) ve P22 fajı (P) konsantrasyonlarına bağlı değişiminin modellenmesi.....	126
Şekil 4.73 Farklı pH değerlerinde nisin konsantrasyonlarının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi.....	127
Şekil 4.74 pH 5.5 değerinde nisin ve EDTA kombinasyonunun <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi	128
Şekil 4.75 pH 5.5 değerinde nisin ve EDTA kombinasyonunun olgun <i>Salmonella</i> biyofilmi üzerindeki eradikasyon etkisi	129
Şekil 4.76 Farklı NaCl konsantrasyonlarında nisin konsantrasyonlarının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi	131
Şekil 4.77 % 0.5 NaCl konsantrasyonunda nisin ve EDTA kombinasyonlarının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi	132
Şekil 4.78 % 0.5 NaCl konsantrasyonunda nisin ve EDTA kombinasyonunun olgun <i>Salmonella</i> biyofilmi üzerindeki eradikasyon etkisi.....	133

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bakteriyosinlerin sınıflandırması	21
Çizelge 2.2 Bazı gıda uygulamalarında nisin kullanımı	26
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan antibiyotikler, antimikrobiyal maddeler ve dezenfektanlar	38
Çizelge 3.2 Biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan “cut off” (sınır değer) dönüşümleri	44
Çizelge 4.1 Denemede kullanılan antimikrobiyal ajanlar ve konsantrasyonları...	53
Çizelge 4.2 Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin MİK ve MBK değerleri.....	57
Çizelge 4.3 Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanların MİK ve MBK değerleri.....	57
Çizelge 4.4 <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşu için fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu değerleri ve etki şekilleri.....	62
Çizelge 4.5 <i>S. Typhimurium</i> SL1344 suşu için fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu değerleri etki şekilleri.....	63
Çizelge 4.6 <i>S. Enteritidis</i> DMC8 suşu için fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu değerleri etki şekilleri.....	64
Çizelge 4.7 CA, KHDGT, SUL ve STR antimikrobiyal ajanlarının <i>Salmonella</i> suşları üzerine nisin ve EDTA ile birlikte kombine kullanımı sonucu etki eden en düşük FBK konsantrasyonları.....	66
Çizelge 4.8 Suşların oluşturduğu pelikül yapılarının özellikleri.....	82
Çizelge 4.9 <i>S. Typhimurium</i> 14028 biyofilmi üzerine antimikrobiyal madde uygulama sonrası en fazla yüzde azalmayı sağlayan MBEC değerleri.....	85
Çizelge 4.10 Farklı inkübasyon periyotları sonunda nisin-EDTA uygulaması sonucu <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun biyofilm miktarlarında görülen maksimum azalma yüzdeleri.....	96
Çizelge 4.11 Farklı inkübasyon periyotları sonunda nisin-EDTA uygulaması sonucu <i>S. Typhimurium</i> SL1344 suşunun biyofilm miktarlarında görülen maksimum azalma yüzdeleri....	97
Çizelge 4.12 Farklı inkübasyon periyotları sonunda nisin-EDTA-P22 uygulaması sonucu <i>S. Typhimurium</i> 14028 suşunun biyofilm miktarlarında görülen maksimum azalma yüzdeleri	98
Çizelge 4.13 Farklı inkübasyon periyotları sonunda nisin-EDTA-P22 uygulaması sonucu <i>S. Typhimurium</i> SL1344 suşunun biyofilm miktarlarında görülen maksimum azalma yüzdeleri	99
Çizelge 4.14 pH 5.5+Nisin+EDTA kombinasyonlarının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi sonucu belirlenen biyofilm yüzde azalma.....	108
Çizelge 4.15 % 0.5 NaCl+Nisin+EDTA kombinasyonlarının <i>Salmonella</i> biyofilm oluşumuna etkisi sonucu belirlenen biyofilm yüzde azalma.....	110

Çizelge 4.16 P22 fajının biyofilm oluşumuna etkisindeki model değişkenleri...	112
Çizelge 4.17 EDTA'nın biyofilm oluşumuna etkisindeki model değişkenleri...	115
Çizelge 4.18 Nisinin biyofilm oluşumuna etkisindeki model değişkenleri.....	118



1. GİRİŞ

2500'den fazla farklı serovaryetesi bulunan *Salmonella*, gıda kaynaklı hastalıklara sıklıkla sebep olan patojenik bir mikroorganizmadır. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) dünya genelinde insanlarda gıda zehirlenmelerine ve enfeksiyonlara neden olan ana serotiplerden birisidir (Anonymous 2012a). *S. Typhimurium* ve diğer tifo etkeni olmayan *Salmonella* türleri akut ve çoğunlukla antibiyotik tedavisi gerektirmeyen gastroenterit etkenidir. Tifo etkeni olmayan enfeksiyonlar insanlar ve hayvanlar arasında yayılabilir (Majtan vd. 2008). Gıdalarda ve gıda katkı maddelerinde *Salmonella* kontaminasyonu dünya genelinde büyük bir sorun teşkil etmekte ve bu durum hayvanlarda ve hayvansal gıdaları tüketen bireylerde *Salmonella* enfeksiyon riskini arttırmaktadır (Crump vd. 2002).

Salmonella konak epitel hücreleri (Misselwitz vd. 2011, Ledebøer vd. 2006), safra taşı (Prouty ve Gunn 2003), bitki yüzeyleri (Teplitski vd. 2009, Berger vd. 2010) gibi biyotik yüzeylerde biyofilm oluşturabilirken; plastik, cam, kauçuk, paslanmaz çelik gibi abiyotik yüzeylerde de biyofilm oluşturabilir (Arnold ve Bailey 2000, Joseph vd. 2001, Stepanovic vd. 2004, Chia vd. 2009). Endüstriyel alanda ve evlerde karşılaşılan bu gibi abiyotik yüzeyler gıda ürünlerinin kontaminasyonu için risk oluşturmaktadır. Biyofilm içerisindeki bakterilerin dezenfektanlara ve kurumaya karşı oldukça dirençli oldukları bilinmektedir (Zogaj vd. 2001). Gıda üretiminin gerçekleştirildiği fabrikalarda, *Salmonella* kontaminasyonunu önlemek için büyük yatırımlar yapılmasına karşın, bazı klonların fabrika koşullarında yıllarca varlığını sürdürebildiği belirlenmiştir. Ayrıca bu klonların biyofilm oluşturma yeteneklerinden dolayı dezenfektanlar aracılığı ile de üretim yapılan yüzeylerden uzaklaştırılamadığı saptanmıştır (Ronner vd. 1993, Møretro vd. 2003).

Yüzeyler üzerinde oluşan biyofilmlerdeki mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ekstrasellüler polimerik matriks (EPS) antimikrobiyal ajanlara karşı direnç sağlamaktadır. Bu durum, gıda üretim sürecinde biyofilm oluşumunu kontrol altına almak için sorun teşkil etmektedir. *Salmonella* biyofilmlerinin eradikasyonunu sağlayabilmek için çeşitli dezenfektan uygulamaları yapılmaktadır (Møretro vd. 2008,

Wong vd. 2010a, 2010b). Ancak biyofilm eradikasyonu için bu dezenfektanların, gıda koruyucularının ve antibiyotiklerin yüksek konsantrasyonlarda kullanımının insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler doğuracağı açıktır. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen nisin (bakteriyosin) gibi prokaryotik orijinli antimikrobiyal peptitler, geleneksel antibiyotiklere karşın tüketici sağlığı açısından daha avantajlıdır ve gıda endüstrisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (Jay 2000). Nisinin genellikle Gram pozitif mikroorganizmalara karşı etkili olduğunun bilinmesine karşın; etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) (Cutter ve Siragusa 1995, Murdock vd. 2007), lizozim (Carneiro de Melo 1998), sitrat (Stevens vd. 1991) ve bitki esansiyel yağları (Solomakos vd. 2008, Govaris vd. 2010) gibi diğer ajanlarla birlikte kullanılmasıyla Gram negatif mikroorganizmalara karşı etkili olduğu da belirlenmiştir. Klinikte kullanılan antibiyotiklerin antimikrobiyal peptitler ile kombine kullanımı antibiyotik direnci problemini çözmek için bir alternatif olarak görülmektedir (Lin vd. 2012). Mahdavi vd. (2007) nisinin gıda kaynaklı suşlar tarafından oluşturulan mikrobiyal biyofilmler üzerine etkilerini araştırmış ve 4×10^3 IU/mL nisin konsantrasyonunun *S. Enteritidis* biyofilmleri üzerinde % 93 oranında azalmada etkili olduğunu belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada ise; MİK değerinden daha düşük konsantrasyonlardaki antibiyotikler ile nisinin *Salmonella* üzerindeki potansiyel etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, nisin-ampisilin ve nisin-EDTA kombinasyonlarının Typhimurium serovaryetesine karşı aditif etki gösterdikleri buna karşın, nisin-seftriakson ve nisin sefotaksim antibiyotik kombinasyonlarının yüksek oranda sinerjik etki gösterdikleri saptanmıştır (Singh vd. 2013).

Salmonella biyofilm yapılarının neden olduğu endüstriyel kontaminasyonların önlenmesi, ekonomik açıdan olduğu kadar tıbbi açıdan da büyük bir önem taşımaktadır. Bu tez çalışması ile; dezenfektanlar, antibiyotikler ve gıda koruyucularının yanı sıra P22 bakteriyofajının nisin ile kombine kullanımının *Salmonella* biyofilm oluşumuna ve eradikasyonuna etkinliği araştırılmıştır. Elde edilen veriler ile, nisin ve geleneksel anti-*Salmonella* ilaçlarının kombine kullanılmasıyla *Salmonella* biyofilmine ve kontaminasyondan kaynaklanan *Salmonella* enfeksiyonlarına karşı mücadelede etkin yöntemlerin geliştirilmesine ve antibiyotik ve dezenfektanların yan etkilerinin en aza indirilmesine olanak sağlanması amaçlanmıştır. Ayrıca *Salmonella* suşlarının farklı çevresel koşullarda oluşturduğu biyofilm yapılarının oluşmasını engelleyen ve eradike

eden koşullara uygun matematiksel modellemenin geliştirilmesi planlanmıştır. Byylece yoğun deney yükü gerektiren çalışmalara ihtiyaç duyulmadan, özellikle endüstriyel çevrelerde bu matematiksel modeller kullanılarak biyofilm yapılarının gelişiminin öngörülmesi ve buna bağlı olarak korunma stratejilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri

1884 yılında Daniel Elmer Salmon tarafından koleralı domuzdan izole edilen *S. Chloeraesuis* suşları, 1980'lerin başında Le Minor vd. (1982) tarafından yeniden adlandırılarak *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür içinde sınıflandırılmıştır (Le Minor vd. 1982, Humphrey 2000). *S. enterica* subspecies *enterica*'nın altı alt türü (*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *houtaenae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *indica* ve *S. enterica* subsp. *arizonae*) vardır. Günümüzde ise, O (lipopolisakkarit O-antijen) ve H (filagellar protein) antijenleri esas alınarak belirlenen Kauffmann-White şemasına göre tanımlanan *Salmonella enterica*'nın insanlarda salmonellozisin % 80'inden sorumlu olan Typhimurium ve Enteritidis serovaryeteleri de dahil 2500'den fazla serovaryetesi bulunmaktadır (Pelludat vd. 2005, Sonne-Hansen ve Jenabian 2005).

Enterobacteriaceae familyası içerisinde yer alan *Salmonella* türleri Gram negatif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen bakterilerdir ve doğal ortamları hayvanların bağırsak sistemleridir. *Salmonella* cinsi üyelerinin optimum gelişme sıcaklıkları 37 °C olup; 7-47 °C sıcaklık aralığında, düşük su aktivitesinde (>0.94) ve pH 4-9 aralığında üreyebilirler (D'Aoust 1989, Budnik 1990). Bu mikroorganizmaların pH toleransı suş, inkübasyon sıcaklığı ve mevcut asit türüne bağlıdır (Doyle ve Cliver 1990). Besin ortamı ayarlanırken sitrik asit ve hidroklorik asit kullanıldığında pH 4'de üreyebilirler. Ancak propiyonik, asetik ve bütirik asitlerin kullanımı aynı pH'da üremeyi engeller. *Salmonella* türleri donma (-23 °C) ve kuruma ($A_w < 0.20$) gibi olumsuz koşullar altında yıllarca hayatta kalabilirler (Budnik 1990).

2.2 Salmonellozis ve *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Tifoidal olmayan enfeksiyonlar, yani salmonelloz, insanlar arasında yayılabilir. Salmonelloz; ishal, karın krampları, ateş ve mide bulantısı gibi belirtiler ile

karakterizedir. Bu semptomlar genellikle hafiftir ve birkaç gün sürebilir, ancak bireyler arasında değişkenlik gösterebilir. Özellikle yaşlılar, hamileler ve bağışıklığı baskılanmış olan bireylerde semptomlar daha şiddetli olabilir ve beraberindeki su kaybı hayatı tehdit edebilir. Salmonelloz ayrıca sistemik enfeksiyonlar ve uzun süreli veya kronik reaktif artrit ile de ilişkilidir (Hannu vd. 2006). İnsan salmonelloz vakaları genellikle hayvan kaynaklı kontamine gıda ürünlerinin tüketilmesinden kaynaklanır (RIVM 2011, Anonymous 2011). Bu gıda ürünleri aynı zamanda gıda kaynaklı salgınların da kaynağıdır (Anonymous 2012b). Son çalışmalar, meyve ve sebzelerin de *Salmonella* salgınları için potansiyel birer kaynak olabileceğini göstermiştir (Berger vd. 2010, Anonymous 2011).

Tifoidal olmayan salmonelloz, kontamine gıda ürünlerinin tüketilmesi ile teşvik edilir ve kuluçka süresi 12 ila 72 saat arasındadır. Alınan *Salmonella* hücreleri ilk önce asidik mide ile karşılaşılır ve sonra bağırsağa girerler. Bağırsaklarda; indirgenmiş oksijen, safra tuzları, yüksek ozmolarite, konak bağışıklık sistemi ve yerleşik mikroorganizmalarla besin öğeleri ve kalıcılık için rekabete girerler. Hayatta kalabilen ve bu koşullara uyum sağlayabilen bakteri hücreleri intestinal sisteme bağlanırlar (Rychlik ve Barrow 2005). Bu bağlanma, fimbria adı verilen bakteri hücre yüzeyindeki protein yapıları tarafından sağlanır (Ledeboer vd. 2006). Bağlandıktan sonra, bir efektör protein seti tip III salgı sistemi (TTSS) vasıtasıyla ökaryotik konakçı hücrelere enjekte edilir. En önemli iki TTSS, *Salmonella* patojenite adası 1 ve 2 tarafından kodlanır (SPI-1 ve SPI-2). TTSS'ler tarafından salgılanan efektör proteinler, bir bağışıklık yanıtını indükler ve salmonellozu karakterize eden semptomlara neden olur (Srikanth vd. 2011, de Jong vd. 2012). Bazı vakalarda *Salmonella* bağırsak hücrelerine tutunmakla kalmaz, aynı zamanda bağırsak hücrelerini işgal eder. Primer invazyon bölgesi, bağırsak lümenindeki M hücrelerdir. İnvazyondan sonra *Salmonella* pek çok sistemik enfeksiyona neden olabilir (de Jong vd. 2012).

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) farelerde tifoya neden olurken; insanlarda gastroenterit, diğer hayvanlarda enterit veya septisemiye neden olur. Tifoidal olmayan serovaryetelerin sebep olduğu gastroenterit vaka sayısı her yıl 90 milyonun üzerinde olup, bu vakalardan 150 binden fazlası ölümle

sonuçlanmaktadır (Majowicz vd. 2010, Jaglic vd. 2014). *S. Typhimurium* LT2'nun tüm genom dizisi 2001 yılında tamamlanmıştır (McClelland vd. 2001). Bu serovar, 1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde kontamine pastörize süttten 168,791 ve 197,581 kişiye bulaşarak farklı zamanlarda iki büyük gıda zehirlenmesi salgınına sebep olmuştur (Ryan vd. 1987). Gıda kaynaklı *Salmonella* enfeksiyonları bugün hala en önemli gıda kökenli enfeksiyonlardan biri olma özelliğini korumaktadır (Anonymous 2009).

2.3 Bakteriyel Biyofilmler

On yedinci yüzyılın sonlarında Antonie van Leeuwenhoek, mikroorganizmaların dış yüzeyine tutunduklarını tespit etmiş ve bu mikrobiyal biyofilmin ilk tanımlaması olarak sayılmıştır. 1930'lu yıllarda biyofilm oluşumu, bakterilerin cam yüzeylere tutunarak sabit topluluklar oluşturduklarını bildiren Zobell vd. (1943) tarafından tanımlanmıştır (Zobell 1943). Doğada bakterilerin yüzeylerde kolonileşme eğiliminde oldukları ve süspansiyon halinde üremek yerine biyofilmler oluşturduğu bilinmektedir. Biyofilm, hücre dışı bir matriste gömülü ve yüzey üzerinde hareketsiz kılınmış bakteri hücrelerinin birikimi olarak tanımlanmaktadır. Daha geniş bir tanımlama ile; biyofilmler, bakteriyel popülasyonların ara yüzeylere, birbirlerine ya da bir substrata geri dönüşümlü olarak tutunmaları ve ürettikleri hücre dışı polimerik matriksin içine gömülmeleri sonucu gelişme oranı ve genetik ifade ile ilişkili biçimde değişen bir fenotip sergileyen yapılar olarak adlandırılabilir (Donlan ve Costerton 2002). Biyofilm yapılarında en dikkat çekici özelliklerden biri, polimerik matriks içerisine gömülü vaziyette bulunan bakterilerin planktonik yaşam tarzlarından farklı olarak fenotipik ve morfolojik farklılıklar sergilemesidir (Stickler 1999).

ABD Ulusal Sağlık Enstitülerine göre, insan enfeksiyonlarının % 80'inden fazlası biyofilm kaynaklıdır (Kalmokoff vd. 2006). Tedavisi oldukça zor birçok kronik hastalığın başlıca etmeni olan bakteriyel biyofilmler; endokardit, kistik fibrozis, otit, kronik rinosinüzit, kronik ostemiyolit, prostetik eklem enfeksiyonları, interovenöz katater ve stentlerden kaynaklanan enfeksiyonlar ve kronik yara enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Costerton 2007). Biyofilmler içerisindeki bakteriler; çevresel streslere, antibiyotiklere, dezenfektanlara ve konakçı immün yanıtına karşı iyi bir şekilde

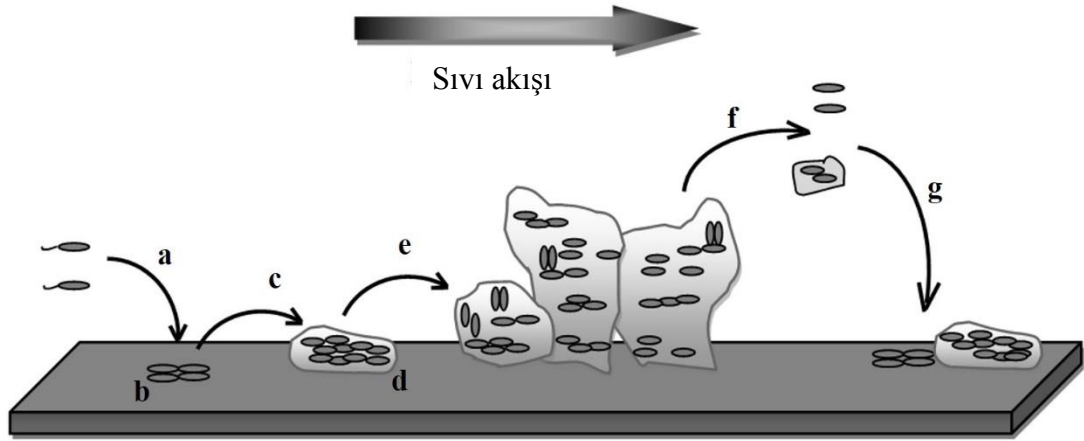
korunmuş olup, eradikasyonları oldukça zordur (Hoiby vd. 2010, Jensen vd. 2010). Biyofilm kaynaklı kronik enfeksiyonların en temel karakteristikleri, antibiyotik uygulamalarına yüksek düzeyde dirençlilik göstermeleridir. Uygulamalar, minimal inhibasyon konsantrasyonunu (MİK) incelemek suretiyle belirlenen antibiyotik etkinlikleri planktonik (serbest) formdaki laboratuvar fenotipleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Ancak aynı bakterilerin biyofilm formlarını öldürülebilmesi için gerekli olan doz, planktonik formlara etkili dozun binlerce kat üzerinde olabileceği bilinmektedir. Dolayısı ile biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar söz konusu olduğunda, planktonik bakterilerle yapılan laboratuvar testleri yerine biyofilm yapılarının kullanılması önerilmektedir (Davey ve O'toole 2000, Donlan 2002, Bothwell vd. 2003, Bayles 2007, Kirketerp-Moller vd. 2008).

Gıda endüstrisinde, işleme sırasında bakteriyel kontaminasyonu önlemek için etkili temizleme ve sanitasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Besin artıkları, mikroorganizmaların azaltılması ve ortadan kaldırılması için sodyum hipoklorit veya kuaterner amonyum bileşikleri gibi dezenfektan uygulamaları ile yüzeyden uzaklaştırılır (Blaschek 2007). Ancak 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. Gıda kökenli hastalıklara neden olan *Salmonella*'nın çeşitli gıda temaslı yüzeylere kolayca tutunabildiğini ve biyofilm oluşturduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır (Giaouris ve Nychas 2006, Oliveira vd. 2006, Chia vd. 2009, Rodrigues vd. 2011). Yüzeylerin zayıf sanitasyonu ile oluşan biyofilmler mikrobiyal kontaminasyon için kalıcı kaynak oluşturmaktadır. Bu nedenle biyofilm esaslı kontaminasyonlar dikkatle izlenmekte ve etkin önlemler alınmaya çalışılmaktadır (Shi ve Zhu 2009).

2.3.1 Biyofilm oluşum basamakları

Biyofilm oluşumu evreleri dört ana aşama içermektedir. Bunlar; planktonik hücrelerin yüzeye tutunması, EPS oluşumu ve hücre-hücre sinyal moleküllerinin üretimi, geri

dönüşümsüz tutunma ve olgun biyofilm yapısının oluşması şeklinde tanımlanmaktadır (Şekil 2.1) (Meireles vd. 2015). Mikrobiyal tutunma, biyofilm oluşumunun ilk aşamasıdır ve tersinir veya geri dönüşümsüz tutunma olarak iki şekilde sınıflandırılır. Birincisinde, sıvı akışı ile taşınan planktonik hücreler yüzeye geri dönüşümlü olarak tutunurlar. Bu safhada hücreler van der Waals kuvvetleri, elektrostatik kuvvetler ve hidrofobik etkileşimler gibi fiziksel güçlerin bir sonucu olarak veya flagella, fimbriya ve pili sayesinde bakteri hareketlerinin sonucu olarak taşınırlar. Geri dönüşümsüz tutunma durumunda ise, hücreler ile yüzey arasındaki kimyasal reaksiyonlar ile bakteriler yüzeye daha sağlam tutunurlar (Dunne 2002).



Şekil 2.1 Biyofilm oluşumunun basamakları (Meireles vd. 2015)

a; planktonik hücrelerin sıvı ile yüzeye taşınması, b; hücrelerin yüzeye tutunması, c; EPS oluşumunun başlaması ve hücre-hücre sinyal moleküllerinin üretilmesi, d; hücrelerin geri dönüşümsüz tutunması, e; biyofilmin olgunlaşması, f; biyofilmden kopmalar, g; biyofilmin yeniden oluşması

Mikrobiyal tutunma, üç kategoride gruplandırılabilen çeşitli faktörlerden etkilenebilir. Bunlar: (i) üreme ortamının özellikleri; (ii) yüzeyin özellikleri; (iii) mikroorganizmanın özellikleridir (An ve Friedman 1998, de Schryver vd. 2008). Tutunma sürecini etkileyen kültür ortamının özellikleri arasında; gerekli maddeler veya antimikrobiyal bileşikler, pH, sıcaklık, akış hızı, maruz kalma süresi, mikroorganizma konsantrasyonu, yüzey gerilimi ve iyonik kuvvetler bulunmaktadır. Yüzeyin fiziko-kimyasal ve morfolojik özellikleri de mikrobiyal tutunmanın etkinliğine katkıda bulunur. Yüzeyin kimyasal bileşimi, gözenekliliği ve pürüzlülüğü, mikroorganizmaların yüzeydeki yüksek veya düşük ilgisini belirler (Kokare vd. 2009). Yüzey özelliklerinin yanı sıra,

mikroorganizma yüzeyinin fiziko kimyasal özellikleri de tutunma sürecinde önem taşımaktadır. Tutunma sürecinde önemli rolü olduğu bilinen diğer mikroorganizma özelliği, hücre dışı matris (EPS) üretme kabiliyetidir (Watnick ve Kolter 2000).

Biyofilmin mikrokoloni oluşumu evresinde, yüzeye tutunan bakteri üremeye başlar ve tutunduğu yüzeyde koloni oluşturur. Aynı yüzeyde başka bakterilerin de koloni oluşturmaya başlaması ile polimer matriksite yer alan mikroorganizmalarda artış görülür. EPS senteziyle beraber bakteriler oluşan EPS'nin içinde gömülü bir vaziyette yaşamaya devam ederler. Bu durum bakterileri çeşitli antimikrobiyal ajanlara ve UV ışınlarına karşı dirençli kılmaktadır. Ayrıca biyofilm yapısı bakterilerin, diğer bakteriler ile genetik aktarım yapmalarına ve sekonder metabolit üretimlerinin artmasına da yol açmaktadır (Blenkinsopp ve Costerton 1991, Poulsen vd. 1999). Mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara dönüşürler. Aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (Kumar ve Anand 1998).

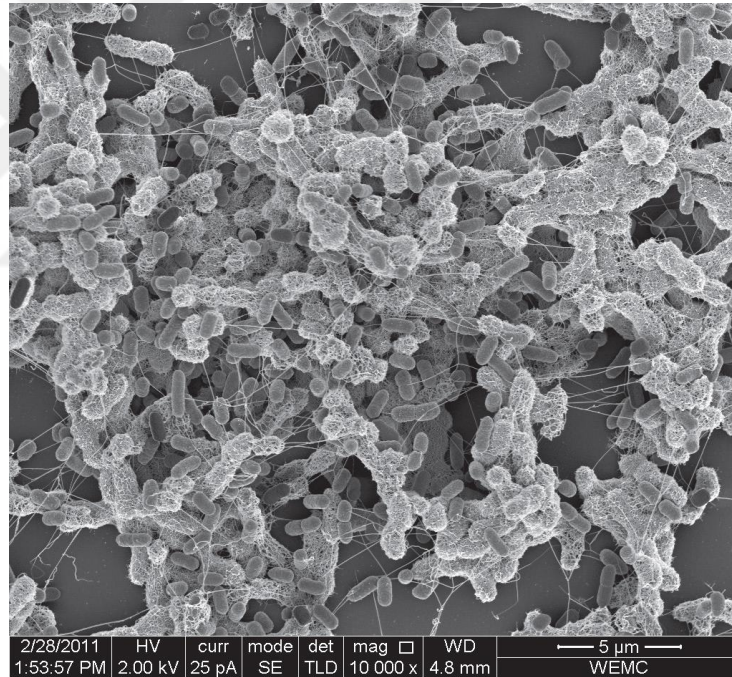
Biyofilm içindeki bir bakterinin farklı bölgelerde kolonize olabilmesi için birtakım dağılma mekanizmalarına ihtiyaç vardır. Biyofilm gelişiminin kopma veya ayrılma evresinde tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum basamağının bir parçası olarak tek bir hücrenin veya çoklu hücrelerin kopmasının bir sonucu da olabilmektedir (Costerton vd. 1994, Poulsen vd. 1999).

2.3.2 *Salmonella* biyofilm oluşumu ve biyofilm matriksi kompozisyonları

Salmonella suşları plastik, cam, çimento, kauçuk ve paslanmaz çelik gibi abiyotik yüzeylerde biyofilmler oluşturabilir (Arnold ve Bailey 2000, Joseph vd. 2001, Stepanovic vd. 2004, Chia vd. 2009). Endüstriyel ortamlarda ve evlerde yaygın olarak karşılaşılan bu yüzeylerde oluşan biyofilmler, gıda ürünlerinin (çapraz) kontaminasyonu için bir risk oluşturabilir. Abiyotik yüzeylerin yanında, *Salmonella*, konakçı epitel hücreleri (Ledebøer vd. 2006, Misselwitz vd. 2011) ve safra taşları (Prouty ve Gunn 2003) gibi biyotik yüzeylerde de biyofilm oluşturabilir. Ayrıca, son yıllarda ortaya

çıkan *Salmonella* salgınlarının tohumlar, sebzeler ve meyveler gibi bitki yüzeylerinde bulunan *Salmonella* biyofilmleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Teplitski vd. 2009, Berger vd. 2010).

Biyofilm oluşumu karmaşık bir süreçtir ve birçok çevresel faktör, EPS oluşumunu etkiler. Biyofilm biyokütlesinin % 90'ını oluşturan ekstrasellüler matriks; protein yapıları, ekzopolisakkaritler, lipopolisakaritler, ekstrasellüler DNA (eDNA) ve yağ asitlerini içeren bir ağdan oluşmaktadır. Bu matriks, biyofilm olgunlaşmasını kolaylaştırır, hücrelerin kurumasını önler ve biyofilm içerisindeki hücreleri kimyasal dezenfeksiyon işlemleri gibi çeşitli çevresel streslere karşı korur (Zogaj vd. 2001, Anriany vd. 2006, Gibson vd. 2006, White vd. 2006, Steenackers vd. 2012), (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 *S. Typhimurium* biyofilminin taramalı elektron mikroskop görüntüsü (Castelijm 2013)

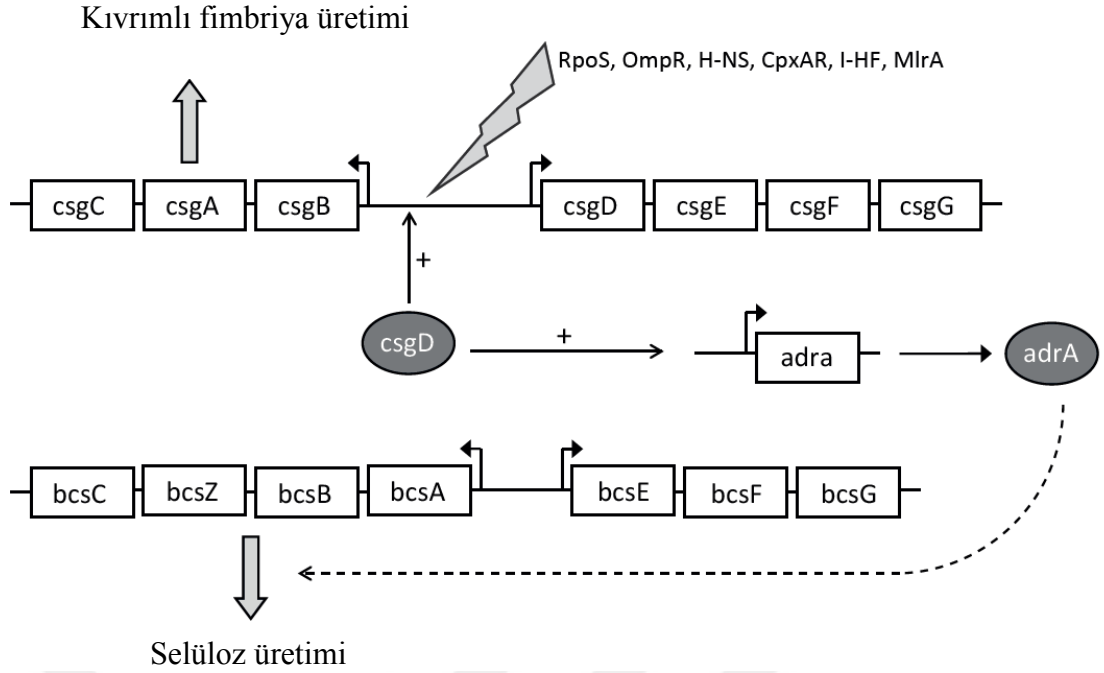
Hücre dışı matriks içinde bulunan hücreler

Salmonella biyofilmlerinin hücre dışı matriksinin en çok çalışılan yapıları kıvrımlı (curli) fimbriya ve selülozdur. Bu yapılar *Salmonella*'nın agar plakalarında çok hücreli davranışı sırasında oluşan rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü) morfotipe ait en önemli bileşenlerdir. Bu morfotip biyofilm oluşum kapasitesi ile ilgilidir (Römling vd. 1998,

Gerstel and Römling 2003, Römling 2005). Kıvrımlı fimbriya ve selüloz; *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Enterobacter* spp. ve *Citrobacter* spp. gibi *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri arasında yaygın şekilde ifade edilir (Gerstel ve Römling 2003, Bokranz vd. 2005, Solomon vd. 2005). Bu yapısal bileşenlerin ortak ifadesi, sıkı bir şekilde paketlenmiş hücrelerin hidrofobik ağı ile oluşur (Zogaj vd. 2001).

2.3.2.1 Kıvrımlı (curli) fimbriya

Kıvrımlı fimbriya, insan ve tavuk epitel hücreleri ve bitki yüzeyleri gibi biyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunu ve adezyonu sağlayan hücre dışı protein yapıları olmasının yanı sıra, çeşitli abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda da önemli bir rol oynamaktadır (Zogaj vd. 2001, Ledeböer vd. 2006, Berger vd. 2010, Hermans vd. 2011). Ökaryotik amiloid liflere biyokimyasal ve yapısal olarak benzemektedir ve konakçı kolonizasyonu, kalıcılık (persistans), hareket ve işgal (invazyon) gibi süreçlerde rol oynar. Amiloid lifleri gibi kıvrımlı fimbriyalar da Kongo kırmızısına bağlanan dallanmamış, β -tabakalı fiberlerdir ve işlevsel olarak birbirine bağlı iki *csgBAC* ve *csgDEFG* operonu tarafından kodlanır (Şekil 2.3). *csgA*, hücre dışındaki CsgB tarafından liflere bağlanan büyük yapısal altbirimi kodlar. CsgA ve CsgB, dış zar proteini CsgG ile hücre dışı ortamda salgılanır. Periplazmik proteinler olan CsgE ve CsgF'nin tam rolü henüz aydınlatılamamıştır, ancak bu proteinlerin kıvrımlı fimbriyanın birleştirilmesi için gerekli olduğu bilinmektedir (Barnhart ve Chapman 2006). Kıvrımlı fimbriya birleşimi CsgD tarafından etkinleştirilir. *csgD* ekspresyonunun regülasyonu çok karmaşıktır ve *csgBAC* ve *csgDEFG* operonları arasında bulunan büyük intergenik bir bölgenin kontrolü altındadır. Bu bölge; RpoS, OmpR, H-NS, CpxA/CpxR, I-HF ve MlrA gibi birkaç düzenleyici proteinin hedefidir. Düzenleyici proteinlerin bağlanması *csgD* ifadesini etkiler (Şekil 2.3). Düzenleyici proteinlerden oluşan farklı bir set, farklı çevresel koşullar tarafından aktive edilir ve bu nedenle *csgD*'nin ekspresyonu çevresel koşullardan yüksek oranda etkilenir (Gerstel ve Römling 2003, Barnhart ve Chapman 2006). *csgD* ekspresyonunu uyaran çevresel koşullar arasında ortam sıcaklığı, düşük ozmolarite, açlık ve mikroaerofilik koşullar yer almaktadır (Gerstel ve Römling 2003).



Şekil 2.3 *csgD* operonu tarafından kodlanan kıvrımlı fimbriya ifadesinde CsgD'nin rolünün şematik bir gösterimi (Castelijn 2013)

CsgD aynı zamanda *adrA*'nın ekspresyonunu artırarak selüloz üretimini dolaylı olarak etkiler. Bu nedenle, posttranskripsiyonel düzeyde selüloz üretimini etkileyen AdrA üretimi artırılır. *csgD*'nin transkripsiyonu, çevresel koşullar tarafından aktive edilen ve/veya baskılanan farklı düzenleyici proteinlerden etkilenir

2.3.2.2 Selüloz

Selüloz, β (1 \rightarrow 4) bağlı D-glukoz birimlerine karbonhidrat polimerlerinin bağlanmasıyla oluşan bir polisakkarittir. Kıvrımlı fimbriya gibi selüloz da çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda etkilidir. Biyofilm sisteminde hücre-hücre interaksiyonlarını tesis ederek yapışkan ve kompozit bir matris ağı oluşturur (Zogaj vd. 2001, Ledebøer vd. 2006, Barak vd. 2007). Selüloz biyosentezi için gerekli olan proteinler, *bcsABZC* ve *bcsEFG* operonları tarafından kodlanır (Şekil 2.3). BcsA, bir siklik-di(3' \rightarrow 5')-guanilik asit (c-di-GMP) bağlayıcı protein olan BcsB'nin bağlanmasıyla aktive edilen katalitik altbirimdir ve selüloz sentaz kompleksi BcsA ve BcsB'den oluşur (Zogaj vd. 2001). Selüloz üretiminin transkripsiyon sonrası regülasyonu, *adrA* ifadesi ile aktive olan CsgD'den dolaylı olarak etkilenir (Şekil 2.3). Bu gen, c-di-GMP üretiminde rol alan di-guanilat siklazı kodlar. c-di-GMP, BcsB'ye bağlanarak selüloz sentazı aktive eden efektör bir moleküldür (Zogaj vd. 2001, Römling 2005). CsgD kıvrımlı fimbriya ve selülozun yanında; büyük bir salgı proteini olan BapA

ve yüksek molekül ağırlıklı kapsüller polisakkarit (anyonik O-antijen kapsülü) gibi biyofilmlerin ekstraselüler matriks bileşenlerinin ekspresyonunu da etkiler (Latasa vd. 2005, Gibson vd. 2006). Sonuç olarak, CsgD biyotik ve abiyotik yüzeylerde *Salmonella* biyofilm oluşumunda kilit bir aktivatördür (Zogaj vd. 2001, Gerstel ve Römling 2003, Römling 2005, Zakikhany vd. 2010).

2.3.3 *Salmonella* biyofilmlerinde hücre-hücre etkileşimleri (quorum sensing)

Bakteriyel hücrelerin yeter sayı algılama (quorum sensing-QS) olarak bilinen bir süreçte, difüze olabilir küçük sinyal moleküllerini salgılayıp algılayarak iletişim kurdukları bilinmektedir (Miller ve Bassler 2001, Whitehead vd. 2001, Smith vd. 2004). Hücreden hücreye sinyal mekanizmaları yoluyla, bakteriler kendi davranışlarını modüle eder ve aynı zamanda diğer türlerin ürettiği sinyallere cevap verirler (Ryan ve Dow 2008). QS, gen ekspresyonunun modülasyonu ile sonuçlanan sinyal moleküllerinin (otoindükleyiciler, AI) yoğunluğa bağlı olarak tanınmasıyla oluşur (Bassler 1999). Gram pozitif bakteriler çeşitli otoindükleyici polipeptitleri (AIP) kullanırken, Gram negatif bakteriler otoindükleyici-1 (AI-1) gibi çeşitli *N*-açilhomoserin laktonları (AHL) kullanırlar. AHL'ler sırasıyla LuxI ve LuxR homologlarından oluşan QS devreleri tarafından sentezlenir ve tanınır (Whitehead vd. 2001). AHL'ler ve AIP'lerin her ikisi de onları üreten türlere özeldir. Üçüncü bir QS sistemi, türler arası iletişimi sağlayan, otoindükleyici-2 (AI-2) adı verilen bir bileşiğin üretiminden kısmen sorumlu olan LuxS enzimine dayanır (Schauder vd. 2001). Bakteriler genetik aktarım, patojenite (virulans), hareketlilik, sporülasyon, biyoluminesans ve antimikrobiyal maddelerin üretimi gibi çeşitli fizyolojik aktiviteleri düzenlemek için QS iletişim devrelerini kullanırlar (Miller ve Bassler 2001). Pek çok çalışma QS'nin birçok farklı tür tarafından biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır (Davies vd. 1998, Irie ve Parsek 2008, Annous vd. 2009, Lazar 2011). Biyofilmler tipik olarak yüksek konsantrasyonda hücre içerdiklerinden, otoindükleyici (AI) aktivitesi ve QS gen ekspresyonu regülasyonu biyofilm fizyolojisinin temel bileşenleri olarak önerilmiştir (Kjelleberg ve Molin 2002, Parsek ve Greenberg 2005). *S. enterica*'da üç QS sistemi belirlenmiştir ve virülansın düzenlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (SdiA, luxS / AI-2 ve AI-3 / epinefrin / norepinefrin sinyal sistemi) (Walters ve Sperandio 2006, Boyen vd. 2009).

2.4 Salmonella Biyofilmlerinin Eradikasyonu

Dezenfektanlar cansız yüzeylerdeki bakteriyel kontaminasyonu arındırmak amacıyla kullanılan kimyasal ajanlardır. Kimyasal dezenfektan olarak genellikle perasetik asit, klorheksidin glukonat, benzalkonyum klorid ve diğer kuaterner amonyum bileşenleri kullanılmaktadır (Wong vd. 2010a, Steenackers vd. 2012). Antibiyotiklerin aksine, geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahiptirler ve genellikle dış ve sitoplazmik membranlar, fonksiyonel ve yapısal proteinler, DNA, RNA ve diğer sitozolik bileşenler gibi mikrobiyal hücrelerdeki çeşitli hedefleri etkilerler (Russell 2003).

2.4.1 Klorheksidin diglukonat

Katyonik polibiguanid (bisbiguanid) klorheksidin, günümüzde kullanılan dezenfektanlar arasında en çok tercih edilenlerden biridir. Gram-pozitif, Gram-negatif patojenler ve mantarlar üzerinde geniş spektrumlu bakterisidal etkiye sahiptir. Antimikrobiyal aktivitesi sitoplazmik membranı bozan membran-aktif tip olarak tanımlanabilir. Amfipatik yapıda bir molekül olup, genellikle bakterilerin hücre yüzeyindeki fosfolipidler ve proteinlerle etkileşime girer. Fosfolipid baş grupları ile ilişkili divalent katyonların (Mg^{2+} ve Ca^{2+}) yer değiştirmesi ile işlev görür ve bu da membran akışkanlığında azalmaya neden olur (Davies 1973). Klorheksidin'in ayrıca bakterilerde oksijen kullanımını ve enerji üretimini de engelleyebileceği düşünülmektedir. Bu biyositin neden olduğu etkiler arasında DNA hasarı ve protein sentezinin engellenmesi yer almaktadır (Nde vd. 2009). İritasyonunun az olması ve uygulandığı yüzeyde uzun süre kalması gibi özelliklere sahip olduğundan diğer antimikrobiyal maddelere göre daha fazla tercih edilmektedir (Edmiston vd. 2013). Klorheksidin diglukonat, birçok türü ihtiva eden biyofilmleri kontrol etmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Uygulama konsantrasyonu antimikrobiyal etkinlikte kritik bir önem taşımaktadır. Düşük konsantrasyonu sitoplazma mebranının bütünlüğünü etkiler ve bakteriyostatiktir, yüksek konsantrasyonlarda klorheksidin bakteri hücre zarının sıvı kristal halini almasına neden olur ve hücresel içeriğin hızlı bir şekilde kaybedilmesini sağlar (bakteriyosidal) (Jones 2000, Touzel vd. 2016).

2.4.2 EDTA

Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) sentetik bir amino asittir ve EDTA'nın sodyum tuzları (Na_2EDTA) diş hekimliğinde kullanılmaktadır. Şelatlayıcı ajan olarak kullanılır ve aletlere karşı aşındırıcı değildir. EDTA genel olarak diş ve diş eti hastalarında görülen enfeksiyonların tedavisinde, tıbbi cihazların temizliğinde, veterinerlik alanında, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların cerrahi yaralarının temizlenmesinde ve ağır metal iyonlarıyla zehirlenme vakası görülen hastaların tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu bir dezenfektandır. Bakterisidal ve bakteriyostatik değildir, ancak büyüme için gerekli olan metalik iyonları şelatlandığı için bakterilerin üremesini engeller. Toksik olmamasına karşın, zayıf çözeltide hafif tahriş edici özelliktedir. % 15-17 konsantrasyondaki EDTA, dentin kalsiyumunu giderir ve geride yumuşak bir dentin matriksi bırakır. EDTA'nın % 17'lik bir konsantrasyonda 10 dakikadan fazla uygulanmasının, aşırı peritübüler ve intertübüler dentin erozyonuna neden olduğu gösterilmiştir. EDTA'dan istenen etkiyi elde etmek için önerilen uygulama, kök kanal sisteminde 1-5 dakika muamele edilmesidir. Sitrik asit bilinen bir alternatifi olmasına karşın EDTA daha hızlı bir şelatlayıcı ajandır (Iqbal 2012, Finnegan ve Percival 2015).

EDTA ayrıca biyofilmin yapısında bulunan çeşitli iyonların (magnezyum, bakır, çinko, demir) dengesini bozarak bakterinin hücre duvarını şelatlamaktadır, böylece biyofilmin ortamdaki eradikasyonuna ve patojen bakterilerin ölümüne neden olmaktadır. Özellikle katater ve benzeri yüzeylerde oluşan biyofilmlerin eradikasyonunda farklı ajanlarla (çeşitli antibiyotikler, sitrik asit, polihekzametil bisguanid ve gümüş gibi) beraber kullanıldığında daha yüksek düzeyde aktivite gösterdiği saptanmıştır. Katyon konsantrasyonunu azaltarak EPS'nin suda çözünürlüğünü arttırmakta ve antimikrobiyal ajanın biyofilmin içine nüfus etmesini sağlamaktadır (Finnegan ve Percival 2015). Düşük konsantrasyonlarda, bakterilerin tutunmasını engelleyerek biyofilm oluşumunu engellediği ve ayrıca biyofilm kolonizasyonunu ve proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Banin vd. 2006, Chang vd. 2012).

2.4.3 Sitrik asit

Sitrik asit (CAS No. 77-92-9), çeşitli bitkiler tarafından doğal olarak üretilen bir hidroksi trikarboksilik asittir. Farmasötikte ve gıda endüstrisinde ağırlıklı olarak kullanılan diğer asitlerle karşılaştırıldığında düşük toksisitesi nedeniyle sitrik asit tüketimine yönelik dünyada büyük bir talep bulunmaktadır. E330 olarak da bilinen sitrik asit, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan asitlerden biridir. Dünya FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi tarafından Genellikle Güvenilir Olarak (GRAS) kabul edilmiştir. Sitrik asitin diğer uygulamaları arasında deterjan ve temizlik ürünleri, kozmetik ve tuvalet malzemelerinde kullanılması sayılabilir. Antimikrobiyal ajan olarak kullanılmamasına karşın, % 0.75 konsantrasyonundaki sitrik asidin bazı küf ve bakterilere karşı aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar sitrik asitin *Salmonella*'ya karşı antimikrobiyal etkisinin diğer asidik bileşiklere göre; özellikle laktik asit ve hidroklorik asitten daha etkili olduğunu belirlemiştir (Nazer vd. 2005). pH-düşürücü etkisi yanında, şelatlayıcı ajan olarak kullanılmaktadır (Branen vd. 2001, Soccol vd. 2006). Wong vd. (2010b), 3 günlük *Salmonella* biyofilmleri üzerinde sitrik asit ve dezenfektanların etkisini araştırmış ve 5 dk inkübasyon sonrası sitrik asit ve sodyum hipokloritin önerilen kullanıcı konsantrasyonlarında (% 3.2 w/w) biyofilmi ortadan kaldırdığını belirlemiştir (Wong vd. 2010b).

2.5 *Salmonella* Biyofilmlerinin Stress Faktörlerine Karşı Direnci

Salmonella türleri, konakçısının bulunmadığı ortamlarda da hayatta kalabilirler. Bir bağırsak patojeni olmasına rağmen, biyofilm oluşturabilmelerinden dolayı konakçı organizmaların dışında adaptasyon sağlayabilirler. Oluşturdukları biyofilmlerin hem konakçı hem de konakçı olmayan ortamlarda karşılaşılan çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı bu bakterilere direnç kazandırdığı belirlenmiştir (Steenackers vd. 2012).

Dezenfektanların subletal konsantrasyonlarına sık sık maruz kalma olasılığı yüksek olan gıda işleme endüstrisi ve evlerde, bakterilerin antimikrobiyal bileşiklere olan direnç ve adaptasyonu artmaktadır. Dezenfeksiyon işlemi sırasında bir biyositin düşük miktarda

kullanılması bu biyositin biyofilmin derin bölgelerine nüfuz etmesini kısıtlayabilir. Biyofilmler bu nedenle dezenfektanların öldürücü miktarlarına karşı direnç geliştirebilmektedir. Bakteriler arasındaki dezenfektan duyarlılığındaki değişiklikler, tipik olarak antibakteriyel bileşiklerin alımını etkileyen intrinsik bakteri membranı özellikleri ile ilişkilendirilmiştir (Sheldon 2005, Møretro vd. 2012). Gram-negatif bakterilerde, LPS katmanı ile birlikte dış zar, kimyasal dezenfektanlara karşı ana bariyerdir. Ayrıca biyofilm matriksi antimikrobiklerin biyofilm içerisindeki bakterilere nüfuzunu engelleyerek bir bariyer görevi görmektedir. Biyofilmlerin kalınlığına (tek ya da çok tabakalı oluşuna) göre, uygulanan biyositlerin hücrelere penetrasyon etkinliği değişmektedir (Stewart vd. 2001).

Salmonella'da önemli antimikrobiyal mekanizmalar; efluks, enzimatik bozunma ve spesifik antimikrobiyal hedeflerdeki mutasyonlar veya hedef proteinlerin aşırı ifadesidir (Nishino vd. 2009). *Salmonella*'da, hücrenin dışına transportu sağladığı (AcrAB, AcrEF ve MdsABC) bilinen en az dokuz ilaç efluks gen sistemi mevcuttur. *Salmonella*'nın dezenfektanlara toleransındaki efluksun rolü hakkındaki çalışmalar ve bilgiler, çoklu antibiyotik direncinde bilinen rolü ile karşılaştırıldığında sınırlıdır. AcrAB-TolC efluks sisteminin artan ekspresyonu, dezenfektanlar da dahil olmak üzere antimikrobik maddelere duyarlılığın azaltılmasında temel bir mekanizma olarak tanımlanmıştır. Efluks sistemleri; genellikle düşük pH, ozmotik değişiklikler, dezenfektanlar ve/veya konakçı hücre tarafından üretilen bileşikler gibi çeşitli stres faktörleri yoluyla indüklenmektedir (Nishino vd. 2009, Møretro vd. 2012).

2.5.1 *Salmonella* biyofilmlerinin dezenfektanlara karşı direnci

Biyofilm ve planktonik *S. Typhimurium* hücrelerinin kimyasal dezenfektanlara karşı duyarlılığını karşılaştırmak için çeşitli çalışmalar yapılmış ve *Salmonella* biyofilmlerine karşı yaygın olarak kullanılan dezenfektanların etkinliği karşılaştırılmıştır (Joseph vd. 2001, Mangalappalli-Illathu ve Korber 2006, Tabak vd. 2007, Mangalappalli-Illathu vd. 2008, Arnold ve Yates 2009, Moretro vd. 2009, Wong vd. 2010a). Joseph vd. (2001), plastik, çimento ve paslanmaz çelik yüzeylerdeki *Salmonella* biyofilmlerinin, planktonik hücrelere kıyasla klor ve iyot dezenfektanlarına karşı çok daha dirençli

olduğunu belirtmiştir. Yüzeyle bağı olarak 15 dk muamle ile biyofilmleri tamamen ortadan kaldıran konsantrasyonlar; klor için 100 ppm ve iyot için 50 ppm olurken, planktonik hücreleri 5 dk da tamamen öldüren konsantrasyonların klor ve iyot için sırasıyla 10 ve 5 ppm olarak belirlemişlerdir (Joseph vd. 2001). Bir başka araştırmada ise; polistiren peglerdeki *Salmonella* biyofilmlerinin klorheksidin glukonat, sitrik asit, benzalkonyum klorid ve diğere kuaterner amonyum bileşiklerine, planktonik hücrelere kıyasla daha az duyarlı olduğunu belirlenmiştir (Wong vd. 2010a). Tabak vd. (2007) yaptıkları çalışmada, planktonik *Salmonella* hücreleri (log ve sabit fazlar), biyofilm ile ilişkili hücreler ve parçalanmış biyofilmden türetilmiş bakteriler üzerinde triklosanın etkisini araştırmıştır. Triklosan'ın (1000 µg/ml) log fazındaki hücreler üzerinde güçlü bir etkisinin olduğu gözlenirken, sabit faz ve biyofilm kaynaklı hücrelerde daha az, parçalanmış biyofilmden türetilmiş hücrelerde ise zayıf bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Biyofilm ile ilişkili hücrelerin, biyofilm kaynaklı hücrelere kıyasla daha yüksek direncinin olması, triklosan direncinde matriksin önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Bu durum ayrıca kıvrımlı fimbriya ve selüloz sentezini kodlayan genlerdeki delesyonların varlığının biyofilmi daha duyarlı hale getirdiği bulgusu ile doğrulanmıştır (Tabak vd. 2007).

2.5.2 *Salmonella* biyofilmlerinin antimikrobiyal direnci

Dezenfektanlara karşı artan direnç yanında, *Salmonella* biyofilmleri antibiyotiklere de direnç kazandırmaktadır. Biyofilmlerdeki antibiyotik direnci; mikroorganizmaların intrinsik direnci, ekstraselüler matrikse antibiyotik difüzyonunun azalması veya matriks içindeki inaktivasyonu gibi mekanizmalar ile oluşabilmektedir. Ayrıca biyofilmler sayesinde lateral gen transferi aracılığıyla antibiyotiklere karşı direnç gelişebilmektedir (Hannan vd. 2010). Zira biyofilm ortamları genetik aktarım için optimum ortamlardır. Olson vd. (2002), planktonik hücreler üzerindeki enrofloksasin, gentamisin, eritromisin, tilmikozin, ampisilin, oksitetrasiklin ve trimetoprim-sulfadoksin antibiyotiklerinin ve klinik *S. Typhimurium* ve *S. Bredeney* izolatlarının polistiren pegler üzerindeki olgun biyofilmlerine etkisini araştırmıştır. Planktonik popülasyonların eritromisin ve tilmikozin hariç tüm antibiyotiklere karşı duyarlı olduğu, *Salmonella* biyofilmlerinin ise sadece enrofloksasin ve ampisiline duyarlı olduğu bulunmuştur. Tabak vd. (2009) ise,

olgun *S. Typhimurium* biyofilmlerinin planktonik hücelere kıyasla siprofloksasine karşı 2000 kat daha dayanıklı olduğunu belirlemiştir. Farklı bir çalışmada; gentamisin, siprofloksasin ve sefotaksim alt inhibisyon konsantrasyonlarının (sub-MİK), klinik *Salmonella* izolatlarının polistiren mikrotitre plakalarında oluşturdukları biyofilm miktarı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Gentamisin ve siprofloksasin sub-MİK'leri, test edilen tüm izolatların oluşturduğu biyofilm miktarını azaltırken, üç izolatta sefotaksim antibiyotığının 1/2 MİK değeri ile biyofilm oluşumunda ve EPS üretiminde belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar, antibiyotiklerin sadece bakteriyel silahlar olmadığını, aynı zamanda mikrobiyal toplulukları düzenleyen sinyal molekülleri olabilecekleri görüşünü de desteklemektedir (Majtán vd. 2008, Steenackers vd. 2012).

2.5.3 Sıcaklık, pH ve NaCl'nin *Salmonella* biyofilmlerine etkisi

Salmonella biyofilmleri konakçı dışında sıklıkla karşılaşılan sıcaklık, düşük pH ve radyasyon gibi diğer stres faktörlerinin etkisi altındadır. Biyofilm oluşumu; suşların buldukları besin ortamı, tutunacakları yüzeyin tipi, sıcaklık, pH, temas süresi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Ayrıca genetik ifadenin; sıcaklık, O₂, CO₂, pH ve besin miktarı gibi çevresel koşullarda değiştiği bilinmektedir (Ogasawara vd. 2011).

Farklı NaCl konsantrasyonlarında hücre yüzey özelliklerinin değişmesi ile biyofilm dağılması arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak hücre hidrofobisitesi azalmaktadır. Yüzeylerde biyofilm oluşumu için yüksek hidrofobisite önem taşırken, NaCl konsantrasyonunun artması hücre adezyonunu engellemektedir (Xu vd. 2010). Gıda bozulmalarının engellenmesi, gıda kaynaklı hastalıkların önüne geçilmesi ve gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasında, pH değişimlerinden ve farklı NaCl konsantrasyonları ile belirlenen su aktivitesinden yararlanılmaktadır. Özellikle gıda kaynaklı patojenlerin öldürülmesinde ya da üremelerinin önlenmesinde geleneksel tuzlama yöntemi (NaCl) uzun yıllardır kullanılmaktadır (Doyle ve Glass 2010). Gıdalar üzerinde de biyofilm oluşturabildiği bilinen *Salmonella*'nın gıda yüzeylerindeki biyofilmlerinin engellenmesinde tuzlama ve pH etkileri gözetilerek gıda korumasına katkıda bulunulabilir. Gıdalardaki bakteriyosinlerin aktivitesi; gıdanın kimyasal bileşimi, pH ve sıcaklık gibi fiziksel

koşullar da dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenir (Balciunas vd. 2013). Prudencio vd. (2016), farklı sıcaklık ve pH'larda *S. Typhimurium*'un EDTA ve nisin kombinasyonuna duyarlılığını araştırmıştır. *S. Typhimurium* hücrelerinin sayısındaki azalma, sıcaklığa ve pH'ya göre değişmiş ve sıcaklık artışı ile hücrelerin logaritmik olarak azalması sağlanmıştır. Düşük sıcaklık ve düşük pH'da, EDTA varlığına bakılmaksızın, bakteriyosine uzun süre maruz kaldıktan sonra canlılığın önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar *Salmonella*'ya karşı nisin kullanım olanağının bulunduğunu kanıtlanmıştır (Prudencio vd. 2016).

2.6 Bakteriyosinler ve Sınıflandırılması

Bakteriyosinler antimikrobiyal aktiviteye sahip ribozomal olarak sentezlenen peptitler veya proteinlerdir. Sentezlenme ve etki şekilleri, toksisite ve direnç mekanizmaları bakımından antibiyotiklerden farklıdırlar. İlk olarak *Escherichia coli*'de (kolisin) tanımlanmıştır. Kolisinlerin çoğu, iç membrana veya diğer sitozolik hedeflere bağlanarak yakın akraba bakterileri öldüren büyük proteinlerdir (80 kDa'a kadar) (Cascales vd. 2007). Günümüzde bakteriyosin terimi, daha geniş bir inhibisyon spektrumu sergileyen ve Gram pozitif laktik asit bakterileri (LAB) tarafından sentezlenen küçük, ısı-kararlı katyonik peptidleri tanımlamak için kullanılmaktadır (Cotter vd. 2005). LAB, geleneksel olarak gıda ile ilişkili olduğundan ve güvenli olarak değerlendirildiğinden, gıdaların biyolojik korumasında çoğunlukla LAB bakteriyosinleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Garcı'a vd. 2010).

Bakteriyosinler; primer yapıları, bileşimleri ve fiziko-kimyasal özellikleri açısından çok heterojen bir gruptan oluşur. Bakteriyosinler "evrensel" sınıflandırılmalarında dört ana sınıf içerisinde gruplandırılmaktadır (Çizelge 2.1) (Heng ve Tagg 2006), (Garcı'a vd. 2010).

Çizelge 2.1 Bakteriyosinlerin sınıflandırması (Heng ve Tagg 2006)

Sınıf	Genel Özellikler	LAB tarafından üretilen bakteriyosin
I-Lantibiyotikler	Modifiye edilmiş, ısıya dayanıklı, <15 kDa	
Ia-Doğrusal	Gözenek oluşumu, katyonik	Nisin, Laktisin 481, Plantarisin C
Ib-Küresel	Enzim inhibitörleri, katyonik değil	Yok
Ic-Çok bileşenli	İkili peptid	Lct3147, Plantarisin W
II-Modifiye edilmemiş peptidler	Isıya dayanıklı, <15 kDa	
IIa- Pediosin benzeri	Anti- <i>Listeria</i> , YGNGV konsensüsü	Pediosin PA1/AcH, Enterosin A, Sakasin A
IIb-Çok yönlü	Pediosin benzeri olmayan	Enterosin B, L50, Karnobakteriyosin A
IIc-Çok bileşenli	İkili peptid	Laktokoksin G, Plantarisin S, Laktasin F
III-Büyük proteinler	Isıya dayanıksız, > 30 kDa	
IIIa-Bakteriyolitik	Hücre duvarı bozulması	Enterolisin A, Lcn972 ^a
IIIb-Litik olmayan	Sitozolik hedefler	Kolisin ^b E2-E9
IV-Halkasal peptidler	Isıya dayanıklı, kuyruk başında peptid bağı	AS-48, Gasserisin A, Asidosin B

^a Lcn972 hücre duvarındaki lipit II'ye bağlanır ve hücre duvarı biyosentezini bloke eder, 15 kDa.
^b Kolisinler *E. coli* tarafından sentezlenir.

Sınıf I veya lantibiyotikler, lantiyonin ve β -metil-lantiyonin'in tiyoeter esaslı intramoleküler halkalarıyla karakterize edilen post-translasyonel olarak modifiye edilmiş peptidlerden oluşmaktadır (Xie ve van der Donk 2004). Sınıf II, ısıya dayanıklı, modifiye edilmemiş peptitleri kapsar ve Gram pozitif bakteriyosinler arasındaki en büyük sınıftır. Genellikle, yüksek izoelektrik noktaları olan kısa katyonik peptitlerdir. Pediosin benzeri bakteriyosinler güçlü anti-*Listeria* aktivitesi göstermelerinden dolayı gıdaların biyolojik muhafazasında kullanılırlar (Sınıf IIa). Sınıf III, gıda biyo-koruyucu madde olarak kullanılabilen ısıya dayanıksız büyük proteinlerden oluşur. Kolisin V ve mikrosinler hariç olmak üzere, Gram negatif bakteriyosinler bu sınıfa girmektedir. Son olarak, C- ve N-terminalleri arasında bir peptid bağı ile karakterize edilen halkasal peptitler sınıf IV'te gruplandırılmıştır. Aktifliği, iki bağımsız peptitin uyumlu çalışmasına bağlı olan bakteriyosin örnekleri hem I hem de II. sınıflarda bulunur.

Gıdaların biyolojik muhafazasında kullanılan çoğu LAB bakteriyosinleri, Sınıf Ia, II ve IV'e aittir (Çizelge 2.1). Ribozomal olarak sentezlenen peptidler (bakteriyosinler) plasmid- veya kromozom- üzerinde bulunan özel taşıyıcı proteinleri kodlayan yapısal genler ile kodlanır (Heng ve Tagg 2006, Garcı'a vd. 2010).

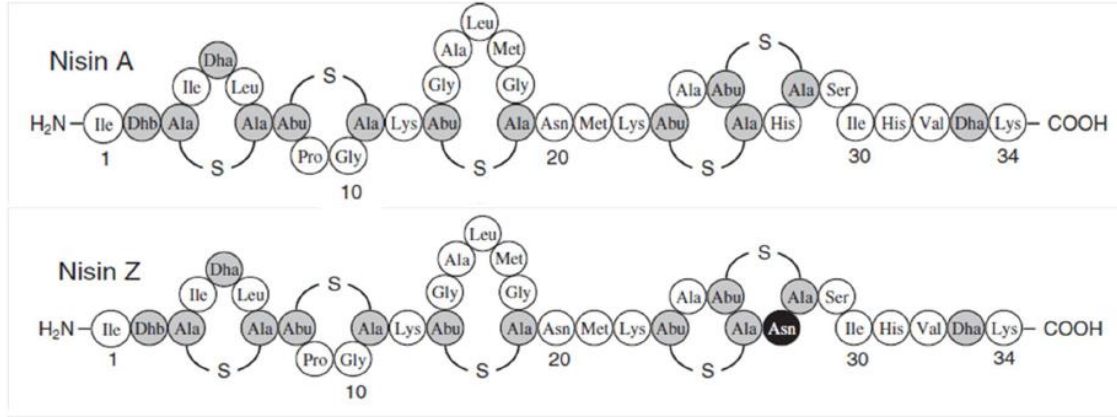
2.6.1 Nisin

2.6.1.1 Nisinin yapısı

Bir bakteriyosin olan nisin ilk olarak İngiltere'de Rogers ve Whittier (1928) tarafından keşfedilmiştir (Rogers ve Whittier 1928). Özellikle *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* gibi bazı laktik asit bakterileri tarafından (LAB) savunma yanıtı olarak üretilmektedir. Nisinin gıda koruyucu olarak kullanımı ilk olarak Hirsch vd. (1951) tarafından önerilmiştir. Günümüze kadar, 50'den fazla ülkede koruyucu katkı maddesi olarak kullanılmak üzere onaylanan nisin bakteriyosini GRAS olarak tanımlanmıştır (Anonymous 1969, Anonymous 1998, Jay 2000). Nisin, sentetik olarak veya modifiye süt ortamının fermantasyonu sırasında üretilir (Lee ve Kim 1985). Nisaplin® (Danisco tarafından üretilmiştir) ve Krisin, *L. lactis* subsp. *lactis* yabancı tip izolatları kullanılarak hazırlanan ticari preparatlardır (White 2011).

Nisin sınıf I lantibiyotikler içerisinde kategorize edilmektedir. Lantiyonin ve metillantiyonin grupları içeren küçük katyonik, amfifilik polipeptitlerdir (Klaenhammer 1993). Esnek bir yapıda olup kararlı dimer bir formu vardır. Nisin monomerinin moleküler ağırlığı 3.5 kDa'dur ve 34 aminoasit içerir. *L. lactis*'ten izole edilen A, Z, F ve Q; *Streptococcus uberis*'den izole edilen U ve U2; *Streptococcus suis* ve *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*'den izole edilen P varyantları bulunmaktadır (Khan ve Oh 2016). Son zamanlarda *Streptococcus hyointestinalis* tarafından üretilen nisin H olarak adlandırılan yeni bir nisin varyantı izole edilmiştir (O'Connor vd. 2015). Nisin A ve Z en aktif formlarıdır. Her iki formu da içerdiği histidin sayılarına göre farklılık gösterir (A formu 2, Z formu 1) (Şekil 2.4). Z varyantında 27. pozisyondaki histidin asparajin ile değişmiştir ve böylece bu nisin varyantının çözünürlüğü ve difüzyon karakteristiği artmıştır (Laridi vd. 2003). Sıradışı

amino asitleri; nisinin asit toleransı, düşük pH'da termostabilite, antimikrobiyal aktivite ve bakterisidal etki gibi fonksiyonel özelliklerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (White 2011, Gharsallaoui vd. 2015).



Şekil 2.4 Nisin A ve Z varyantlarının yapısı (Fukao vd. 2008)

Siyah dolgulı amino asit nisin A ile karşılaştırıldığında farklı amino asidi, gri dolgulular ise sıradışı amino asitleri göstermektedir. ABU, aminobutirik asit; DHA, dehidroalanin; DHB, dehidrobutirin (β -metildehidroalanin); ALA-S-ALA, lantiyonin; ABU-S-ALA, β -metillantiyonin

2.6.1.2 Nisinin fizikokimyasal özellikleri

Nisinin antimikrobiyal aktivitesi büyük ölçüde pH değişimindeki çözünürlüğüne ve yapısal stabilitesine bağlıdır. Asidik koşullar altında daha çözünür ve daha karardır. pH 2.5'de ağırlıkça % 12, pH 5.0'te ağırlıkça % 4'lük bir çözünürlüğe sahiptir. Nötr pH'a ulaşıldığında veya aşıldığında bu çözünürlük sıfıra yakındır (Hurst 1981). Nisin aktivitesi, düşük sıcaklıklarda (örneğin dondurma sırasında) son derece karardır, ancak bu aktivite, peptid uzun süre ısıtıldığında kaybolabilir. Buna ek olarak, nisin termostabilitesi büyük oranda pH ile ilişkilidir. Örneğin, nisinin antibakteriyel aktivitesi, 121 °C'de otoklavlama sonrasında pH 2'de tamamen korunur ancak pH 11'de 63 °C'de 30 dakika sonra tamamen kaybolur (Hansen vd. 1991). Nisin, peptid zincirini kırabilen pankreatin, α -kimotripsin ve fisin gibi proteolitik enzimler tarafından inaktive edilebilir. Bununla birlikte, tripsin, pepsin ve karboksipeptidaz gibi diğer enzimlerin nisinin antimikrobiyal aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi yoktur (Chollet vd. 2008).

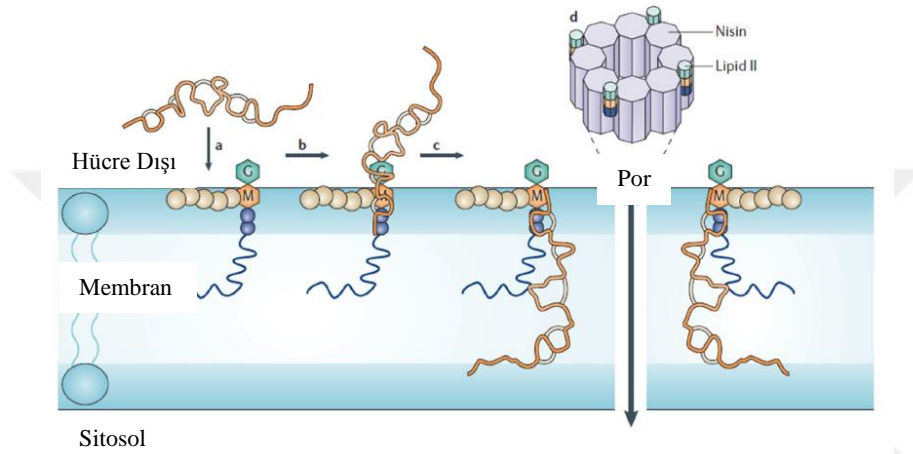
2.6.1.3 Nisinin antimikrobiyal etki aralığı

Nisin, doğal bir antimikrobiyal peptid olarak kullanılmaktadır ve üretici organizma da dahil olmak üzere Gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Vejetatif hücrelerin ve sporların nisin'e duyarlılığı *Alicyclobaccillus*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Micrococcus* ve *Staphylococcus* bakteri cinsleri arasında farklılık göstermektedir (White 2011). Nisin'e dirençli olan Gram pozitif suşlar, nisini indirgeyen nisinaz enzimini sentezleyebilmektedirler (Abee vd. 1995). Gram negatif bakterilerde bulunan dış lipopolisakarit membranı aşamaması nedeniyle, nisin bu bakterilere karşı etkili değildir (Boziaris ve Adams 1999). Bunun yanında maya hücre duvarını da aşamaz ve küflere etki etmemektedir. Nisin ile diğer antimikrobiyal maddelerin kombinasyonlarının bakterilere karşı önemli ölçüde önleyici veya öldürücü etkileri olduğu bildirilmiştir. Özellikle pediosin (Cabo vd. 2009) ve leukosin F10 (Parente vd. 1998) gibi bakteriyosinler, karvakrol (Pol ve Smid 1999) ve timol (Solomakos vd. 2008) gibi bitki esansiyel yağları, lizozim (Mangalassary vd. 2007), EDTA (Ukuku vd. 2009), sıcaklık, darbeli elektrik alanı (Dutreux vd. 2000) ve yüksek basınç (Yuste vd. 1998) ile birlikte kombine edildiğinde başarılı olunmuştur. Nisin tek başına Gram negatif bakterilere karşı etkili değildir (White 2011). EDTA, proteinler ve polisakaritler arasında elektrostatik etkileşimler sağlayarak, Gram negatif dış membranın stabilitesine katkıda bulunan iki değerlikli katyonların (özellikle Ca^{2+} ve Mg^{2+}) şelatlayıcısıdır. Bu etkileşimlerin yokluğunda nisin gibi antimikrobiyal ajanlarla parçalanmaya duyarlılığı arttıran hidrofobik fosfolipidler ortaya çıkarır. EDTA varlığında nisin, *Salmonella* gibi Gram negatif bakterilere karşı yüksek bir aktiviteye sahiptir (Tu ve Mustapha 2002).

2.6.1.4 Nisinin etki mekanizması

Katyonik ve hidrofobik özelliklerinden dolayı çoğu peptid, membran geçirgenliğini artırır. Duyarlı vejetatif hücrelerde nisinin hem A hem de Z formlarının birincil etki alanı sitoplazmik zarıdır (Abee vd. 1995, Kuwano vd. 2005). Nisin membrana bağlanarak membran bütünlüğünü yok eden gözenek (por) oluşturma yeteneğine sahiptir. Por oluşumu sonucunda, K^+ iyonlarının ve ATP'nin sızıntısı ile birlikte proton

motivasyon gücü tükenir ve transmembran potansiyelinin depolarizasyonu sayesinde hücre ölümü gerçekleşir (Millette vd. 2004). Ayrıca nisin, bir peptidoglikan öncüsü olan lipid II ile bağlanarak hücre duvar biyosentezini bozduğu da saptanmıştır (Mantovani ve Russell 2001, Bauer ve Dicks 2005). Böylece, hücre duvar biyosentezinin inhibisyonu ve gözenek oluşumu ile güçlü bir antimikrobiyal aktivite için ikili etki birleştirilir (Şekil 2.5) (Wiedemann vd. 2001, Garcı'a vd. 2010).



Şekil 2.5 Nisin etki mekanizmasının şematik görünümü (Gharsallaoui vd. 2015)

a. Nisin önce bakteri plazma zarına ulaşır, b. amino terminal halkaları vasıtasıyla Lipid II'ye bağlanır, c. daha sonra gözenek oluşumu gözlenir, d. Dörtlü nisin-Lipid II kompleksi oluşumu sırasında diğer bir dörtlü nisin molekülü por kompleksini oluşturmak için dahil olur

2.6.2 Nisinin gıda uygulamalarında kullanımı

Nisin (E234), renk verici ve tatlandırıcılar dışındaki gıda katkılarından farklı olarak 95/2/EC (Anonymous 1995) sayılı yönergesi ile Avrupa Birliği'nde gıda koruyucusu olarak onaylanmıştır. İşlenmiş peynir, bazı pudingler, krema ve maskarponda bulunur. Nisin için teknik özellikler 96/77/EC yönergesinde belirtilmiştir (Anonymous 1996). Gıda Katkı Maddeleri FAO/WHO Ortak Uzman Komitesi (JECFA), nisin çok yüksek spesifik aktivitesi nedeniyle gıda işlemede saf biçimde kullanılmaması gerektiğini tespit etmiş ve sonuç olarak en az % 2.5 aktif nisin olan ticari nisin konsantreleri için bir şartname belirlemiştir. 2001 yılında, FDA nihai üründe azami % 0.025 nisin ihtiva eden bir seviyede kullanıldığında, pişmiş et ve kümes hayvanı ürünlerinde GRAS olarak kabul edileceğini onaylamıştır (Anonymous 2001).

Bakteriyosinler temel olarak üç farklı formatta uygulanabilir: i) starter veya koruyucu kültürler ile *in situ* üretim, ii) bileşen maddesi olarak (bakteriyosinojenik suşun fermantasyonu) olarak veya iii) yarı veya saflaştırılmış bir preparatta bir katkı maddesi olarak (García vd. 2010). Nisin'in bazı yaygın kullanımları çizelge 2.2'de verilmiştir (Gharsallaoui vd. 2015).

Çizelge 2.2 Bazı gıda uygulamalarında nisinin kullanımı (Gharsallaoui vd. 2015)

Gıda	Hedef bakteri	Etkin nisin konsantrasyonu (IU mL ⁻¹ /IU g ⁻¹)	Kaynak
Süzme peynir	<i>L. monocytogenes</i>	2000	Ferreira ve Lund 1996
Rikotta peyniri	<i>L. monocytogenes</i>	100	Davies vd. 1997
Yağsız süt	<i>B. cereus</i> sporları	4000	Wandling vd. 1999
Bologna tipi sosis	<i>Lb. sake</i> ve <i>Lb. curvatus</i>	1000	Davies vd. 1999
İşlenmiş peynir	<i>Clostridium</i> spp.; <i>Bacillus</i> spp.	200-600	Delves-Broughton 2005
Süt ürünleri	<i>Clostridium</i> spp.; <i>Bacillus</i> spp.	10-400	Delves-Broughton 2005
Pastörize çorba	<i>B. cereus</i>	100-250	Delves-Broughton 2005
Hamur tatlısı	<i>B. cereus</i>	160-250	Delves-Broughton 2005
Konserveler	<i>C. botulinum</i>	100-200	Delves-Broughton 2005
Daldırma sosları	LAB	50-250	Delves-Broughton 2005
Bira	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i>	1000-1500	Delves-Broughton 2005

2.6.3 Nisinin kombinasyon uygulamaları

Pek çok çalışmada; nisinin etkinliğinin, lizozim (Chung ve Hancock 2000), bazı laktatlar (Nykänen vd. 2000), esansiyel yağlar (Razavi Rohani vd. 2011) ve listeriofajlar (Dykes ve Moorhead 2002) gibi diğer moleküller ile kombine edildiğinde arttığı gösterilmiştir. Özellikle bazı araştırmacılar, diğer bakteriyosinlerle birlikte nisinin antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmiştir (Gálvez vd. 2008). Lizozim, *Bacillus* cinsi bakterileri inhibe etmek amacıyla peynir yapımında yaygın olarak kullanılan bir

enzimdir. Ancak *Lactococcus* türleri gibi nisin üreticileri üzerinde hiçbir etkiye sahip değildir. Araştırmacılar lizozim ve nisin kombinasyonunu, nisinin tek başına kullanıldığı numuneler ile karşılaştırdıklarında ve taramalı elektron mikroskobu ile incelediklerinde, hücre hasarına neden olduğunu belirtmişlerdir (Chung ve Hancock 2000). Ayrıca nisin'in laktik asit ile kombinasyonu sonucu bazı Gram negatif bakterileri inhibe etme etkinliğinin arttığı saptanmıştır (Ariyapitipun vd. 2000).

Isıl işlem esnasında nisin ilavesi, gıdaların organoleptik ve duyuşsal özelliklerini korumaya yardımcı olan ve gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmanın etkili bir yoludur (Al-Holy vd. 2012, Li vd. 2012). Sterilizasyon sırasında nisinin, D sabitinin (ondalık azaltma süresi) değerini değiştirerek mikroorganizmanın ısıl direncini etkilediği bilinmektedir. Nisin (25 mg L^{-1}) varlığında, sütteki *B. cereus*'un ortalama D değeri, 80-100 °C'lik bir sıcaklık aralığında % 40'dan fazla azalmıştır (Penna ve Moraes 2002).

Mevcut eğilim, yüksek hidrostatik basınç (HHP) (Pathanibul vd. 2009, Zhao vd. 2012) ya da dalgalı alan elektrik (PEF) (Nguyen ve Mittal 2007) uygulamaları gibi yeni termal olmayan ayırma teknikleriyle birlikte nisinin kullanılması şeklindedir. HHP uygulamaları, *E. coli* ve *P. fluorescens* gibi Gram-negatif bakterileri inaktive edebilmektedir. Lee ve Kaletunç (2010), iki patojen *S. Enteritidis* suşunun difransiyel tarama kalorimetresi (DSC) ile nisin (5 mg L^{-1}) ve HHP'nin (100-150 MPa) ve bunların kombinasyonlarının etkilerini incelemiştir. Basıncın, suşların nisin duyarlılığını arttırdığını göstermişlerdir (Lee ve Kaletunç 2010).

Florür ve klorheksidin, en yaygın anti-diş çürüğü ajanları olup diş macunu ve gargarada birincil bileşenler olarak kullanılırlar, bu nedenle diş çürümelerinin önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Günümüzde nisin yaygın bir anti-çürük ajanı olarak görülmekte ve bu nedenle yoğun araştırmaların odağı haline gelmektedir. Klorheksidin ve nisin antibakteriyel etkinlik açısından farklı değildir ve benzer bakterisidal davranışlar gösterirler. Nisin ve klorheksidin kombine kullanıldığında *Streptococcus mutans* üzerinde antibakteriyel etkileri açısından bir sinerji görülmemiştir. Ancak, nisin klorheksidinden daha üstün olabilir. Çünkü klorheksidin muhtemel aşırı hassasiyete ve dişlerin ve dilin renk değişikliğine neden olabilmektedir (Tong vd. 2011, 2014a).

Linezolid ve imipenemin de yer aldığı 18 farklı antibiyotiğin dış köklerinden izole edilen *E. faecalis* suşlarına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, antibiyotikler *E. faecalis* suşlarını tek başlarına tamamen öldüremezken, 200 U/mL nisin ilavesi ile antibiyotiklerin antibakteriyel etkilerinin arttığı belirlenmiştir (Tong vd. 2014b). *Salmonella* suşlarının sergilediği çoklu ilaç direnci, etkili bir anti-*Salmonella* tedavisinin geliştirilmesinde büyük bir engel teşkil etmektedir. *S. Typhimurium*'a karşı nisin-ampisilin ve nisin-EDTA kombinasyonlarının aditif; nisin-seftriakson ve nisin-sefotaksim kombinasyonlarının ise oldukça sinerjik olduğu belirlenmiştir. SEM sonuçları, çeşitli kombinasyonlarla muamele edilen bakteri hücrelerinin dış zarında belirgin değişiklikler olduğunu ortaya koymuştur (Singh vd. 2013).

Bakteriyofajlar tarafından kodlanan litik enzimler ile klasik antibiyotikler veya bakteriyosinler arasındaki etkileşimleri tanımlayan pek çok yeni araştırma bulunmaktadır. Nisin ile iki *Staphylococcus aureus* litik fajının (Φ 35 ve Φ 88) kombine etkisi değerlendirilen bir çalışmada sinerjik bir etki gözlenmiştir. Ancak, nisin adaptasyonu ve her iki faja olan direnç, bu kombine terapinin pratik uygulanmasını engellemiştir (Martínez vd. 2008). Nisin ve listeriofaj LH7'nin, tek başlarına ve kombinasyonları halinde et suyu ve iki model gıda sisteminde *L. monocytogenes* suşlarının üremesi ve hayatta kalması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Nisin ve listeriofaj kombine kullanımının gıdalardaki *L. monocytogenes*'i kontrol etme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir (Dykes ve Moorhead 2002).

S. Typhimurium'un γ -ışını uygulamasında duyarlılığı arttırmak için esansiyal yağların (EO) tek başına veya nisin ile birlikte kullanımı araştırılmıştır. *S. Typhimurium* hücre süspansiyonunun radyasyona duyarlılığı, karvakrol ve nisin kombinasyonu uygulaması sonrası 1.84 kat artmıştır (Ndoti-Nembe vd. 2013). Isıl işlem (55 °C'de 15 dk), nisin ve karvakrolün kombine etkisinin *S. Enteritidis* ve *S. Senftenberg* gelişimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada, 1.2 μ M nisin ile 0.77 mM karvakrol kombinasyonunun ısıyla işlem gören hücrelerin üremesini önemli ölçüde engellediği belirlenmiştir (Esteban vd. 2012).

Farklı nisin ve di-sodyum etilen diamin tetraasetik asit (Na-EDTA) oranlarının antimikrobiyal aktivitesi, seçilen Gram negatif (*E. coli* ve *S. Typhimurium*) ve Gram pozitif (*Listeria monocytogenes*) bakterilere karşı geniş bir pH aralığında test edilmiştir. Sistemik olarak bir optimizasyon formülünü test etmek ve geliştirmek için 3 faktörden (nisin, Na-EDTA ve pH) oluşan bir deney tasarımı oluşturulmuştur. Faktörlerin regresyon analizi temel alınarak polinomial denklemler oluşturulmuş ve formülasyonların öngörülen antimikrobiyal aktivitesi deney sonuçları ile iyi uyum içinde olduğu belirlenmiştir. 20-30 mM Na-EDTA ve 125-150 mg/mL nisin konsantrasyonunun, pH 5-6 değerinde seçilen bakterilerin tümünü inhibe ettiği belirlenmiştir (Khan vd. 2015).

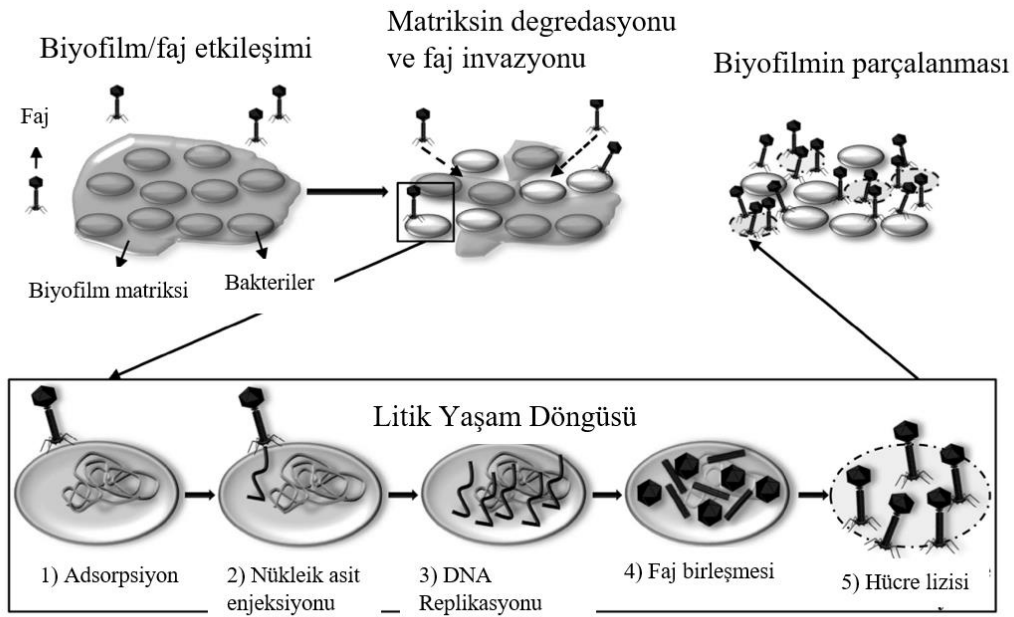
Gıda ve beslenme sektöründe nisin uygulamalarını düzenlemek ve yönetmek için nanoteknolojinin kullanımı giderek artmaktadır. Nanoteknoloji, nanopartikül dağıtım sistemleri, ambalajlama ve gıda güvenliği gibi gıda uygulamalarında oldukça önemlidir. Nisin ile kaplanan nanoemülsiyonlar, polimerik nanopartiküller, nanofiberler ve diğer teknolojilerin kombinasyonları gibi çeşitli nanopartikül sistemlerini içeren alternatif stratejiler, gıda endüstrisinde nisin yararlılığını arttırmak için kullanılmaktadır (Khan ve Oh 2016).

2.7 Bakteriyofajlar ve Anti-biyofilm Aktiviteleri

Bakteriyofajlar konaklarının bulunduğu habitatlarda yaygın olarak bulunan prokaryot virüsleridir. Bakteriyofajların sınıflandırılması şekillerine, boyutlarına ve nükleik asit türüne göre yapılmaktadır. Üç aileye (*Myoviridae*, *Podoviridae* ve *Siphoviridae*) bölünen *Caudovirale* düzeni (kuyruklu-bakteriyofaj) kuyruk morfolojilerinin mikroskopik özelliklerine göre ayırt edilmiştir (Gutiérrez vd. 2016). Bakteriyofajlar, bakterileri litik ve lizojenik yol olmak üzere iki farklı yaşam döngüsü ile enfekte etmektedir. Çoğu fajda litik döngü, konak bakterilerin lizisiyle ve hücre içinde çoğalan fajların serbest bırakılmasıyla sona erer. Bakteriyofajların antimikrobiyal özellikleri, enfekte olmuş konakçıların ölmesi amaçlandığından, litik döngü ile bağlantılıdır. Aksine, ılımlı bakteriyofajların izlediği lizojenik döngü, çevresel sinyaller litik döngüyü tetikleyinceye kadar faj genomunun bakteri kromozomuna (profaj) yerleşmesi anlamına

gelir ve böylece yalnızca enfekte olmuş popülasyonu öldürür. Buna ek olarak, bir profaj taşıyan lizojenik bakteriler, ilgili faj için enfeksiyona dirençlidir (Kutter vd. 2004).

Doğada çoğu bakteri biyofilmler içinde yaşamlarını sürdürmektedir. Bakteriler ile litik fajlar arasındaki etkileşim beş farklı adımda gerçekleşir. Bakteriyofajın adsorpsiyonu ve yeni faj soyunun salınması, bakteriyofaj enfeksiyonu sürecinde önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 2.6) (Gutiérrez vd. 2016).

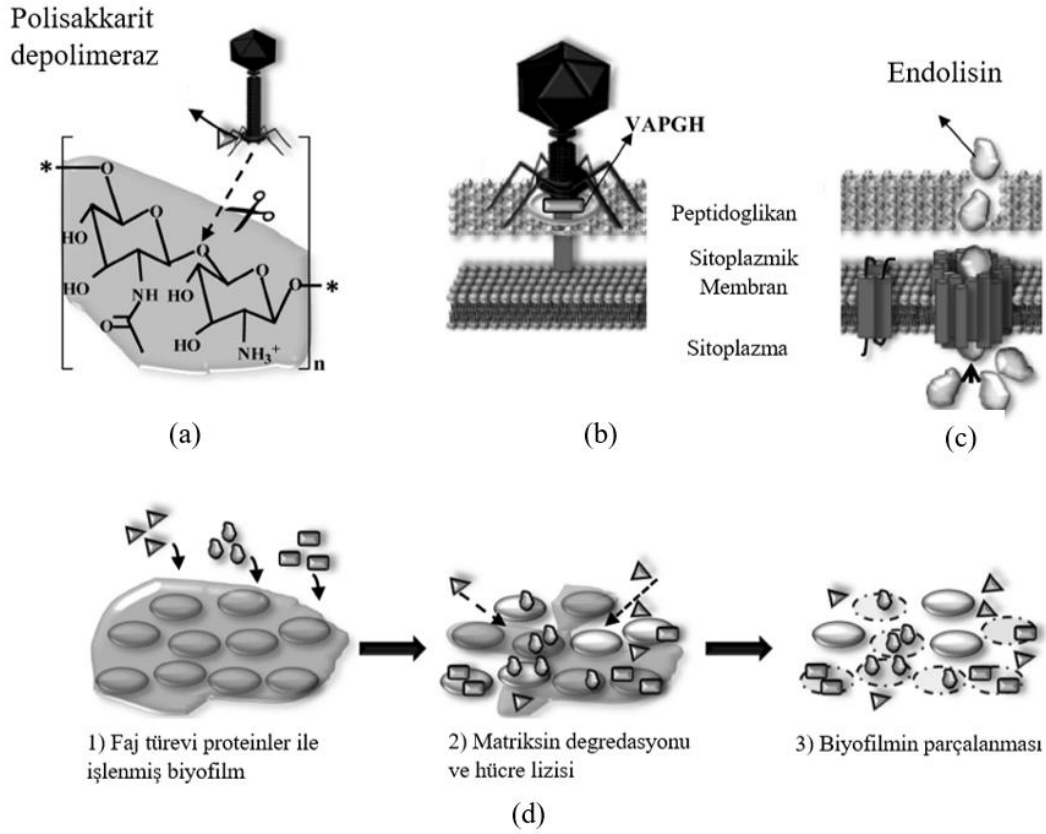


Şekil 2.6 Biyofilm içindeki fajların litik yaşam döngüleri (Gutiérrez vd. 2016)

1. Faj partiküllerinin bakteri hücresi yüzeyine adsorbe edilmesi. Kuyruk fiberleri hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır. 2. Nükleik asidin bakterinin sitoplazmasına enjeksiyonu. 3. Faj genomunun replikasyonu ve birden fazla kopyasının oluşması. Faj erken genlerinin, faj yayılımına tabi tutulacak konak metabolik mekanizmaları düzenlemek üzere eksprese edilmesi. 4. Faj geç genlerinin ekspresyonu ve faj başlarının ve kuyruklarının bir araya getirilmesi, nükleik asidin başların içinde ambalajlanması ve virionların olgunlaşması ile yeni faj partiküllerinin oluşumu. 5. Konak bakterinin parçalanması ve biyofilmdeki diğer hücrelere ulaşmak için yeni bir döngüye başlamak üzere yeni faj yavrularının serbest bırakılması

Konak bakteri bir biyofilm içerisinde olduğundan, biyofilm matriksi fajın ilk fiziksel bariyerini oluşturmaktadır. Bu sorunu çözmek için bazı fajlar, polisakkaritler veya polisakkarid türevlerini substrat olarak kullanabilen spesifik hidrolitik enzimler olan polisakkarit depolimerazlara sahiptirler (Şekil 2.7.a) (Pires vd. 2016). Polisakkarit depolimerazların varlığı, yeni bakterilerin enfeksiyon sürecini başlatan biyofilm

yapılarına etki bakımından faja önemli bir avantaj kazandırır. Ayrıca bazı fajlar enfeksiyonun ilk basamağında rolü olduğu bilinen ve VAPGH olarak adlandırılan litik enzimlere sahiptir (Şekil 2.7.b). Bu enzimlerin aktivitesi faj genetik materyalinin sitoplazmaya ulaşması için hücre duvarında küçük bir delik oluşturması şeklindedir (Moak ve Molineux 2004). Son zamanlarda, bu proteinler litik aktivitelerinden dolayı yeni antimikrobiyaller olarak önerilmiştir (Rodríguez-Rubio vd. 2013). Çift sarmallı fajlar, endolizinler olarak adlandırılan, hücre çeperini bozmak için holinler ile birlikte hareket ederek ve litik enfeksiyon döngüsünün son aşamasında konak bakterileri parçalayan litik proteinleri kodlarlar (Şekil 2.7.c). Peptidoglikan hidrolazlar olan endolizinler, sitoplazmik zardaki holinsin tarafından oluşturulan delikler yoluyla periplazmik boşluğa erişirler. Peptidoglikan yapısındaki kovalent bağların hidrolizi hücre duvarı yapısını destabilize eder ve osmotik basıncın atması ile sitoplazma içine doğru lizis başlar. Gram pozitif bakterilerde endolizinler, antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı hücre dışından ilave edildiğinde peptidoglikanı degrades edebilirler (enzibiyotik) (Fischetti 2008). Gram negatif bakterilerde ise, peptidoglikan dış membran tarafından korunmaktadır ve bu bakteriler endolizinelere duyarlı değildir. Günümüzdeki, endolizin uygulamaları ile alakalı Gram negatif patojenlere karşı yapılan araştırmalar bu kuralı değiştirmektedir. Dış membrana nüfuz edebilen bir polikasyonik peptit olan artilisinlerin bir endolizin ile kombinasyonunun yapılması, Gram negatif patojenlere karşı yüksek bakterisidal etkinliğin sağlanmasına yol açmaktadır (Briers vd. 2014a, 2014b).



Şekil 2.7 Litik enfeksiyon döngüsündeki enzimler (Gutiérrez vd. 2016)

a. Faj partikül ve etki tarzında stafilokok türlerinin biyofilm hücre dışı matrisinin (PIA/PNAG) β -(1,6) bağlarını parçalayan eksopolisakarit depolimerazın yeri. b. Virion ile ilişkili peptidoglikan hidrolazın (VAPGH) faj parçasındaki yeri ve enfeksiyon sürecindeki rolü. c. Bakteri lizisi esnasında Gram pozitif bakteri hücre duvarının yapısı ve endolizinin rolü. d. Faj kaynaklı proteinlerin aktivitesi ve polisakaridik matrisleri parçalayan anti-biyofilm ajanları (polisakarit depolimerazlar) ve bakterilerin lize olması (VAPGH'ler ve endoliziner)

Yukarıda açıklanan çalışma mekanizmalarından dolayı bakteriyofajlar ve faj kaynaklı proteinler; gıda zincirinin tamamını ("çiftlikten sofraya kadar") kapsayan kalite, emniyet ve iyi hijyen koşullarını sağlamak için istenmeyen bakterilere karşı, gıda maddeleri üretiminde kullanılabilir. Bu mekanizmalar; hayvan sağlığının iyileştirilmesi için uygulanan stratejiler (faj uygulaması), taze gıda ve hazır ürünlerin dekontaminasyonu, gıda ile temas eden yüzeylerin dezenfeksiyonu ve depolama sırasında patojenik veya bozulmaya sebep olan bakterilerin üremesini inhibe etmek için biyolojik koruma maddeleri olarak kullanımı ve ayrıca farklı imalat aşamaları yoluyla istenmeyen bakterilerin saptanması için araçlar olarak düşünülmektedir (García vd. 2010, Gutiérrez vd. 2016).

2.7.1 Bakteriyofajların *Salmonella* ve *Salmonella* biyofilmleri üzerindeki etkileri

Bakteriyofajlar, bakteriyel lizis özgülüğünün yüksek olması ve doğal ortamda her yerde bulunmaları nedeniyle hem tıbbi hem de gıda endüstrisindeki patojenlerin kontrolünde 70 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. Bakteriyofajlar, gıdalarda koruyucu ajanlar ve patojen bakterileri tespit eden araçlar yanında, hayvan sağlığında antibiyotiklerin alternatifleri olarak da öngörülmektedir (Henry ve Debarieux 2012). Fajların antibiyotiklere kıyasla benzersiz avantajları vardır. Genellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerden kaynaklanan ortak mide bağırsak sistemi florasının (dysbiosis) dengesizliğini önleyerek, sadece hedeflenen alt grupta çoğalırlar. Ek olarak, hedeflenen bakteri mevcut olduğu sürece çoğalırlar ve doğal olarak kendi kendilerini sınırlandırır (Atterbury vd. 2007).

LIF 102 faj preparasyonunun (ListShield™ Intralytix) hazır gıda içerisindeki *Listeria monocytogenes*'i kontrol etmek için bir katkı maddesi olarak kullanılması ve GRAS statüsünde tanınması için FDA tarafından onay verilmiştir. Ayrıca daha sonra bütün gıda ürünlerinde kullanımı için Microos, OmniLytics, Novolytics, Biophage Inc. gibi birçok şirket tarafından patojenlere karşı birçok faj preparatı hazırlanmıştır (Zinno vd. 2014). Son yıllarda ise bakteriyofaj uygulaması, bakteriyofaj depolimerazın enzimatik aktivitesi vasıtasıyla ekzopolisakkaritin bozulmasını sağladıklarından bakteriyel biyofilmlerin kontrol edilmesi için yeni bir biyolojik metot olarak düşünülmüştür (Fu vd. 2010).

Guenther vd. (2012), pişmiş ve dilimlenmiş hindi göğsü ve yumurta sarısı gibi bazı hazır yemeklerde *S. Typhimurium*'un üremesini kontrol etmek için FO1-E2 bakteriyofaj uygulamasını kullanmıştır (Guenther vd. 2012). Bir başka çalışmada ise, pişmiş ve çiğ ette *S. Typhimurium* ve *Campylobacter jejuni*'nin biyokontrol ajanları olarak fajların kullanılması üzerine odaklanılmıştır (Bigwood vd. 2008, Zinno vd. 2014). Spricigo vd. (2013), tavuk göğsü üzerinde *Salmonella*'ya karşı bir bakteriyofaj kokteyli uygulamış ve soğutma sıcaklıklarında 7 gün sonra kontrol ile karşılaştırıldığında ortalama 2 Log₁₀ azalma elde etmişlerdir. Tavuk göğsüne *S. Typhimurium* yapay olarak inoküle ettikten

sonra, 4 °C’de 48 saat kuluçkadan sonra P22 bakteriyofajı kullanarak yaklaşık 2 Log₁₀ azalma elde edilmiştir (Zinno vd. 2014).

Birçok çalışmada, bakteriyofaj uygulamasının, *Salmonella*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* ve *E. coli*’nin oluşturduğu çeşitli yüzeylerdeki bakteriyel biyofilmlerin azaltılmasında yüksek verimliliğe sahip olduğu gösterilmiştir (McLaughlin 2007, Knezevic ve Petrovic 2008, Ahn vd. 2013, Chandra vd. 2015). Paslanmaz çelik yüzeylere *Salmonella*’nın tutunmasını ve biyofilm oluşturmasının bakteriyofaj uygulaması (10⁴–10⁸ pfu/mL) ile ortadan kaldırılması amaçlanan bir çalışmada; bu yolla biyofilm oluşumunun engellenmesi ve olgun biyofilm yapısının azaltılması sırasıyla % 90 ve % 66 oranında sağlanmıştır (Gong ve Jiang 2017). Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan paslanmaz çelik, cam ve polivinil klorür (PVC) yüzeylerindeki *Salmonella* biyofilminin kontrolünde bakteriyofaj kombinasyonunun etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada; bu uygulamanın cam yüzey biyofilmleri için çok etkin olduğu saptanmıştır (Garcia vd. 2017).

Konakçı bakteri kendi bakteriyofajına karşı direnç kazanabilir. Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrar (CRISPR) genlerinin kazanılması, bir bakterinin faj genomu gibi yabancı DNA’yı dahili olarak tanımasını ve bir dizi biyokimyasal reaksiyon ile bakteriyofaj üretimine direncini artırır. Bu sistem bir tür prokaryotik bağışıklık sistemi olarak tanımlanmıştır. Touchon ve Rocha (2010) tarafından yapılan bir araştırmada, *Salmonella* genomlarının CRISPR lokusu analiz edilmiş ve tüm genomların, en azından CRISPR1 ve CRISPR2 lokuslarına sahip olduğunu ve bunların eksojen faj genomlarını hedefleme ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak bakteriyel direnç, çoklu yüzey reseptörlü çoklu fajların uygulandığı bir faj kokteyli kullanılarak engellenebilir. Bu sayede faja karşı bakteri direnci önlenabilir veya geciktirilebilir (Grant vd. 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriler

Araştırmada kullanılan *S. Typhimurium* 14028, *S. Typhimurium* SL1344 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşları Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır. Bakteri suşları, % 60 gliserol içeren LB broth ortamlarında -80 °C'de saklanmıştır.

3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler

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

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

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra sterilizasyon aşamasından önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlanmıştır. Bu aşamalardan sonra hazırlanan broth besiyeri cam tüplere dağıtılmış ve sterilizasyon işlemi otoklavda 121°C/15 dakika yapılmıştır.

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

İçerik	g/L
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
Agar	15

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

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

İçerik	g/L
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
Kongo kırmızısı	0,04
Agar	15

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

Kalkoflor İçeren (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Luria Bertani (LB) Agar (NaCl'siz)

İçerik	g/L
Tripton	10
Maya ekstraktı	5
Kalkoflor	0,05
Agar	15

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

Fosfatla Tamponlanmış Su (PBS)

İçerik	g/L
NaCl	80
KCl	2
Na ₂ HPO ₄	14.4
KH ₂ PO ₄	2.4

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

Minimal E Ortamı (50X)

İçerik	g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	10
Sitrik Asit	100
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	655
NaNH ₄ PO ₄ .4H ₂ O	175

Kimyasallar 500 mL dH₂O içerisinde ısı uygulayarak çözülmüştür. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanarak 25 mL kloroform eklenmiş ve oda sıcaklığından muhafaza edilmiştir.

P22 Transdüksiyon Ortamı

İçerik	mL
LB Broth	97
Minimal E Ortamı	2
Glukoz (% 20)	1
P22 Faj Lizatı	0,1

Evrensel Nötralizan

İçerik	
L-Histidin	1 g
L-Sistein	1 g
İndirgenmiş Glutatyon	2 g

20 mL ddH₂O'da çözülüp 0.20 µm filtre ile steril edilmiş ve -20 °C'de saklanmıştır.

Surfaktan Çözeltisi

İçerik

Tween 80	10 g
Saponin	20 g
LB broth	1000 mL

Sterilizasyondan önce pH 7.0±0.2'ye ayarlanmış ve otoklavda (121 °C'de 15 dakika) sterilize edilmiştir. Nötralizasyon çözeltisi her kullanımdan önce taze olarak hazırlanmıştır. 20 mL surfaktan çözeltisine 500 µL evrensel nötralizan ilave edilmiştir.

3.1.3 Antimikrobiyal ajanlar

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan antibiyotikler, antimikrobiyal maddeler ve dezenfektanlar

Antimikrobiyal Ajan	Sembol	Çözücü madde
Nisin	N	0.02 N HCl
Etilen Diamin	EDTA	dH ₂ O
Tetraasetik Asit		
Klorheksidin Diglukonat	KHDGT	dH ₂ O
Sitrik asit	CA	dH ₂ O
Ampisilin	AMP	dH ₂ O
Kloramfenikol	CHL	Etanol
Siprofloksasin	CIP	dH ₂ O+HCl
Streptomisin	STR	dH ₂ O
Sülfanomid	SUL	DMSO

3.2 Yöntem

3.2.1 Antimikrobiyal ajanların planktonik *Salmonella* suşlarına etkinliğinin agar kuyu difüzyon yöntemi ile araştırılması

Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanların etkinliğini araştırmak amacıyla Rishi vd. (2011) tarafından önerilen agar kuyu difüzyon testi uygulanmıştır. 18 saat çalkalamalı koşullarda inkübasyon sonrası kültür süspansiyonunun bulanıklığı, McFarland 0.5 standardının absorbansı 625 nm’de 0.08-0.13 (10^7 cfu/mL) olacak şekilde ayarlanmıştır. Absorbansı ayarlanan *Salmonella* kültürleri % 0.7 oranında agar içeren 5 mL yumuşak agar ortamına 100 µL inoküle edilerek, LB agar plakları üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. 5 mm çapında kuyular açılarak uygun antimikrobiyal ajanlar 20 µL olacak şekilde kuyulara aktarılmıştır. Çalışmada nisin ve antimikrobiyal ajanlar tek tek ve nisin ile birlikte kombinasyonlar halinde kullanılmıştır. Deney kontrolü olarak % 0.85 serum fizyolojik kullanılmıştır. Nisin ve antibiyotiklerin son konsantrasyonları 1 mg/mL, EDTA 500 mM, sitrik asit % 3.2, klorheksidin diglukonat son konsantrasyonu ise % 1 olacak şekilde ayarlanmıştır. 37 °C’de 24 saat inkübasyon sonunda kuyular etrafındaki inhibisyon zon çapları değerlendirilmiştir. Denemeler 4 paralel 2 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonunun (MBK) belirlenmesi

Suşların antimikrobiyal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi için minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) denemeleri yapılmıştır. Denemeye alınan bakteriler Müller Hinton Broth (MHB) besiyeri ortamında 37 °C’de 18 saat üretilmiştir. Aktif kültürlerden MHB besiyeri kullanılarak 10^7 hücre/mL yoğunluğunda bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. 96 kuyulu mikrodilüsyon plakları kullanılarak, seri dilüsyonlar ile artan antibiyotik ve antimikrobiyal ajan konsantrasyonları hazırlanmıştır. Dilüsyon sonrasında tüm kuyucuklara 10 µL bakteri süspansiyonu eklenerek bakteriler 37 °C’de 18 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Inkübasyon sonrası üremenin inhibe olduğu kuyudan bir önceki antimikrobiyal madde miktarı MİK değeri olarak tespit edilmiştir. Kontrol olarak

E. coli ATCC 25922 suşu kullanılmıştır. Antibiyotikler için saptanan değerler CLSI tarafından verilen kırılma noktaları ile karşılaştırılarak dirençli (R), orta derecede dirençli (I) ya da duyarlı (S) olarak değerlendirilmiştir (Anonymous 2008).

İncelenen bakterinin % 99,9'unu öldüren en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunu (mg/L veya µg/mL) belirlemek amacı ile üremenin olmadığı kuyulardan 100 µL alınarak 10⁻⁶'ya kadar dilüsyonlar gerçekleştirilmiş ve her bir dilüsyon antimikrobiyal ajanın olmadığı MHA besiyerine damlatma yöntemi ile aktarılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonucunda koloni sayımı gerçekleştirilmiş ve logaritmik azalma (LR);

$$LR = \log(\text{Başlangıç cfu/mL}) - \log(\text{Kalan cfu/mL})$$

% LR = $(1 - 10^{-LR}) \times 100$ formülleri ile, logaritmik azalmanın standart sapması;

$S_{LR} = [(S_{(\text{Uygulama öncesi})} / n_{(\text{Uygulama öncesi})}) + (S_{(\text{Uygulama sonrası})} / n_{(\text{Uygulama sonrası})})]^{1/2}$ formülü ile hesaplanmıştır.

3.2.3 Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) ve fraksiyonel bakterisidal konsantrasyonun (FBK) belirlenmesi

Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanların ve nisinin ikili kombinasyonlarının hangi konsantrasyonlarda daha etkin olduğunu belirlemek amacı ile sinerji testleri gerçekleştirilmiştir. Antimikrobiyal ajanların belirlenen MİK değerlerinin iki kat üstü konsantrasyonları (4 x MİK) ve beş kat altı dilüsyonları (0.03 x MİK) kullanılarak iki farklı ilaç kombinasyonunun etkinliği, her bir izolat ve her bir ajan için 96 kuyucuklu plak üzerinde test edilmiştir. Bir antimikrobiyal ajanın 2⁻¹ seri dilüsyonları dikey düzlem boyunca yapılırken diğer antimikrobiyal ajanın 2⁻¹ seri dilüsyonları yatay düzlem boyunca yapılmıştır. Böylelikle her iki antimikrobiyal ajanın 64 farklı kombinasyonu elde edilmiştir. Plak üzerinde her iki ilacın MİK değerleri dama tahtası testi ile eş zamanlı tekrar çalışılarak; elde edilen sonuçlar, ilk çalışılan MİK değerleri ile karşılaştırılmış ve sinerji testleri yorumlanırken eş zamanlı olarak çalışılan MİK

değerleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bir kombinasyonun dama tahtası plağının temsili görünümü şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Plak üzerinde antibiyotik içermeyen pozitif kontrol kuyucuğu ve bakteri içermeyen negatif kontrol kuyucuğu hazırlanmıştır. Test edilen iki ilacın farklı konsantrasyonları ve son bakteri inokulum konsantrasyonu 10^5 cfu/mL olacak şekilde bakteri süspansiyonu kuyucuklara aktarılmış; 37 °C’de 18 saatlik inkübasyondan sonra plaklar gözle değerlendirilmiştir. İncelenen bakterinin % 99,9’unu öldüren en düşük antimikrobiyal madde kombinasyonu konsantrasyonunu belirlemek amacı ile, MBK yöntemi ile logaritmik azalma (LR) hesaplanmıştır. Dama tahtası testlerinde uyumsuz çıkan sonuçlar iki kez daha çalışılarak, üreme olmayan kuyucuklardan MHB besiyerine ekimler yapılarak inkübe edilmiş; üreme olmadığı netleştirilerek kontrolleri yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde, tüm satır ve sütunlardaki üreme olmayan en düşük ilaç konsantrasyonunun olduğu kuyucuklar değerlendirmeye alınmıştır. Bu kuyucukların her biri için A ve B ilacının FİK değerleri hesaplanıp ve her kuyucuk için ayrı ayrı FİK indeksi (FİKİ) hesaplanarak, elde edilen değerler toplanmış ve kuyucuk sayısına bölünerek FİKİ’nin ortalaması alınmıştır.

$$\sum \text{FİK}_{\text{İndeks}} (A+B) = \frac{\text{MİK AB}}{\text{MİK A}} + \frac{\text{MİK AB}}{\text{MİK B}}$$

(MİK AB= Kombinasyondaki A/B ilacı, MİK A= Tek başına A ilacı, MİK B= Tek başına B ilacı)

FİKİ ≤ 0.5 ise sinerji; $0.5 > \text{FİKİ} < 1$ ise parsiyel sinerji; FİKİ = 1 ise aditif; $1 > \text{FİKİ} < 4$ ise indifferansiye ve ≥ 4 ise antagonizma olarak değerlendirilmiştir (Kiffer vd. 2005).

Kombine antibiyotik uygulamasında antibiyotiklerin birbirleri ile olan sinerjik etkisinde; kombinasyonu oluşturan antibiyotiklerin birlikte etkisi, her bir antibiyotiğin tek başına kullanımı ile oluşan etkisinden oldukça önemli miktarda artar. Pozitif bir etkileşimdir. Antagonist etkide; denenen ilaçların birlikte etkisi, her bir ilacın tek başına kullanımı sonucunda oluşan etkiden önemli ölçüde azdır. Negatif bir etkileşimdir.

Additif etki, birlikte kullanılan antibiyotiklerin etkisi ayrı ayrı etkilerinin toplamı olarak belirtilir. Kısmi sinerjiyi gösterir. İndifferens etkide ise; ilaçların bir arada etkisi, daha etkili olan diğerinin tek başına yaptığı etki kadardır. Antibiyotikler birbiriyle etkileşmezler (Aktaş 2014). Sonuçlar bu esas üzerinden değerlendirilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A MİK*	B MİK*	12
A	A 128 B 1	A 128 B 2	A 128 B 4	A 128 B 8	A 128 B 16	A 128 B 32	A 128 B 64	A 128 B 128		A 128	B 128	PK
B	A 64 B 1	A 64 B 2	A 64 B 4	A 64 B 8	A 64 B 16	A 64 B 32	A 64 B 64	A 64 B 128		A 64	B 64	PK
C	A 32 B 1	A 32 B 2	A 32 B 4	A 32 B 8	A 32 B 16	A 32 B 32	A 32 B 64	A 32 B 128		A 32	B 32	PK
D	A 16 B 1	A 16 B 2	A 16 B 4	A 16 B 8	A 16 B 16	A 16 B 32	A 16 B 64	A 16 B 128		A 16	B 16	PK
E	A 8 B 1	A 8 B 2	A 8 B 4	A 8 B 8	A 8 B 16	A 8 B 32	A 8 B 64	A 8 B 128		A 8	B 8	NK
F	A 4 B 1	A 4 B 2	A 4 B 4	A 4 B 8	A 4 B 16	A 4 B 32	A 4 B 64	A 4 B 128		A 4	B 4	NK
G	A 2 B 1	A 2 B 2	A 2 B 4	A 2 B 8	A 2 B 16	A 2 B 32	A 2 B 64	A 2 B 128		A 2	B 2	NK
H	A 1 B 1	A 1 B 2	A 1 B 4	A 1 B 8	A 1 B 16	A 1 B 32	A 1 B 64	A 1 B 128		A 1	B 1	NK

Şekil 3.1 Antimikrobiyal ajan A ve B için MİK değerlerinin tespit edildiği A/B kombinasyonunun dama tahtası plağındaki çalışma formatı (sayılar µg/mL antibiyotik konsantrasyonunu göstermektedir)

A; Birinci Antimikrobiyal ajan, B; İkinci Antimikrobiyal ajan, PK; pozitif kontrol (üreme kontrolü), NK; Negatif kontrol (besiyeri kontrolü), *; Eş zamanlı çalışılan MİK

Denemelerden elde edilen verilere göre; inhibisyona sebep olan en düşük nisin ve EDTA konsantrasyonları, diğer antimikrobiyal ajanlar ile birlikte üçlü kombiasyonlar halinde planktonik *Salmonella* suşlarına karşı etkinliği araştırılmıştır.

3.2.4 Antimikrobiyal ajanların etki sürelerinin zaman-ölüm denemeleri ile belirlenmesi

Çalışmada dama tahtası yöntemi ile belirlenen sinerjik etkinin doğrulanması ve kullanılan antimikrobiyal ajanların etkisinin ne kadar sürede gerçekleştiğinin ve etki

tipinin (bakterisidal ya da bakteriyostatik) tespit edilmesi amacı ile zaman ölüm denemeleri gerçekleştirilmiştir (Singh vd. 2013). Tüm antimikrobiyal ajanların *in vitro* sinerjik etkileşimleri; MİK, MBK, FİK ve FBK analizlerinden elde edilen değerlere göre tekrar değerlendirilmiştir. Tüm ajanlar tek başlarına ve nisin ile kombinasyonlar halinde 10^7 cfu/mL konsantrasyonunda hücre ihtiva eden 3 mL Nutrient sıvı besiyerine eklenmiş ve 37 °C’de inkübe edilmiştir. 0, 3, 6, 12, 24 ve 48 saat sonunda her bir tüpten alınan 100 µL örneğin 10^{-6} ’ya kadar dilüsyonları yapılmış ve her bir dilüsyondan alınan 10 µL süspansiyon agar üzerine damlatılmıştır. 37 °C’de 24 saat inkübasyon sonrası koloni sayımı yapılmış ve toplam \log_{10} cfu/mL belirlenmiştir. Denemeler 2 paralel ve 2 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Denemede eş zamanlı olarak, antimikrobiyal ajan bulundurmeyen besi ortamına 10^7 cfu/mL konsantrasyonunda hücre ilave edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. 0, 3, 6, 12, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen sayım sonuçları kontrol olarak değerlendirilmiştir. Kombinasyondaki ajanların tek başına kullanılan en aktif ajan ile karşılaştırıldığı 6 ila 24 saat sonundaki koloni sayımındaki $\geq 2 \log_{10}$ azalma sinerji, $<2 \log_{10}$ artış ya da azalış indifferans, $\geq 2 \log_{10}$ artış antagonizm olarak değerlendirilmiştir (Petersen vd. 2006, Sopirala vd. 2010).

3.2.5 Polistiren üzerinde *in vitro* biofilm oluşumunun incelenmesi

Salmonella izolatlarının polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Woodward vd. (2000) tarafından önerilen yöntem modifiye edilmiştir. Bu amaçla, NaCl içermeyen 5 mL’lik LB broth (LB^{wo}/NaCl) ortamlarında 37 °C’de çalkalamalı koşullarda bir gece boyunca geliştirilen aktif kültürler LB^{wo}/NaCl ile 550 nm’ de 0.2 OD düzeyine kadar seyreltilmiştir (Shimadzu spektrofotometer, Japan) ve bu süspansiyonlardan, 100 µL LB^{wo}/NaCl içeren 96 kuyuluk mikrotitrasyon plaklarına 30 µL aktarılmıştır. Bakteri süspansiyonlarını içeren mikrotitrasyon plakları 24, 48, 72 ve 96 saat süresince 20, 28 ve 37 °C’de statik koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde, kuyular 3 defa steril serum fizyolojik (% 0,85 NaCl) (Merck, Almanya) ile yıkandıktan ve plaklar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra % 95’lik metanol ile 15 dakika süresince fikse edilmiştir. 130 µL % 1’lik kristal viyole kuyulara aktarılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra plaklar steril distile su ile 2 kez yıkanmıştır. Biyofilm tabakasına bağlanan boyaların çözünmesi için

kuyulara 130 µL % 33'lük glasiyel asetik asit aktarılmıştır ve plakalar 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Stepanovic vd. 2000). İnkübasyon bitiminde OD₅₉₅'te çözünen kristal viyole boyası Elisa okuyucusunda (Biorad, USA) ölçülmüştür. Biyofilm ölçümlerinin sonucu her sekiz paralelden alınan OD değerlerinin ortalamasından, kontrol (yalnızca NaCl'siz LB sıvı besiyeri içeren kuyular) kuyularının OD değerlerinin ortalamasının çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. Denemeler 8 paralel ve 2 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Suşlar aynı zamanda eşik (cut off, sınır) değerlerinin dönüşümleri de esas alınmak suretiyle, biyofilm üretimleri açısından “üretici olmayan”, “zayıf”, “orta” ve “güçlü” olmak üzere değerlendirmeye tabi tutulmuştur (Stepanovic vd. 2000). Sınır değerleri, mikrotitre plaka ölçüm esasına dayalı yöntemlerde negatif test gruplarından gelen ölçüm sonuçlarının istatistiki sapma değerlerini ifade eden bir değerdir. Biyofilm üreticisi suşların biyofilm üretim kapasiteleri çizelge 3.2'de ifade edilen sınır değerlerin dönüşümleriyle ifade edilmektedir.

Çizelge 3.2 Biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan “cut off” (sınır değer) dönüşümleri

$OD \leq OD_c$	Üretici değil
$OD_c < OD \leq 2xOD_c$	Zayıf üretici
$2xOD_c < OD \leq 4xOD_c$	Orta düzey üretici
$4xOD_c < OD$	Güçlü üretici

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

Salmonella suşları -20 °C stoğundan alınarak 5'er mL'lik LB broth besiyerlerine % 1 inokülasyon oranıyla aktarılmış ve 18 saat süresince çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bir gecelik inkübasyondan sonra aktif kültürlerden % 1 oranında alınan inokülasyonlar 5'er mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarına (LB^{wo}/NaCl; baktotripton 10 g/L, maya özütü 5 g/L) aktarılmış ve suşlar 37

°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Römling vd. 1998). İnkübasyondan sonra aktif kültürlerden, biyofilm matriksinin bileşenleri için indikatör özellik gösteren Kongo kırmızısını (0.04 g/L) içeren NaCl’siz LB agar besiyerlerine 5 µL, 10 µL ve 15 µL olacak şekilde damlatılmıştır. Bu ortamlar, 20 °C’de en az 8 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Römling ve Rohde 1999). İnkübasyon bitiminde tüm petripler stereo mikroskopunda (Leica, Germany) görsel olarak incelenmiştir. Çalışma 3 paralel ve 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Suşların içerdiği morfotipler: biyofilmin matriksinde kıvrımlı fimbriya ve selüloz bulunduran ‘rdar’ (kırmızı, kuru ve pürüzlü), yalnızca kıvrımlı fimbriya bulunduran ‘bdar’ (kahverengi, kuru ve pürüzlü), yalnızca selüloz bulunduran ‘pdar’ (pembe, kuru ve pürüzlü) ve her ikisini de bulundurmayan ‘saw’ (düz ve ıslak) olmak üzere kategorize edilmiştir (Vestby vd. 2009).

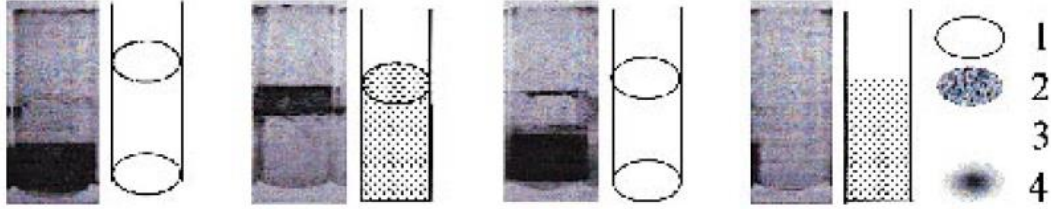
3.2.7 Kalkoflor bağlanma uygulaması

Çalışılan suşlar, selüloz indikatörü olan kalkofloru içeren (fluorescent brightner 28, Sigma-Aldrich, China, 200 µg/L) NaCl’siz LB agar besiyerlerinde üretilmiştir. Bu ortamlar 20 °C’de 8 gün süresince inkübasyona bırakılmış ve suşlar bir hücre dışı matriks bileşeni olan selülozu üretilen üretilmediklerine göre 366 nm UV ışık altında değerlendirmeye tabi tutulup fotoğraflanmıştır (Kodak Gel Logic 200 Imaging System). Çalışma 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. 366 nm UV ışık altında florosan özellik gösteren örnekler selüloz üretimi bakımından pozitif; göstermeyenler ise selüloz üretimi bakımından negatif olarak değerlendirilmiştir (Vestby vd. 2009).

3.2.8 Sıvı besiyerlerinde pelikül oluşumu

Çalışılan tüm suşlar sıvı besiyerlerinde sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturmalarına göre incelenmiştir. Suşlar 5 mL’lik NaCl’siz LB broth (LB broth ^{wo}/NaCl) besiyerlerinde bir gece boyunca 37 °C’de çalkalamalı koşullarda üretilmiştir. Sıvı-hava ara fazında pelikül oluşumlarının varlığını gösterebilmek için 4,5 mL NaCl’siz LB broth (LB ^{wo}/NaCl broth) besiyerlerine bir gecelik aktif kültürlerden 0,5 mL inoküle edilmiş ve test tüpleri 20 °C’de statik koşullarda 8 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Suşlar her gün pelikül oluşturup oluşturmamalarına göre incelenmiştir (Solano vd. 2002).

Gözlemler aynı zamanda besiyerindeki turbidite değişimine, sıvı-hava ara fazında halka yapısının oluşumuna ve tüpün tabanındaki peletin durumuna göre de yapılmıştır (Şekil 3.2) (Römling vd. 2000).



Şekil 3.2 Tuzsuz LB ortamında 20 °C'de 8 günlük inkübasyon sonundaki pelikül oluşumu (Römling vd. 2000)

1; sıvı-hava arafazındaki halka yapısı oluşumu, 2; pelikül oluşumu, 3; sıvı besiyerindeki bulanıklık, 4; tüp tabanındaki hücre yoğunluğu

3.2.9 *S. Typhimurium*' da P22 faj lizatlarının hazırlanması ve faj titresinin yükseltilmesi

S. Typhimurium'da P22 faj lizatlarının hazırlanması ve faj titresinin yükseltilmesi Casjens ve Hayden (1988) tarafından önerilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. % 1 inokülasyon oranı ile LB broth ortamına aktarılan *Salmonella* suşları 37 °C'de 200 rpm çalkalama hızında 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda gelişen kültür ortamından alınan 1 mL'lik hacimler üzerine 4 mL P22 transdüksiyon broth ortamı aktarılmıştır. Hazırlanan bu ortamların 37 °C'de 200 rpm çalkalama hızında 18 saatlik inkübasyonu sonunda ortama 100 µL kloroform ilave edilerek 37 °C'de 5 dk daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde faj ve konakçı karışımı 10 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 8000 rpm'de +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilerek bakteriler ve hücre kalıntıları çöktürülmüştür. Üst sıvı yeni steril tüplere aktarılmış ve üzerine 100 µL kloroform ilave edilerek 30 saniye karıştırılmıştır. Ayrıca üst sıvı 0.45 µm por çaplı filtreden (Sartorius, Germany) geçirilmiştir. Hazırlanan faj lizatları +4 °C'de saklanmıştır. Faj lizatlarının titresini belirlemek için, lizatlardan 100 µL alınarak 900 µL PBS içeren steril ortamlarda 10^{-7} seviyesine kadar faj dilüsyonları hazırlanmıştır. Aktif *Salmonella* kültürleri % 0,7 oranında agar içeren 5 mL yumuşak agar ortamına 100 µL inoküle edilerek, LB agar plakları üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır. Agar yüzeyleri kuruduktan sonra her bir dilüsyondan uygun yerlere 10 µL damlatma

yapılmıştır. 37 °C’ de 18 saat inkübasyon süresinin sonunda faj plakları incelenmiştir. Faj titreleri;

$$\text{Faj Titresi (pfu/mL)}: \frac{\text{Plaklarının sayısı} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 1000 (\mu\text{L/ mL})}{\text{Damlatma miktarı} (\mu\text{L})}$$

formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.10 P22 bakteriyofajı, nisin ve EDTA’nın tek tek ve kombine kullanımı ile *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisinin belirlenmesi

Tez kapsamında kullanılan *Salmonella* suşlarının biyofilm üretimi üzerine P22 bakteriyofajının, nisin ve EDTA’nın tek başına inhibisyon etkinliğini belirlenmiştir. Bu amaçla farklı inkübasyon periyotlarında farklı titrasyonlarda P22 fajı ve farklı konsantrasyonlarda nisin ve EDTA kullanılmıştır. Denemeler suşların optimum biyofilm ürettikleri sıcaklıklarda (*S. Typhimurium* 14028 ve SL1344 suşları için 20 °C, *S. Enteritidis* DMC8 suşu için 37 °C) gerçekleştirilmiştir. 96-kuyucuklu polisistren mikrotitrasyon plakalarına tuzsuz LB sıvı besi ortamında dilüe edilen faj süspansiyonlarından (10^9 - 10^1 pfu/mL) 100 µL, 550 nm’de OD 0.2’ye seyreltilen aktif kültürlerden ise 30 µL eklenmiştir. Ayrı plakalara nisin ve EDTA’nın tuzsuz LB sıvı besi ortamında artan seri dilüsyonları hazırlanmış ve 550 nm’ de OD 0.2’ye seyreltilen aktif kültürlerden ise 30 µL eklenmiştir. Kontrol kuyularına ise sadece besiyeri ve sadece inokulum ilave edilmiştir. Mikrotitrasyon plakaları biyofilm için optimum inkübasyon koşullarında 24, 48, 72 ve 96 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde plakalar kristal viyole ile boyama işlemine tabi tutulmuş ve biyofilm miktarları OD₅₉₅ nm’de ölçülmüştür. Denemeler 4 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Biyofilm üretim miktarlarındaki azalma yüzdeleri;

$[(C-B)-(T-B)] / [(C-B)] \times 100$ formülü ile hesaplanmıştır.

C = sadece suş içeren kontrol kuyuları

B = besiyeri ve uygun faj/nisin/EDTA dilüsyonları içeren kuyular

T = faj/nisin/EDTA dilüsyonları ve suş içeren kuyular

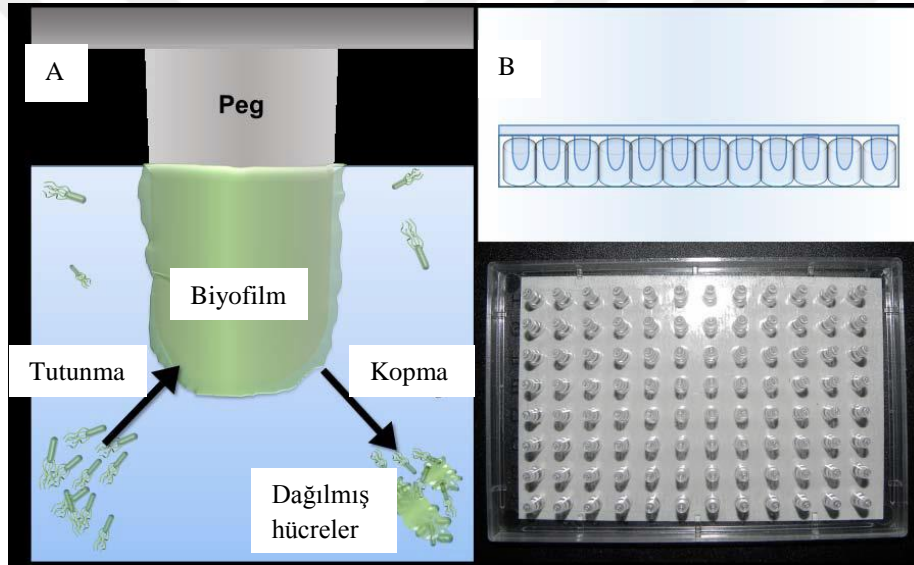
Salmonella suşlarının biyofilm üretimi üzerine nisin+EDTA'nın, nisin+P22 bakteriyofajının, nisin+EDTA+P22 bakteriyofajının kombine kullanımı sonucu oluşan inhibisyon etkinliğini belirlemek amacı ile farklı inkübasyon periyotlarında yatay ve dikey düzlemde hazırlanan 64 farklı ajan konsantrasyonları kullanılmıştır. Denemeler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.11 Nisin, EDTA ve P22 bakteriyofajının ayrı ayrı ve kombine uygulanarak *S. Typhimurium* 14028 olgun biyofilmi üzerindeki eradikasyon etkilerinin belirlenmesi

Salmonella suşlarının olgun biyofilmlerine nisin, EDTA ve P22 bakteriyofajının tek tek ve kombine kullanımıyla eradikasyon etkinliğini belirlemek amacı ile, *S. Typhimurium* 14028 suşunun optimum biyofilm ürettiği koşullarda (20 °C'de 72 saat) 96-kuyucuklu polisistren mikrotitrasyon plakaları kullanılarak biyofilm üretimleri sağlanmıştır. Deneme sadece *S. Typhimurium* 14028 suşu ile gerçekleştirilmiştir. Çünkü *S. Typhimurium* SL1344 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşlarının biyofilm yapıları ileri inkübasyon sürelerinde parçalanmaktadır. Dolayısı ile 24 saatten sonra antimikrobiyal ajan uygulamasına olanak vermemektedir. İnkübasyon bitiminde planktonik hücreler steril koşullarda pipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve kuyular 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Nisin, EDTA ve faj seri dilüsyonları hazırlanmış ve ayrı ayrı biyofilm matriksinin bulunduğu kuyulara aktarılmıştır. Daha sonra ajanların tek başlarına uygulandığında elde edilen eradikasyon verilerine göre kombine kullanımları için konsantrasyonlar hesaplanmış ve olgun biyofilm bulunan kuyulara aktarılmıştır. Nisin dilüsyonları 0.02N HCl ile EDTA ve P22 faj dilüsyonları LB^{-NaCl} ile hazırlandığı için kontrol kuyularına 0.02N HCl ve tuzsuz LB aktarılmıştır. Plakalar 37 °C'de 24 saat süre ile inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon bitiminde plakalar kristal viyole ile boyama işlemine tabi tutulmuş ve OD_{595 nm}'de ölçülmüştür. Denemeler 4 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.12 Antimikrobiyal maddelerin minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyonlarının (MBEC) belirlenmesi

Antimikrobiyal maddelerin *Salmonella* olgun biyofilm yapılarının eradikasyonu üzerindeki etkisi bu aşamada, daha hassas inceleme olanağı sağlayan Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu (MBEC) yöntemi ile belirlenmiştir. Ceri vd. (1999) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek denemeler gerçekleştirilmiştir. MBEC belirlemek amacı ile 'Calgary Biofilm Device' kullanılmıştır. Sistem 96 adet peg'lerin bulunduğu kapak ve standart 96 kuyucuklu plaka olmak üzere iki aparatın oluşmaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 MBEC belirlemek amacıyla kullanılan 'Calgary Biofilm Device'

A. Planktonik bakterilerin yüzeye adsorpsiyonu ile polistiren peg yüzeyinde oluşan biyofilm yapıları. Planktonik bakteriler yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunurlar ve olgun biyofilm yapılarını oluşturmak için gelişirler. B. Besiyeri ve antimikrobiyal maddelerin bulunduğu 96 kuyucuklu mikrotitre plakaya uyumlu olan 96 özdeş peg bulunan kapak

Antimikrobiyal maddelerin *Salmonella* olgun biyofilm yapılarının eradikasyonu üzerindeki etkisini tanımlayan MBEC değerlerinin belirlenmesinde; öncelikle 18 saatlik aktif *Salmonella* kültürlerinin optik yoğunluğu OD_{550 nm}'de 0.2 (10⁷ cfu/mL) düzeyine ayarlanmış ve daha sonra 1/10 oranında seyreltilerek 10⁶ cfu/mL stok kültürler hazırlanmıştır. Daha sonra mikrotitre plaklarındaki her kuyucuğa 150 µL bakteri süspansiyonu aktarılmıştır. Eradikasyon denemelerinde sadece güçlü biyofilm üreticisi

olan *S. Typhimurium* 14028 suşu ile çalışılmıştır. Peg yüzeylerinde biyofilmin oluşması için plaklar, suşun optimum biyofilm ürettiği koşul ve inkübasyon süresinde (20 °C’de 72 saat) tuzsuz LB besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda biyofilm yapısına katılmayan ya da gevşek tutunan hücreleri ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla peg’ler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. MBEC denemelerinde MİK ve MBK denemelerinden elde edilen değerler temel alınarak, kullanılacak antimikrobiyal ajan ve antibiyotik konsantrasyonları hesaplanmış ve 200 µL olacak şekilde artan konsantrasyonlarda 96 kuyulu polistren plaklara aktarılmıştır. Yıkama aşamasından sonra biyofilm oluşturulan peg’ler antimikrobiyal madde bulunan plakalara aktarılmış 24 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde tekrar 3 defa PBS çözeltisi ile yıkanmış ve nötralizasyon çözeltisi ile 15 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Peg’ler, evrensel nötralizan çözeltisi ile muamele edildikten sonra tekrar PBS ile 3 defa yıkanmış ve biyofilm yapısı kurumaya bırakılmıştır. Ardından kalan biyofilm yapılarının fikse edilmesi amacıyla ile % 95’lik metanol yeni plakalara ilave edilerek peg’ler 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra kuyulara, biyofilm yapısının boyanması için kristal viyole eklenmiş ve peg’ler oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Boyama basamağını takiben, boyanın peg’lerden uzaklaştırılması için dH₂O ile yıkanmıştır. Antimikrobiyal uygulamasından sonra kalan biyofilm yapılarının içinde tutulan boya, kuyulara % 33’lük glasiyel asetik asit ilave edilerek çözülmüştür. Kalan biyofilm miktarını belirlemek amacıyla ile çözünen boya Elisa Reader (Thermo, Multiskan Go) cihazında 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.2.13 Antimikrobiyal ajanlar ile nisin kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 olgun biyofilmi üzerine etkisi

MBEC denemesinden elde edilen verilere göre en fazla eradikasyonu sağlayan antimikrobiyal maddelerin alt ve üst konsantrasyonları nisin ile ikili kombinasyonu, nisin+EDTA ile üçlü kombinasyonları oluşturularak olgun biyofilm üzerine etkileri araştırılmıştır. Peg’ler üzerinde geliştirilen biyofilmler 200 µL olacak şekilde 64 farklı ajan kombinasyonları ile muamele edilmiş, MBEC protokolüne benzer şekilde biyofilm matriksine bağlanan boyanın çözülmesi ile Elisa Reader da ölçüm yapılmış ve biyofilm

miktarları hesaplanmıştır. Denemeler 2 paralel 2 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.14 Farklı pH, NaCl değerlerinde ve sıcaklıklarda *Salmonella* suşlarının polistren üzerinde nisin ve EDTA kullanılarak biyofilm oluşumunun engellenmesi ve olgun biyofilmlerin eradikasyonu

Endüstriyel süreçlerde en yaygın kullanılan dört pH değerinin (pH 4.5, 5.5, 6.5, ve 7.4), beş NaCl konsantrasyonunun (% 0.5, 2, 4, 6 ve 8 NaCl) ve dört sıcaklık derecesinin (5, 20, 37, 40 °C) nisin ve EDTA kullanılarak *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşumuna ve olgun biyofilmlerin eradikasyonuna etkisi araştırılmıştır. pH değerleri 1N NaOH ve 1N HCl ile besiyerlerinin sterilizasyonundan önce ayarlanmıştır. Nisin düşük pH'larda daha aktif olduğu için denemelerde üst pH limitlerine çıkılmamıştır. Su aktivitesi değerleri belirtilen yüzde konsantrasyonlarda NaCl'nin tuzsuz LB broth besiyerine ilave edilmesiyle azaltılmıştır. Sıcaklığın biyofilm oluşumu üzerine etkisinin inceleneceği denemenin dışındaki denemelerde inkübasyon *S. Typhimurium* 14028 ve SL1344 suşları için 20 °C'de sırasıyla 72 ve 24 saat, *S. Enteritidis* DMC8 suşu için 37 °C'de 24 saat süresince gerçekleştirilmiştir. Çalışılan suşlar 5 mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarımda % 1 oranında inokülasyon yapılarak bir gece geliştirilmiştir. Bir gecelik aktif kültürler spektrofotometrede OD₅₅₀ 0.2 değerine ayarlanmıştır. Daha sonra bu kültürlerden 30'ar µL alınarak nisin-EDTA dilüsyonları ihtiva eden ve farklı pH ve NaCl değerlerinde LB içeren kuyulara aktarılmıştır. İnkübasyondan sonra ölçüm için gereken aşamalar daha önce polistren üzerinde biyofilm oluşumu incelemesinde belirtildiği gibi tekrarlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda ölçümler Elisa okuyucusunda OD₅₉₅'te yapılmıştır. Denemeler 4 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Salmonella suşlarının olgun biyofilmleri üzerine pH+Nisin, pH+Nisin+EDTA, NaCl+Nisin ve NaCl+Nisin+EDTA kombinasyonlarının eradikasyon etkilerini belirlemek amacı ile güçlü biyofilm üreticisi olan *S. Typhimurium* 14028 suşunun 72 saat süre ile tuzsuz LB sıvı besi ortamında 20 °C'de biyofilm üretimi sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda planktonik hücreler 3 kez steril PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Biyofilm oluşumunu engelleyen nisin ve EDTA konsantrasyonları

baz alınarak eradikasyon çalışmaları için gerekli olan konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Ayrıca denemeye en etkin pH ve NaCl konsantrasyonları ile devam edilmiştir. 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon sonunda kuyularda kalan biyofilm yapıları boyanarak biyofilm oranları belirlenmiştir.

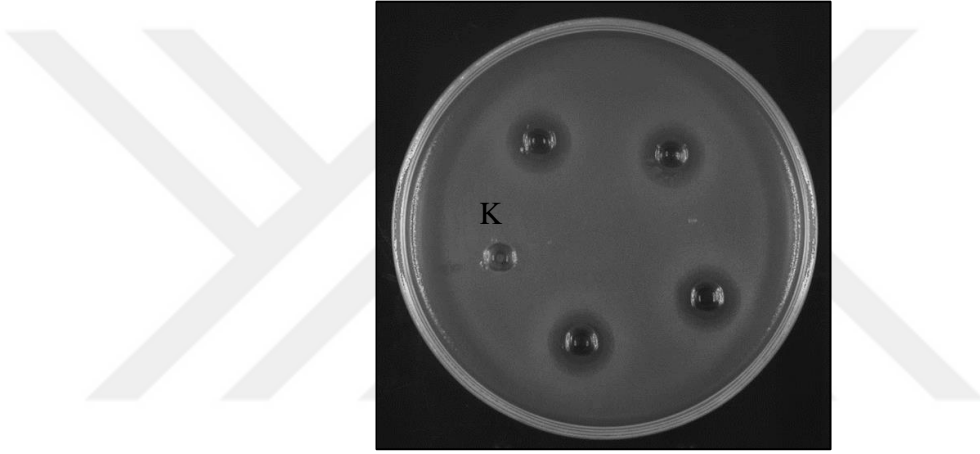
3.3 İstatistiki Analizler ve Modelleme

Sonuçların değerlendirilmesinde tercih edilecek istatistiki testler SPSS 22.0 (IBM, USA) paket yazılımını kullanarak belirlenmiştir. Tüm olgularda istatistiksel olarak anlamlılık için P değeri <0.05 kabul edilmiştir. Modelleme ve grafiklerin çizilmesinde ise SigmaPlot 2000 versiyon 12.00 programı kullanılmıştır (Chicago, IL, USA).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Antimikrobiyal Ajanların Planktonik *Salmonella* Suşlarına Etkinliğinin Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi ile Araştırılması

Antimikrobiyal ajanların planktonik *Salmonella* hücreleri üzerindeki etkinliğini araştırmak amacıyla ilk aşamada agar kuyu difüzyon testi uygulanmıştır (Şekil 4.1). Denemede kullanılan antimikrobiyal ajanların son konsantrasyonları çizelge 4.1’de verilmiştir.

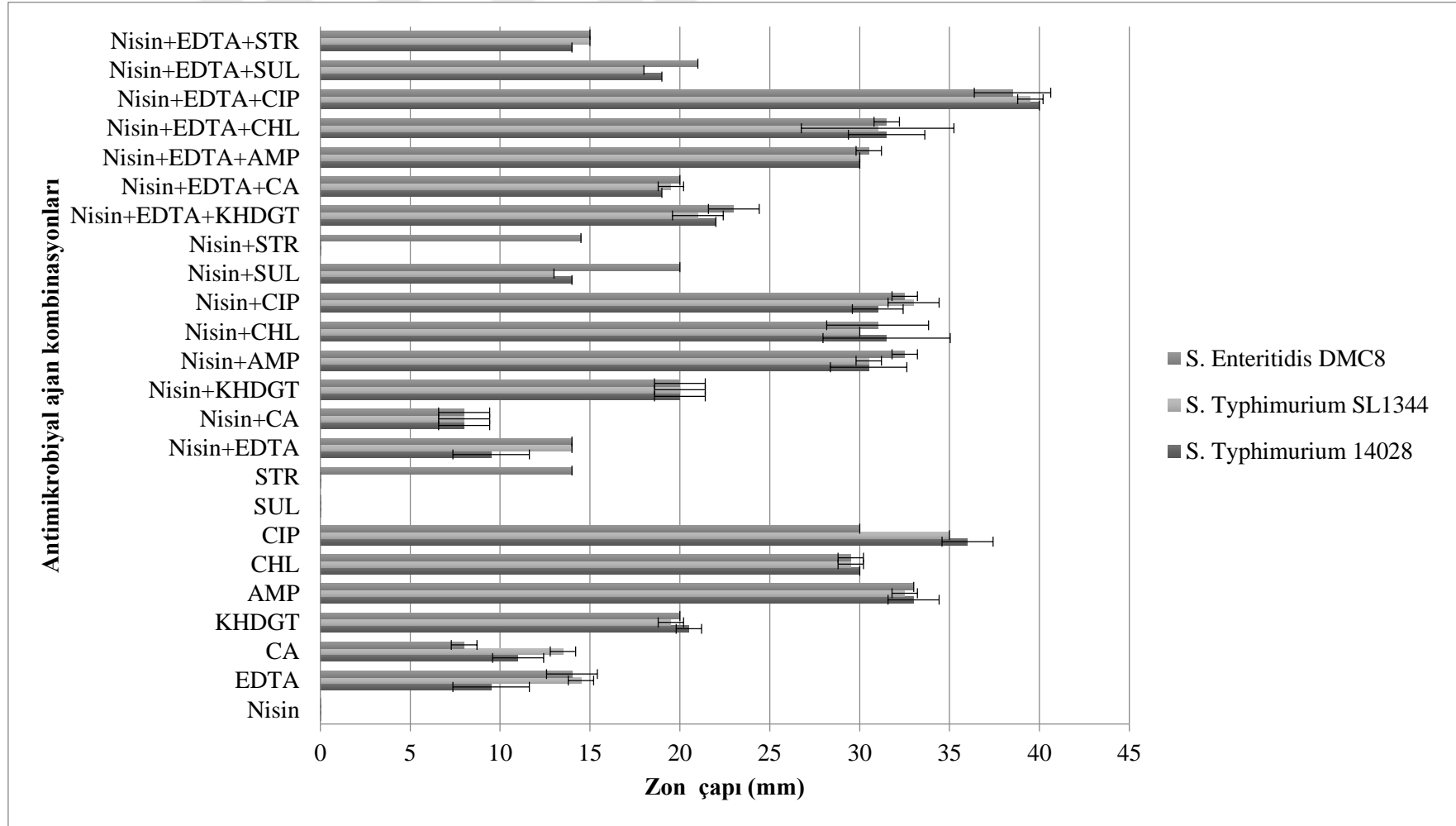


Şekil 4.1 Antimikrobiyal ajanların *Salmonella* suşlarına karşı etkinliklerinin agar kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmesi. K; Kontrol, SF

Çizelge 4.1 Denemede kullanılan antimikrobiyal ajanlar ve konsantrasyonları

Antimikrobiyal ajan	Konsantrasyon
Nisin	1 mg/mL (1000 IU/mL)
EDTA	500 mM
Klorheksidin diglukonat (KHDGT)	% 1
Sitrik asit (CA)	% 3.2
Ampisilin (AMP)	1 mg/mL
Kloramfenikol (CHL)	1 mg/mL
Siprofloksasin (CIP)	1 mg/mL
Streptomisin (STR)	1 mg/mL
Sülfanomid (SUL)	1 mg/mL

Nisin ve sülfanomid (SUL) antibiyotiği tek başına kullanıldığında *Salmonella* suşları üzerinde etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Streptomisin antibiyotiğinin kullanılan konsantrasyonuna sadece *S. Enteritidis* DMC8 suşu duyarlıdır. Diğer tüm antibiyotik ve antimikrobiyal ajanların (EDTA, sitrik asit, klorheksidin diglukonat, ampisilin, kloramfenikol, siprofloksasin) kullanılan konsantrasyonlarının *Salmonella* suşlarına karşı farklı inhibisyon zonları oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Nisinin; antimikrobiyal ajanlar ile ikili kombinasyonları sonucunda oluşan inhibisyon zonlarında ajanların tek başına kullanımını sonucu oluşan zonlara kıyasla artış gözlenmemiştir. Bununla birlikte, EDTA'nın ilavesi ile oluşan üçlü kombinasyonda ampisilin antibiyotiği hariç diğer tüm ajanların suşlara karşı oluşturduğu inhibisyon zon çaplarında artış gözlenmiştir (Şekil 4.2). Bu ön denemelerden sonra antimikrobiyal maddelerin hangi konsantrasyonlarda daha etkin olduğunu belirlemek amacı ile sinerji testleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2 Antimikrobiyal ajanların varlığında oluşan inhibisyon zon çapı değerleri

4.2 Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

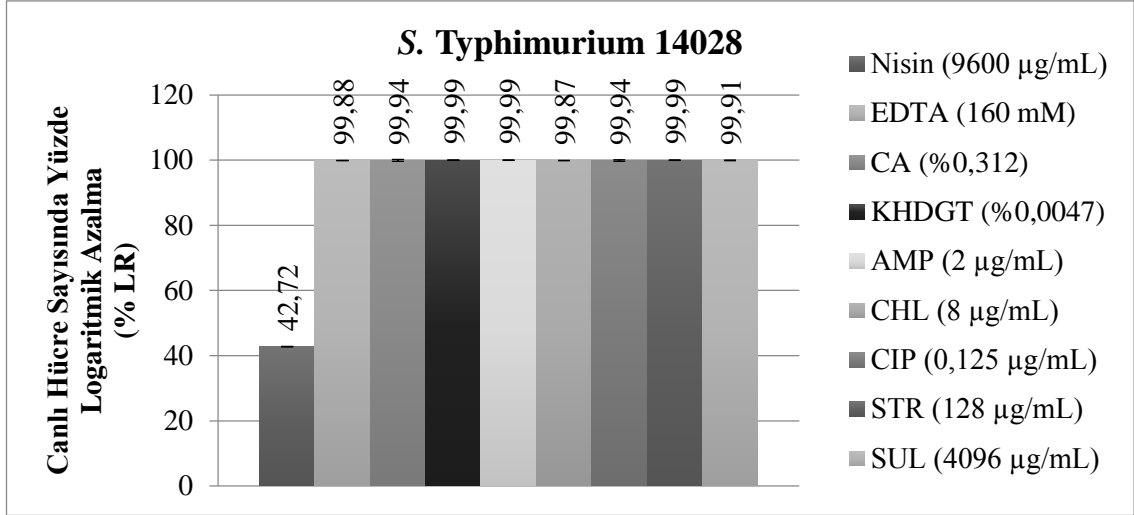
Salmonella suşlarının antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlilik fenotipi minimal inhibisyon konsantrasyonlarının kritik dilüsyon yöntemi (MİK) ile araştırılması sonucu belirlenmiştir. Ayrıca bakterinin % 99,9'unu öldüren en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu için (MBK) logaritmik azalma hesaplanmıştır. Kontrol olarak standart suş *E. coli* ATCC 25922 ile çalışılmıştır. Denemede Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün (Anonymous 2008) belirlediği kırılma noktaları ile karşılaştırma sonucu; ampisilin, siprofloksasin, kloramfenikol antibiyotiklerine karşı çalışılan tüm *Salmonella* suşlarının duyarlı olduğu belirlenmiştir. *S. Enteritidis* DMC8 suşu streptomisin antibiyotigine duyarlı iken (8 µg/mL), *S. Typhimurium* 14028 ve *S. Typhimurium* SL1344 suşlarının sırasıyla 128 µg/mL ve 2048 µg/mL gibi yüksek konsantrasyonlardaki streptomisine dirençli olduğu belirlenmiştir. Tüm *Salmonella* suşları en yüksek antibiyotik dirençliliği sülfanomid'e karşı (4096 µg/mL) göstermiştir (Çizelge 4.2). CA ve KHDGT ajanları, çok düşük konsantrasyonlarda dahi *Salmonella* suşlarının tamamını inhibe edebiliyorken; EDTA'nın, suşların % 99'unu öldüren konsantrasyonları *S. Typhimurium* 14028 suşu için 160 mM, *S. Typhimurium* SL1344 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşları için 320 mM olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Çalışmada kullanılan tüm antimikrobiyal ajanların MİK ile MBK değerleri paralellik göstermiştir (Çizelge 4.2-4.3). KHDGT'ın besiyerinde oluşturduğu bulanıklıktan MİK değeri gözlem yolu ile belirlenememiştir. KHDGT için denenen tüm konsantrasyonların MBK'ların hesaplanması yolu ile suşları inhibe eden en düşük KHDGT konsantrasyonu elde edilmiştir. Antimikrobiyal uygulama sonrası suşların koloni sayılarının kontrole kıyasla logaritmik azalmaları şekil 4.3-4.5'te verilmiştir. Nisin Gram negatif bakteriler üzerinde etkili değildir ve denemede kullanılan en yüksek nisin konsantrasyonu (9600 µg/mL), *S. Typhimurium* 14028 suşuna % 42, *S. Typhimurium* SL1344 suşuna % 12, *S. Enteritidis* DMC8 suşuna ise % 55 düzeyinde etkili bulunmuştur (Şekil 4.3-4.5).

Çizelge 4.2 Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin MİK ve MBK değerleri

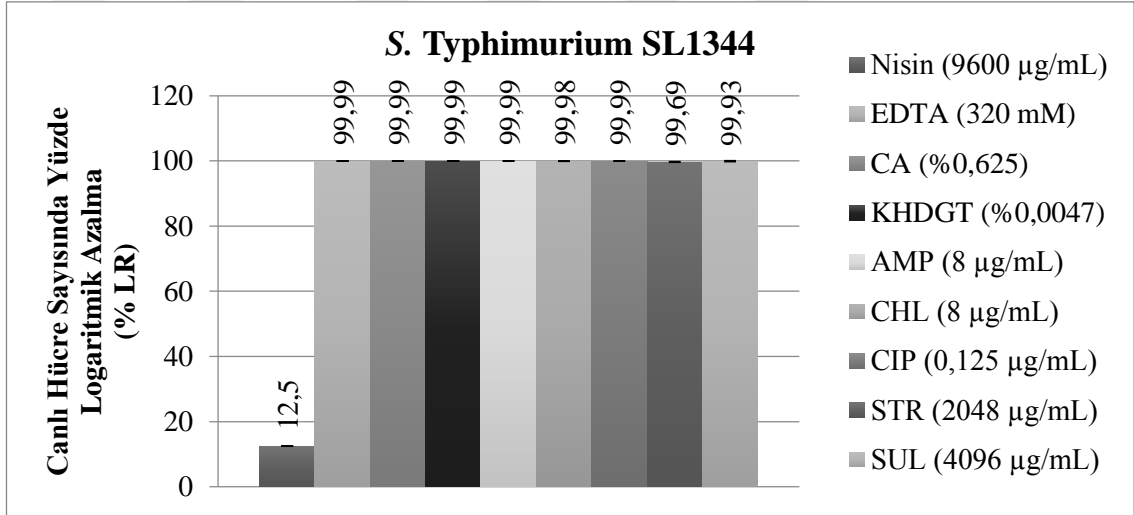
		S. Typhimurium 14028	S. Typhimurium SL1344	S. Enteritidis DMC8	<i>E. coli</i> ATCC 25922
AMP	MİK (µg/mL)	2	8	2	< 2
	MBK (µg/mL)	2	8	2	1
CHL	MİK (µg/mL)	8	4	4	16
	MBK (µg/mL)	8	8	8	16
CIP	MİK (µg/mL)	< 2	< 2	< 2	< 2
	MBK (µg/mL)	0,125	0,125	0,125	1
STR	MİK (µg/mL)	128	2048	8	256
	MBK (µg/mL)	128	2048	8	256
SUL	MİK (µg/mL)	4096	4096	4096	4096
	MBK (µg/mL)	4096	4096	4096	4096

Çizelge 4.3 Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanların MİK ve MBK değerleri

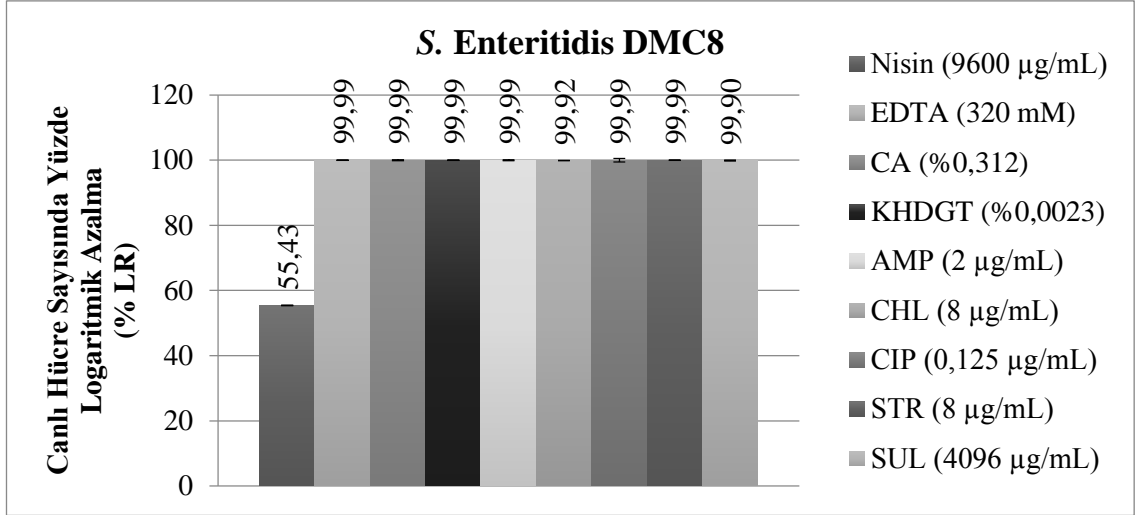
		S. Typhimurium 14028	S. Typhimurium SL1344	S. Enteritidis DMC8
Nisin	MİK (µg/mL)	>9600	>9600	>9600
	MBK (µg/mL)	>9600	>9600	>9600
EDTA	MİK (mM)	160	160	320
	MBK (mM)	160	320	320
CA	MİK (%)	0,312	0,625	0,312
	MBK (%)	0,312	0,625	0,312
KHDGT	MİK (%)	-	-	-
	MBK (%)	0,0047	0,0047	0,0023



Şekil 4.3 Antimikrobiyal ajanların *S. Typhimurium* 14028 suşuna karşı etkinliği



Şekil 4.4 Antimikrobiyal ajanların *S. Typhimurium* SL1344 suşuna karşı etkinliği



Şekil 4.5 Antimikrobiyal ajanların *S. Enteritidis* DMC8 suşuna karşı etkinliği

4.3 Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu (FİK) ve Fraksiyonel Bakterisidal Konsantrasyonun (FBK) Belirlenmesi

Nisin ve diğer antimikrobiyal ajanlar arasındaki sinerjik etkinin belirlenebilmesi için gerçekleştirilen bu denemede ortalama fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) esas alınmıştır. İki antimikrobiyal ajanın 64 farklı kombinasyonu elde edilmiş ve 96 kuyucuklu plakadaki tüm satır ve sütunlardaki bakterilerin % 99,9'unu öldüren en düşük antimikrobiyal madde kombinasyonu konsantrasyonunun (FBK) olduğu kuyucuklar değerlendirmeye alınmıştır. Bu kuyucukların her biri ve her iki ilaç için FİK ve FİK indeksi (FİKİ) değerleri hesaplanıp elde edilen değerler toplanmış ve kuyucuk sayısına bölünerek FİKİ'nin ortalaması ($\sum FİK$) alınmıştır. $FİKİ \leq 0.5$ ise sinerji; $0.5 > FİKİ < 1$ ise parsiyel sinerji; $FİKİ = 1$ ise aditif; $1 > FİKİ < 4$ ise indifferansiye ve ≥ 4 ise antagonizma olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan *Salmonella* suşları AMP, CHL ve CIP antibiyotiklerine duyarlı olduklarından bu antibiyotikler sinerji çalışmalarına dahil edilmemiştir.

Çalışmada *S. Typhimurium* 14028 suşu üzerine nisin ve antimikrobiyal ajanların fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu değerleri çizelge 4.4'te verilmiştir. *S. Typhimurium* 14028 suşu üzerinde % 99 oranında inhibisyon etkisi gösteren kombinasyondaki en düşük nisin ve EDTA konsantrasyonları sırasıyla 1200 µg/mL ve 1.25 mM'dır. Dama tahtası yöntemi ile elde edilen FİK indeksi 0.427 olup nisin ve

EDTA kombine kullanıldığında sinerjik etki göstermektedir. Nisinin CA ile birlikte kullanımı sonucu, CA'nın tek başına kullanıldığında % 0.312 olan inhibisyon konsantrasyonu % 0.078'e düşmüştür. FİK indeksi (1.498) bu iki antimikrobiyal ajan arasında indiferans etkinin olduğunu göstermektedir. Nisinin klorheksidin diglukonat (KHDGT) ile birlikte kullanımı sonucu, KHDGT inhibisyon konsantrasyonu 4 katı kadar azalmış (% 0.0011) ve aralarında kısmi sinerji gözlenmiştir (FİKİ=0.528). Aynı şekilde nisin, aminoglikozit grubu bir antibiyotik olan streptomisin ile birlikte kullanıldığında streptomisin MİK değeri 32 kat (4 µg/mL) azalmış ve aralarında kısmi sinerji saptanmıştır (FİKİ= 0.607). Ancak nisinin sülfanomid ile kombinasyonu sonucu sülfanomid MİK değeri 2 kat (8192 µg/mL) artmış ve aralarında indiferans (FİKİ=2.498) etkileşim olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

S. Typhimurium SL1344 suşunda belirlenen fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu değerleri çizelge 4.5'te verilmiştir. Nisin ve EDTA'nın kombinasyonu sonucu nisinin inhibisyon etkisi gösteren kombinasyondaki MİK değeri 1200 µg/mL olup, EDTA'nın etki ettiği konsantrasyon 1.25 mM'a düşmüştür. Dama tahtası yöntemi ile elde edilen FİK indeksi 0.343 olup, nisin ve EDTA birlikte kullanıldığında *S. Typhimurium* SL1344 suşuna karşı sinerjik etki göstermektedir. Nisinin CA ile birlikte kullanımı sonucu, CA konsantrasyonu % 0.078'e düşmüş ve FİK indeksi (0.873) bu iki antimikrobiyal ajan arasında kısmi sinerji olduğunu göstermiştir. Nisinin KHDGT ile birlikte kullanımı sonucu KHDGT'nin inhibisyon konsantrasyonu 2 katı kadar azalmış (% 0.0023) ve aralarında kısmi sinerji tespit edilmiştir (FİKİ=0.81). Nisin, STR ile birlikte kullanıldığında STR'nin MİK değeri 16 katı kadar (128 µg/mL) azalarak nisin ile indiferans etkileşim (FİKİ=2.167), SUL ile kombine kullanımı sonucu SUL'in MİK değeri 2 kat (8192 µg/mL) artarak nisin ile aralarında indiferans etkileşim (FİKİ=2.248) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

S. Enteritidis DMC8 suşu üzerine fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu değerleri çizelge 4.6'te verilmiştir. Nisin ve EDTA'nın kombine kullanımı sonucu diğer *Salmonella* suşlarına benzer şekilde nisinin kombinasyondaki MİK değeri 1200 µg/mL olarak belirlenmiş, EDTA'nın etki ettiği konsantrasyon 1.25 mM'a düşmüştür. Aralarındaki FİK indeksi 0.374 olup nisin ve EDTA kombine kullanıldığında sinerjik

etki göstermektedir. Nisinin CA ile birlikte kullanımı sonucu, kombinasyondaki CA konsantrasyonu % 0.078'e düşmüş ve değerlendirilen FİK indeksi (1.373) bu iki antimikrobiyal ajan arasındaki etkinin indifferans olduğunu göstermiştir. Nisinin KHDGT ile birlikte kullanımı sonucu KHDGT'nin inhibisyon konsantrasyonu 2 katı kadar azalmış (% 0.0011) ve aralarında kısmi sinerji gözlenmiştir (FİKİ=1.123). Nisin ve sülfanomid kombinasyonunda SUL MİK değeri 2 kat (8192 µg/mL) artmış ve sonuçta aralarında indifferans etkileşim (FİKİ=2.998) tanımlanmıştır (Çizelge 4.6).



Çizelge 4.4 *S. Typhimurium* 14028 suşu için fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu değerleri ve etki şekilleri

Antimikrobiyal ajan	Denemede kullanılan konsantrasyon aralığı	MİK Değeri	Kombinasyondaki MİK değeri		FİK		FİK İndeks (Σ FİK)	Etki
			Nisin ($\mu\text{g/mL}$)	Antimikrobiyal ajan	Nisin	Antimikrobiyal ajan		
Nisin	75-9600 $\mu\text{g/mL}$	> 9600 $\mu\text{g/mL}$	-	-	-	-	-	-
EDTA	1.25-320 mM	160 mM	1200	1.25 mM	0.321	0.106	0.427	Sinerjik
CA	% 0.009-2.5	% 0.312	4800	% 0.078	0.248	1.25	1.498	İndiferans
KHDGT	% 0.0001-0.019	% 0.0047	2400	% 0.0011	0.081	0.446	0.528	Parsiyel sinerji
STR	2-256 $\mu\text{g/mL}$	128 $\mu\text{g/mL}$	2400	4 $\mu\text{g/mL}$	0.081	0.526	0.607	Parsiyel sinerji
SUL	128-16384 $\mu\text{g/mL}$	4096 $\mu\text{g/mL}$	150	8192 $\mu\text{g/mL}$	0.248	2.25	2.498	İndiferans
AMP	-	<2	-	-	-	-	-	-
CHL	-	8	-	-	-	-	-	-
CIP	-	<2	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.5 *S. Typhimurium* SL1344 suşu için fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu değerleri etki şekilleri

Antimikrobiyal ajan	Denemede kullanılan konsantrasyon aralığı	MİK Değeri	Kombinasyondaki MİK değeri		FİK		FİK İndeks (ΣFİK)	Etki
			Nisin (µg/mL)	Antimikrobiyal ajan	Nisin	Antimikrobiyal ajan		
Nisin	75-9600 µg/ mL	> 9600 µg/ mL	-	-	-	-	-	-
EDTA	1.25-320 mM	320 mM	1200	1,25 mM	0.289	0.054	0.343	Sinerjik
CA	% 0.009-2.5	% 0.625	4800	% 0.078	0.248	0.625	0.873	Parsiyel sinerji
KHDGT	% 0.0001-0.019	% 0.0047	2400	% 0.0023	0.248	0.562	0.81	Parsiyel sinerji
STR	64-8192 µg/ mL	2048 µg/ mL	2400	128 µg/ mL	0.141	2.026	2.167	İndiferans
SUL	128-16384 µg/ mL	4096 µg/ mL	75	8192 µg/ mL	0.248	2	2.248	İndiferans
AMP	-	8	-	-	-	-	-	-
CHL	-	4	-	-	-	-	-	-
CIP	-	<2	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.6 *S. Enteritidis* DMC8 suşu için fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu değerleri etki şekilleri

Antimikrobiyal ajan	Denemede kullanılan konsantrasyon aralığı	MİK Değeri	Kombinasyondaki MİK değeri		FİK		FİK İndeks (Σ FİK)	Etki
			Nisin ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Antimikrobiyal ajan	Nisin	Antimikrobiyal ajan		
Nisin	75-9600 $\mu\text{g}/\text{mL}$	> 9600 $\mu\text{g}/\text{mL}$	-	-	-	-	-	-
EDTA	1.25-320 mM	320 mM	1200	1.25 mM	0.321	0.053	0.374	Sinerjik
CA	% 0.009-2.5	% 0.312	4800	% 0.078	0.248	1.125	1.373	İndiferans
KHDGT	% 0.0001-0.019	% 0.0023	4800	% 0.0011	0.248	0.875	1.123	İndiferans
SUL	128-16384 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4096 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1200	8192 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.248	2.75	2.998	İndiferans
STR	-	8	-	-	-	-	-	-
AMP	-	2	-	-	-	-	-	-
CHL	-	4	-	-	-	-	-	-
CIP	-	<2	-	-	-	-	-	-

4.3.1 Nisin ve EDTA'nın diğer antimikrobiyal ajanlar ile üçlü kombinasyonunun planktonik *Salmonella* suşlarına inhibisyon etkisinin araştırılması

Nisinin antimikrobiyal ajanlar ile ikili kombinasyon denemesinden elde edilen verilere göre; *Salmonella* suşlarının % 99,99 oranında inhibisyonuna yol açan en düşük EDTA ve nisin FBK konsantrasyonları denenen tüm *Salmonella* suşları için 1.25 mM EDTA ve 1200 µg/mL nisin olarak belirlenmiştir. Üçlü kombinasyon denemelerinde, bu konsantrasyonların diğer antimikrobiyal ajanlar ile birlikte kullanılarak planktonik *Salmonella* suşlarına karşı etkinliği araştırılmıştır.

Kombinasyon denemeleri sonucu; tüm *Salmonella* suşları için CA ve KHDGT ajanlarının çok düşük konsantrasyonlarda dahi % 99 oranında inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. CA+EDTA+nisin kombinasyonu ile *S. Typhimurium* 14028 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşları için MİK değerleri 16 kat azalırken (% 0.019), *S. Typhimurium* SL1344 suşu için MİK değeri 64 kat azalmıştır (% 0.009). Benzer şekilde KHDGT+EDTA+nisin kombinasyonu ile *S. Typhimurium* 14028 ve *S. Typhimurium* SL1344 suşları için MİK değerleri 8 katı kadar (% 0.0005) azalırken, *S. Enteritidis* DMC8 suşu için MİK değeri 4 katı kadar (% 0.0005) azalmıştır. Bununla beraber nisinin de uygulama konsantrasyonunda azalma görülmüştür (600 µg/mL). Sülfanomid antibiyotiğinin tüm suşlara karşı, nisin ve EDTA ile birlikte kullanımı antibiyotiğin tek başına kullanımına göre etkili olmamıştır. Uygulamalarda antibiyotiğin tek başına kullanımı ile kombinasyonda kullanımı arasında bir doz farkı bulunmamaktadır. Streptomisin antibiyotiğinin ise, üçlü kombinasyondaki kullanımında bir azalış görülmemekle beraber, ikili kombinasyonda kullanımı (nisin ile birlikte) inhibisyon çalışmaları için daha uygundur (Çizelge 4.7).

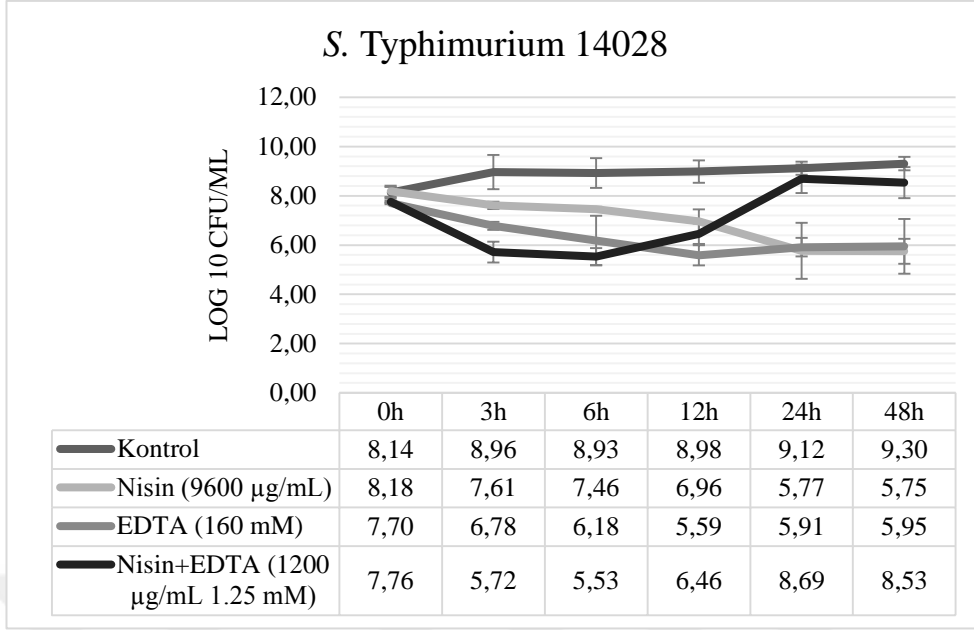
Çizelge 4.7 CA, KHDGT, SUL ve STR antimikrobiyal ajanlarının *Salmonella* suşları üzerine nisin ve EDTA ile birlikte kombine kullanımı sonucu etki eden en düşük FBK konsantrasyonları

	S. Typhimurium 14028	S. Typhimurium SL1344	S. Enteritidis DMC8
CA MİK değeri	% 0.312	% 0.625	% 0.312
CA MİK değeri (2'li kombinasyon)	% 0.078	% 0.078	% 0.078
CA MİK değeri (3'lü kombinasyon)	600 µg/ml Nisin + 1.25 mM EDTA+ % 0.019 CA	600 µg/ml Nisin + 1.25 mM EDTA+ % 0.009 CA	600 µg/ml Nisin + 1.25 mM EDTA+ % 0.019 CA
KHDGT MİK değeri	% 0.0047	% 0.0047	% 0.0023
KHDGT MİK değeri (2'li kombinasyon)	% 0.0011	% 0.0023	% 0.0011
KHDGT MİK değeri (3'lü kombinasyon)	600 µg/ml Nisin + 1.25 mM EDTA + % 0.0005 KHDGT	600 µg/ml Nisin + 1.25 mM EDTA +% 0.0005 KHDGT	150 µg/ml Nisin + 1.25 mM EDTA +% 0.0005 KHDGT
SUL MİK değeri	4096 µg/mL	4096 µg/ mL	4096 µg/ mL
SUL MİK değeri (2'li kombinasyon)	8192 µg/ mL	8192 µg/ mL	8192 µg/ mL
SUL MİK değeri (3'lü kombinasyon)	600 µg/ mL Nisin + 1.25 mM EDTA + 4096 µg/ mL SUL	150 µg/ mL Nisin + 1.25 mM EDTA + 4096 µg/ mL SUL	150 µg/ mL Nisin + 1.25 mM EDTA + 4096 µg/ mL SUL
STR MİK değeri	128 µg/ mL	2048 µg/ mL	-
STR MİK değeri (2'li kombinasyon)	4 µg/ mL	128 µg/ mL	-
STR MİK değeri (3'lü kombinasyon)	600 µg/ mL Nisin + 1.25 mM EDTA + 4 µg/ mL STR	600 µg/ mL Nisin + 1.25 EDTA+ 2048 µg/ mL STR	-

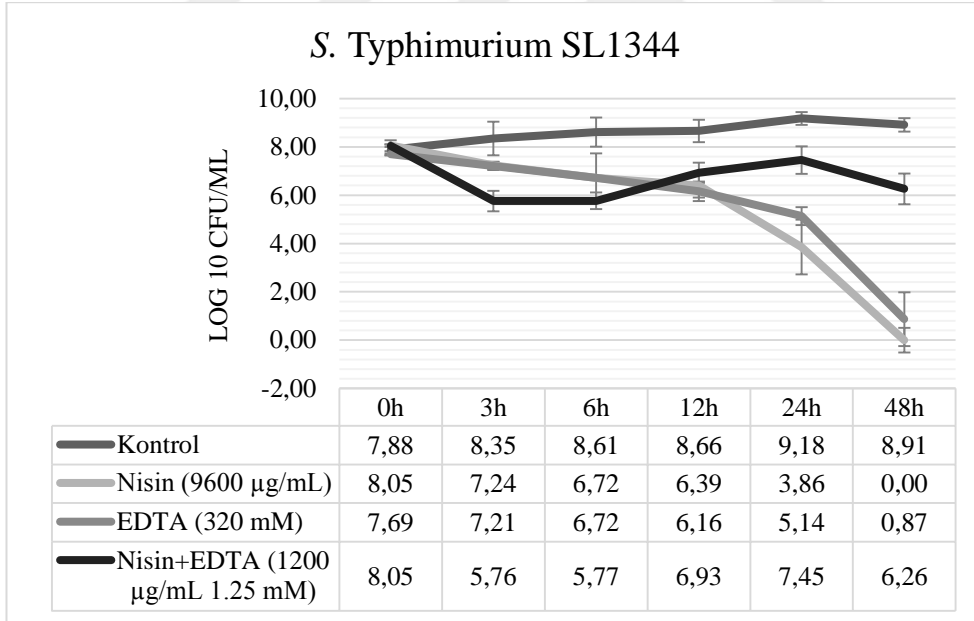
4.4 Antimikrobiyal Ajanların ve Kombinasyonlarının Etki Sürelerinin Zaman-Ölüm Denemeleri ile Belirlenmesi

Dama tahtası yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal ajanların *in vitro* sinerjik etkileşimlerinin doğrulanması, etkinin ne kadar sürede gerçekleştiğinin ve etki tipinin (bakterisidal ya da bakteriyostatik) tespit edilmesi amacı ile zaman ölüm denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada; MİK, MBK, FİK ve FBK analizlerinde elde edilen bakterilerin % 99,99'unu öldüren konsantrasyonlar kullanılmıştır. Kombinasyondaki ajanların tek başına kullanılan en aktif ajan ile karşılaştırıldığı 6 ila 24 saat sonundaki koloni sayımındaki $\geq 2 \log_{10}$ azalma sinerji, $< 2 \log_{10}$ artış ya da azalış indifferans, $\geq 2 \log_{10}$ artış antagonizm olarak değerlendirilmiştir.

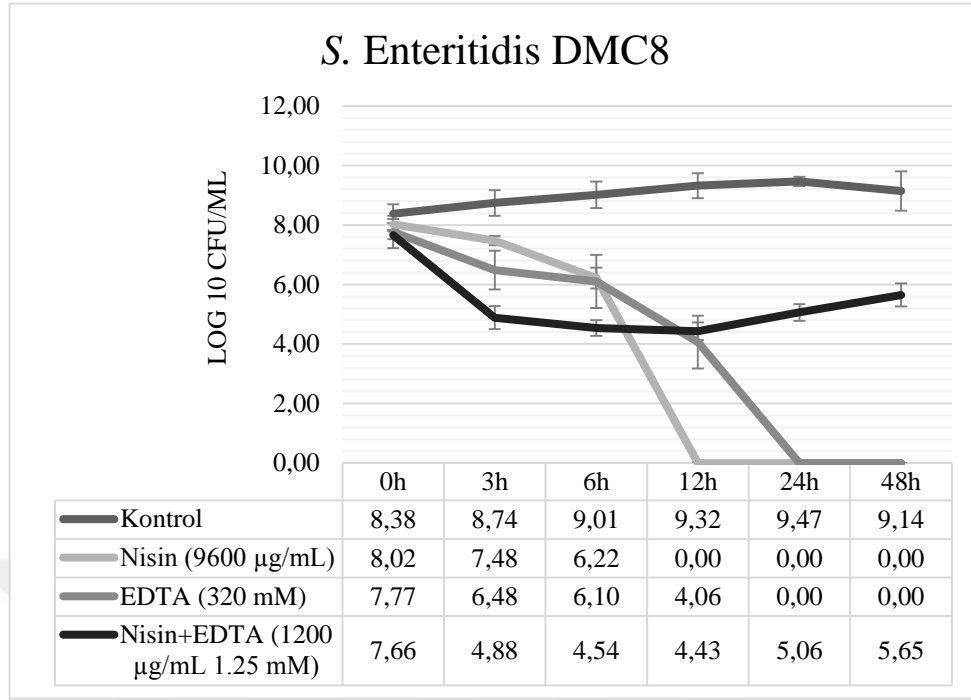
Zamana bağlı öldürme deneylerinin sonuçlarına göre; 9600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin konsantrasyonu *S. Typhimurium* 14028 suşunun canlı hücre sayısında 48 saat sonunda $\geq 3 \log_{10}$ azalma sağlarken, *S. Enteritidis* DMC8 ve *S. Typhimurium* SL1344 suşlarını sırasıyla 12 ve 48 saat sonunda tamamen inhibe etmiştir. Benzer şekilde MİK değerlerinde kullanılan EDTA konsantrasyonları, *S. Typhimurium* 14028 suşunun canlı hücre sayısında 48 saat sonunda $\geq 3 \log_{10}$ azalma sağlarken, *S. Enteritidis* DMC8 ve *S. Typhimurium* SL1344 suşlarını sırasıyla 24 ve 48 saat sonunda tamamen inhibe etmiştir. MİK değerlerinden daha düşük konsantrasyonlarda kullanılan nisin ve EDTA kombinasyonu (1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ nisin+1.25 mM EDTA), *S. Typhimurium* 14028 suşunda 3 ila 6 saat sonunda $\geq 3 \log_{10}$ ve *S. Typhimurium* SL1344 suşunda 3 ila 6 saat sonunda $\geq 2 \log_{10}$, *S. Enteritidis* DMC8 suşunda ise 3 ila 48 saat sonunda $\geq 3 \log_{10}$ olarak koloni sayılarında azalma sağlamış ve sinerjik etki tanımlanmıştır ($P < 0.001$) (Şekil 4.6-4.8). *Salmonella* suşları için inkübasyon süresi uzadıkça ikili kombinasyonun etkisinde düşme meydana gelmiştir. Elde edilen verilere göre, nisin ve EDTA'nın uygulanan kombinasyon konsantrasyonları ve etki biçimleri üç suş için de aynıdır.



Şekil 4.6 *S. Typhimurium* 14028 suşunun nisin ve EDTA kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

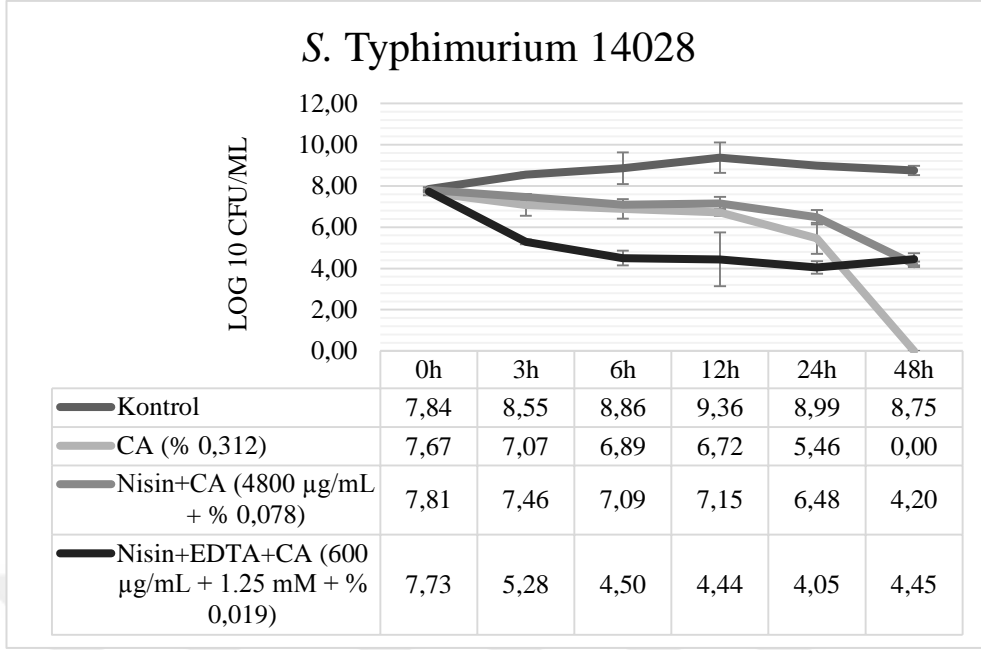


Şekil 4.7 *S. Typhimurium* SL1344 suşunun nisin ve EDTA kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

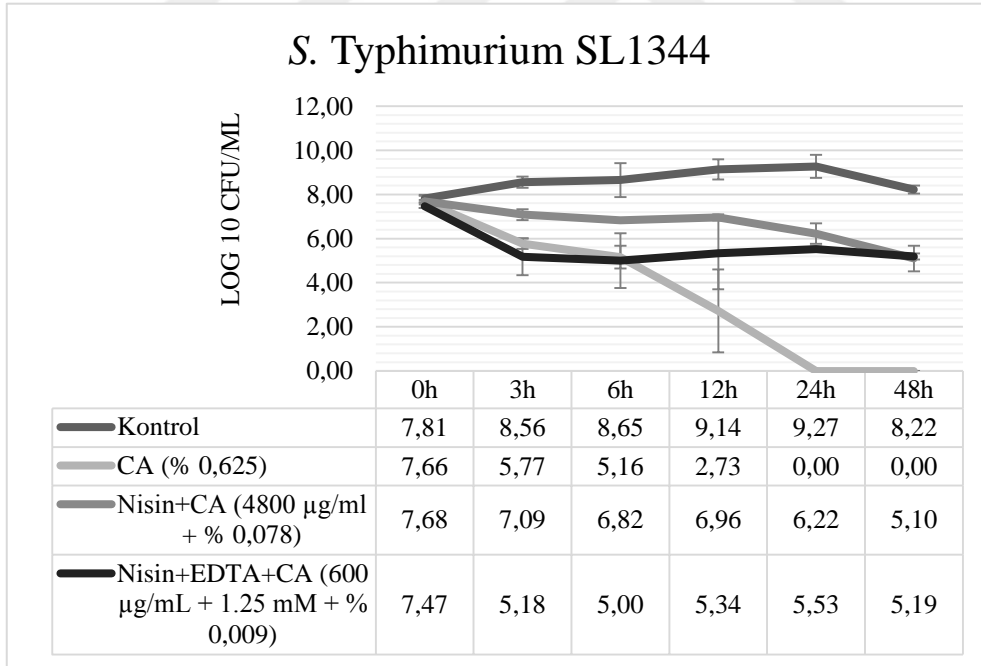


Şekil 4.8 S. Enteritidis DMC8 suşunun nisin ve EDTA kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

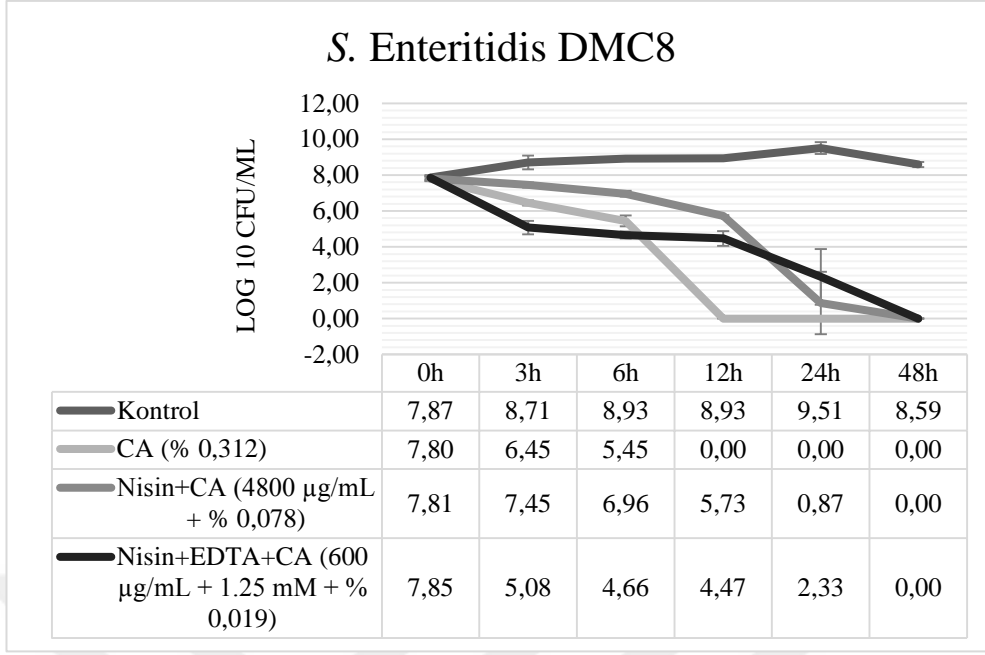
Sitrik asit, her suş için belirlenen MİK değerlerinde kullanıldığında; *S. Typhimurium* 14028 suşunu 48 saat, *S. Typhimurium* SL1344 suşunu 24 saat ve *S. Enteritidis* DMC8 suşunu ise 12 saat sonunda tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.9-4.11). Zaman ölüm denemelerinden elde edilen verilere göre; nisin'in 1/2 MİK değeri ile CA'nın 1/4 MİK değerinin birlikte kullanılması (4800 µg/mL nisin+% 0.078 CA) tüm suşların canlı hücre sayılarında 12 ila 48. saatlerin sonunda $\geq 2 \log_{10}$ azalma sağlamış ve aralarında sinerjik etki tanımlanmıştır ($P<0.05$). Bu konsantrasyonlar *S. Enteritidis* DMC8 suşunu 48. saat sonunda tamamen inhibe edilmiştir. Kombinasyona üçüncü bir antimikrobiyal madde olarak EDTA eklendiğinde, daha az konsantrasyonlarda kullanılan nisin ve CA'nın (*S. Typhimurium* 14028 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşları için % 0.019 CA, *S. Typhimurium* SL1344 suşu için % 0.009 CA) 3. saatten itibaren canlı hücre sayılarında $\geq 3 \log_{10}$ azalma sağladığı belirlenmiştir ($P<0.05$). *S. Enteritidis* DMC8 suşunu ise 48. saatte tamamen inhibe etmiştir (Şekil 4.9-4.11).



Şekil 4.9 *S. Typhimurium* 14028 suşunun nisin, EDTA ve sitrik asit (CA) kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

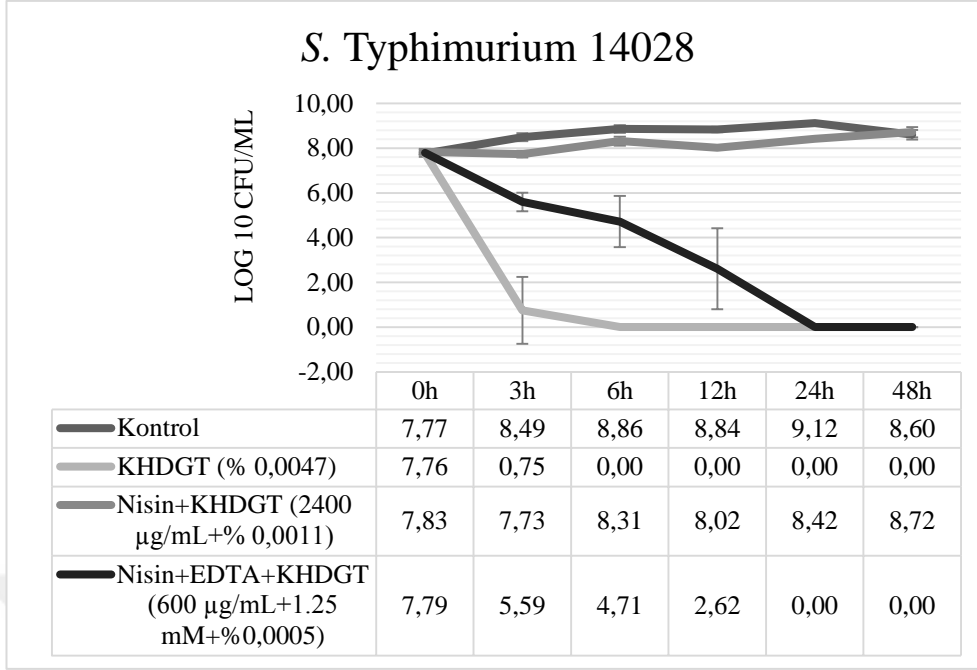


Şekil 4.10 *S. Typhimurium* SL1344 suşunun nisin, EDTA ve sitrik asit (CA) kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

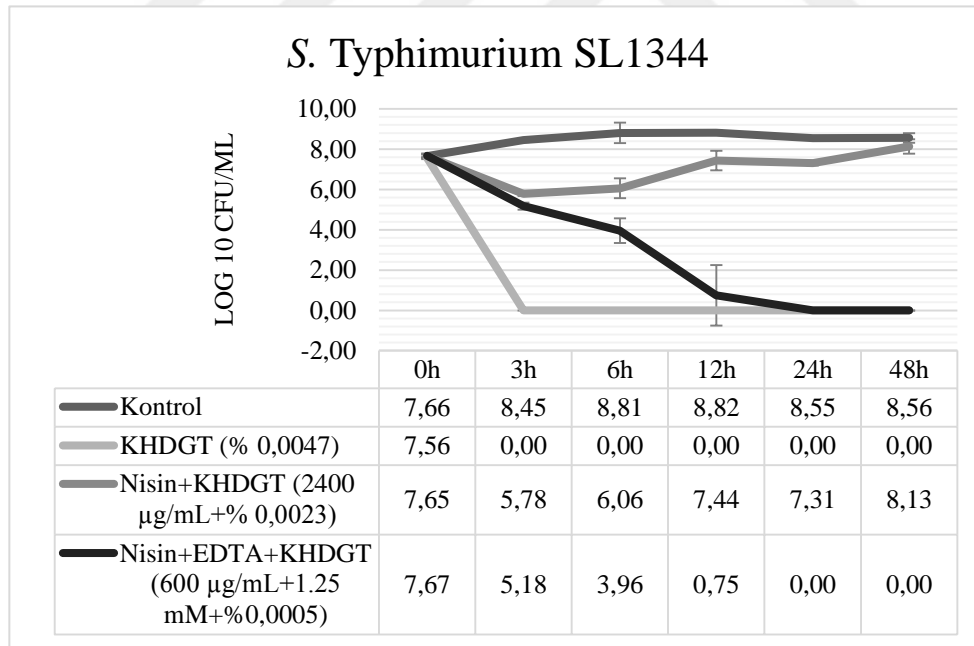


Şekil 4.11 S. Enteritidis DMC8 suşunun nisin, EDTA ve sitrik asit (CA) kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

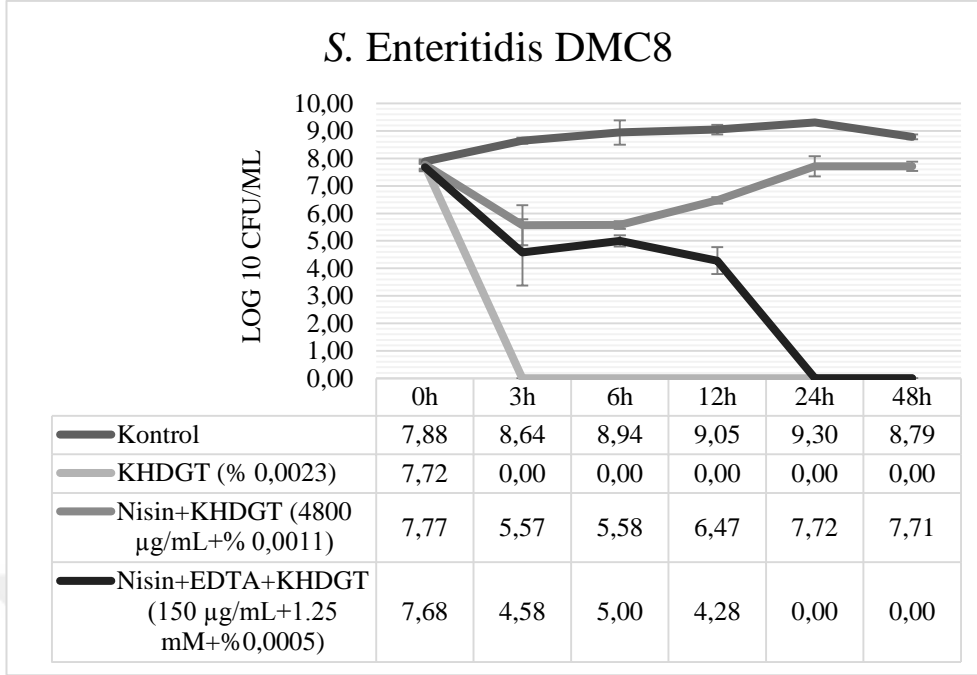
MİK değerlerinde kullanılan KHDGT'nin *Salmonella* suşları üzerindeki bakterisidal etkisi 3 saat sonunda belirlenmiştir (Şekil 4.12-4.14). *S. Typhimurium* 14028 suşu için, KHDGT ve nisin kombinasyonu 3 saat sonunda canlı hücre sayısında $<2 \log_{10}$ azalma sağlamıştır. Aralarındaki etki indifferans olarak belirlenmiştir. İnkübasyon süresinin artması ile ajanların etkisi azalmıştır. Kombinasyona EDTA ilavesi ile sağlanan üçlü kombinasyon (600 µg/mL nisin+1.25 mM EDTA+% 0.0005 KHDGT) 3. saatten itibaren $\geq 2 \log_{10}$ azalma sağlamış, 24. saatten sonra ise bu suşun üremesini tamamen inhibe etmiştir ($P<0.001$) (Şekil 4.12). *S. Typhimurium* SL1344 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşlarının canlı hücre sayıları üzerinde 3 ila 6 saat sonunda $\geq 2 \log_{10}$ azalma sağlayan KHDGT ve nisin'in beraber etkisi sinerjik etki olarak tanımlanmıştır. İnkübasyon süresinin artması ile bu ajanların etkisi azalmıştır ($P<0.001$). Bu kombinasyona EDTA ilavesi ile 3. saatten itibaren $\geq 3 \log_{10}$ azalma sağlanmış ve 24 saat sonunda suşları tamamen inhibe eden kombinasyondaki konsantrasyonlarının *S. Typhimurium* SL1344 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşları için sırasıyla 600 µg/mL nisin+1.25 mM EDTA+% 0.0005 KHDGT ve 150 µg/mL nisin+1.25 mM EDTA+% 0.0005 KHDGT olduğu belirlenmiştir ($P<0.001$) (Şekil 4.13-4.14).



Şekil 4.12 *S. Typhimurium* 14028 suşunun nisin, EDTA ve klorheksidin diglukonat kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

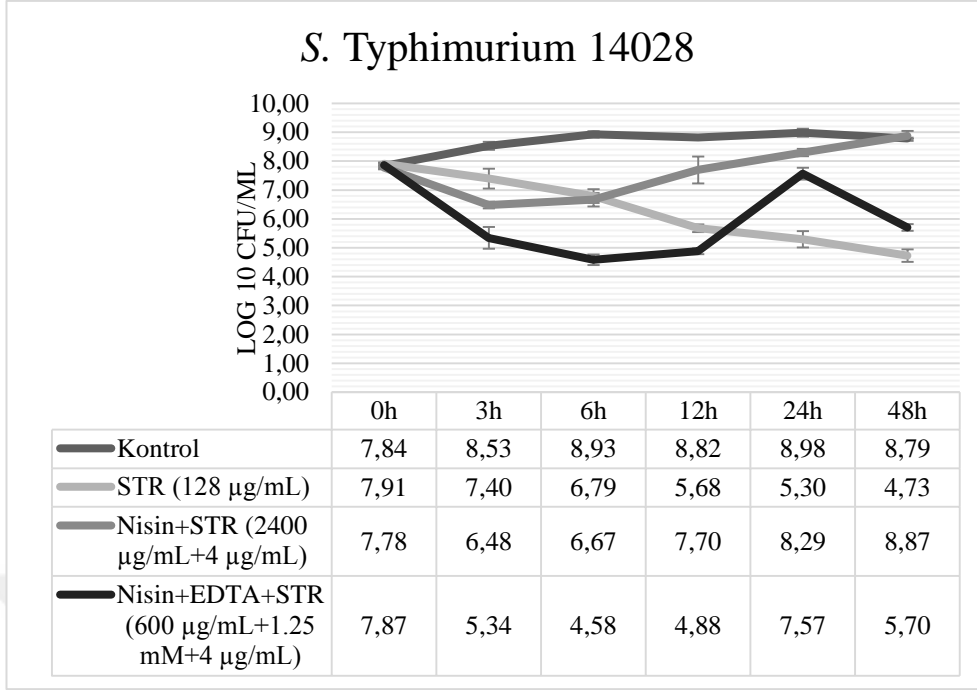


Şekil 4.13 *S. Typhimurium* SL1344 suşunun nisin, EDTA ve klorheksidin diglukonat kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

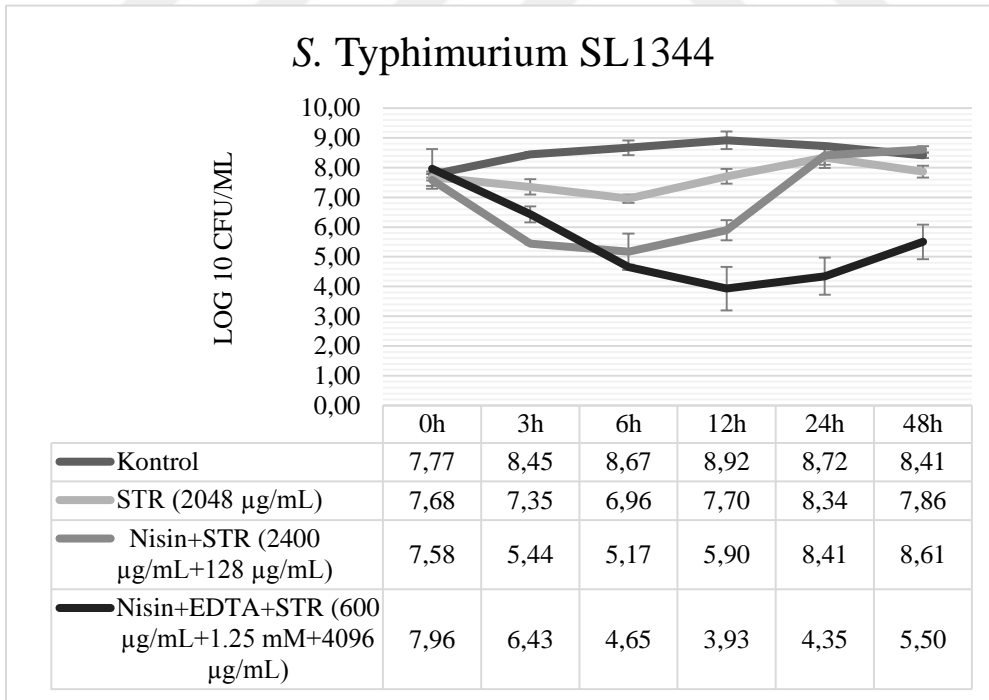


Şekil 4.14 *S. Enteritidis* DMC8 suşunun nisin, EDTA ve klorheksidin diglukonat kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

Streptomisin antibiyotiği nisin ile birlikte kullanıldığında *S. Typhimurium* 14028 suşunun canlı hücre sayısı 3 ila 6 saat sonunda $\geq 2 \log_{10}$, *S. Typhimurium* SL1344 suşunun ise 3 ila 12 saat sonunda $\geq 3 \log_{10}$ düzeyinde azalmıştır ve bu iki ajan arasındaki ilişki sinerjetik etki olarak tanımlanmıştır ($P < 0.001$). Ancak inkübasyon süresi uzadıkça ajanların etkilerinde azalma meydana gelmiştir. Kombinasyona EDTA eklendiğinde elde edilen üçlü kombinasyon ile *S. Typhimurium* 14028 ve *S. Typhimurium* SL1344 suşlarının canlı hücre sayısında 48 saat sonunda $\geq 3 \log_{10}$ azalma belirlenmiştir ($P < 0.001$) (Şekil 4.15-4.16).

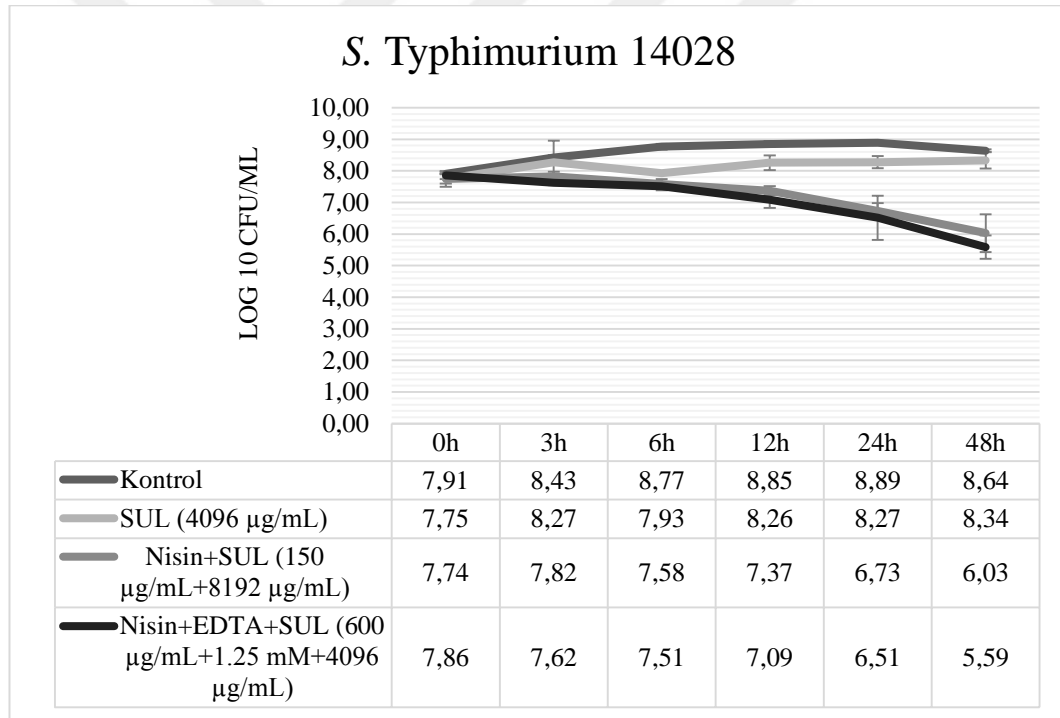


Şekil 4.15 S. Typhimurium 14028 suşunun nisin, EDTA ve streptomisin kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

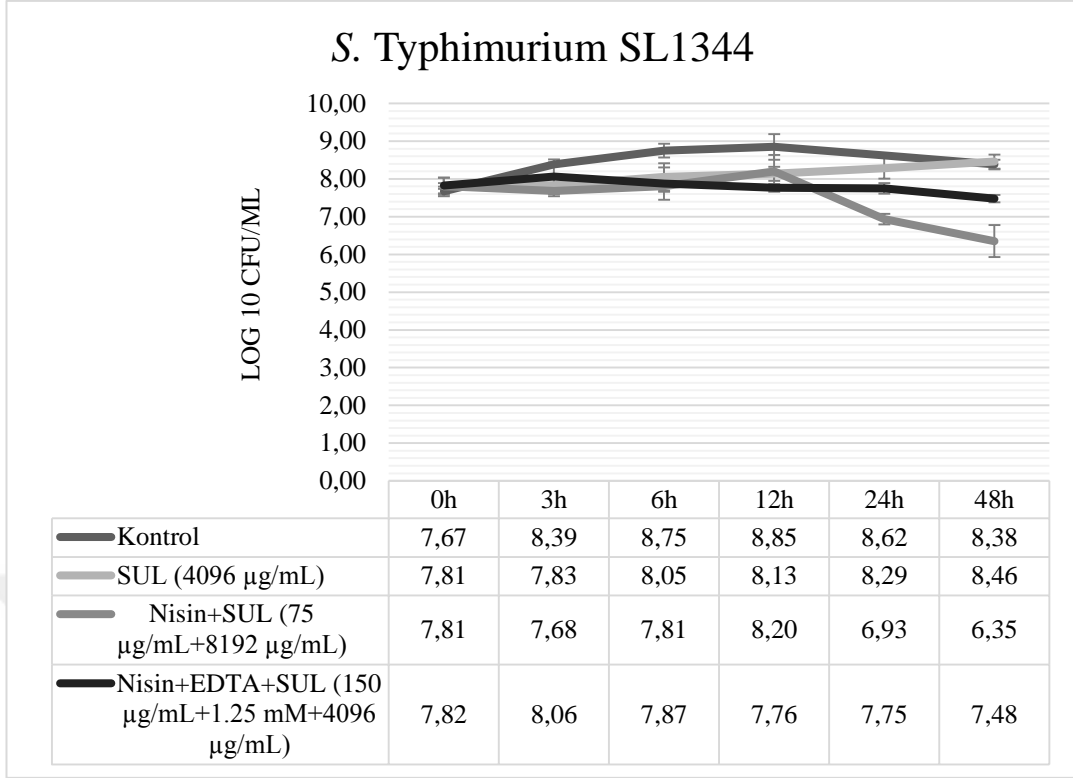


Şekil 4.16 S. Typhimurium SL1344 suşunun nisin, EDTA ve streptomisin kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

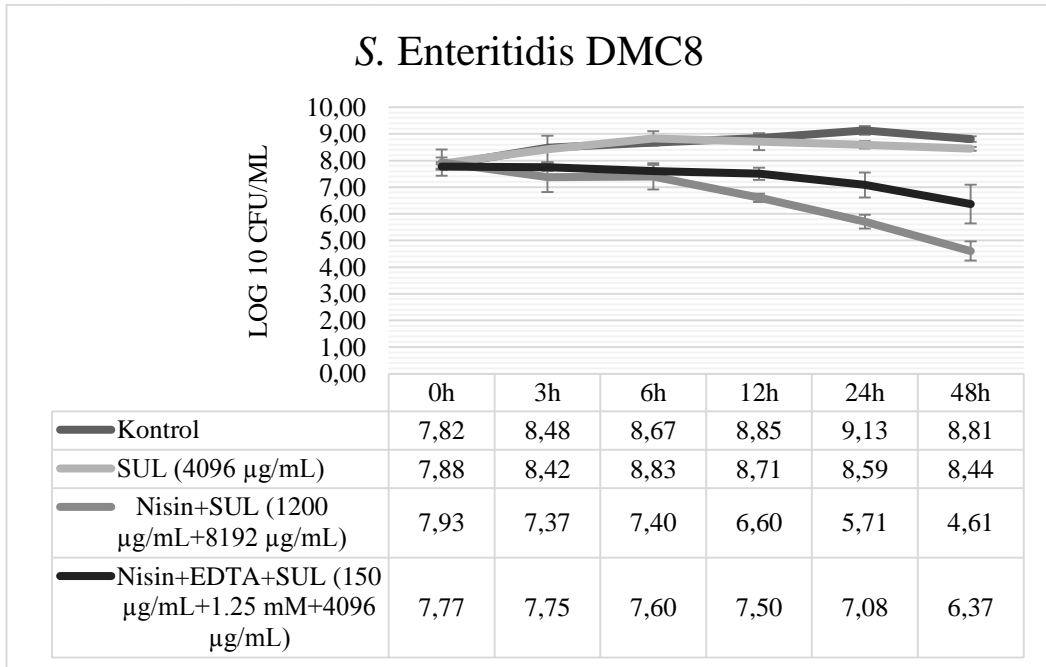
Sülfanomid antibiyotiği nisin ile birlikte kullanıldığında; canlı hücre sayısında $\geq 2 \log_{10}$ azalma, *S. Typhimurium* 14028, *S. Typhimurium* SL1344 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşları için sırasıyla 24, 48 ve 12 saatlerin sonunda belirlenmiştir ($P < 0.05$). Nisin ile birlikte ikili kombinasyonda kullanılan SUL konsantrasyonu 2 MİK artmıştır, ancak bu antibiyotiğin tek başına kullanıldığı konsantrasyondan daha etkili olduğu belirlenmiştir. *S. Typhimurium* 14028 suşu için SUL MİK değeri, 48 saat sonunda hücreler üzerinde $< 1 \log_{10}$ azalma sağlarken, kombinasyona nisin ve EDTA'nın ilavesi ile azalma oranı $\geq 3 \log_{10}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17). Benzer şekilde *S. Typhimurium* SL1344 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşlarında canlı hücre sayıları için üçlü kombinasyondaki azalmalar 48 saat sonunda sırası ile $1 \log_{10}$ ve $\geq 2 \log_{10}$ olarak saptanmıştır ($P < 0.05$) (Şekil 4.18, 4.19).



Şekil 4.17 *S. Typhimurium* 14028 suşunun nisin, EDTA ve sülfanomid kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi



Şekil 4.18 *S. Typhimurium* SL1344 suşunun nisin, EDTA ve sülfanomid kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

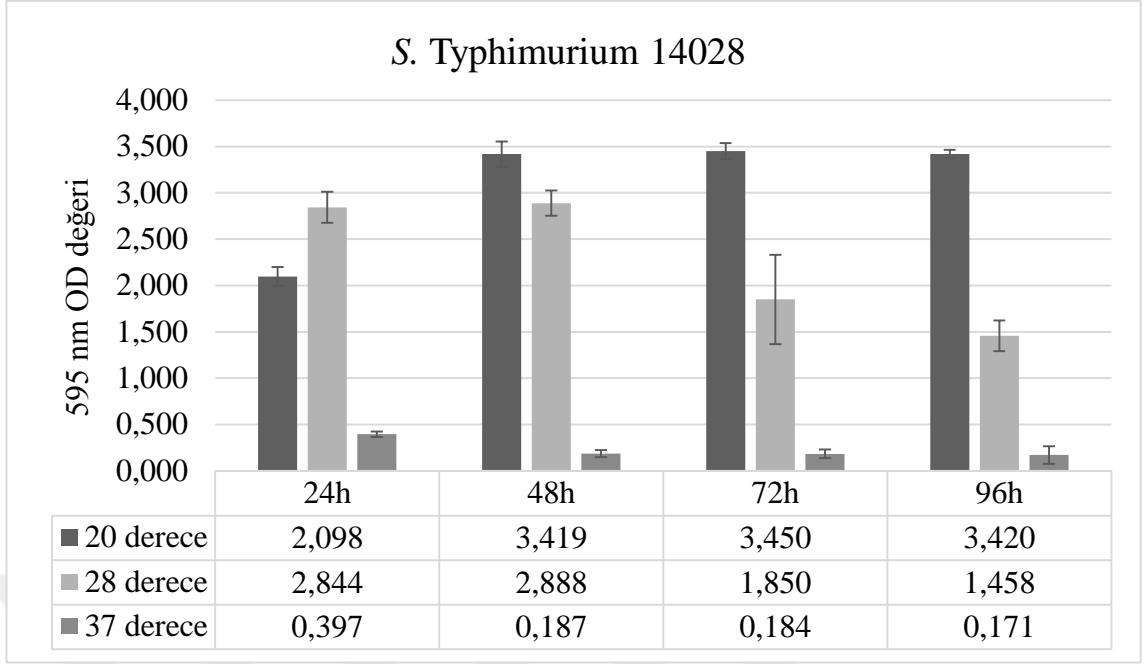


Şekil 4.19 *S. Enteritidis* DMC8 suşunun nisin, EDTA ve sülfanomid kombinasyonunda zamana bağlı öldürme eğrisi

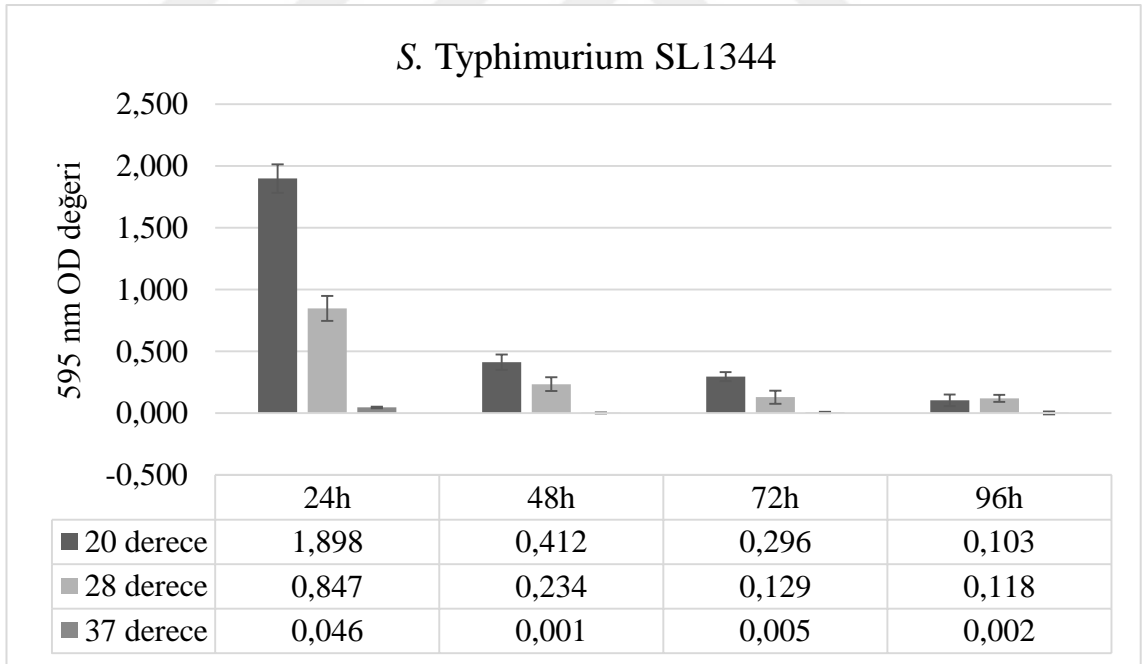
4.5 *Salmonella* Suşlarında Biyofilm Üretim Düzeylerinin Belirlenmesi

Salmonella izolatlarının polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Woodward vd. (2000) tarafından önerilen yöntem modifiye edilmiştir. Yöntemde negatif kontrol (bakteri içermeyen besiyeri) üzerinden eşik değer (cut-off OD, OD_c) hesaplandıktan sonra biyofilm üretimi bakımından değerlendirmeye tabi tutulmuştur. OD_c değeri, negatif kontrolün ortalaması artı standart hatanın üç katı şeklinde hesaplanmıştır.

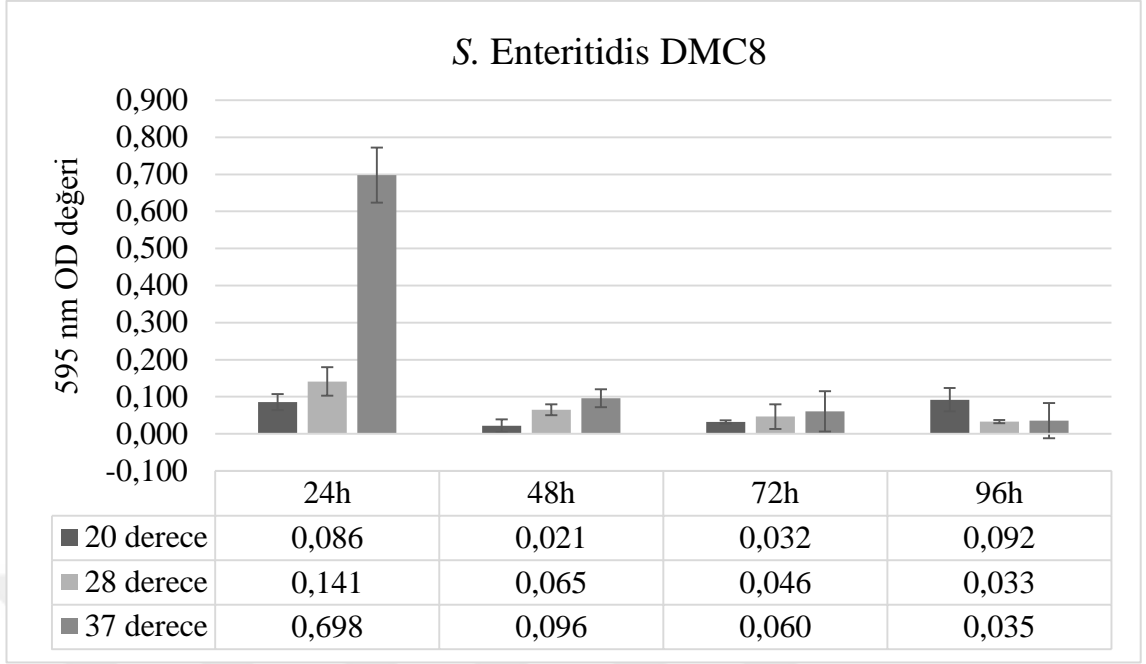
S. Typhimurium 14028, *S. Typhimurium* SL1344, *S. Enteritidis* DMC8 suşlarının mikrotitre plaklarda farklı gün ve sıcaklık değerlerinde oluşturdukları biyofilm miktarları şekil 4.20-4.22’de verilmiştir. Elde edilen verilere ve hesaplanan eşik değerlerine göre; *S. Typhimurium* 14028 suşunun maksimum biyofilm üretimi, 20 °C sıcaklıkta ve 72 saat sonunda (OD₅₉₅=3,450) izlenerek, ‘güçlü biyofilm üretici’ olarak belirlenmiştir. 28 ve 37 °C sıcaklıklarda ise; güçlü biyofilm ürettiği saatler sırasıyla 48 ve 24 olarak saptanmıştır (Şekil 4.20). *S. Typhimurium* SL1344 suşunun, maksimum biyofilm üretimi 20 °C’de 24 saat sonunda (OD₅₉₅=1,898) sağlanmıştır. Ancak inkübasyon süresi uzadıkça ve sıcaklık arttıkça biyofilm üretim miktarlarında azalma meydana gelmiştir. 37 °C sıcaklıkta ise bu suşun denenen tüm inkübasyon sürelerinde biyofilm üretmediği belirlenmiştir (Şekil 4.21). *S. Typhimurium* suşlarının aksine, *S. Enteritidis* DMC8 suşunun, 20 °C’de biyofilm üretmediği tespit edilmiştir. Bu suş 28 °C’de 24 saat inkübasyon süresi sonunda ise zayıf biyofilm üretmektedir. Maksimum biyofilm üretimi (OD₅₉₅=0,698) 37 °C’de 24 saat sonunda saptanmıştır (Şekil 4.22). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, biyofilm üretimi için denenen inkübasyon dereceleri ve süreleri *Salmonella* serotipleri arasında farklılık göstermiştir.



Şekil 4.20 *S. Typhimurium* 14028 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde ürettiği biyofilm miktarları



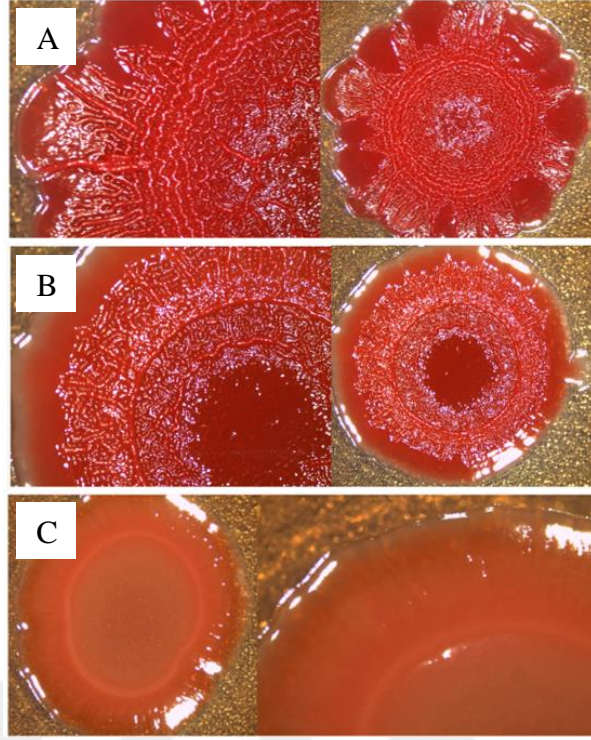
Şekil 4.21 *S. Typhimurium* SL1344 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde ürettiği biyofilm miktarları



Şekil 4.22 *S. Enteritidis* DMC8 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde ürettiği biyofilm miktarları

4.6 Kongo Kırmızısı İçeren LB Agar Besiyerlerinde *Salmonella* Suşlarının Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi

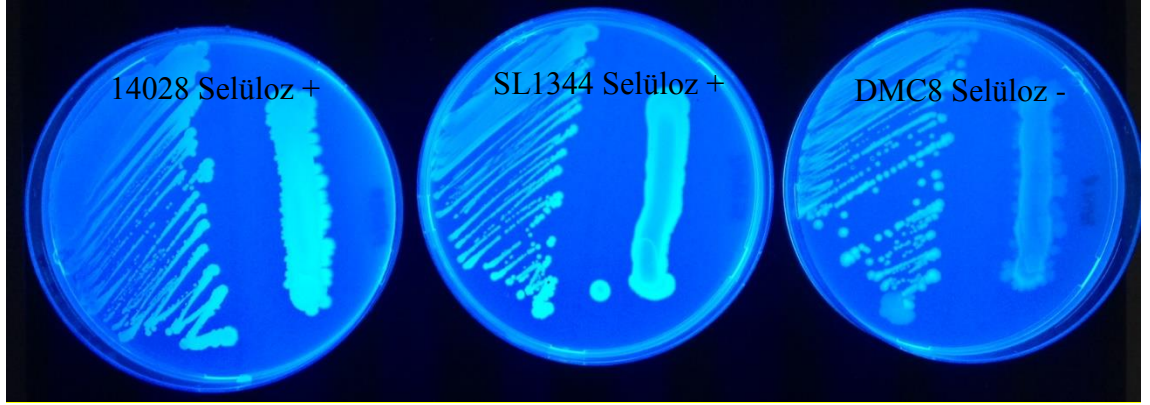
Suşların ürettiği biyofilmlerin morfotipleri; biyofilmin matriksinde kıvrımlı fimbriya ve selüloz bulunduran ‘rdar’ (kırmızı, kuru ve pürüzlü), yalnızca kıvrımlı fimbriya bulunduran ‘bdar’ (kahverengi, kuru ve pürüzlü), yalnızca selüloz bulunduran ‘pdar’ (pembe, kuru ve pürüzlü) ve her ikisini de bulundurmayan ‘saw’ (düz ve ıslak) olmak üzere kategorize edilmiştir. *S. Typhimurium* 14028 ve *S. Typhimurium* SL1344 suşlarının biyofilm morfotipleri ‘rdar’, *S. Enteritidis* DMC8 suşunun biyofilm morfotipi ‘bdar’ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 *Salmonella* suşlarının biyofilm morfotipleri. A; *S. Typhimurium* 14028 suşu 'rdar', B; *S. Typhimurium* SL1344 suşu 'rdar', C; *S. Enteritidis* DMC8 suşu 'bdar' morfotipi

4.7 Selüloz Üretiminin Belirlenmesi

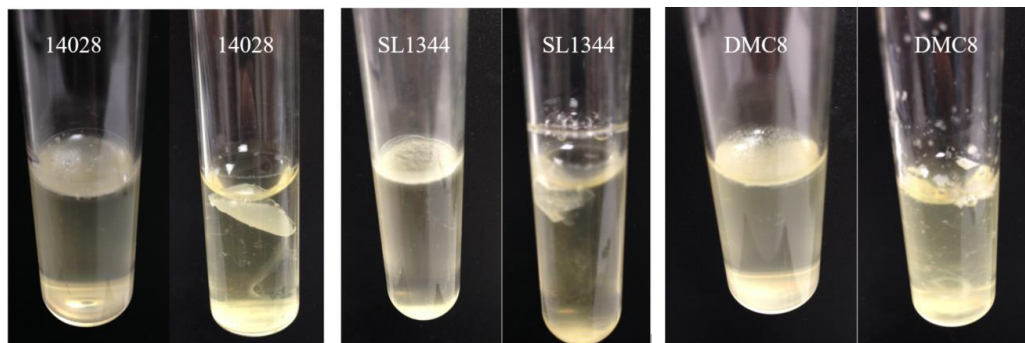
Salmonella suşlarının selüloz üretiminin belirlenmesi amacı ile kalkoflor denemesi gerçekleştirilmiştir. 366 nm UV ışık altında incelenen petri plaklarında üreyen *S. Typhimurium* 14028 ve *S. Typhimurium* SL1344 suşları selüloz üretimlerinden dolayı kuvvetli florasan ışımaya vermişlerdir. *S. Enteritidis* DMC8 suşu tarafından biyofilm matriksinin önemli bileşeni olan selüloz sentezlenmediği için mat bir görünüm elde edilmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 UV ışık altında floresan özellik gösteren selüloz (+) ve floresan özellik göstermeyen selüloz (-) örnekler

4.8 Sıvı Besiyerlerinde Pelikül Oluşumunun Belirlenmesi

Denemeden elde edilen verilere göre, 'rdar' morfortipine sahip olan (matriksinde hem selüloz hem de kıvrımlı fimbriya içeren) *S. Typhimurium* 14028 ve *S. Typhimurium* SL1344 suşlarının pelikül yapıları daha sağlam fiziksel özelliklere sahip olup, çalkalama ve karıştırma gibi etkiler sonucunda dahi dağılmadan kalabilmektedir (rijit pelikül yapısı). 'bdar' morfortipine sahip olan (matriksinde kıvrımlı fimbriya içeren) *S. Enteritidis* DMC8 suşunun pelikül yapısı ise çalkalama ve karıştırma gibi etkiler sonucunda dağılmaktadır (Şekil 4.25). Pelikül oluşumu, besiyerindeki turbidite değişimi, sıvı-hava ara fazında halka yapısının oluşumu ve tüpün tabanındaki pelet oluşumu durumuna göre yapılan gözlemler çizelge 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.25 *Salmonella* suşlarının tuzsuz LB ortamında 20 °C'de 8 günlük inkübasyon sonrası pelikül oluşturması

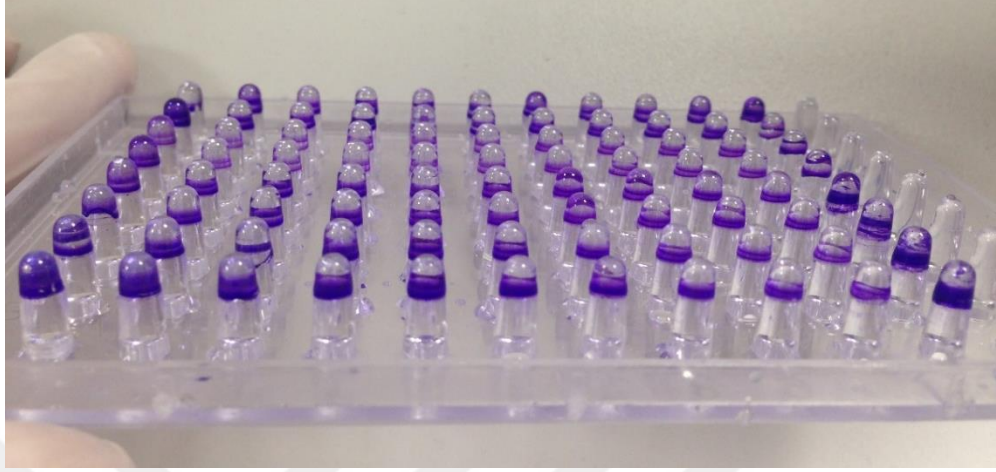
Çizelge 4.8 Suşların oluşturduğu pelikül yapılarının özellikleri

Suş	Sıvı-hava arafazında oluşan halka yapısı	Sıvı-hava arafazında oluşan pelikül yapısı	Sıvı besi ortamındaki bulanıklık	Tüp tabanında oluşan hücre yoğunluğu
S. Typhimurium 14028	Var	Var (Rijit)	Az	Var (++)
S. Typhimurium SL1344	Var	Var (Rijit)	Az	Var (++)
S. Enteritidis DMC8	Var	Var (Kırılgan)	Yoğun	Var (+)

4.9 Antimikrobiyal Maddelerin Minimal Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonunun (MBEC) Belirlenmesi

Denemelerde kullandığımız *S. Typhimurium* 14028 suşunun 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda oluşturduğu biyofilm yapısı üzerinde antimikrobiyal maddelerin (Nisin, CA, KHDGT, EDTA, STR, SUL, AMP, CHL ve CIP) eradikasyon etkileri ajanların tek başına, nisin ile ikili kombinasyonu ve nisin+EDTA ile birlikte üçlü kombinasyonları kullanılarak MBEC yöntemiyle araştırılmıştır. Olgun biyofilm eradikasyonu için, planktonik hücreleri inhibe eden MİK değerinden daha üst konsantrasyonlara çıkılmıştır. Antimikrobiyal maddeler ile muamele sonrası biyofilm yapılarında kalan boyanın ölçülmesi ile biyofilm miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.26). Antimikrobiyal maddelerin biyofilm üzerine etkinliğinin araştırıldığı denemede, ajanların tek başına ve ikili/üçlü kombinasyonlar halinde kullanıldığında elde edilen MBEC değerleri çizelge 4.9'da verilmiştir. MBEC denemesinden elde edilen verilere göre en fazla eradikasyonu sağlayan antimikrobiyal maddelerin alt ve üst konsantrasyonları nisin ile kombine kullanılarak olgun biyofilm üzerine etkileri araştırılmıştır ve ikili kombinasyonda 64 farklı antimikrobiyal madde konsantrasyonu denenmiştir. Üçüncü bir ajan olarak

kombinasyona 20 mM EDTA ilave edilerek her ajan için üçlü kombinasyon denemesi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.26 İnkübasyon sonrası peg'lerde oluşan biyofilm yapıları

S. Typhimurium 14028 suşunun olgun biyofilm yapısında, 24 saat inkübasyon süresi sonunda 9600 µg/mL nisin konsantrasyonu ile % 54, 80 mM EDTA konsantrasyonu ile % 77 oranında azalma sağlanmıştır. Nisin ve EDTA birlikte kullanıldığında biyofilm eradikasyonu üzerinde % 62 oranında etki sağlanmıştır. Nisin ve EDTA'nın birlikte bu etkiyi sağlayan konsantrasyonları, MBEC konsantrasyonlarından sırasıyla 1/64 ve 1/4 oranında daha azdır (150 µg/mL Nisin+20 mM EDTA). MBEC denemelerinden elde edilen verilere göre; en fazla etkiyi sağlayan (% 64) CA konsantrasyonunun % 0.312 olduğu belirlenmiştir. Nisin ile birlikte kombine kullanımı sonucu, kullanılan CA konsantrasyonu 1/2 oranında azalmış ve eradikasyon etkisi artmıştır (% 70). Kombinasyona EDTA'nın eklenmesi ile birlikte kullanılan CA konsantrasyonunda bir değişiklik olmazken biyofilm eradikasyon oranı artarak % 83'e ulaşmıştır. Biyofilm eradikasyonunda en fazla etkiyi sağlayan (% 83) en düşük KHDGT konsantrasyonu % 0.019 olarak belirlenmiştir. KHDGT+EDTA+nisin üçlü kombinasyonunun, KHDGT'ın tek başına ve nisin ile birlikte kullanımına göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Üçlü kombinasyonda MİK değerinde dahi (% 0.0023) biyofilm üzerinde etkili olurken, bu oran % 86 olarak belirlenmiştir.

S. Typhimurium 14028 biyofilmi üzerine antibiyotiklerin nisın ve EDTA ile kombinasyonları halinde uygulanan konsantrasyonlarının, tek başına kullanılan konsantrasyonlardan daha az konsantrasyonlarda etkili olduğu belirlenmiştir. Planktonik *S. Typhimurium* 14028 hücrelerini % 99,99 oranında inhibe eden STR konsantrasyonunun 128 µg/mL olduğu önceki denemeler ile belirlenmiştir. Biyofilmi eradike etmek için kullanılan antibiyotik konsantrasyonlarının planktonik hücreleri inhibe eden değerlerden (MİK) 100-1000 kat fazla olması gerektiği bilinmektedir. Bu bağlamda, *S. Typhimurium* 14028 biyofilmini maksimum % 89 oranında eradike eden STR konsantrasyonunun 8192 µg/ml olduğu belirlenmiştir. STR, nisın ile birlikte kullanıldığında bu konsantrasyon 1/2 oranında azalmış ve eradikasyon oranının % 86 olduğu belirlenmiştir. Kombinasyona EDTA'nın ilavesi ile STR'nin MBEC değeri 1/128 oranında azalmış (64 µg/mL) ve biyofilmi % 83 oranında eradike ettiği saptanmıştır. Denemede en fazla eradikasyonu sağlayan (% 44) sülfanomid konsantrasyonunun 8192 µg/mL olduğu, kombinasyona nisın ilavesi ile bu konsantrasyonun 1/8 oranında azaldığı ve eradikasyon oranının ise arttığı (% 79) tespit edilmiştir. EDTA ilavesi ile birlikte eradikasyon oranı % 84'e yükselmiştir. AMP, CHL ve CIP antibiyotiklerine duyarlı olan planktonik hücrelerin oluşturdukları biyofilm yapılarını maksimum düzeyde (% 80 üzeri) ortadan kaldırmak için gerekli olan konsantrasyonların sırasıyla 64, 64 ve 128 µg/mL olduğu belirlenmiştir. AMP antibiyotiği nisın ile birlikte kullanıldığında MBEC değeri 1/32 katı kadar azalmış (2 µg/mL=MİK değeri) ve % 88 eradikasyon sağlanmıştır. Kombinasyona EDTA ilave edildiğinde ise, % 81 eradikasyon sağlayan konsantrasyon MBEC değerinin 1/16'sı kadardır. % 80 üzerinde biyofilm eradikasyonu sağlayan ikili ve üçlü kombinasyondaki CHL konsantrasyonları ise MBEC değerinden 1/2 kat daha az olduğu saptanmıştır. CIP antibiyotiğinin nisın ile birlikte kullanımı sonucu MBEC değeri 1/2 oranında azalmış, biyofilm eradikasyonu % 86 oranında gerçekleşmiştir. Kombinasyona EDTA ilavesi ile MBEC değeri 1/16 kat azalmıştır. Sonuçlar göstermektedir ki; kombinasyon çalışmaları ile biyofilm eradikasyonu için gerekli antibiyotik ve dezenfektan konsantrasyonlarının önemli ölçüde azaltılması mümkün olmaktadır. Ancak bu kombinasyonlar ile en fazla % 88 oranında eradikasyon sağlanmış, biyofilm yapıları tamamen ortadan kaldırılamamıştır.

Çizelge 4.9 *S. Typhimurium* 14028 biyofilmi üzerine antimikrobiyal madde uygulama sonrası en fazla yüzde azalmayı sağlayan MBEC değerleri

	MBEC	Yüzde Azalma (%)	Standart Sapma (OD₅₉₅)
Nisin	9600 µg/mL	54	±0,252
EDTA	80 mM	77	±0,012
Nisin+EDTA	150 µg/mL+20 mM	62	±0,221
CA	% 0.312	64	±0,034
CA+Nisin	% 0.156+300 µg/mL	70	±0,009
CA+EDTA+Nisin	% 0.156+20 mM+300 µg/mL	83	±0,174
KHDGT	% 0.019	83	±0,078
KHDGT+Nisin	% 0.0023+150 µg/mL	76	±0,400
KHDGT+EDTA+Nisin	% 0.0023+20 mM+150 µg/mL	86	±0,127
STR	8192 µg/mL	89	±0,040
STR+Nisin	4096 µg/mL+75 µg/mL	86	±0,085
STR+EDTA+Nisin	64µg/mL+20 mM+300 µg/mL	83	±0,195

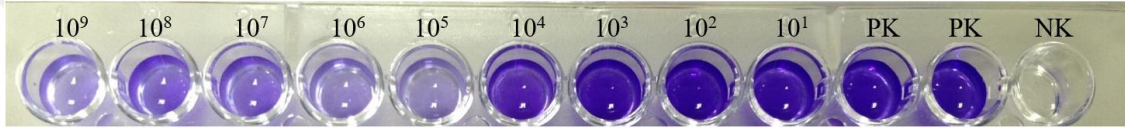
Çizelge 4.9 *S. Typhimurium* 14028 biyofilmi üzerine antimikrobiyal madde uygulama sonrası en fazla yüzde azalmayı sağlayan MBEC değerleri (devamı)

	MBEC	Yüzde Azalma (%)	Standart Sapma (OD₅₉₅)
SUL	8192 µg/mL	44	±0,213
SUL+Nisin	1024 µg/mL+600 µg/mL	79	±0,159
SUL+EDTA+Nisin	2048 µg/mL+20 mM+300 µg/mL	84	±0,087
AMP	64 µg/mL	84	±0,070
AMP+Nisin	2 µg/mL+150 µg/mL	88	±0,187
AMP+EDTA+Nisin	4 µg/mL+20 mM+300 µg/mL	81	±0,066
CHL	64 µg/mL	79	±0,069
CHL+Nisin	32 µg/mL+300 µg/mL	86	±0,103
CHL+EDTA+Nisin	32 µg/mL+20 mM+150 µg/mL	84	±0,146
CIP	128 µg/mL	83	±0,073
CIP+Nisin	64 µg/mL+300 µg/mL	86	±0,091
CIP+EDTA+Nisin	8 µg/mL+20 mM+150 µg/mL	83	±0,085

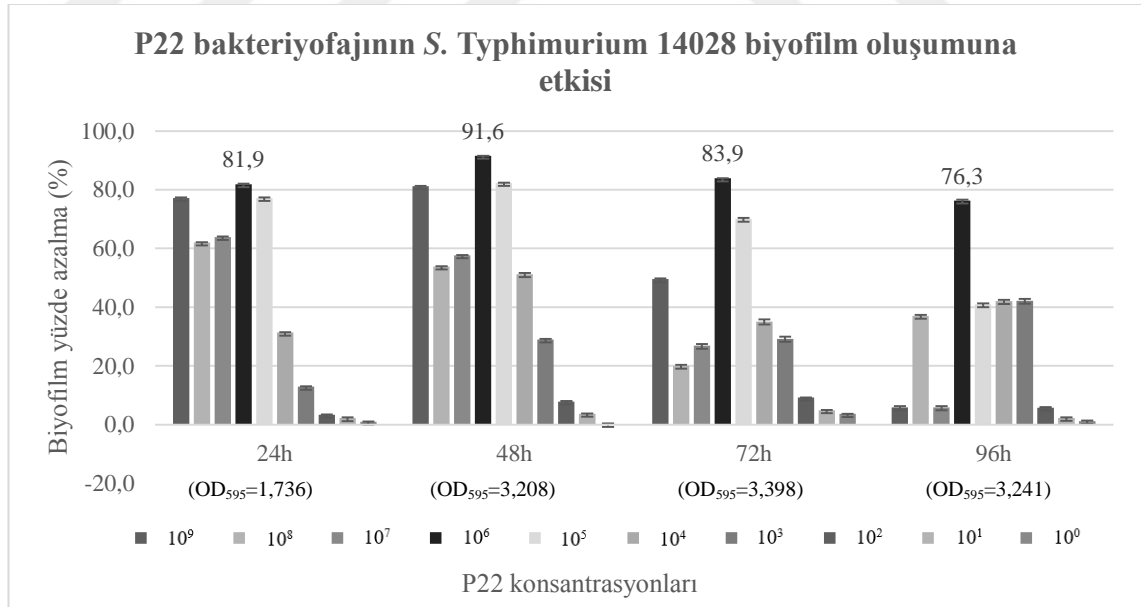
4.10 P22 Bakteriyofajlarının Nisin ve EDTA ile Kombine Kullanımı Sonucu *Salmonella* Suşlarının Biyofilm Yapılarına Etkisinin Belirlenmesi

4.10.1 P22 bakteriyofajının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

Salmonella suşlarının biyofilm oluşumuna P22 bakteriyofajının inhibisyon etkinliğini belirlemek amacı ile farklı P22 faj titreleri (10^1 - 10^9 pfu/mL); *Salmonella* suşlarına karşı 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon periyotlarında kullanılmıştır. İnkübasyon bitiminde biyofilm yapıları boyama işlemine tabi tutulmuş ve biyofilm üretim miktarları hesaplanmıştır (Şekil 4.27).

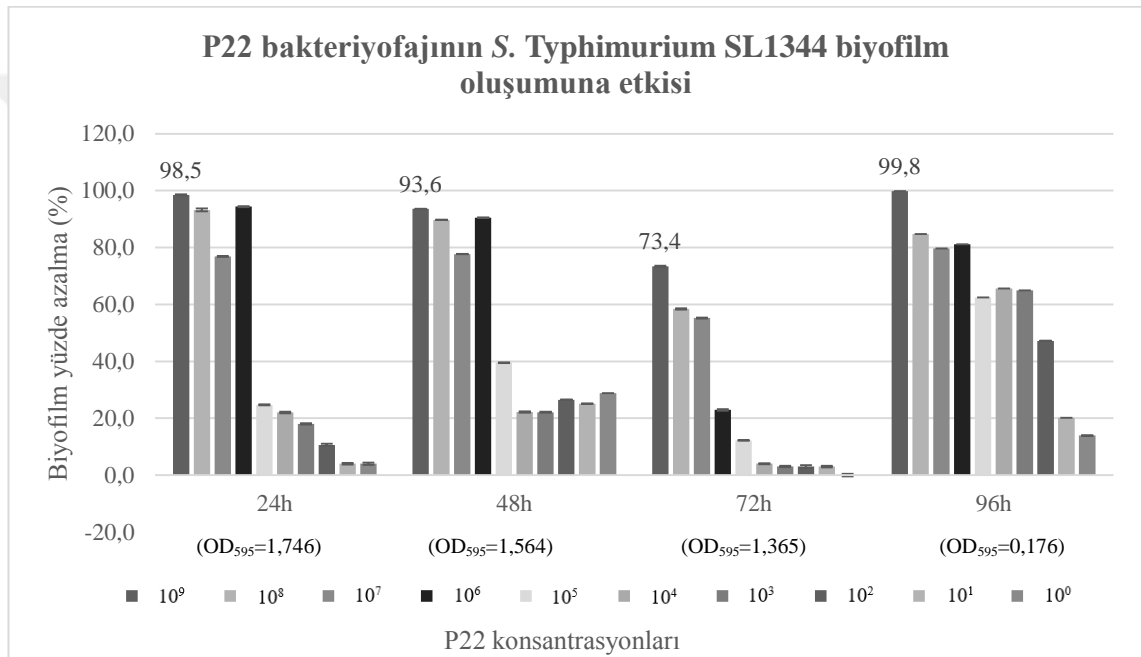


Şekil 4.27 P22 bakteriyofajı ile uygulama sonrası *Salmonella* biyofilm oluşumunun inhibisyonunu gösteren örnek mikrotitreplaka. PK; sadece suş içeren kontrol kuyuları, NK; besiyeri ve uygun faj dilüsyonları içeren kuyular



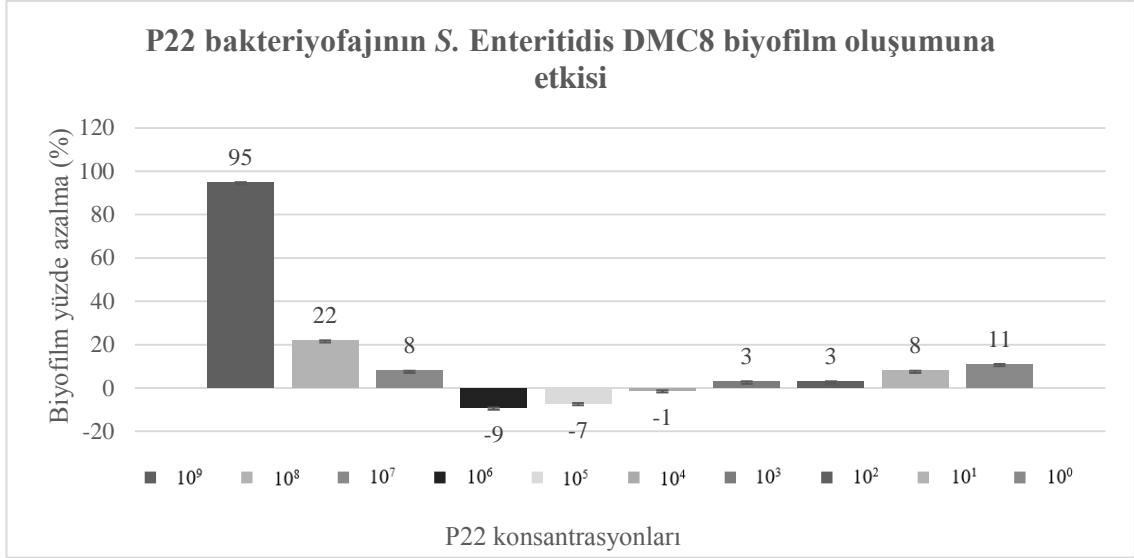
Şekil 4.28 P22 bakteriyofajının *S. Typhimurium* 14028 biyofilm oluşumuna etkisi

Biyofilm oluşumu üzerine P22 fajının etkisini belirlemek amacı ile gerçekleştirilen denemede saptanan, *S. Typhimurium* 14028'in biyofilm miktarındaki azalma yüzdeleri şekil 4.28'de verilmiştir. 10^3 - 10^9 pfu/mL faj konsantrasyonlarının tümü değişken oranlarda biyofilm üzerinde etkili olurken, uygulanan tüm saatlerde gözlenen maksimum azalma 10^6 pfu/mL faj konsantrasyonu ile sağlanmıştır. Maksimum biyofilm üretiminin görüldüğü 72 saat sonunda 595 nm dalga boyunda ölçülen biyofilm OD değeri 3,398'den $OD_{595}=0,548$ 'e düşmüş ve biyofilm miktarındaki azalma % 83,9 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.29 P22 bakteriyofajının *S. Typhimurium* SL1344 biyofilm oluşumuna etkisi

Denemeye alınan ikinci bakteri, *S. Typhimurium* SL1344 suşunun biyofilm miktarındaki azalma yüzdeleri şekil 4.29'da verilmiştir. 10^5 - 10^9 pfu/mL faj konsantrasyonlarının tümü biyofilm oluşumunda ilk 72 saat sonunda etkili olmuş ve tüm saatlerde gözlenen maksimum azalma 10^9 pfu/ml faj konsantrasyonu ile sağlanmıştır. Maksimum biyofilm üretiminin görüldüğü 24 saat sonunda ölçülen biyofilm OD_{595} değeri 1,746'dan 0,549'a düşmüş ve biyofilm miktarındaki azalma % 98,5 olarak belirlenmiştir.

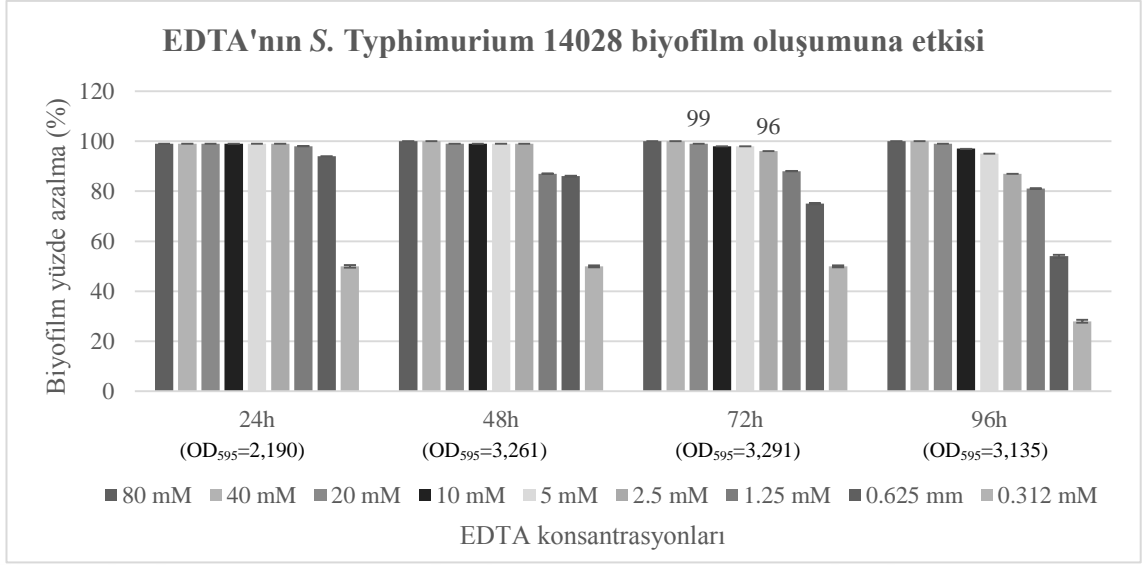


Şekil 4.30 P22 bakteriyofajının *S. Enteritidis* DMC8 biyofilm oluşumuna etkisi

P22 fajının denenen son bakterisi olan *S. Enteritidis* DMC8'in biyofilm oluşumu üzerine etkisi şekil 4.30'da verilmiştir. 24 saat sonunda gözlenen maksimum azalma 10⁹ pfu/mL faj konsantrasyonu ile sağlanmıştır. OD₅₉₅=0,174 olarak ölçülen biyofilm miktarı OD₅₉₅=0,009'a düşerek % 95 oranında bir azalma sağlanmıştır. *S. Enteritidis* DMC8 suşu 48 ve ileri saatlerde biyofilm üretmediği için denemelere diğer inkübasyon süreleri dahil edilmemiştir.

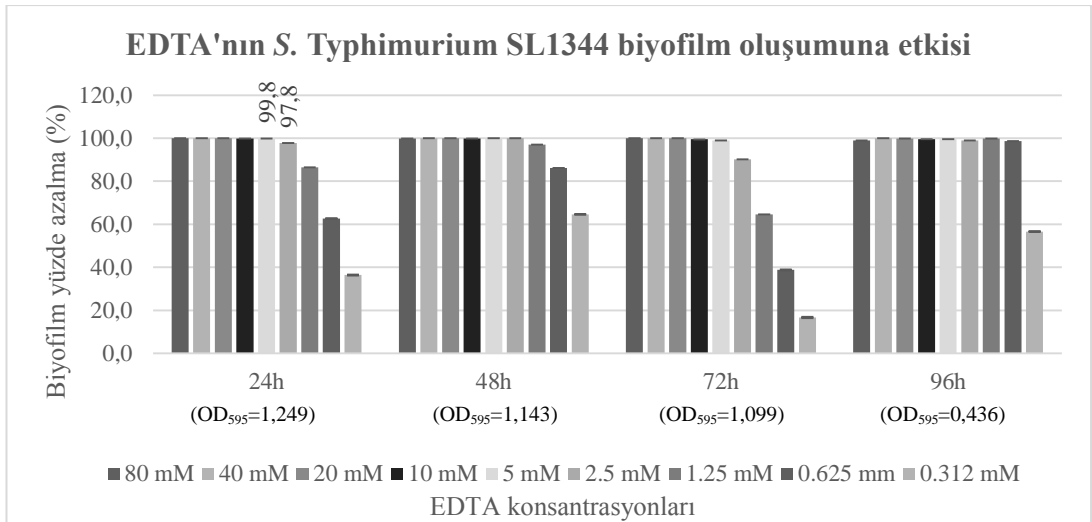
4.10.2 EDTA'nın *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

Salmonella suşlarının biyofilm oluşumu üzerine EDTA'nın inhibisyon etkinliğini belirlemek amacı ile farklı EDTA konsantrasyonları (0.312-80 mM); suşlara karşı 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon periyotlarında kullanılmıştır. Inkübasyon bitiminde biyofilm yapıları boyama işlemine tabi tutulmuş ve biyofilm üretim miktarları hesaplanmıştır.



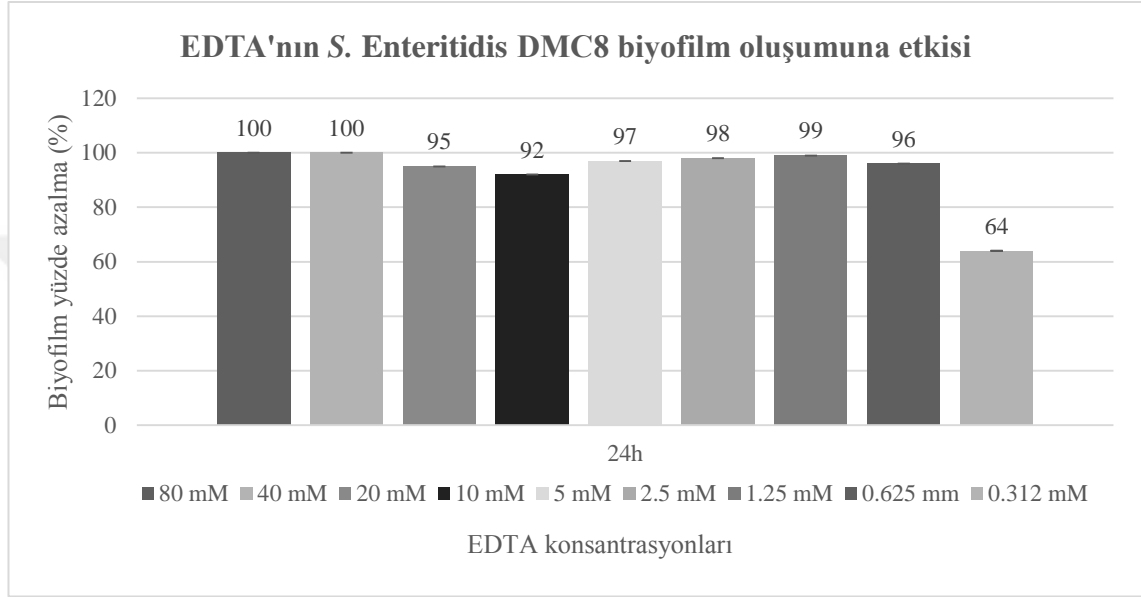
Şekil 4.31 EDTA'nın *S. Typhimurium* 14028 biyofilm oluşumuna etkisi

S. Typhimurium 14028'de biyofilm oluşumu üzerine EDTA'nın tek başına olan etkisini belirlemek amacı ile gerçekleştirilen deneme sonuçları şekil 4.31'de verilmiştir. *S. Typhimurium* 14028 için maksimum biyofilm üretiminin görüldüğü (OD₅₉₅=3,291) 72 saat sonunda 2.5 mM EDTA konsantrasyonu % 90'ın üzerinde bir azalmaya yol açmıştır. Biyofilm miktarında % 99'luk azalma biyofilm ölçümünde esas alınan OD₅₉₅ değerini 0,034'e düşüren 20 mM EDTA konsantrasyonu ile elde edilmiştir.



Şekil 4.32 EDTA'nın *S. Typhimurium* SL1344 biyofilm oluşumuna etkisi

S. Typhimurium SL1344' ün biyofilm oluşumuna EDTA'nın etkisi şekil 4.32'de verilmiştir. *S. Typhimurium* SL1344 için maksimum biyofilm üretiminin görüldüğü 24 saat sonunda 2.5 mM EDTA konsantrasyonu % 90'ın üzerinde bir azalma sağlarken, % 99'luk azalma 5 mM EDTA konsantrasyonu ile elde edilmiş ve $OD_{595}=1,249$ olan değer $OD_{595}=0,002$ 'ye düşmüştür.

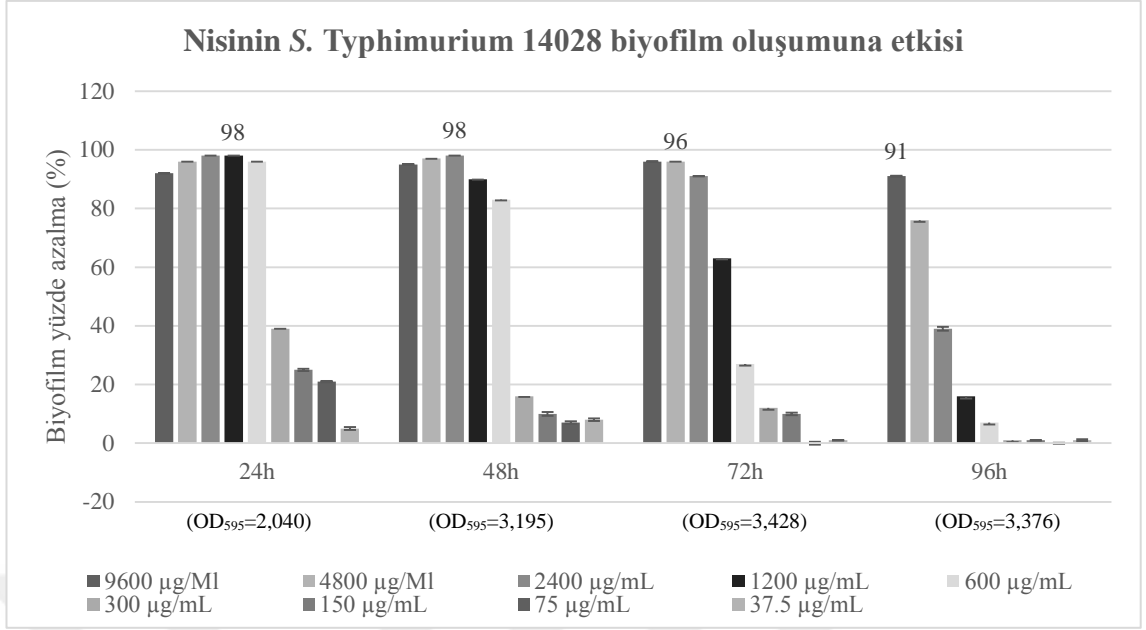


Şekil 4.33 EDTA'nın *S. Enteritidis* DMC8 biyofilm oluşumuna etkisi

Denemede kullanılan son bakteri *S. Enteritidis* DMC8' in biyofilm oluşumuna EDTA'nın etkisi şekil 4.33'de verilmiştir. 24 saat sonunda orta seviyede biyofilm üreten ($OD_{595}=0.143$) DMC8 suşunda 0.625 mM EDTA konsantrasyonu ve üzerinde denenen tüm konsantrasyonlar biyofilm miktarını % 90 ve üzerinde azaltmıştır.

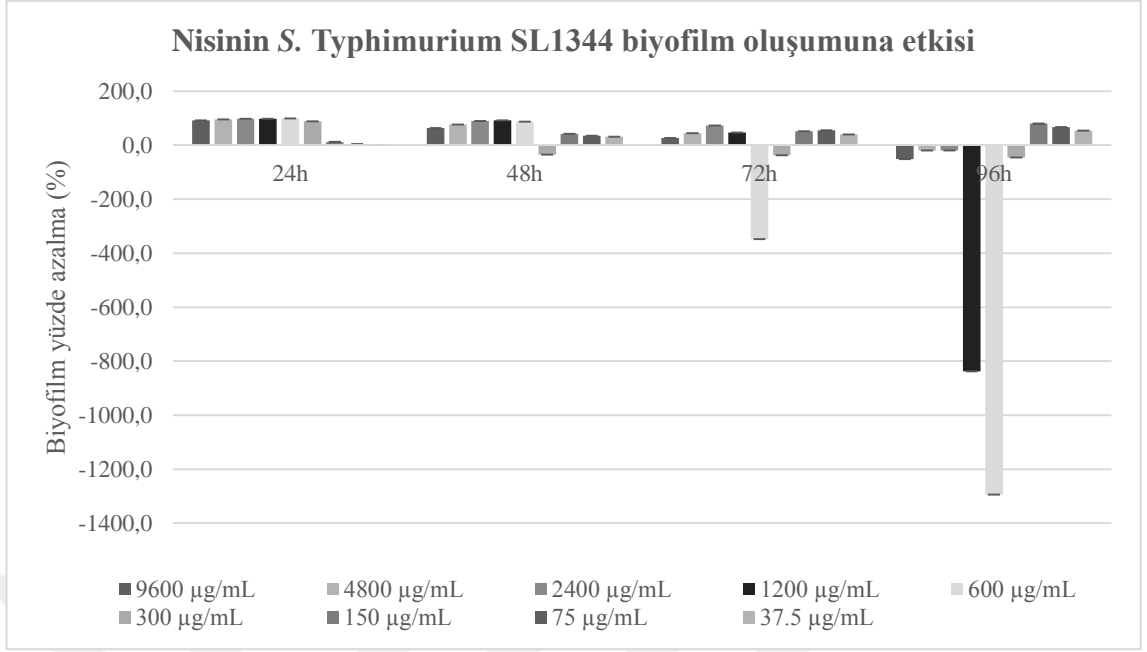
4.10.3 Nisinin *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

Salmonella suşlarının biyofilm üretimi üzerine nisinin inhibisyon etkinliğini belirlemek amacı ile suşlara; 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon periyotlarında farklı nisin konsantrasyonları (37.5-9600 $\mu\text{g/mL}$) uygulanmıştır. İnkübasyon bitiminde biyofilm yapıları boyama işlemine tabi tutulmuş ve biyofilm üretim miktarları hesaplanmıştır.



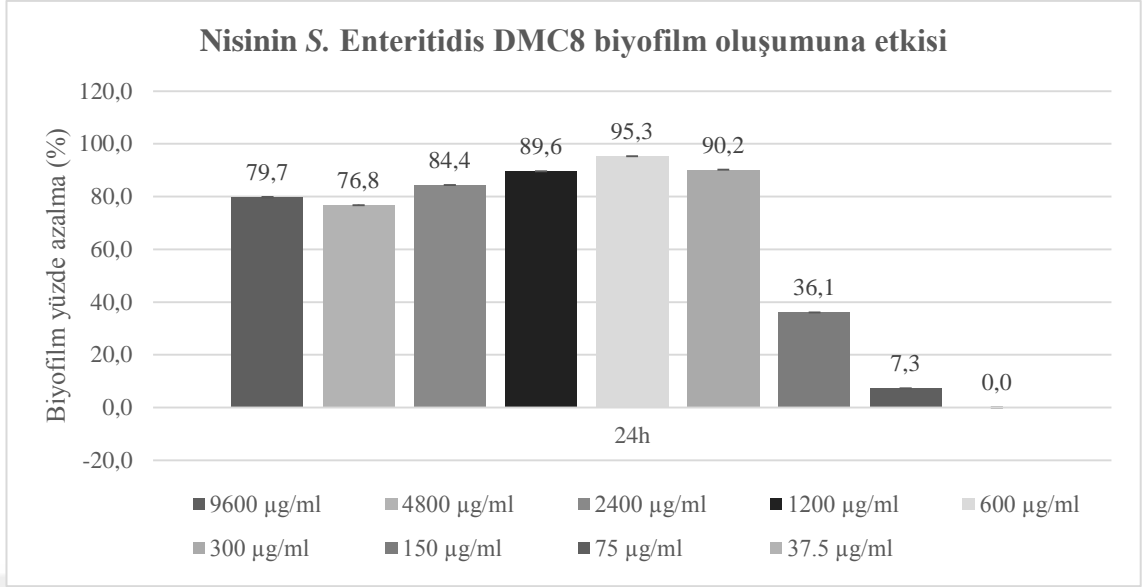
Şekil 4.34 Nisinin *S. Typhimurium* 14028 biyofilm oluşumuna etkisi

Nisinin tek başına, *S. Typhimurium* 14028 suşunun biyofilm oluşumu üzerine etkisi şekil 4.34’de verilmiştir. İnkübasyon süresi uzadıkça biyofilm oluşumunu inhibe eden nisin konsantrasyonları artmaktadır. *S. Typhimurium* 14028 için biyofilm üretim miktarının en fazla olduğu 72 saat sonunda 2400 µg/mL ve üzerindeki nisin konsantrasyonları biyofilm üretiminde % 90 üzerinde azalma sağlamıştır. Biyofilm miktarını en fazla azaltan (% 96) nisin konsantrasyonu ise, 4800 µg/mL’dir (OD₅₉₅=3,428 değerini OD₅₉₅=0,126’ya düşürmüştür).



Şekil 4.35 Nisinin *S. Typhimurium* SL1344 biyofilm oluşumuna etkisi

S. Typhimurium SL1344'ün nisin varlığında biyofilm üretimindeki düşmeler şekil 4.35'te yüzde cinsinden verilmiştir. 24 saat sonunda biyofilm üretiminde maksimum azalmanın görüldüğü (% 98.3) en düşük nisin konsantrasyonu 600 µg/mL'dir ve $OD_{595}=2,692$ değerini $OD_{595}=0,046$ 'ya düşürmüştür. *S. Typhimurium* SL1344 suşunun biyofilm oluşum kapasitesinin değerlendirildiği denemeden elde edilen verilere göre, ileri inkübasyon periyotlarında biyofilm yapısının parçalandığı ve biyofilm üretim miktarında azalma görüldüğü belirlenmiştir. Ancak 48, 72 ve 96 saat sonunda 1200, 600 ve 300 µg/mL nisin konsantrasyonlarının biyofilm oluşumunu yüksek oranda indükledikleri tespit edilmiştir. Bu nedenle *S. Typhimurium* SL1344 suşu için ilk 24 saatten sonraki inkübasyon periyotlarında nisinin biyofilm oluşumunun engellenmesi amacıyla kullanımı uygun değildir.

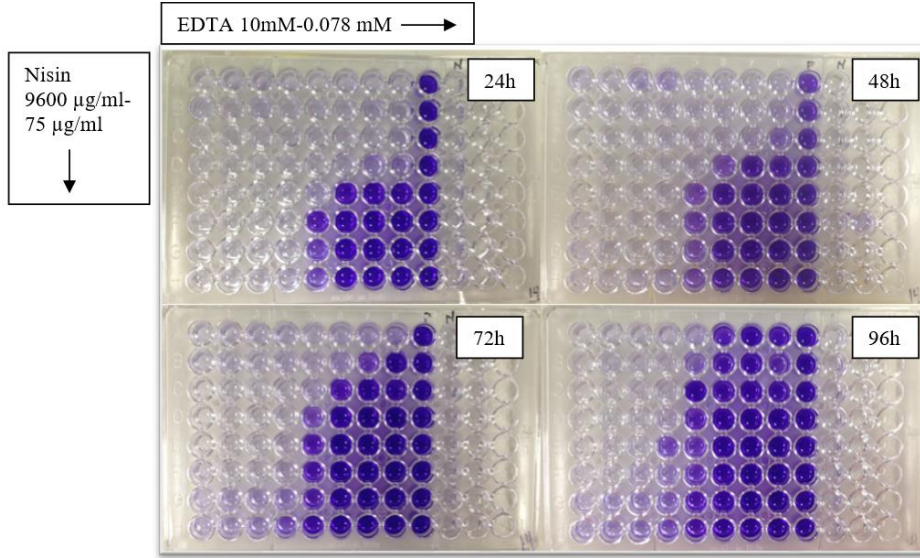


şekil 4.36 Nisinin *S. Enteritidis* DMC8 biyofilm oluşumuna etkisi

Nisinin *S. Enteritidis* DMC8 suşunun biyofilm oluşumu üzerine etkisi şekil 4.36'da verilmiştir. 24 saat sonunda orta seviyede biyofilm ureten ($OD_{595}=0.183$) DMC8 suşuna 600 µg/mL nisin konsantrasyonu uygulaması sonucu biyofilm oluşumunda en yuşsek azalma (% 95.3) geręekleřmiřtir. Bu uygulama ile $OD_{595}=0.183$ değeri $OD_{595}=0,008$ 'e duişmüştür.

4.10.4 Nisinin, EDTA ve P22 bakteriyofajı ile ikili kombinasyonlarının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisinin belirlenmesi

Salmonella suşlarının biyofilm oluşturma özellikleri üzerine nisin ve EDTA'nın kombine kullanımı sonucu oluşan inhibisyon etkinliğini belirlemek amacı ile 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon periyotlarında 64 farklı nisin-EDTA kombinasyonu uygulanmıştır (şekil 4.37).



Şekil 4.37 *S. Typhimurium* 14028 suşunun 64 farklı nisin-EDTA konsantrasyonu ile muamele edilmesi sonucu biyofilm oluşumunu gösteren mikrotitre plakalar

Nisin ve EDTA'nın ayrı ayrı biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı denemelerde; 24 saat sonunda biyofilm miktarında % 90 ve üzerinde azalmaya sebep olan nisin konsantrasyonu 600 µg/mL, EDTA konsantrasyonu ise 0.625 mM olarak belirlenmiştir. İki ajanın kombine kullanımı sonucu, 1200 µg/mL nisin ve 0.078 mM EDTA konsantrasyonları biyofilm miktarında % 96,2'lik bir azalma sağlanmıştır. 48 saat sonunda % 90 ve üzerinde azalmaya sebep olan nisin konsantrasyonu 1200 µg/mL, EDTA konsantrasyonu 2.5 mM olarak daha önceki denemeler ile belirlenmiştir. EDTA ve nisin birlikte kullanımı sonucu tek başına kullanımlarına göre sinerjik etkileşim görülmüş ve biyofilm oluşumunu maksimum azaltan (% 93,4) en düşük konsantrasyonlar 1.25 mM EDTA+75 µg/mL nisin olarak belirlenmiştir. *S. Typhimurium* 14028 suşu için maksimum biyofilm üretiminin görüldüğü 72 saat sonunda biyofilm miktarındaki % 90 üzerindeki azalmaya sebep olan EDTA konsantrasyonu 2.5 mM, nisin konsantrasyonu ise 2400 µg/mL olup, EDTA ve nisin birlikte kullanıldıklarında % 92,7 azalmaya sebep olan en düşük EDTA+nisin konsantrasyonu 1.25 mM EDTA+150 µg/mL nisin olarak belirlenmiştir. 96 saat sonunda biyofilm miktarındaki % 90 üzerindeki azalmaya sebep olan EDTA konsantrasyonu 5 mM, nisin konsantrasyonu ise 9600 µg/mL olarak belirlenmiştir. EDTA ve nisin birlikte kullanıldıklarında maksimum azalmaya (% 92,5) yol açan en düşük kombinasyon 1.25 mM EDTA+150 µg/mL nisin oranlarıyla hazırlanmıştır. 24

saat süresince biyofilm oluşumuna EDTA+nisin kombinasyonunun etkisi, ajanların tek başlarına kullanıldıkları zamanki etkilerinden farklı olmadığı saptanmıştır. İnkübasyon süresi uzadıkça iki ajanın kombine kullanımı ile birlikte etki ettikleri konsantrasyonlar tek başına kullanılan konsantrasyonların altına düşmüştür. *S. Typhimurium* 14028 suşu için maksimum biyofilm üretiminin görüldüğü 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda bu iki ajan kombine kullanıldıkları zaman biyofilm oluşumu üzerinde çok düşük miktarlarda kullanılmaları halinde dahi etki ettikleri saptanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 Farklı inkübasyon periyotları sonunda nisin-EDTA uygulaması sonucu *S. Typhimurium* 14028 suşunun biyofilm miktarlarında görülen maksimum azalma yüzdeleri

İnkübasyon Süresi	Nisin+EDTA İnhibisyon Konsantrasyonu	Yüzde Azalma (%)
24 saat	1200 µg/mL+0.078 mM	96,2
48 saat	75 µg/mL+1.25 mM	93,4
72 saat	150 µg/mL+1.25 mM	92,7
96 saat	150 µg/mL+1.25 mM	92,5

Nisin ve EDTA'nın ayrı ayrı biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin araştırıldığı denemelerde, *S. Typhimurium* SL1344 suşu için maksimum biyofilm üretiminin görüldüğü 24 saat sonunda biyofilm miktarındaki % 90 üzerindeki azalmaya sebep olan EDTA konsantrasyonu 2.5 mM, nisin konsantrasyonu ise 600 µg/mL olarak belirlenmiştir. EDTA ve nisin birlikte kullanıldıklarında biyofilm miktarında maksimum azalmaya sebep olan (% 95,9) en düşük EDTA+nisin konsantrasyonu 0.312 mM+300 µg/mL olarak belirlenmiştir. 48 saat sonunda biyofilm miktarındaki % 90 üzerindeki azalmaya sebep olan EDTA konsantrasyonu 1.25 mM, nisin konsantrasyonu ise 1200 µg/mL olarak belirlenmiş olup, EDTA ve nisin birlikte kullanıldıklarında % 92,7 azalmaya sebep olan EDTA+nisin konsantrasyonu 0.156 mM+600 µg/mL olarak saptanmıştır. 72 saat sonunda biyofilm oluşumunda % 90 üzerindeki azalmaya sebep olan EDTA konsantrasyonu 2.5 mM, maksimum azalmayı sağlayan (% 73) nisin konsantrasyonu ise 2400 µg/mL olarak tespit edilmiştir. EDTA ve nisin birlikte kullanıldıklarında % 92,7 azalmaya sebep olan en düşük EDTA+nisin konsantrasyonu

0.625 mM+1200 µg/mL olarak belirlenmiştir. 96 saat sonunda biyofilm miktarındaki % 90 üzerindeki azalmaya sebep olan EDTA konsantrasyonu 0.625 mM olarak belirlenmiş ve 300 ila 9600 µg/mL aralığındaki nisin konsantrasyonlarının hepsi biyofilm oluşumunu indüklemiştir. EDTA ve nisin birlikte kullanılmaları ve tek başına kullanılmaları sonucu elde edilen etki arasında fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 Farklı inkübasyon periyotları sonunda nisin-EDTA uygulaması sonucu *S. Typhimurium* SL1344 suşunun biyofilm miktarlarında görülen maksimum azalma yüzdeleri

İnkübasyon Süresi	Nisin+EDTA İnhibisyon Konsantrasyonu	Yüzde Azalma (%)
24 saat	300 µg/ml+0,312 mM	95,9
48 saat	600 µg/ml+0,156 mM	92,7
72 saat	1200 µg/ml+0,625 mM	92,7
96 saat	-	-

S. Enteritidis DMC8 suşu için 24 saat sonunda biyofilm miktarındaki % 90 üzerindeki azalmaya sebep olan EDTA konsantrasyonu 0.625 mM, nisin konsantrasyonu ise 300 µg/mL olarak daha önceki demeler ile belirlenmiştir. İki ajanın kombine kullanımı sonucu bu konsantrasyonların altında bir değer ile biyofilm inhibisyonu sağlanamamıştır.

Salmonella suşlarının biyofilm oluşumuna nisin ve P22 bakteriyofajının kombine kullanımı sonucu oluşan inhibisyon etkinliğini belirlemek amacı ile gerçekleştirilen denemede; 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon periyotlarında 64 farklı nisin ve faj kombinasyonu denenmiştir. Denemeden elde edilen veriler doğrultusunda, tüm *Salmonella* suşları için nisin ve P22 bakteriyofajının biyofilm oluşumunu üzerinde sinerjik etkiye sahip olmadıkları belirlenmiştir.

4.10.5 Nisin, EDTA ve P22 kombinasyonlarının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisinin belirlenmesi

Salmonella suşlarının biyofilm oluşumu üzerine nisin, EDTA ve P22 bakteriyofajının kombine kullanımı sonucu oluşan inhibisyon etkinliğini belirlemek amacı ile farklı inkübasyon periyotlarında (24, 48, 72 ve 96 saat) 64 farklı nisin-EDTA-faj konsantrasyonları uygulanmıştır. Bu kombinasyonlarda EDTA miktarı sabit tutulmuştur.

Nisin-EDTA-faj kombinasyonunun *S. Typhimurium* 14028 biyofilm oluşumuna etkisinin incelendiği denemede; denenen tüm konsantrasyonların 24, 48, 72 saat sonunda biyofilm miktarında % 90 üzerinde bir azalma sağladığı belirlenmiştir. Biyofilm oluşum miktarındaki bu azalmayı sağlayan en düşük faj konsantrasyonu 10^2 pfu/mL ve kombinasyondaki nisin ve EDTA konsantrasyonu sırasıyla 9.375 µg/mL ve 1.25 mM olmuştur. P22 bakteriyofajı biyofilm oluşumunu en etkili 10^6 pfu/mL konsantrasyonda inhibe ederken, bu konsantrasyon kombinasyon çalışması ile 10^4 kat azalmıştır. 96 saat sonunda biyofilm miktarında en fazla % 97 oranında azalma sağlayan nisin-EDTA-faj konsantrasyonu ise 9.375 µg/mL+1.25 mM+ 10^6 pfu/mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 Farklı inkübasyon periyotları sonunda nisin-EDTA-P22 uygulaması sonucu *S. Typhimurium* 14028 suşunun biyofilm miktarlarında görülen maksimum azalma yüzdeleri

İnkübasyon Süresi	Nisin+EDTA+P22 Bakteriyofajı İnhibisyon Konsantrasyonu	Yüzde Azalma (%)
24 saat	9.375 µg/mL+1.25 mM+ 10^2 pfu/mL	93,6
48 saat	9.375 µg/mL +1.25 mM+ 10^2 pfu/mL	99
72 saat	9.375 µg/mL +1.25 mM+ 10^2 pfu/mL	96,2
96 saat	9.375 µg/mL +1.25 mM+ 10^6 pfu/mL	97

Nisin-EDTA-faj kombinasyonunun *S. Typhimurium* SL1344 biyofilm oluşumuna etkisinin incelendiği denemede; 24 ve 48 saat sonunda biyofilm miktarında % 90

üzerinde azalma sağlayan en düşük faj-EDTA-nisin konsantrasyonları sırasıyla 10^2 pfu/mL+0.078 mM+300 μ g/mL ve 600 μ g/mL+0.078 mM+ 10^2 pfu/mL olarak belirlenmiştir. 72 saat sonunda ise, 10^2 pfu/mL+0.078 mM+1200 μ g/mL konsantrasyonundaki faj+EDTA+nisin kombinasyonu biyofilm miktarında % 80 üzerinde azalma sağlamıştır. *S. Typhimurium* SL1344 suşunun biyofilm oluşumunu inhibe eden maksimum faj konsantrasyonu 10^9 pfu/mL iken, Nisin-EDTA-P22 bakteriyofajının kombine olarak kullanılmasıyla bu değer 10^2 pfu/mL konsantrasyona düşmüştür ve kombinasyonlar ilk 24 ve 48 saatte % 90 üzerinde, 72 saatte ise % 86 azalma sağlamıştır. 96 saat sonunda ise; nisin, EDTA ve P22 fajı tek başına kullanıldığında oluşan biyofilm miktarındaki azalma yüzdesi ile bunların kombinasyon halinde kullanımı sonrası oluşan biyofilm miktarındaki azalma yüzdesi arasında fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 Farklı inkübasyon periyotları sonunda nisin-EDTA-P22 uygulaması sonucu *S. Typhimurium* SL1344 suşunun biyofilm miktarlarında görülen maksimum azalma yüzdeleri

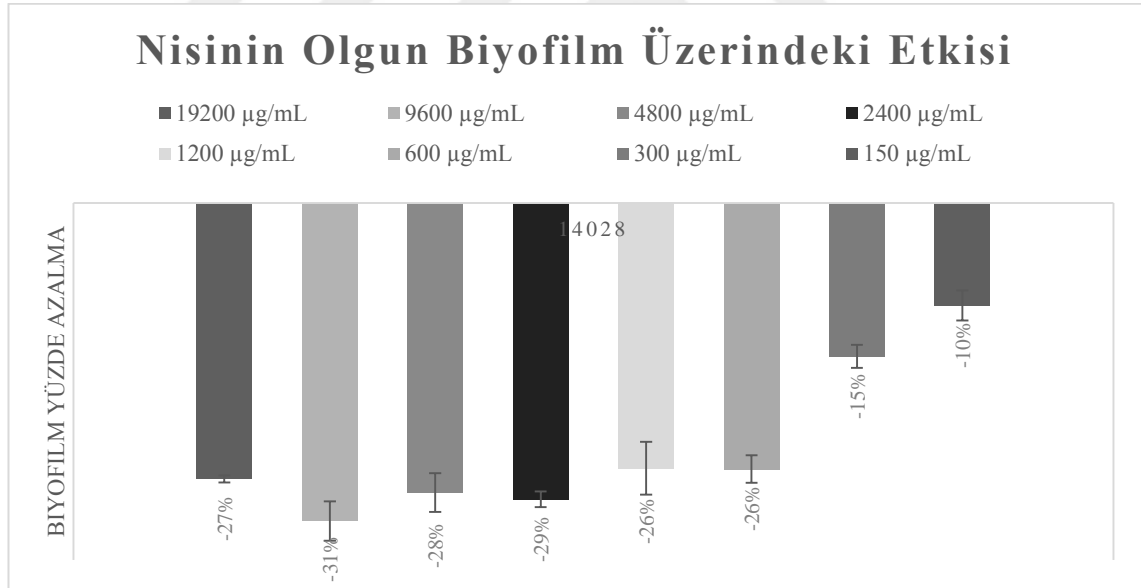
İnkübasyon Süresi	Nisin+EDTA+P22 Bakteriyofajı İnhibisyon Konsantrasyonu	Yüzde Azalma (%)
24 saat	300 μ g/mL +0.078 mM+ 10^2 pfu/mL	90,8
48 saat	600 μ g/mL+0.078 mM+ 10^2 pfu/mL	91,7
72 saat	1200 μ g/mL+0.078 mM+ 10^2 pfu/mL	86,4
96 saat	-	-

Nisin-EDTA-faj kombinasyonunun *S. Enteritidis* DMC8 biyofilm oluşumuna etkisinin incelendiği denemede, 24 saat sonunda biyofilm miktarında % 90,3 oranında azalma sağlayan en düşük faj-EDTA-nisin konsantrasyonu 10^2 pfu/mL+0.625 mM+300 μ g/mL olarak belirlenmiştir.

4.10.6 Nisin, EDTA ve P22 bakteriyofajının ayrı ayrı ve kombine uygulanarak *Salmonella* olgun biyofilmleri üzerine etkilerinin belirlenmesi

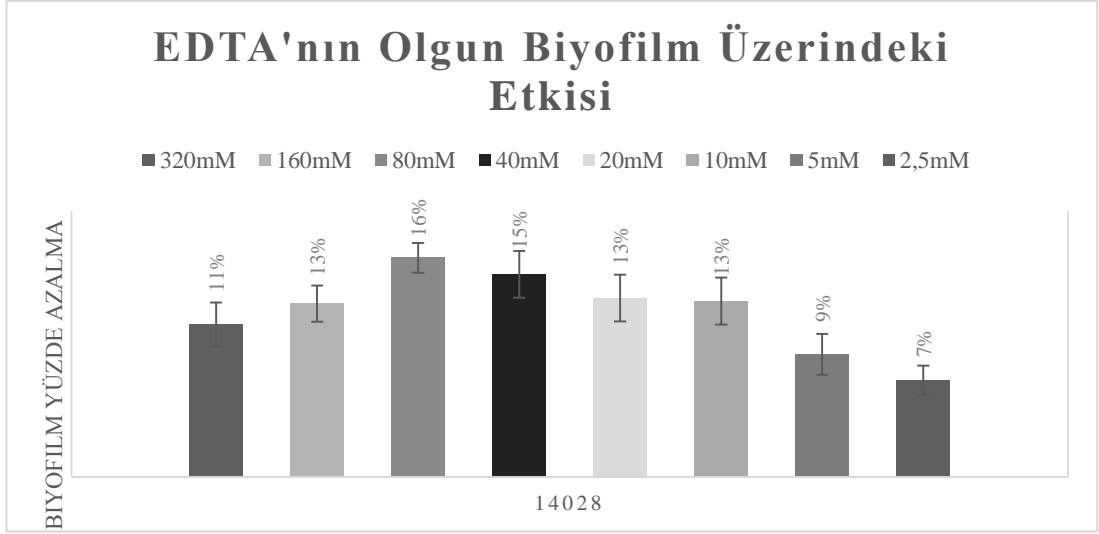
Salmonella suşlarının olgun biyofilmlerine nisin, EDTA ve P22 bakteriyofajının eradikasyon etkinliğini belirlemek amacı ile, *S. Typhimurium* 14028 suşunun optimum biyofilm ürettiği koşullarda (20 °C'de 72 saat) biyofilm üretimi sağlanarak denemeler yürütülmüştür.

Olgun biyofilm üzerine uygulanan nisin konsantrasyonlarının eradikasyon etkinliğini belirlemek için gerçekleştirilen denemeden elde edilen verilere göre, güçlü biyofilm üreticisi olan *S. Typhimurium* 14028 suşunun biyofilmi üzerine 24 saat süre ile uygulanan tüm nisin konsantrasyonlarının biyofilm oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, olgun biyofilm evresinde besi ortamına ilave edilen sub-lethal düzeydeki nisin miktarları biyofilm oluşumunu indüklemektedir (Şekil 4.38).



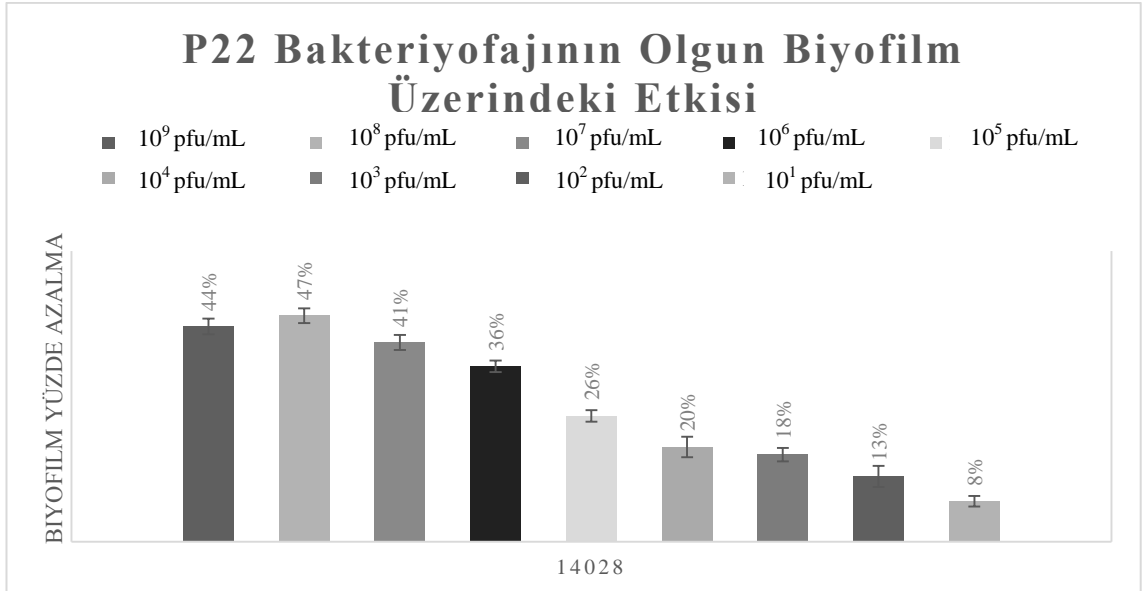
Şekil 4.38 *S. Typhimurium* 14028 suşunun olgun biyofilmine nisinin etkisi

Olgun biyofilm üzerine 24 saat boyunca EDTA uygulaması sonucu, maksimum biyofilm eradikasyonu (% 16) sağlayan EDTA konsantrasyonunun 80 mM olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39 *S. Typhimurium* 14028 suşunun olgun biyofilmine EDTA'nın etkisi

Olgun biyofilm üzerine 24 saat süreyle gerçekleştirilen P22 faj uygulaması sonucu maksimum % 47 oranında biyofilm eradikasyonunu sağlayan en düşük faj konsantrasyonu 10^8 pfu/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.40). Denemede faj konsantrasyonu azaldıkça biyofilm eradikasyon yüzdesinin de doğru orantılı olarak azaldığı saptanmıştır.

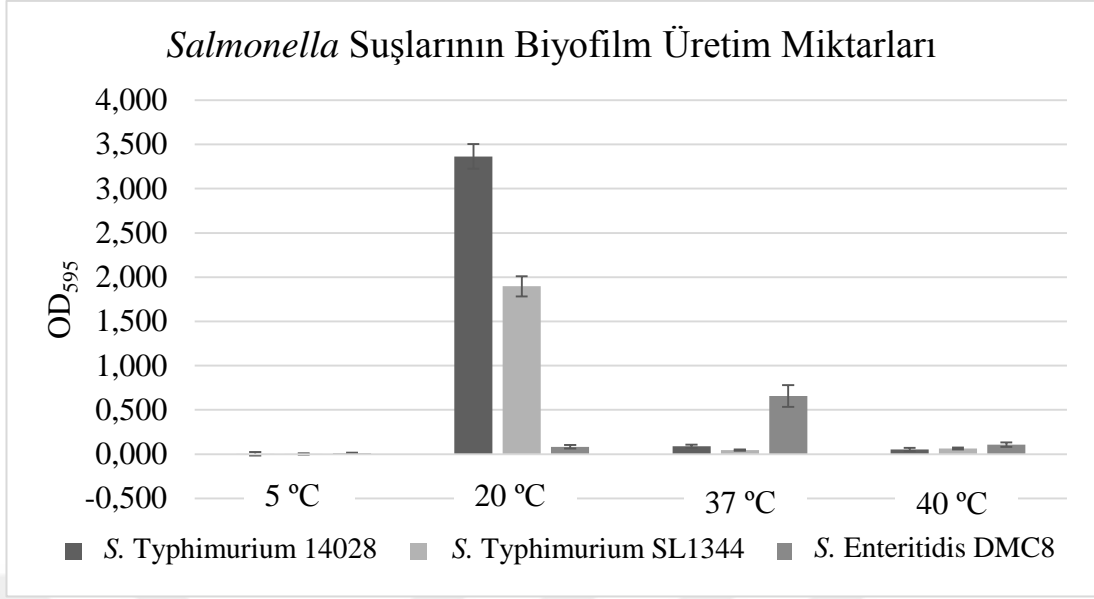


Şekil 4.40 *S. Typhimurium* 14028 suşunun olgun biyofilmine P22 bakteriyofajının etkisi

Nisin, EDTA ve P22 bakteriyofajının ayrı ayrı biyofilm eradikasyon etkinliklerinin belirlendiği denemelerde açıkça görülmektedir ki, *S. Typhimurium* 14028 suşunun oluşturduğu biyofilmi eradike etmek oldukça zor olup, kullanılan konsantrasyonlar yeterli olmamaktadır. Tez amacımızda olduğu üzere eradikasyon çalışmalarına kombinasyon denemeleri ile devam edilmiştir. *S. Typhimurium* 14028 suşunun 72 saatlik olgun biyofilmi üzerine uygulanan farklı Nisin-EDTA konsantrasyonlarından % 51 oranındaki maksimum eradikasyonu sağlayan en düşük kombinasyon 20 mM EDTA+150 µg/mL nisin olarak belirlenmiştir. Kombinasyona P22 bakteriyofajının ilavesi ile % 70 oranında eradikasyon sağlayan değerler ise, 10^7 pfu/mL P22+20 mM EDTA+150 µg/mL nisin olarak saptanmıştır.

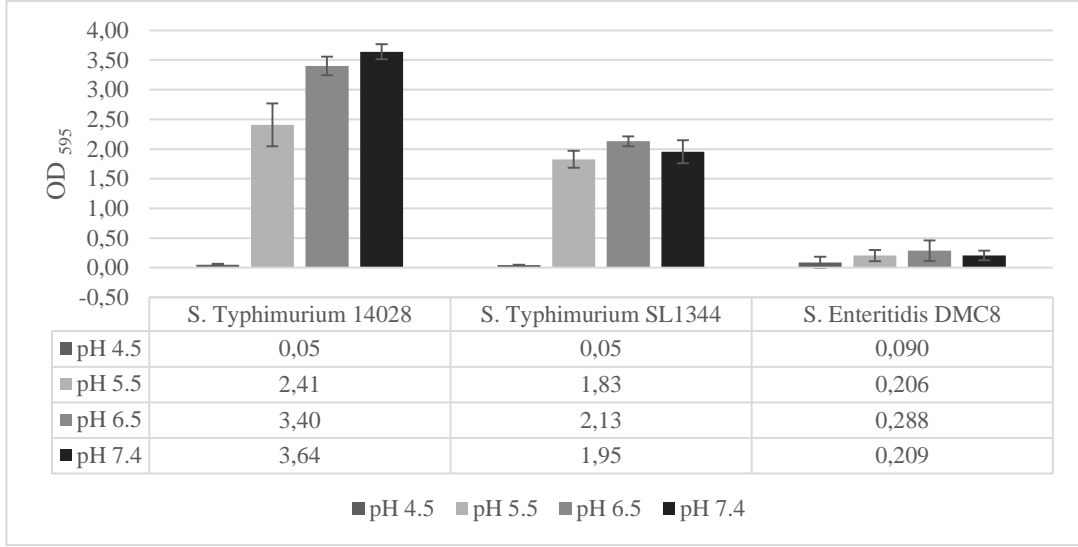
4.11 Farklı Sıcaklık ve pH Değerlerinde Nisin ve EDTA Uygulaması Sonucu *Salmonella* Suşlarında Biyofilm Oluşumunun Engellenmesi ve Biyofilm Eradikasyonu

Bu çalışmada öncelikle endüstriyel süreçlerde en yaygın kullanılan dört sıcaklık derecesinde (5, 20, 37, 40 °C) suşların biyofilm oluşturma özellikleri belirlenmiştir. Suşların optimum biyofilm ürettikleri sıcaklıklar (*S. Typhimurium* 14028 ve *S. Typhimurium* SL1344 20 °C, *S. Enteritidis* DMC8 37 °C) haricindeki denenen diğer inkübasyon sıcaklıklarında biyofilm üretmedikleri saptanmıştır (Şekil 4.41).



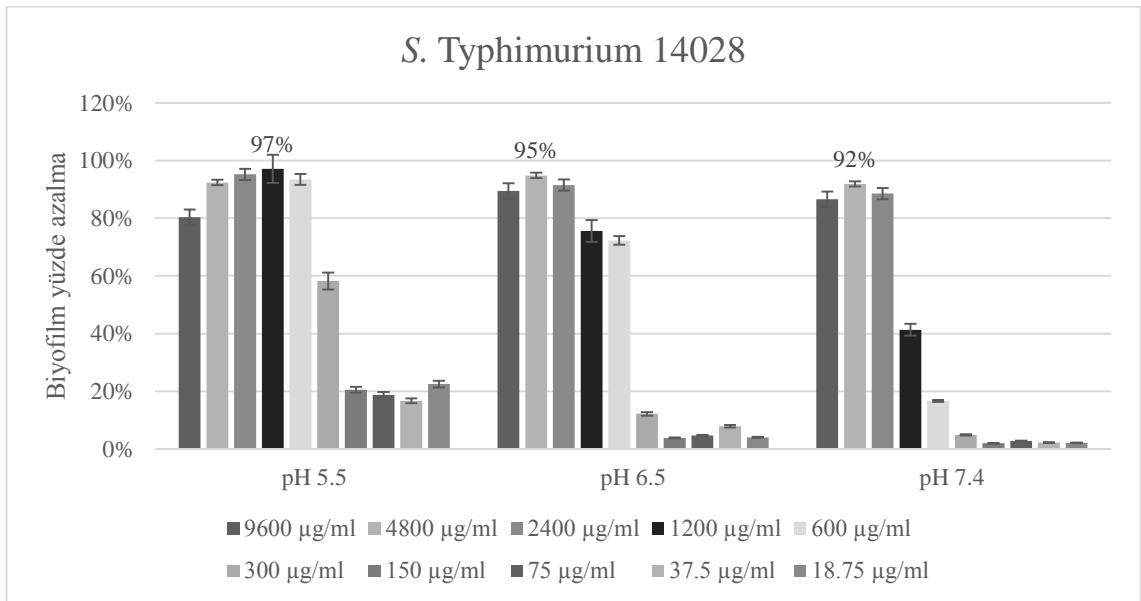
Şekil 4.41 Farklı inkübasyon sıcaklıklarında *Salmonella* suşlarının biyofilm üretim miktarları

Sıcaklıktan bağımsız olarak yürütülen denemede, dört pH değerinde (4.5, 5.5, 6.5, ve 7.4) yalnız pH'nın ve pH, nisin ve EDTA uygulamasının *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşturmaları ve bu biyofilmlerin eradikasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Nisin düşük pH'larda daha aktif olduğu için denemelerde üst pH limitlerine çıkmamıştır. pH değerlerinin *Salmonella* biyofilm oluşumuna olan etkisinin araştırıldığı denemede çalışılan tüm suşların pH 4.5 değerinde biyofilm üretmedikleri saptanmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonunda *S. Typhimurium* 14028 suşu en fazla pH 7.4'de biyofilm üretirken, 24 saatlik inkübasyon sonunda *S. Typhimurium* SL1344 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşlarının pH 6.5 değerinde en fazla biyofilm ürettikleri belirlenmiştir (Şekil 4.42).

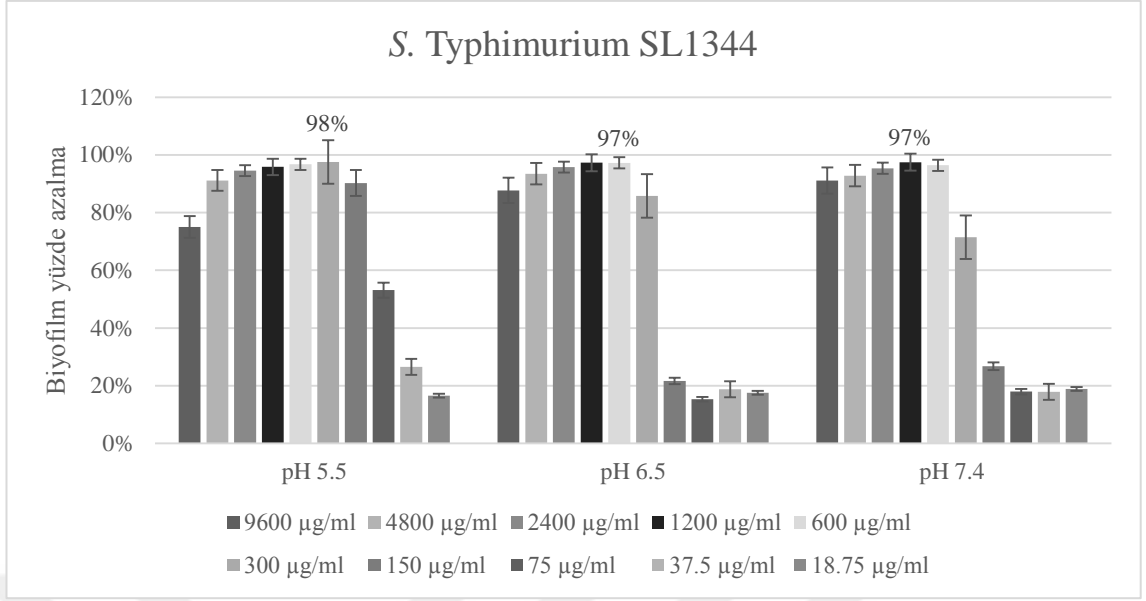


Şekil 4.42 *Salmonella* suşlarının farklı pH değerlerindeki biyofilm oluşturma değerleri

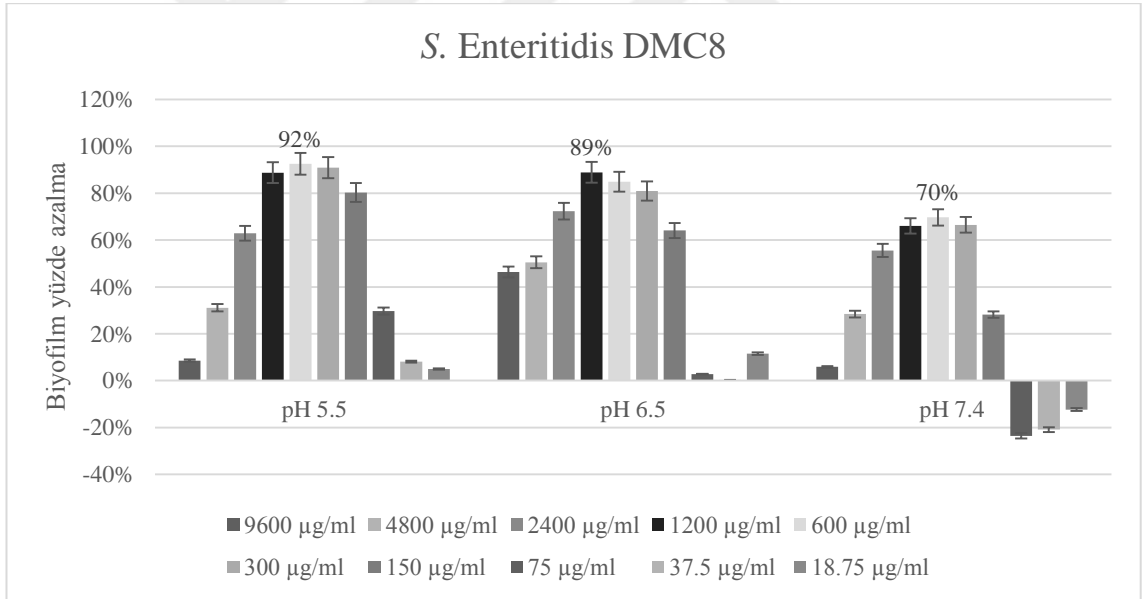
Farklı pH değerlerinde uygulanan nisin konsantrasyonlarının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisinin belirlendiği denemede, biyofilm oluşumunu engelleyen nisin konsantrasyonları en fazla pH 5.5 değerinde etkili olmuştur. pH 5.5+nisin kombinasyonundan elde edilen maksimum azalmayı sağlayan değerler *S. Typhimurium* 14028 için % 97, *S. Typhimurium* SL1344 için % 98 ve *S. Enteritidis* DMC8 için % 92 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.43-4.45).



Şekil 4.43 Nisinin farklı pH değerlerinde *S. Typhimurium* 14028 biyofilm oluşumuna etkisi



Şekil 4.44 Nisinin farklı pH değerlerinde *S. Typhimurium* SL1344 biyofilm oluşumuna etkisi



Şekil 4.45 Nisinin farklı pH değerlerinde *S. Enteritidis* DMC8 biyofilm oluşumuna etkisi

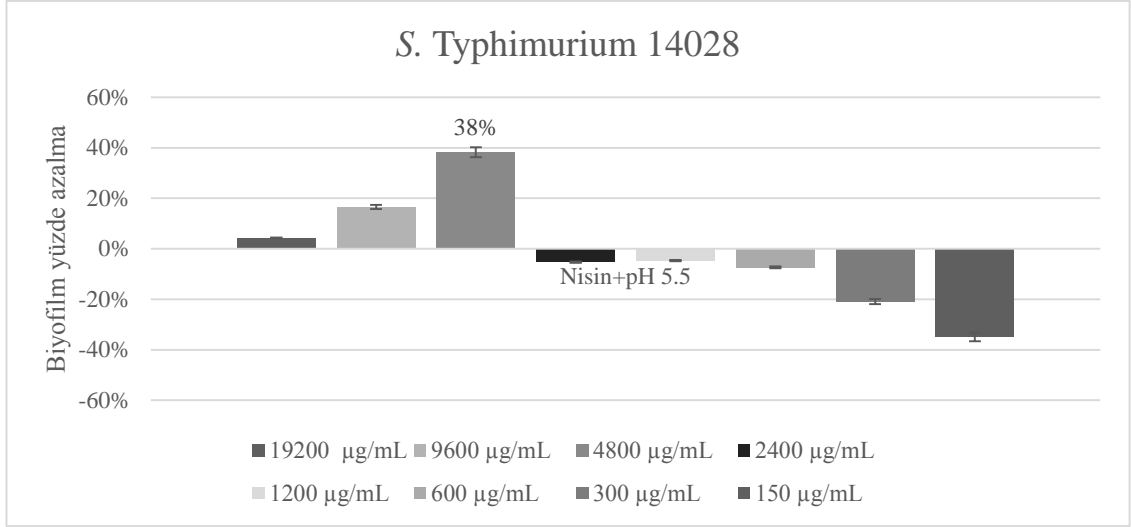
Nisin *Salmonella* biyofilm oluşumuna en fazla pH 5.5 değerinde etki ettiğinden; pH+nisin+EDTA kombinasyonu denemesine pH 5.5 ile devam edilmiştir. *Salmonella* suşlarının optimum biyofilm ürettikleri saatlerde gerçekleştirilen denemede, pH+nisin+EDTA kombinasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkileri sonucu

biyofilm miktarlarındaki yüzde azalmaları çizelge 4.14’de verilmiştir. *S. Typhimurium* 14028 suşu için; pH 5.5 değerinde uygulanan nisin ve EDTA kombinasyonu sonucu biyofilm miktarında maksimum (% 97) azalma sağlayan kombinasyonlar; 9.375 µg/mL Nisin+0.625 EDTA ve 600 µg/mL Nisin+0.019 EDTA olarak belirlenmiştir. *S. Typhimurium* SL1344 suşu için; maksimum (% 92) azalma sağlayan kombinasyon 150 µg/mL Nisin+0.078 EDTA, *S. Enteritidis* DMC8 suşu için ise; maksimum (% 96) azalma sağlayan kombinasyon 300 µg/mL Nisin+0.019 EDTA olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.14 pH5.5+Nisin+EDTA kombinasyonlarının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi sonucu belirlenen biyofilm miktarındaki yüzde azalma

Suşlar	pH 5.5+EDTA+Nisin Konsantrasyonu	Yüzde Azalma (%)
<i>S. Typhimurium</i> 14028	9.375 µg/mL Nisin+0.625 EDTA	97
	600 µg/mL Nisin+0.019 EDTA	97
<i>S. Typhimurium</i> SL1344	150 µg/mL Nisin+0.078 EDTA	92
<i>S. Enteritidis</i> DMC8	300 µg/mL Nisin+0.019 EDTA	96

Salmonella suşlarının olgun biyofilmleri üzerine pH+Nisin ve pH+Nisin+EDTA kombinasyonlarının eradikasyon etkilerini belirlemek amacı ile güçlü biyofilm üreticisi olan *S. Typhimurium* 14028 suşunun 72 saat süre ile tuzsuz LB sıvı besi ortamında 20 °C’de biyofilm üretimi sağlanmıştır. pH 5.5’a ayarlanmış tuzsuz LB sıvı besiyeri kullanarak nisin (19200-150 µg/mL) dilüsyonları ve nisin+EDTA kombinasyonları hazırlanmış ve kuyulara aktarılmıştır. 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon sonunda kuyularda kalan biyofilm yapıları boyanarak biyofilm üretim miktarları hesaplanmıştır. Nisin, *S. Typhimurium* 14028 olgun biyofilmini nötr pH’ da indüklerken, pH 5.5’da gerçekleştirilen kombinasyon denemesinde 4800 µg/mL nisin konsantrasyonu biyofilmi maksimum % 38 oranında eradike etmiştir. Nisinin konsantrasyonu azaldıkça biyofilm miktarında artış görülmüştür (Şekil 4.46).

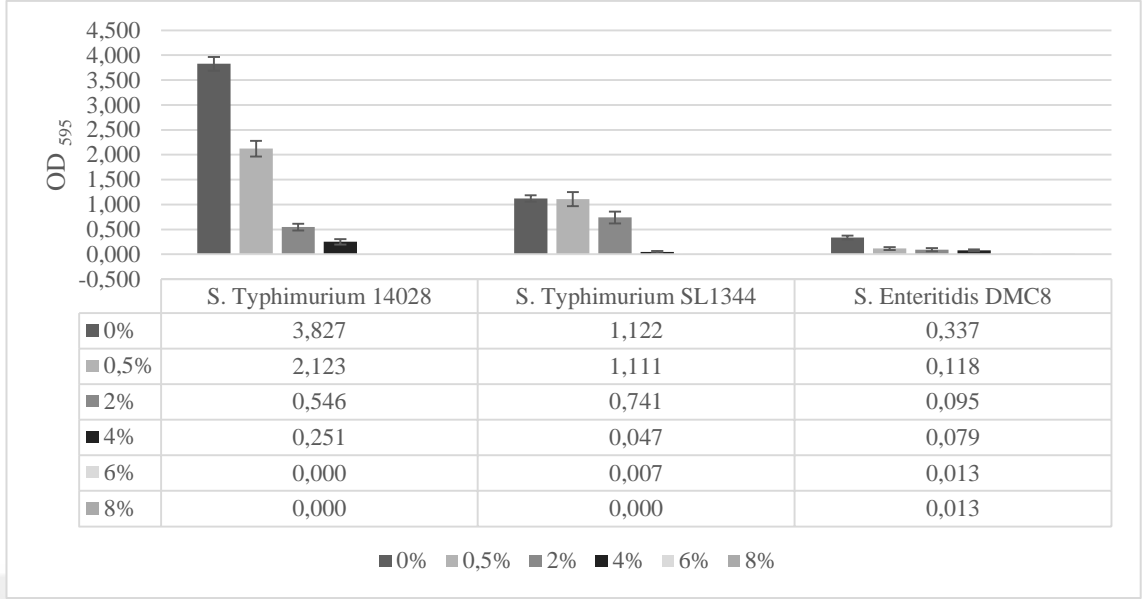


Şekil 4.46 *S. Typhimurium* 14028 olgun biyofilmi üzerine pH 5.5 ve nisinin eradikasyon etkisi

S. Typhimurium 14028 suşunun 72 saatlik olgun biyofilmi üzerine uygulanan 20 mM EDTA+150 µg/mL Nisin kombinasyonu nötr pH'da % 51 oranında eradikasyon sağlarken, pH 5.5'da % 84 oranındaki maksimum eradikasyonu sağlayan konsantrasyonlar 1200 µg/mL Nisin+1.25 mM EDTA olarak saptanmıştır.

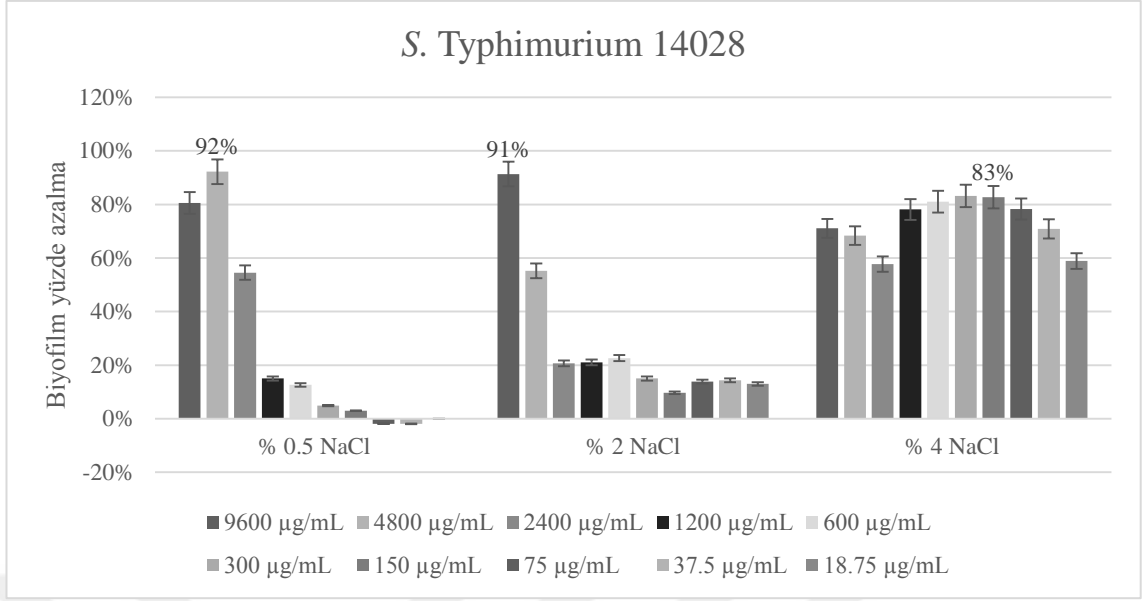
4.12 Farklı NaCl Konsantrasyonlarında *Salmonella* Suşlarının Nisin ve EDTA Kullanılarak Biyofilm Oluşumlarının Engellenmesi ve Eradikasyonu

Bu denemelerde, endüstriyel süreçlerde en yaygın kullanılan beş NaCl konsantrasyonunun (% 0.5, 2, 4, 6 ve 8 NaCl) nisin ve EDTA kullanılarak *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşturmaları üzerine ve biyofilmlerinin eradikasyonuna etkisi araştırılmıştır. NaCl konsantrasyonlarının *Salmonella* biyofilm oluşumu üzerine etkisinin belirlendiği denemeden elde edilen verilere göre, tuz konsantrasyonu arttıkça biyofilm oluşumunun azaldığı ve % 6 ve %8 NaCl konsantrasyonlarında ise biyofilm oluşumunun tamamen engellendiği belirlenmiştir. *S. Typhimurium* 14028 suşu % 0.5, 2 ve 4 NaCl konsantrasyonlarında biyofilm oluşturabiliyorken, *S. Typhimurium* SL1344 suşu % 0.5 ve 2, *S. Enteritidis* DMC8 suşu ise sadece % 0.5 NaCl konsantrasyonunda biyofilm oluşturabilmektedir. Diğer tüm konsantrasyonlar biyofilm oluşumu için engelleyici etki yaratmıştır (Şekil 4.47).

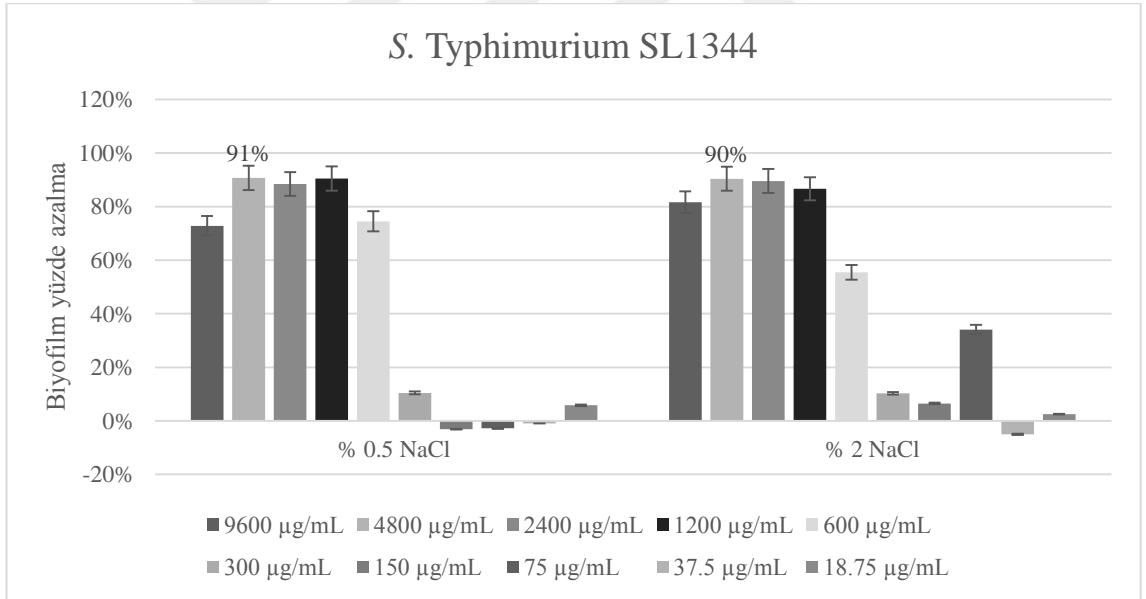


Şekil 4.47 *Salmonella* suşlarının farklı NaCl konsantrasyonlarında biyofilm oluşturma değerleri

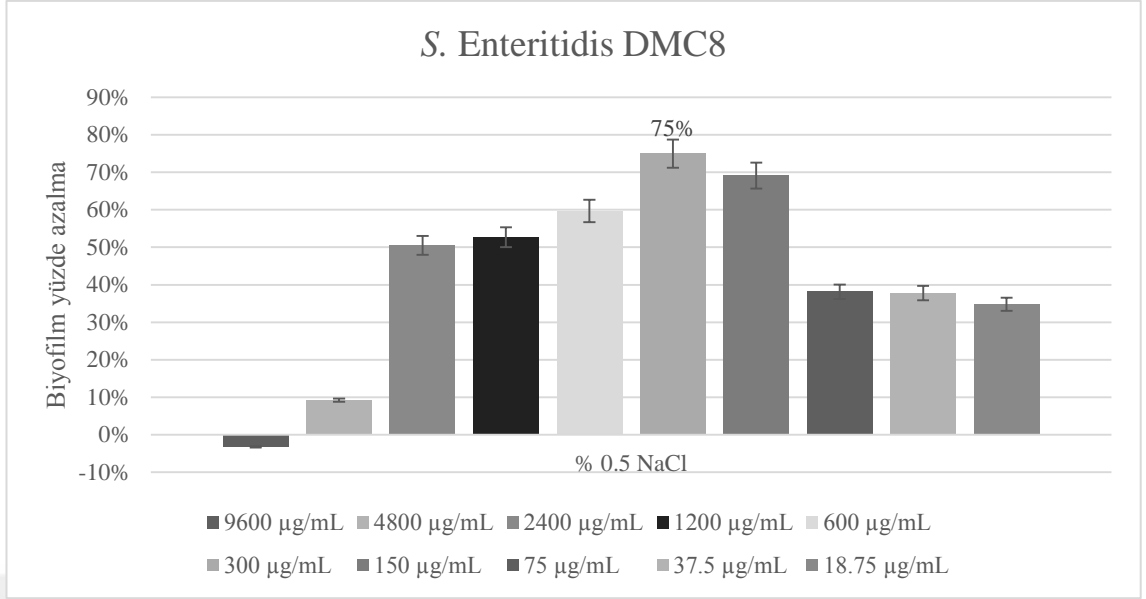
NaCl konsantrasyonları nisin ile kombine edilerek biyofilm oluşumunun engellenmesini sağlayacak olan denemeler gerçekleştirilmiş ve kombinasyonlarda 9600-18.75 µg/mL nisin konsantrasyon aralığı kullanılmıştır. Denenen tüm *Salmonella* suşları için nisin varlığında biyofilm oluşumunda en fazla azalmanın görüldüğü NaCl konsantrasyonu % 0.5 olup, *S. Typhimurium* 14028 suşunda % 92, *S. Typhimurium* SL1344 suşunda % 91 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşunun biyofilm miktarında % 75 azalma sağlanmıştır (Şekil 4.48-4.50).



Şekil 4.48 Nisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında *S. Typhimurium* 14028 biyofilm oluşumuna etkisi



Şekil 4.49 Nisinin farklı NaCl konsantrasyonlarında *S. Typhimurium* SL1344 biyofilm oluşumuna etkisi



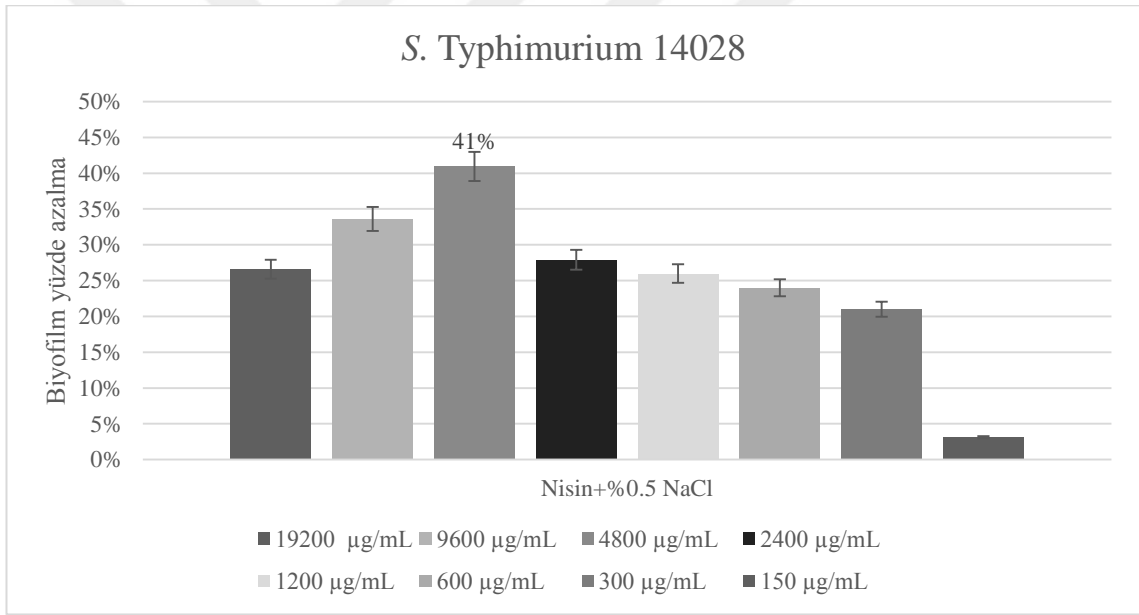
Şekil 4.50 Nisin'in farklı NaCl konsantrasyonlarında *S. Enteritidis DMC8* biyofilm oluşumuna etkisi

Nisin, % 0.5 NaCl konsantrasyonu ile kullanıldığında en fazla azalma yüzdesi elde edildiğinden, NaCl+nisin+EDTA kombinasyonu denemesine % 0.5 NaCl konsantrasyonu ile devam edilmiştir. *S. Typhimurium* 14028 suşu için, % 0.5 NaCl konsantrasyonunda uygulanan nisin ve EDTA kombinasyonu sonucu biyofilm miktarında % 91 azalma sağlayan kombinasyon 600 µg/mL Nisin+2.5 EDTA olarak belirlenmiştir. *S. Typhimurium* SL1344 suşu için, % 96 azalma sağlayan kombinasyon 150 µg/mL Nisin +0.625 EDTA olarak; *S. Enteritidis DMC8* suşu için ise, % 92 azalma sağlayan konsantrasyon 18.75 µg/mL Nisin+0.625 EDTA olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 % 0.5 NaCl+Nisin+EDTA kombinasyonlarının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi sonucu belirlenen biyofilm yüzde azalma

Suşlar	% 0.5 NaCl+EDTA+Nisin Konsantrasyonu	Yüzde Azalma (%)
S. Typhimurium 14028	600 µg/mL Nisin+2.5 mM EDTA	91
S. Typhimurium SL1344	150 µg/mL Nisin +0.625 EDTA	96
S. Enteritidis DMC8	18.75 µg/mL Nisin+0.625 EDTA	92

Salmonella suşlarının olgun biyofilmleri üzerine NaCl+Nisin ve NaCl+Nisin+EDTA kombinasyonlarının eradikasyon etkilerini belirlemek amacı ile güçlü biyofilm üreticisi olan *S. Typhimurium* 14028 suşunun 72 saat süre ile tuzsuz LB sıvı besi ortamında 20 °C’de biyofilm üretimi sağlanmıştır. NaCl konsantrasyonu % 0.5’e ayarlanmış LB sıvı besiyeri kullanarak nisin (19200-150 µg/mL) dilüsyonları ve nisin-EDTA kombinasyonları hazırlanmış ve kuyulara aktarılmıştır. 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon sonunda kuyularda kalan biyofilm yapıları boyanarak biyofilm üretim miktarları hesaplanmıştır. Tuzsuz ortamda oluşan *S. Typhimurium* 14028 olgun biyofilmi nisin ilavesi ile indüklenirken, % 0.5 NaCl konsantrasyonunda gerçekleştirilen kombinasyon denemesinde 4800 µg/mL nisin konsantrasyonu biyofilmi maksimum % 41 oranında eradike etmiştir (Şekil 4.51).



Şekil 4.51 *S. Typhimurium* 14028 olgun biyofilmi üzerine % 0.5 NaCl ve nisinin eradikasyon etkisi

S. Typhimurium 14028 suşunun 72 saatlik olgun biyofilmi üzerine tuzsuz ortamda uygulanan 20 mM EDTA+150 µg/mL nisin konsantrasyonları % 51 oranında eradikasyon sağlarken, % 0.5 NaCl+EDTA+nisin kombinasyonunda % 74 oranındaki maksimum eradikasyonu sağlayan kombinasyon % 0.5 NaCl+9600 µg/mL Nisin+10 mM EDTA olarak belirlenmiştir.

4.13 P22 Bakteriyofajı, Nisin ve EDTA'nın Tek Başına ve Kombinasyonları Halinde Uygulanarak *S. Typhimurium* 14028 Suşunun Biyofilm Üretimi Üzerinde ve Eradikasyonuna Etkisinin Matematiksel Modellerinin Tespiti

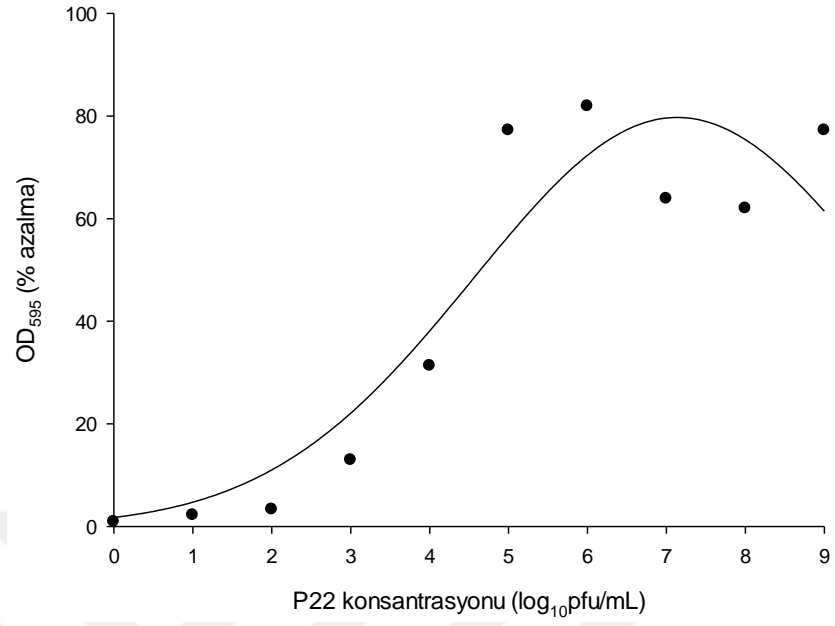
Biyofilm oluşumunun azalmasının [OD_{595} (% azalma)] P22 fajı konsantrasyonuna (P) bağlı değişimi aşağıdaki model kullanılarak tanımlanmaya çalışılmıştır.

$$OD_{595}(\% azalma) = OD_{max} \cdot \exp \left[-0.5 \left(\frac{P - P_{opt}}{b} \right)^2 \right]$$

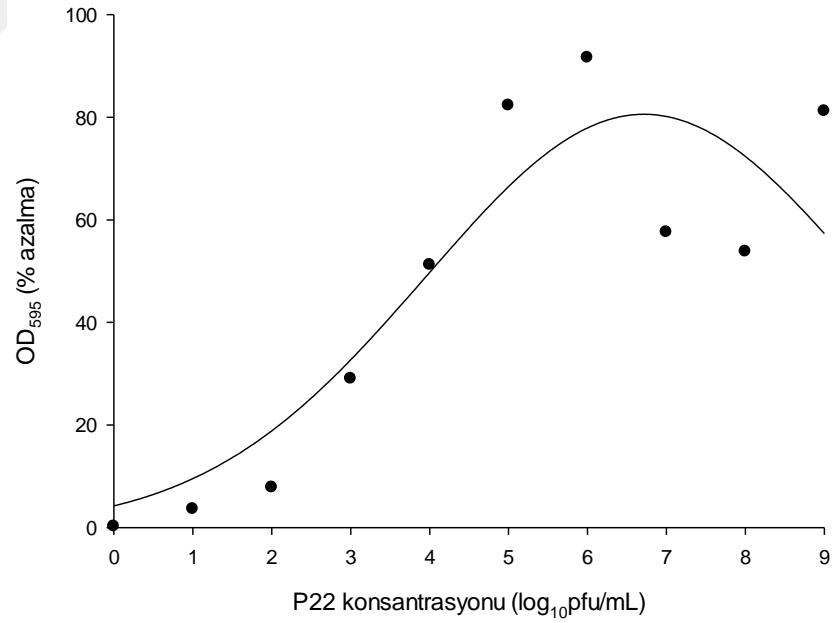
Bu modelde OD_{max} maksimum biyofilm azalma değeri, P_{opt} maksimum biyofilm azalmasının gözlemlendiği P22 konsantrasyonunu, b değeri ise modelde elde edilen tepe noktasının genişlik aralığını göstermektedir.

Çizelge 4.16 P22 fajının biyofilm oluşumuna etkisindeki model değişkenleri

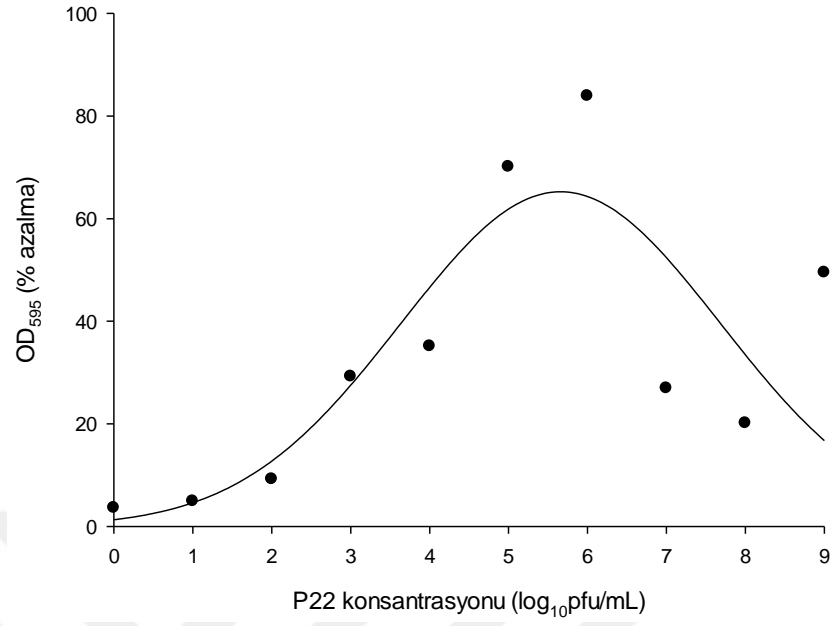
Zaman (saat)	OD_{max} (% azalma)	P_{opt} (\log_{10} pfu/mL)	b (-)	R^2
24	79,7	7,1	2,6	0,87
48	80,6	6,7	2,8	0,81
72	65,3	5,7	2,0	0,63
96	54,4	5,2	2,0	0,60



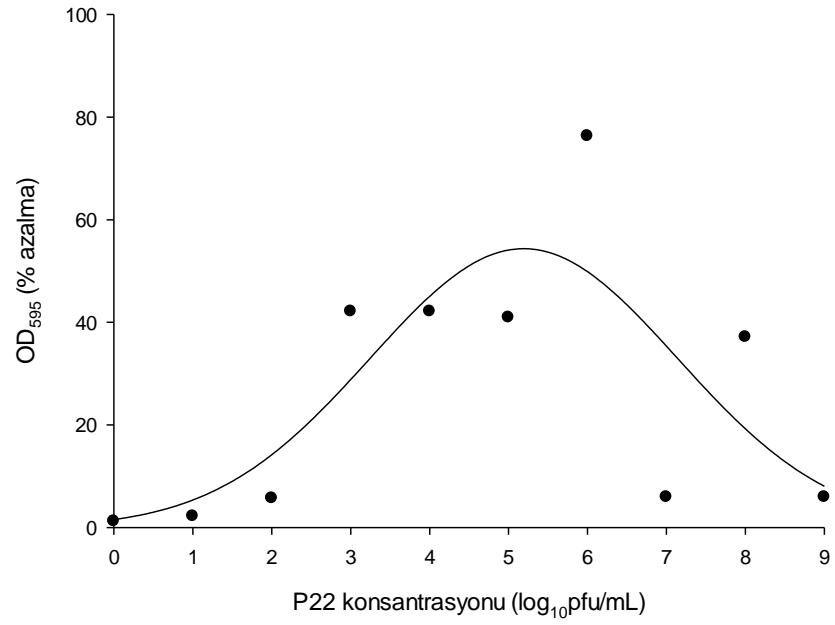
Şekil 4.52 24 saat sonunda P22 fajının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi



Şekil 4.53 48 saat sonunda P22 fajının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

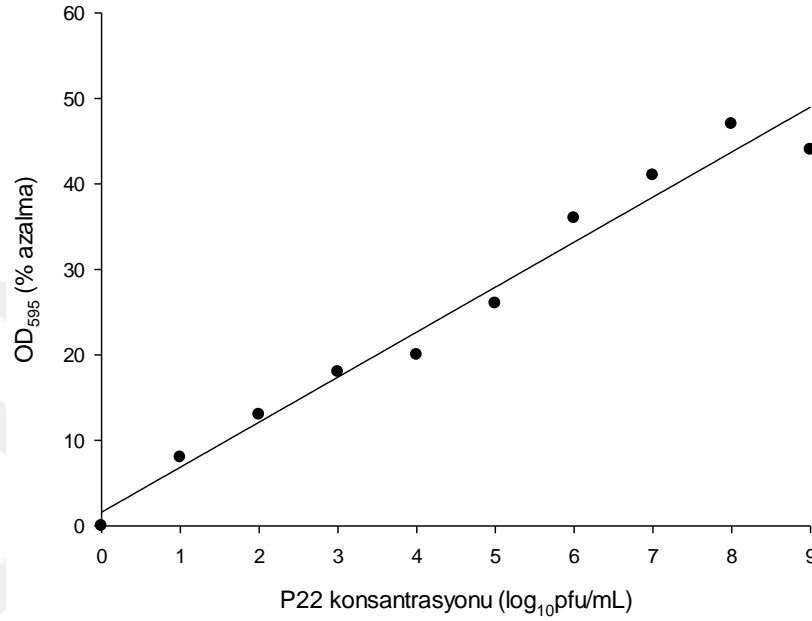


Şekil 4.54 72 saat sonunda P22 fajının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi



Şekil 4.55 96 saat sonunda P22 fajının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

72 saat sonunda *S. Typhimurium* 14028 suşunun oluşturduğu olgun biyofilminin azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] P22 fajı konsantrasyonuna (*P*) bağlı değişimi doğrusal model kullanılarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.56 Olgun biyofilmin yüzde azalmasının P22 konsantrasyonuna göre değişimi

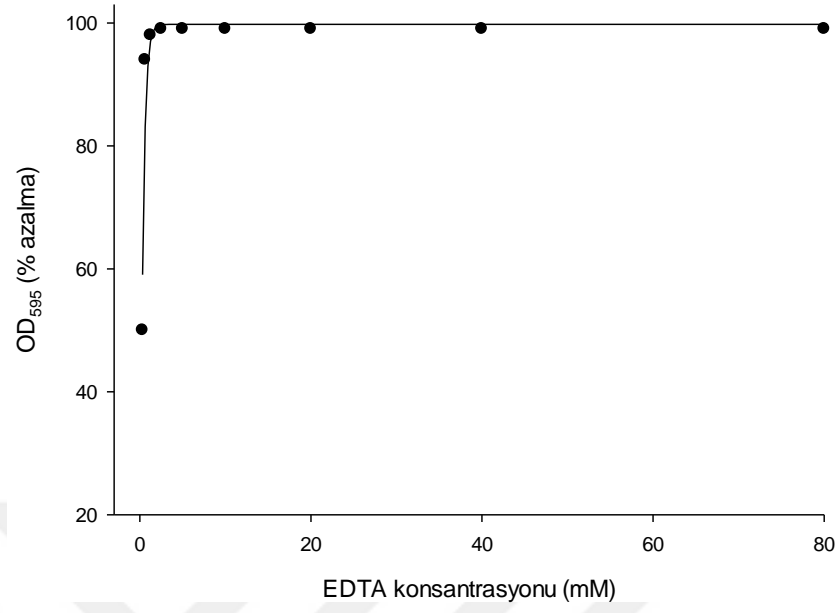
Biyofilm oluşumunun azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] EDTA konsantrasyonuna (*C*_{EDTA}) bağlı değişimi aşağıdaki model kullanılarak tanımlanmaya çalışılmıştır.

$$OD_{595}(\%azalma) = OD_{max} \cdot [1 - \exp(-k \cdot C_{EDTA})]$$

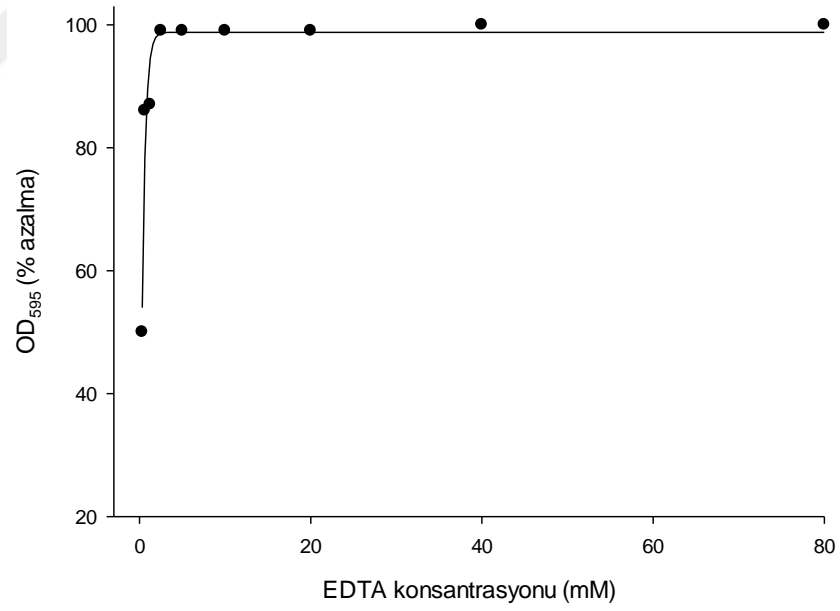
Bu modelde *OD*_{max} maksimum biyofilm azalma değeri, *k* ise biyofilmin azalmasının konsantrasyona bağlı artış hızıdır.

Çizelge 4.17 EDTA'nın biyofilm oluşumuna etkisindeki model değişkenleri

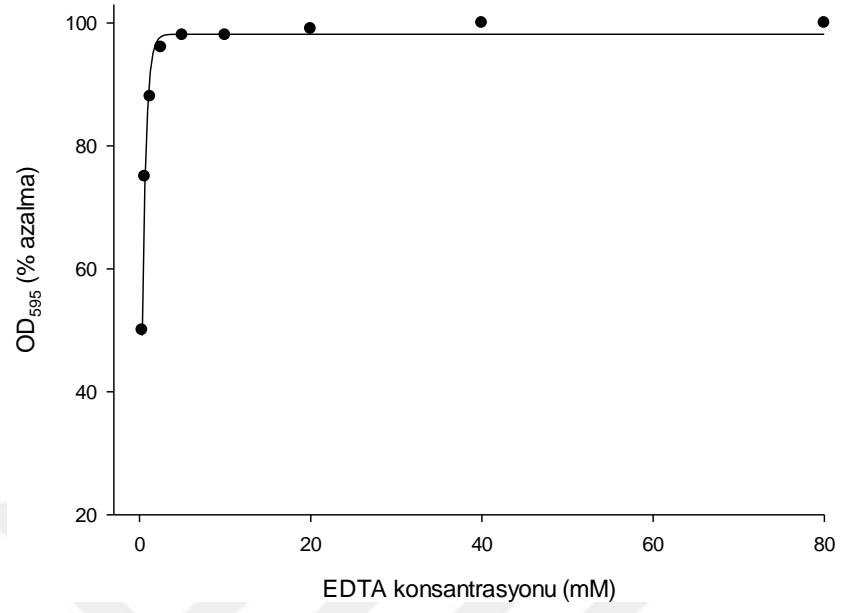
Zaman (saat)	OD _{max} (% azalma)	k (mM ⁻¹)	R ²
24	99,8	2,9	0,90
48	98,8	2,5	0,94
72	98,2	2,2	0,99
96	97,6	1,2	0,98



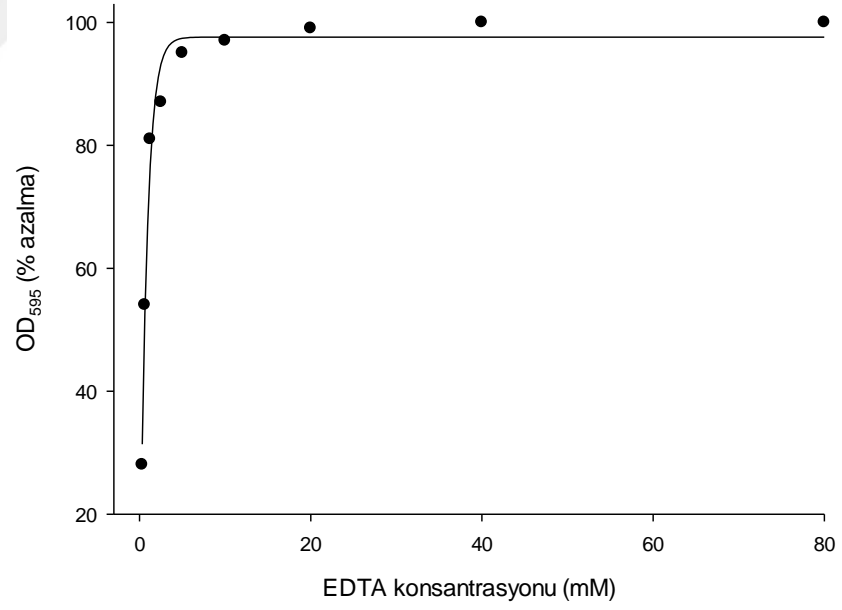
Şekil 4.57 24 saat sonunda EDTA'nın *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi



Şekil 4.58 48 saat sonunda EDTA'nın *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

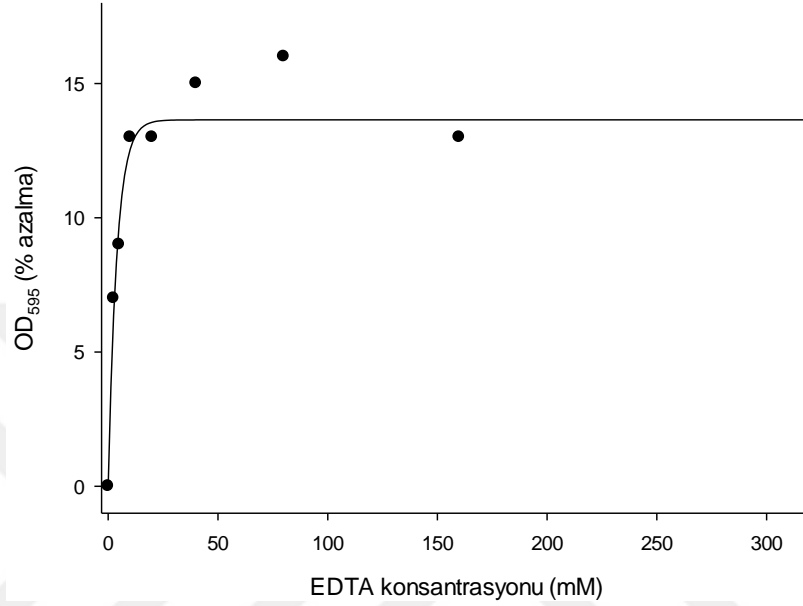


Şekil 4.59 72 saat sonunda EDTA'nın *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi



Şekil 4.60 96 saat sonunda EDTA'nın *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

72 saat sonunda *S. Typhimurium* 14028 suşunun oluşturduğu olgun biyofilminin azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] EDTA konsantrasyonuna (C_{EDTA}) bağlı değişimi aynı model kullanılarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.61 Olgun biyofilmin yüzde azalmasının EDTA konsantrasyonuna göre değişimi

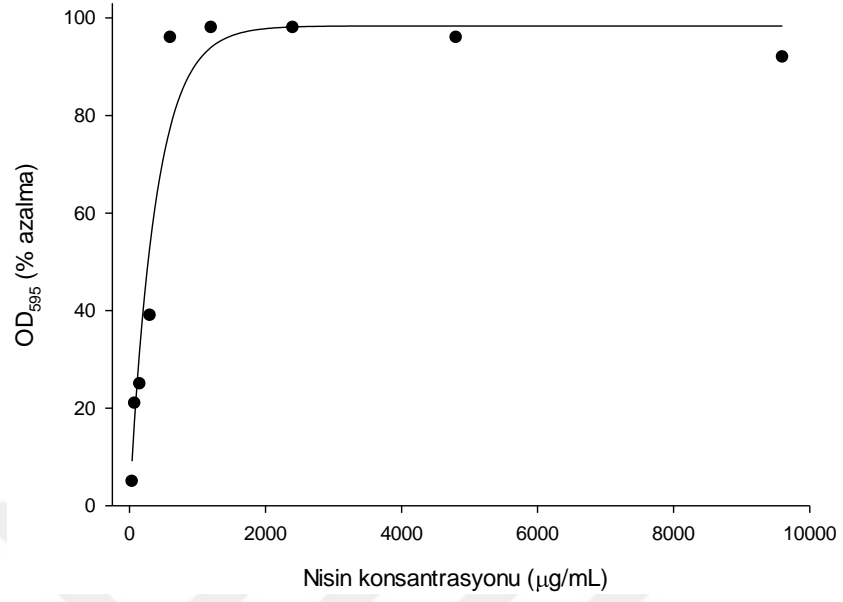
Biyofilm oluşumunun azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] Nisin konsantrasyonuna (C_{Nisin}) bağlı değişimi aşağıdaki model kullanılarak tanımlanmaya çalışılmıştır.

$$OD_{595}(\% azalma) = OD_{max} \cdot [1 - \exp(-k \cdot C_{Nisin})]$$

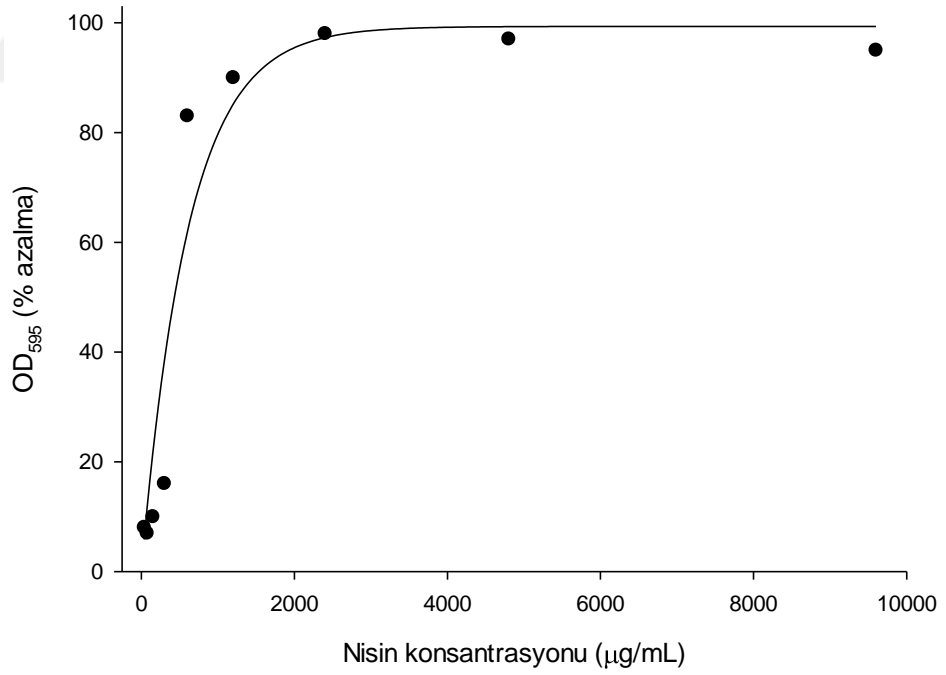
Bu modelde OD_{max} maksimum biyofilm azalma değeri, k ise biyofilmin azalmasının konsantrasyona bağlı artış hızıdır.

Çizelge 4.18 Nisinin biyofilm oluşumuna etkisindeki model değişkenleri

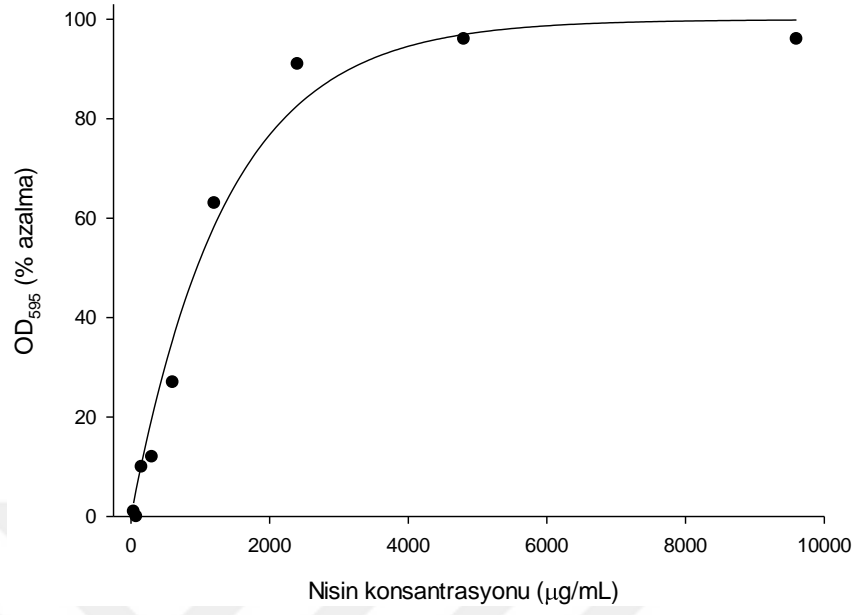
Zaman (saat)	OD _{max} (% azalma)	k (µg ⁻¹)	R ²
24	98,4	0,0026	0,95
48	99,3	0,0016	0,93
72	99,9	0,0007	0,98
96	114,1	0,0002	0,98



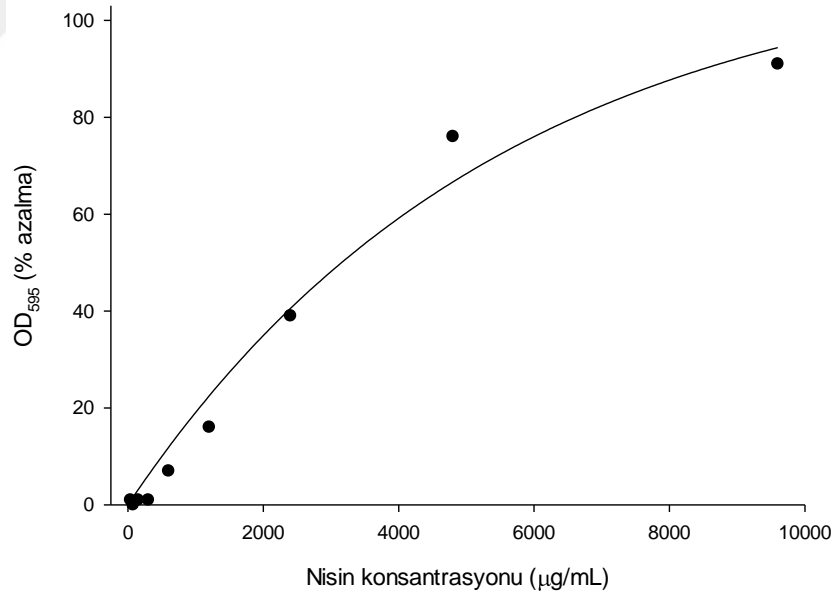
Şekil 4.62 24 saat sonunda nisin'in *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi



Şekil 4.63 48 saat sonunda nisin'in *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

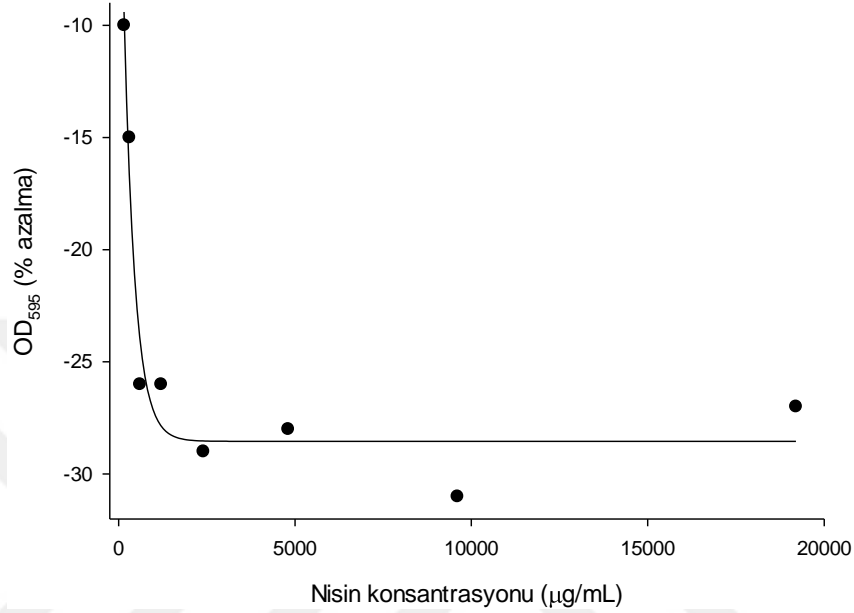


Şekil 4.64 72 saat sonunda nisinin *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi



Şekil 4.65 96 saat sonunda nisinin *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

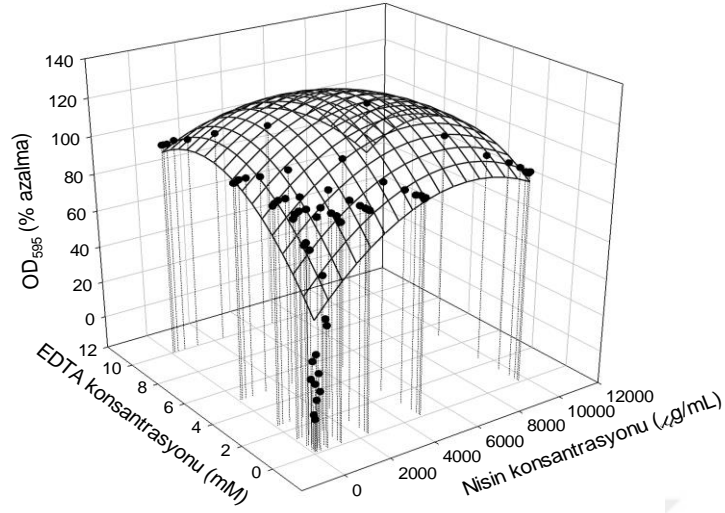
72 saat sonunda *S. Typhimurium* 14028 suşunun oluşturduğu olgun biyofilminin azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] Nisin konsantrasyonuna (C_{Nisin}) bağlı değişimi azalan model kullanılarak tanımlanmıştır.



Şekil 4.66 Olgun biyofilmin yüzde azalmasının nisin konsantrasyonuna göre değişimi

24, 48, 72 ve 96 saatlik biyofilmlerin yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı değişimi ikinci derece polinom modellerle açıklanmaya çalışılmıştır.

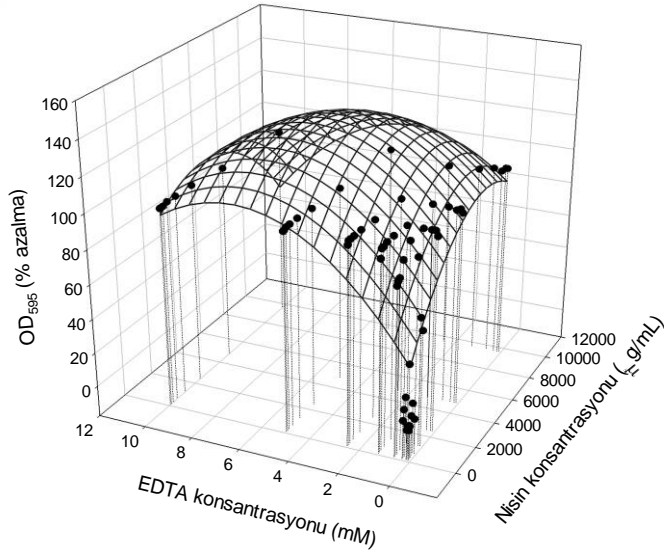
$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = a + bC_{Nisin}^2 + cC_{Nisin} + dC_{EDTA}^2 + eC_{EDTA} + fC_{Nisin}C_{EDTA}$$



Şekil 4.67 24 saat sonunda nisin ve EDTA'nın *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

24 saat için aşağıdaki değişkenler elde edilmiştir:

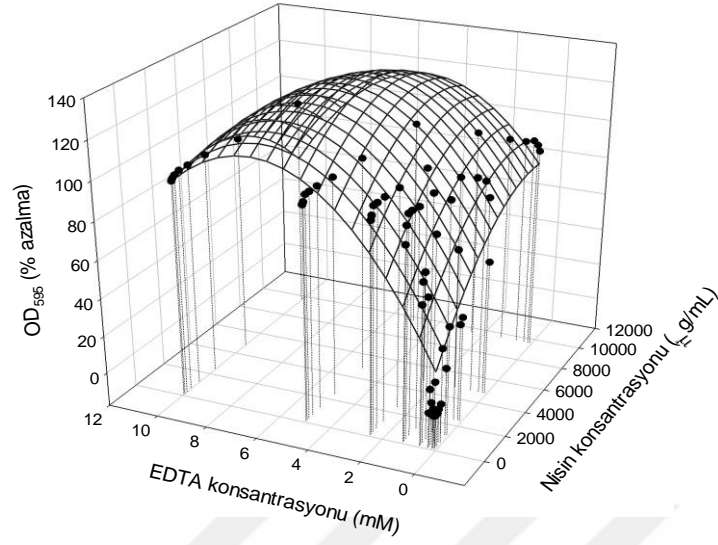
$a = 49,3$, $b = -1,1 \times 10^{-6}$, $c = 0,015$, $d = -1,1$, $e = 15,3$ ve $f = -0,0007$ 'dir. $R^2 = 0,46$ 'dir.



Şekil 4.68 48 saat sonunda nisin ve EDTA'nın *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

48 saat için aşağıdaki değişkenler elde edilmiştir:

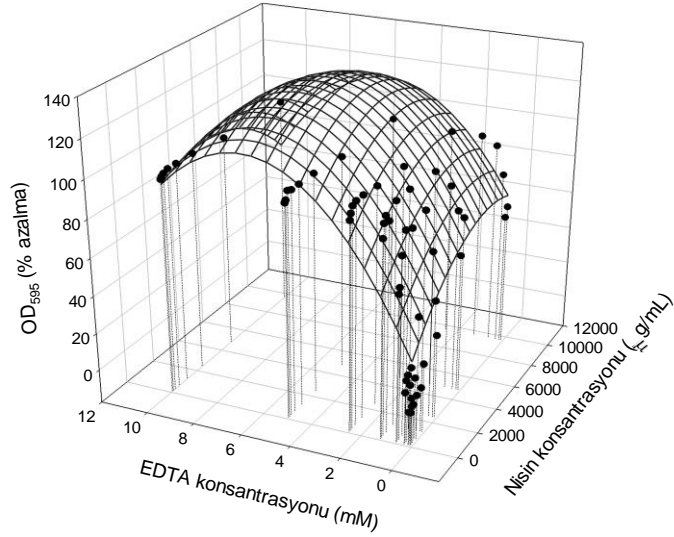
$a = 33,7$, $b = -1,2 \times 10^{-6}$, $c = 0,017$, $d = -1,5$, $e = 20,8$ ve $f = -0,0009$ 'dur. $R^2 = 0,55$ 'dir.



Şekil 4.69 72 saat sonunda nisin ve EDTA'nın *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

72 saat için aşağıdaki değişkenler elde edilmiştir:

$a = 20,1$, $b = -7,6 \times 10^{-7}$, $c = 0,014$, $d = -1,9$, $e = 26,9$ ve $f = -0,001$ 'dir. $R^2 = 0,67$ 'dir.



Şekil 4.70 96 saat sonunda nisin ve EDTA'nın *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

96 saat için aşağıdaki değişkenler elde edilmiştir:

$a = 24,0$, $b = -7,6 \times 10^{-7}$, $c = 0,012$, $d = -2,0$, $e = 27,1$ ve $f = -0,0006$ 'dır. $R^2 = 0,66$ 'dir.

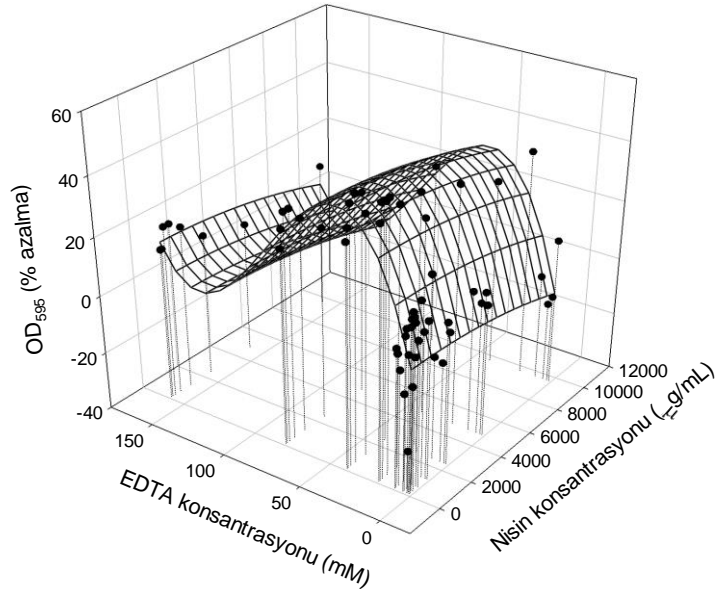
72 saat sonunda *S. Typhimurium* 14028 suşunun oluşturduğu olgun biyofilminin yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı değişimi üçüncü derece polinom modelle açıklanmaya çalışılmıştır.

$OD_{595}(\% \text{ azalma})$

$$= a + bC_{Nisin}^3 + cC_{Nisin}^2 + dC_{Nisin} + eC_{EDTA}^3 + fC_{EDTA}^2 + gC_{EDTA} + hC_{Nisin}^2C_{EDTA} + iC_{Nisin}C_{EDTA}^2 + jC_{Nisin}C_{EDTA}$$

Burada $a, b, c, d, e, f, g, h, i$ ve j model değişkenleridir.

Modelin çok fazla sayıda değişkene sahip olması bir dezavantajmış gibi görünse de modelin uygulanması sırasında istatistiksel olarak anlam ifade etmeyen değişkenler modelden uzaklaştırılarak model veriye bir kez daha uygulanmış ve sonuç olarak hem daha az değişkenli bir model elde edilmiş hem de model değişkenleri istatistiksel olarak anlamlı hale getirilmiştir.



Şekil 4.71 Olgun biyofilmin yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı değişiminin modellenmesi

Olgun biyofilmin (72 saat) yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiminin tanımlanması sonucunda aşağıdaki model elde edilmiştir:

$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = cC_{Nisin}^2 + eC_{EDTA}^3 + fC_{EDTA}^2 + gC_{EDTA}$$

burada $c = -1,1 \times 10^{-7}$, $e = 0,00012$, $f = -0,033$ ve $g = 2,3$ 'dür. $R^2 = 0,59$ 'dur.

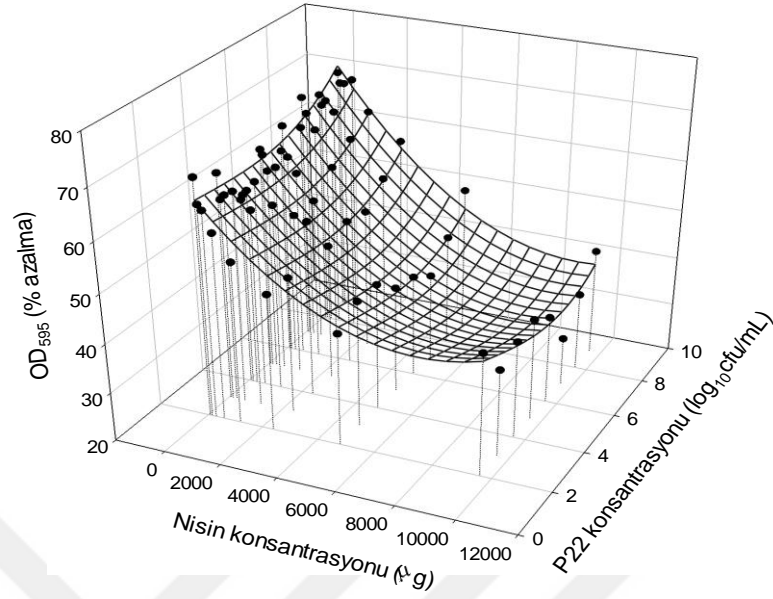
Görüldüğü gibi orijinal model 10 değişkene sahipken elde edilen model 4 değişkenlidir. Bu modele göre maksimum yüzde azalma düşük Nisin ve EDTA konsantrasyonlarında gözlemlenmektedir (Şekil 4.71).

Nisin-EDTA-P22 fajı kombinasyonun biyofilm oluşumu üzerinde denenen tüm saatlerde ve konsantrasyonlarda % 90 üzerinde azalma sağladığı için bu kombinasyon modellenememiştir.

72 saat sonunda *S. Typhimurium* 14028 suşunun oluşturduğu olgun biyofilminin yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] sabit EDTA (C_{EDTA} = 20 mM) konsantrasyonunda Nisin (C_{Nisin}) ve P22 fajı konsantrasyonuna (P) bağlı değişimi de üçüncü derece polinom modelle açıklanmaya çalışılmıştır.

$$\begin{aligned} OD_{595}(\% \text{ azalma}) &= a + bC_{Nisin}^3 + cC_{Nisin}^2 + dC_{Nisin} + eP^3 + fP^2 + gP + hC_{Nisin}^2P \\ &+ iC_{Nisin}P^2 + jC_{Nisin}P \end{aligned}$$

Burada $a, b, c, d, e, f, g, h, i$ ve j model değişkenleridir.



Şekil 4.72 Olgun biyofilmin yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] Nisin (C_{Nisin}) ve P22 fajı (P) konsantrasyonlarına bağlı değişiminin modellenmesi

Olgun biyofilmin (72 saat) yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] sabit EDTA (C_{EDTA} = 20 mM) konsantrasyonunda Nisin (C_{Nisin}) ve P22 fajı konsantrasyonuna (P) bağlı olarak değişiminin tanımlanması sonucunda aşağıdaki model elde edilmiştir:

$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = a + cC_{Nisin}^2 + dC_{Nisin} + eP^3 + fP^2 + jC_{Nisin}P$$

burada $a = 64,7$, $c = 4,0 \times 10^{-7}$, $d = -0,0057$, $e = 0,035$, $f = -0,22$ ve $j = -0,00018$ 'dir. $R^2 = 0,93$ 'dür.

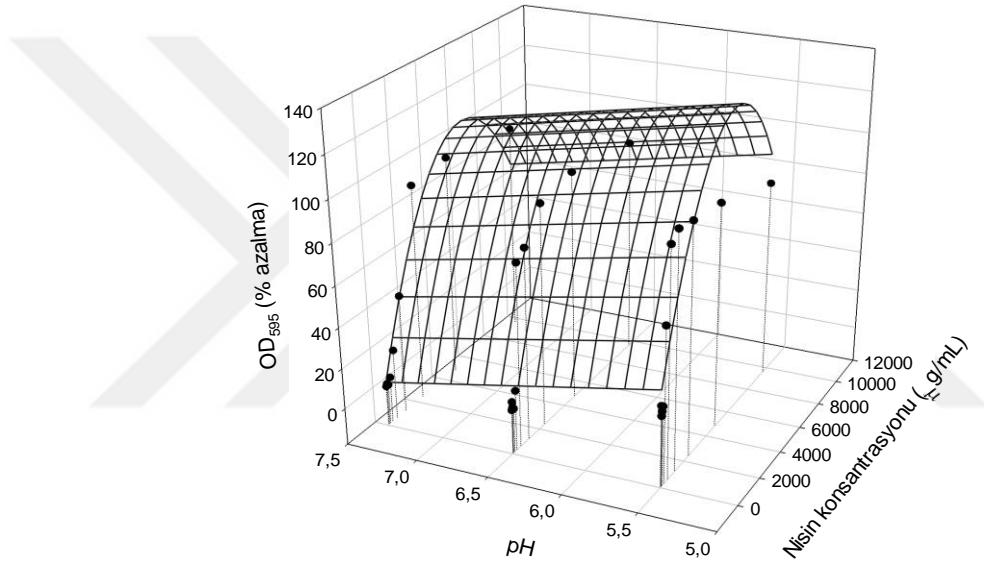
4.14 Farklı pH Koşullarında Kullanılan Nisin ve EDTA Kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 Suşunun Biyofilm Üretimi Üzerine ve Eradikasyonuna Etkisinin Matematiksel Modellerinin Tespiti

Biyofilmin yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] Nisin konsantrasyonuna (C_{Nisin}) ve pH'ye (pH) bağlı değişimi ikinci derece polinom modelle açıklanmaya çalışılmıştır.

$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = a + bC_{Nisin}^2 + cC_{Nisin} + dpH^2 + epH + fC_{Nisin}pH$$

Burada a, b, c, d, e ve f model değişkenleridir.

Daha önce yapmış olduğumuz gibi modelin uygulanması sırasında istatistiksel olarak anlam ifade etmeyen değişkenler modelden uzaklaştırılarak model veriye bir kez daha uygulanmış ve sonuç olarak hem daha az değişkenli bir model elde edilmiş hem de model değişkenleri istatistiksel olarak anlamlı hale getirilmiştir.



Şekil 4.73 Farklı pH değerlerinde nisin konsantrasyonlarının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

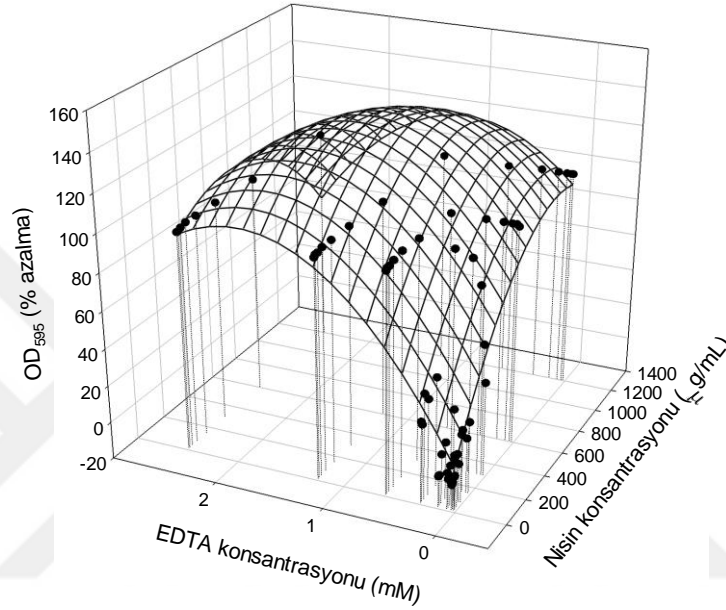
Biyofilmin yüzde azalmasının [OD_{595} (% azalma)] Nisin konsantrasyonuna (C_{Nisin}) ve pH'ye (pH) bağlı olarak değişiminin tanımlanması sonucunda aşağıdaki model elde edilmiştir:

$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = a + bC_{Nisin}^2 + cC_{Nisin} + epH$$

burada $a = 102,5$ $b = -2,8 \times 10^{-6}$, $c = 0,034$ ve $e = -13,4$ 'tür. $R^2 = 0,76$ 'dır.

Biyofilmin yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] sabit pH ($pH = 5,5$) değerinde Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı değişimi de ikinci derece polinom modelle açıklanmaya çalışılmıştır.

$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = a + bC_{Nisin}^2 + cC_{Nisin} + dC_{EDTA}^2 + eC_{EDTA} + fC_{Nisin}C_{EDTA}$$



Şekil 4.74 pH 5.5 değerinde nisin ve EDTA kombinasyonunun *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

Biyofilmin yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] sabit pH ($pH = 5,5$) değerinde Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiminin tanımlanması sonucunda aşağıdaki model elde edilmiştir:

$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = bC_{Nisin}^2 + cC_{Nisin} + dC_{EDTA}^2 + eC_{EDTA} + fC_{Nisin}C_{EDTA}$$

burada $b = -8,4 \times 10^{-5}$, $c = 0,18$, $d = -27,5$, $e = 106,8$ ve $f = -0,04$ 'tür. $R^2 = 0,83$ 'tür.

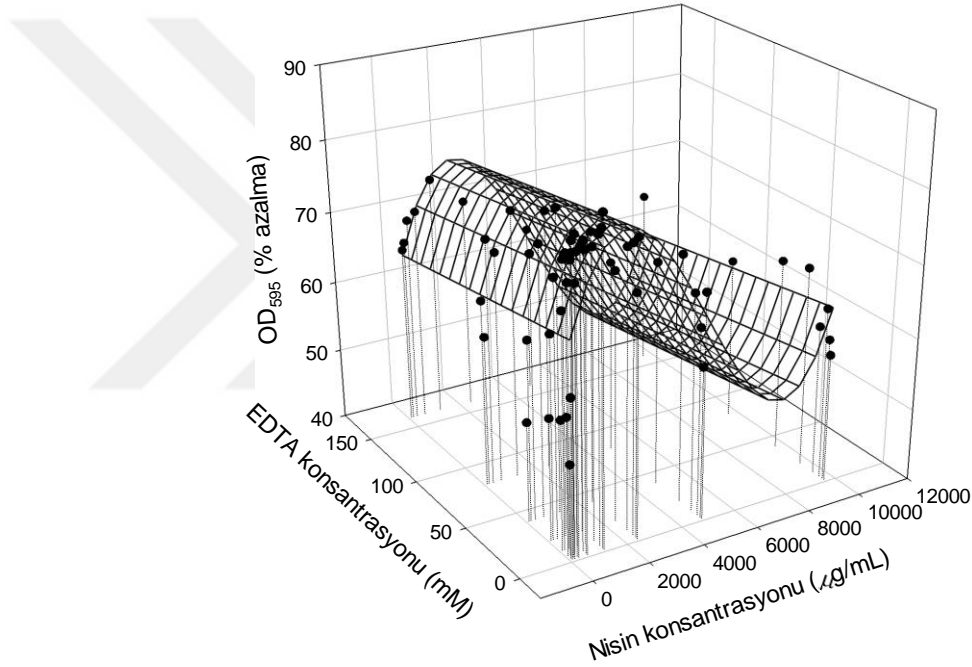
*S. Typhmuri*um 14028 suşunun 72 saat sonunda oluşturduğu olgun biyofilminin yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] sabit pH ($pH = 5,5$) değerinde Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA

(C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı değişimi üçüncü derece polinom modelle açıklanmaya çalışılmıştır.

$$OD_{595}(\% \text{ azalma})$$

$$= a + bC_{Nisin}^3 + cC_{Nisin}^2 + dC_{Nisin} + eC_{EDTA}^3 + fC_{EDTA}^2 + gC_{EDTA} + hC_{Nisin}^2C_{EDTA} + iC_{Nisin}C_{EDTA}^2 + jC_{Nisin}C_{EDTA}$$

Burada $a, b, c, d, e, f, g, h, i$ ve j model değişkenleridir.



Şekil 4.75 pH 5.5 değerinde nisin ve EDTA kombinasyonunun olgun *Salmonella* biyofilmi üzerindeki eradikasyon etkisi

Olgun biyofilmin yüzde azalmasının [OD_{595} (% azalma)] sabit pH ($pH = 5,5$) değerinde Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiminin tanımlanması sonucunda aşağıdaki model elde edilmiştir:

$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = a + bC_{Nisin}^3 + cC_{Nisin}^2 + dC_{Nisin} + gC_{EDTA}$$

burada $a = 60,3$, $b = 3,0 \times 10^{-10}$, $c = -4,4 \times 10^{-6}$, $d = 0,014$ ve $g = -0,032$ 'dir. $R^2 = 0,45$ 'tir.

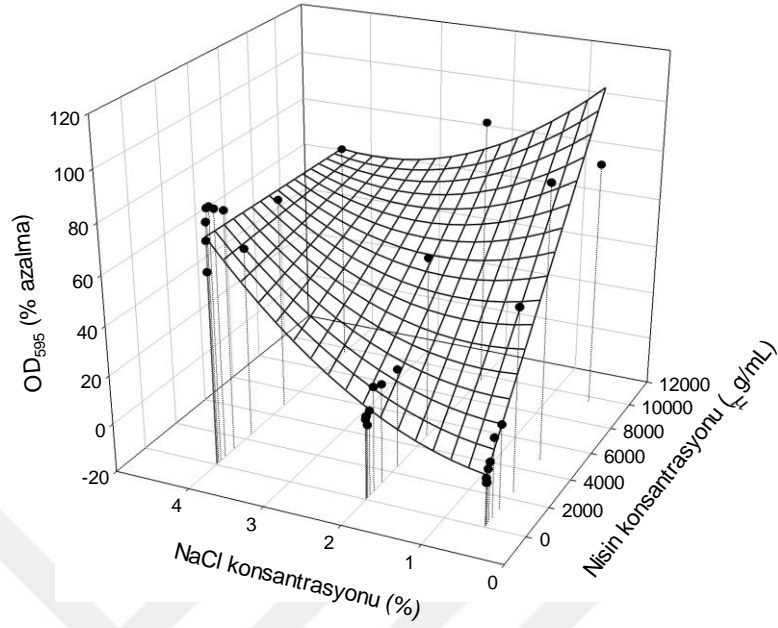
4.15 Farklı NaCl Konsantrasyonlarında, Nisin ve EDTA Kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 Suşunun Biyofilm Üretimi Üzerine ve Eradikasyonuna Etkisinin Matematiksel Modellerinin Tespiti

Biyofilmin yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] Nisin (C_{Nisin}) ve NaCl (C_{NaCl}) konsantrasyonlarına bağlı değişimi ikinci derece polinom modelle açıklanmaya çalışılmıştır.

$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = a + bC_{Nisin}^2 + cC_{Nisin} + dC_{NaCl}^2 + eC_{NaCl} + fC_{Nisin}C_{NaCl}$$

Burada a , b , c , d , e ve f model değişkenleridir.

Daha önce yapmış olduğumuz gibi modelin uygulanması sırasında istatistiksel olarak anlam ifade etmeyen değişkenler modelden uzaklaştırılarak model veriye bir kez daha uygulanmış ve sonuç olarak hem daha az değişkenli bir model elde edilmiş hem de model değişkenleri istatistiksel olarak anlamlı hale getirilmiştir.



Şekil 4.76 Farklı NaCl konsantrasyonlarında nisin konsantrasyonlarının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

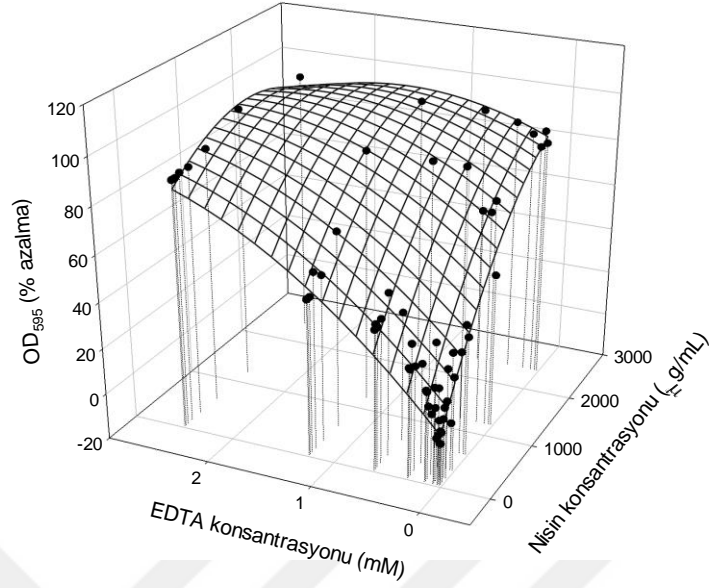
Biyofilmin yüzde azalmasının [OD_{595} (% azalma)] Nisin (C_{Nisin}) ve NaCl (C_{NaCl}) konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiminin tanımlanması sonucunda aşağıdaki model elde edilmiştir:

$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = cC_{Nisin} + dC_{NaCl}^2 + fC_{Nisin}C_{NaCl}$$

burada $c = 0,013$, $d = 4,54$ ve $f = - 0,0033$ 'tür. $R^2 = 0,87$ 'dir.

Biyofilmin yüzde azalmasının [OD_{595} (% azalma)] sabit NaCl ($C_{NaCl} = \% 0,5$) değerinde Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı değişimi de ikinci derece polinom modelle açıklanmaya çalışılmıştır.

$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = a + bC_{Nisin}^2 + cC_{Nisin} + dC_{EDTA}^2 + eC_{EDTA} + fC_{Nisin}C_{EDTA}$$



Şekil 4.77 % 0.5 NaCl konsantrasyonunda nisin ve EDTA kombinasyonlarının *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkisi

Biyofilmin yüzde azalmasının [OD_{595} (% azalma)] sabit NaCl ($C_{NaCl} = \% 0,5$) değerinde Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiminin tanımlanması sonucunda aşağıdaki model elde edilmiştir:

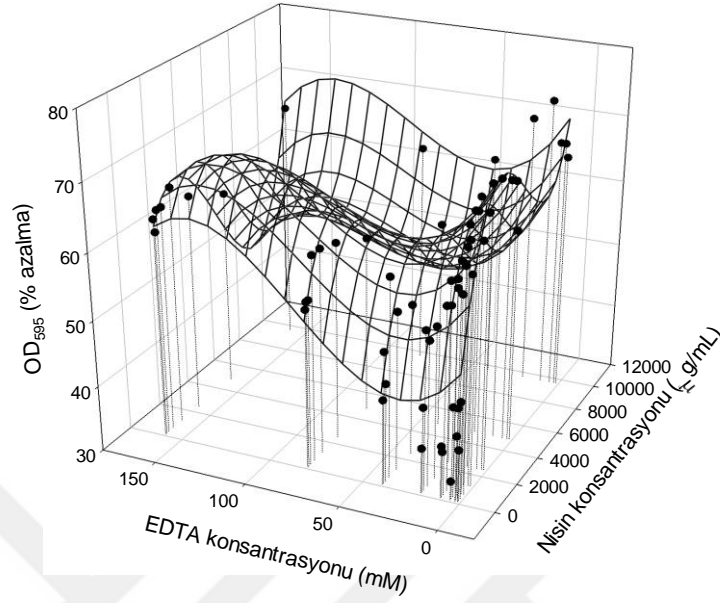
$$OD_{595}(\% \text{ azalma}) = bC_{Nisin}^2 + cC_{Nisin} + dC_{EDTA}^2 + eC_{EDTA} + fC_{Nisin}C_{EDTA}$$

burada $b = -9,7 \times 10^{-6}$, $c = 0,059$, $d = -6,97$, $e = 50,5$ ve $f = -0,013$ 'tür. $R^2 = 0,92$ 'dir.

S. Typhimurium 14028 suşunun 72 saat sonunda oluşturduğu olgun biyofilminin yüzde azalmasının [OD_{595} (% azalma)] sabit NaCl ($C_{NaCl} = \% 0,5$) değerinde Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı değişimi üçüncü derece polinom modelle açıklanmaya çalışılmıştır.

$$\begin{aligned} OD_{595}(\% \text{ azalma}) &= a + bC_{Nisin}^3 + cC_{Nisin}^2 + dC_{Nisin} + eC_{EDTA}^3 + fC_{EDTA}^2 + gC_{EDTA} \\ &+ hC_{Nisin}^2C_{EDTA} + iC_{Nisin}C_{EDTA}^2 + jC_{Nisin}C_{EDTA} \end{aligned}$$

Burada $a, b, c, d, e, f, g, h, i$ ve j model değişkenleridir.



Şekil 4.78 % 0,5 NaCl konsantrasyonunda nisin ve EDTA kombinasyonunun olgun *Salmonella* biyofilmi üzerindeki eradikasyon etkisi

Olgun biyofilmin (72 saat) yüzde azalmasının [OD₅₉₅ (% azalma)] sabit NaCl ($C_{NaCl} = \% 0,5$) değerinde Nisin (C_{Nisin}) ve EDTA (C_{EDTA}) konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiminin tanımlanması sonucunda aşağıdaki model elde edilmiştir:

$$\begin{aligned}
 OD_{595}(\% \text{ azalma}) &= a + bC_{Nisin}^3 + cC_{Nisin}^2 + dC_{Nisin} + eC_{EDTA}^3 + fC_{EDTA}^2 + gC_{EDTA} \\
 &+ hC_{Nisin}^2C_{EDTA} + jC_{Nisin}C_{EDTA}
 \end{aligned}$$

burada $a = 48,4$, $b = 2,4 \times 10^{-10}$, $c = -3,9 \times 10^{-6}$, $d = 0,018$, $e = -3,1 \times 10^{-5}$, $f = 0,008$, $g = -0,41$, $h = 5,3 \times 10^{-9}$ ve $j = -6,2 \times 10^{-10}$, tir. $R^2 = 0,65$ 'tir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Klinik ve endüstriyel alanda ciddi sorunlara sebep olan *Salmonella* suşlarını inhibe eden antimikrobiyal ajan konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla tasarladığımız çalışmanın ilk basamağında kombinasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen agar kuyu difüzyon testinde, nisin tek başına kullanıldığında inhibisyon zonu elde edilmemiş, EDTA ile birlikte kullanıldığında inhibisyon etkisi belirlenmiştir. Planktonik *Salmonella* hücrelerine karşı kullanılan diğer antimikrobiyal ajanların nisin ve EDTA ile birlikte kullanımı sonucu dirençlilik düzeylerinde azalmalar belirlenmiştir. İki antimikrobiyal ajan arasındaki sinerjik etki, ilaçların tek başına kullanımının aksine, kombinasyonu oluşturan antimikrobiyal bileşiklerin birlikte etkisini önemli miktarda artırır. Ajanların kombine kullanımı her birinin farklı etki mekanizmasından yararlanılmasıyla inatçı enfeksiyonların tedavisinde klinik açıdan önem taşımaktadır. *Salmonella* ile mücadelede en büyük problem dış membrandır (OM). OM, lipopolisakkarit lipid çift tabakadan oluşmaktadır (LPS). LPS tabakası sıkı bir kalkan oluşturur ve antibiyotikler, hidrofobik bileşikler, deterjanlar ve boyalar dahil olmak üzere birçok bileşiğe karşı bir bariyer görevi görür (Vaara 1992, Raetz ve Whitfield 2002). Anyonik LPS tabaka iki değerlikli katyonlarla stabilize edilir. Bu katyonlar giderilirse, lipopolisakkarit molekülleri OM'den salınır ve alttaki fosfolipid çift katmanının ortaya çıkmasıyla birlikte OM'nin bütünlüğü bozulur (Vaara 1992). Bakteriyosinlerin etki mekanizmaları, hücre zarında işlev gören mekanizmalar ile gen ifadesi ve protein üretimini etkileyen hücre içinde aktif mekanizmalar olarak ikiye ayrılabilir (Paul vd. 2013). Nisin, antimikrobiyal aktivitesini hem membrandaki gözenek oluşumunu sağlayarak hem de peptidoglikan biyosentezinde gerekli olan lipit II'ye bağlanarak gerçekleştirir. Nisin yalnız başına kullanıldığında genel olarak Gram negatif mikroorganizmalara karşı dış membran bariyerinden dolayı etkili değildir (Paul vd. 2013, Sing vd. 2013). Ancak EDTA gibi şelatlayıcı bir ajan ile kullanıldığında porin kanallarının açılmasıyla bakteriyel hücre içine antimikrobiyal maddenin penetrasyonu sağlanmaktadır (Chaudhary ve Payasi 2012). Çalışmamızda elde edilen veriler bu bilgiler ışığında değerlendirildiğinde; dezenfektanların ve diğer antibiyotiklerin nisin ve EDTA ile birlikte kullanımı sonucu genellikle inhibisyonun

artması, değişen hücre dış mebranın *Salmonella* hücrelerini özellikle nisinin de dahil olduğu antibiyotiklere karşı daha hassas hale getirmesiyle açıklanabilir.

Non-tifoid *Salmonella* serotiplerinde antimikrobiyal direnç küresel bir sorundur ve direnç oranı farklı serotiplere ve farklı antibiyotiklere göre değişmektedir. *S. Enteritidis*, en yaygın *Salmonella* serotiplerinden biridir ve antimikrobiyal ajanlara diğer serotiplerden daha hassastır. Bir diğer yaygın serotip olan *S. Typhimurium* antibiyotiklere daha yüksek direnç göstermektedir (Su vd. 2004). Sülfonamidler en eski antimikrobiyal ajan grubunu temsil eder ve 1930'lardan beri kullanımdadırlar. Bakteriyel enzim olan dihidropteoik asit sentetazı (DHPS) inhibe ederler. Direnç, kromozomal DHPS'deki mutasyonlardan veya sülfonamidler için daha düşük afiniteye sahip olan DHPS ilaç direnci genlerinin (*sul* genleri) edinilmesinden kaynaklanmaktadır (Guerra vd. 2004). Sülfonamidler en çok kullanılan antimikrobik maddelerden biridir ve toplamda 10 Avrupa ülkesinde veterinerlikte kullanılan antibakteriyel ajanların satışlarının % 17'sini sülfonamid ve trimetoprim (sülfonamidler veya kombinasyon halinde) oluşturmaktadır. Birçok aerobik bakteri karşısında bakteriyel aktivite gösterirler ve genellikle trimetoprim ile kombinasyon halinde kullanılır. Tıpta, gastrointestinal enfeksiyonlarda veya idrar yolu enfeksiyonlarında, hayvanlarda ise solunum sisteminin tedavisinde de kullanılmaktadır (Maka vd. 2015). Çalışmamızda MİK ve MBK testlerinden elde edilen verilere göre, sülfonamid antibiyotiğine yüksek seviyede ilaç direnci, denenen tüm suşlarda belirlenmiştir. *Salmonella* suşlarına karşı, bu antibiyotiklerin diğer antimikrobiyal ajanlar ile kombine kullanımıyla inhibisyon etkilerinin artması, bu antibiyotiklerin yüksek oranlarda kullanımını engelleyecek ve yeni nesil antibiyotik arayışına gidilmesinin önüne geçecek bir bulgudur.

Ampisilin, kloramfenikol ve sülfametoksazol-trimetoprim gibi konvansiyonel antibiyotikler artık invaziv salmonellozun tedavisi için uygun bir seçim değildir. Geleneksel antibiyotiklere karşı artan direnç nedeniyle geniş spektrumlu sefalosporinler ve fluorokinolonlar, çoklu ilaç dirençli *Salmonella* serotiplerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen ajanlar haline gelmiştir. Antimikrobiyal direnç, yatay gen transferi yoluyla direnç genlerinin edinilmesi ve popülasyondaki dirençli varyantların seçilmesi de dahil olmak üzere çeşitli şekillerde ortaya çıkar (Su vd. 2004).

Biyofilmlerdeki bakteriyel hücreler, planktonik hücreler ile karşılaştırıldığında spesifik antimikrobiyal ajanlara 10 ila 1000 kat daha az duyarlılık gösterirler (Gilbert vd. 2002). Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tedavisinde MİK değerlerinin altında uygulanan antibiyotik konsantrasyonları (sub-MİK), biyofilm oluşumunu indükleyen sinyal molekülleri olarak davranmalarının yanı sıra, antibiyotik direncinin türler içi veya arasında yatay gen transferi ile aktarılmasına aracılık ederler (Balcázar vd. 2015). Çalışmamızda ampisilin, kloramfenikol, siprofloksasin antibiyotiklerine duyarlı olduğu belirlenen suşlar, özellikle biyofilm yapılarının neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için uygulanacak antibiyotik dozuna dikkat edilmesi gerekliliğine işaret etmektedir. Zira aynı biyofilm yapısı içerisinde yer alan suşların direnç genlerini edinme oranı yüksektir ve bu antibiyotiklerin yüksek düzeylerde kullanılması söz konusu gen aktarımını yeter sayı algılama sistemlerini uyararak teşvik etmektedir.

Çalışmamızda MİK ve MBK denemelerinde en etkili ajan KHDGT olarak bulunmuştur. Çok düşük konsantrasyonda dahi (% 0.0023) *Salmonella* suşlarını % 99,99 oranında inhibe etmiştir. Daha önceki çalışmalara bakıldığında da KHDGT dezenfektanının patojen bakteriler üzerinde çok etkili bir dezenfektan olduğu görülmektedir. Organik madde yokluğunda, 10 dakika içinde 20 °C'de *S. Typhi* suşlarını % 99,99 oranında bir öldürme etkisi için gereken klorheksidin konsantrasyonu 8 mg l⁻¹'dir (Russell ve Day 1993). Klorheksidin diglukonat formülasyonları aynı zamanda, gıda endüstrisinde etken madde olarak % 0.01-0.02 konsantrasyonlarında alet ve alet yüzeylerinin sanitize edilmesi için kullanılmaktadır. % 0.05 klorheksidin diglukonat solüsyonunun *S. Enteritidis*'i tamamen inaktive ederken, *E. coli* ve *S. aureus*'un bazı klonlarının bu konsantrasyonlarda hayatta kalabildiği belirlenmiştir (Ueda ve Kuwabara 2007). Bir diğer çalışmada, % 0.2 w/v klorheksidin glukonat konsantrasyonu planktonik *Salmonella* üremesini engellemiştir (Wong vd. 2010b). Çalışmamızda düşük konsantrasyonda etkili olan bir diğer antimikrobiyal maddenin sitrik asit (CA) olduğu belirlenmiştir. % 0.312 CA konsantrasyonu *Salmonella* suşlarını % 99,99 oranında inhibe etmektedir. Araştırmacılar sitrik asitin *Salmonella*'ya karşı antimikrobiyal etkisinin diğer asidik bileşiklere göre; özellikle laktik asit ve hidroklorik asitten, daha etkili olduğu belirlemiştir (Nazer vd. 2005). Sitrik asit ve laktik asidin üç dilüe konsantrasyonu (1.0, 3.0 ve 5.0) kullanılarak *S. Typhimurium* ve *E. coli* kültürlerinin

üremeleri üzerine etkisi araştırılan bir diğer çalışmada, 12 gün boyunca sığır eti örneklerinde gözlenen popülasyonlar üzerine en etkili CA konsantrasyonunun % 5.0 olduğunu belirlenmiştir (Hussain vd. 2015). Çalışmamızda *Salmonella* suşlarını inhibisyonu için gerekli olan CA ve KHDGT konsantrasyonlarının literatürde yer alan diğer çalışmalara kıyasla daha az olduğu görülmektedir.

Antimikrobiyal ajanların hangi konsantrasyonlarda daha etkin olduğunu ve ajanlar arasındaki etki tipini belirlemek amacıyla fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) ve fraksiyonel bakterisidal konsantrasyonu (FBK) denemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre FİK indeksi (FİKİ) hesaplanırken kullanılan üreme olmayan kuyucuğun seçimi test sonuçlarını büyük oranda değiştirmektedir. Dama tahtası yöntemi kullanılarak yorumlanan sinerji belirleme çalışmalarında, araştırmacılar kullandıkları yorumlama yöntemlerini tam olarak açıklamamaktadır. Ayrıca yorumlama yöntemleri dışında, kullanılan izolatlar ve izolatın yüksek direnç ya da duyarlılık düzeyleri sinerjik aktiviteyi değiştirebilmektedir (Çoban vd. 2009, Yalçın vd. 2010). Bu nedenle uygun yorumlama yöntemini belirleyebilmek için ‘zaman-ölüm’ gibi diğer kombinasyon testlerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırma gereksinimi vardır. Zaman-Ölüm denemelerinde, denenen dezenfektanların etkisinin ne kadar sürede gerçekleştiği tespit edilmiştir. FİK ve FBK denemelerinden elde edilen verilere göre, kullanılan antimikrobiyal ajanların hiçbiri nisin ile antagonistik etki göstermemektedir. EDTA gibi şelatlayıcı ajanlar ile nisin kombinasyonu Gram negatif bakterilere karşı nisin antimikrobiyal etkinliğini arttırmak için etkili bir yaklaşımdır (Gill ve Holley 2003, Norhana vd. 2012, Khare vd. 2014, Khan vd. 2015). EDTA’nın, ilaçların bakteriyel hücrelere penetrasyonunu arttırması sonucu ilaç duyarlılığı artmakta ve MİK değerleri azalmaktadır (Chaudhary ve Payasi 2012). Çalışmamızda kullanılan tüm *Salmonella* suşlarına karşı nisin ve EDTA’nın kullanımı ile görülen sinerjik etki literatür verileri ile benzerdir. EDTA-nisin kombinasyonu ile kullanılan nisin konsantrasyonu yaklaşık 8 kat azalmıştır. Zaman-ölüm denemelerinden elde edilen veriler sinerjik etkiyi doğrulamaktadır. Ancak, 3-12 saatler arasında görülen kombinasyonun sinerjik etkisi inkübasyon süresi uzadıkça azaldığı ve antibakteriyel etkinin bakteriyostatik olduğu belirlenmiştir. Genel olarak nisin ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen en önemli sonuç; nisin, ortam pH’ından çok çabuk

etkileniyor olmasıdır. Yüksek asiditeye sahip olan ortamlarda nisin patojenler üzerindeki inhibisyon etkisinin arttığı gözlenmiştir (De Vuyst ve Leroy 2007). Dama tahtası yönteminde, nisin-EDTA kombinasyonu 18 saat sonunda çalışmamızda kullanılan *Salmonella* suşlarını % 99,99 oranında inhibe etmektedir. Ancak aynı süre sonunda bu inhibisyon etkisinin zaman ölüm denemelerinde görülmemesi, yöntemde kullanılan inkübasyon koşullarından (aerob koşullar) veya ajanların sinerjik etkilerinin besiyerindeki bakteriyel üremeden kaynaklı artan pH değişimlerinden etkilenmesi nedeniyle olabilir. Nisin, bulunduğu ortamda çok uzun süre kalamayan ve yapısı çabuk bozulan peptid yapıda bir molekül olduğu bilinmektedir (Dodd vd. 1990). Çalışmamızda nisin, zaman ölüm denemelerinde 24 ve 48 saatlerin sonunda yüksek konsantrasyonlarda (9600 µg/mL) *Salmonella* suşları üzerinde inhibisyon etkisi göstermektedir. Ancak, benzer etkinin EDTA ile daha düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında görülememesinin nedeni, nisin çok çabuk bozulan yapısı olabilir. Bu nedenle nisin konsantrasyonunun artırılması ya da sürekli sistemlerle ortama kademeli olarak nisin ilave edilmesi ile daha etkili sonuçlar elde etmek mümkün olacaktır.

Asetik, laktik ve sitrik asitler gibi organik asitler, mikrobiyal üremeyi kontrol etmek ve gıdaların raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadır (Cortesi vd. 2009). Farklı saklama koşullarında (10, 21, 37 °C), tahin içerisindeki *S. Typhimurium* üremesinin sitrik asit ile engellendiği bir çalışmada % 0.5 ve daha az konsantrasyonlardaki sitrik asitin 28 günlük inkübasyon sonunda hücreleri ortalama 3 log₁₀ cfu/mL azalttığı belirlenmiştir (Al-Nabulsi vd. 2014). Yapılan çalışmalar, nisin sitrik asit gibi gıda katkı maddeleri ile birlikte kullanıldığında sinerjik etki gösterdiğini kanıtlamıştır (Bari vd. 2005, Ukuku vd. 2005). Champion vd. (2017), nisin A ve biyomühendislik ile üretilen nisin varyantlarının sitrik asit ile kombine etkilerini Gram negatif patojenler üzerinde araştırmışlar ve gıda sınıfı antimikrobiyal sitrik asidin eklenmesiyle (30 mM) *Cronobacter sakazakii*'ye karşı tek başına nisin kullanımına kıyasla çok daha etkin olduklarını saptamışlardır. Nisin ve sitrik asitin birlikte kullanıldığında sinerjik etki göstermeleri, esasen sitrik asidin ortam pH'sını düşürücü etkisinden kaynaklanmaktadır (Mani-López vd. 2012). Çalışmamızda bir diğer şelatlayıcı ajan olan sitrik asitin nisin ile kombinasyondaki etkisi *Salmonella* suşlarına göre farklılık (kısmi sinerji veya indiferans etki) göstermiştir. Nisin ile birlikte kullanıldığında kombinasyondaki sitrik asit konsantrasyonu 4 katı kadar (MİK değerinin

1/4'ü) kadar azalmıştır. Kombinasyona EDTA ilavesi ile CA MİK değeri 16 kat azalmıştır. Zaman-ölüm denemelerinden elde edilen veriler, nisin ve MİK değerinin altında kullanılan CA kombinasyonu *Salmonella* suşları üzerinde 12 ila 48. saatlerin sonunda canlı hücre sayısında $\geq 2 \log_{10}$ azalma sağlayarak sinerjik etkiyi doğrulamıştır. Bu veriler literatür verileri ile paralellik göstermiştir.

Klorheksidin, cilt antiseptisi için klinik uygulamada en yaygın kullanılan antimikrobik maddelerden biridir ve Enfeksiyon Kontrolü (EPIC) ve Sağlık Enfeksiyon Kontrol Uygulamaları Danışma Komitesi (HICPAC) tarafından Kanıta Dayalı Uygulama içerisinde önerilmektedir. Antimikrobiyal etkinliği, pH ve organik madde de dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından önemli ölçüde etkilenmektedir ve yöntemlerin iyileştirilmesi için ek stratejiler düşünülmelidir (Karpanen vd. 2008). KHDGT'nin az da olsa insan sağlığına olan zararlı etkilerinden dolayı, özellikle endodonti alanında KHDGT kullanımını azaltmak amacıyla nisin ile kombinasyon etkisi Gram pozitif bakteriler üzerine araştırılmış ancak, FİK ve FBK testleri ile nisin ve klorheksidin arasında herhangi bir etkileşim bulunamamıştır (Tong vd. 2011). Çalışmamızda sinerji testlerinden elde edilen verilere göre, nisin ve KHDGT kombinasyonunun etkisi kullanılan suşa ve uygulama süresine bağlı olarak farklılık göstermiştir ve bu etkiler sinerjik ve indiferans etki olarak belirlenmiştir. Ayrıca kombine kullanım ile *Salmonella* suşlarını inhibe edebilmek için çok az KHDGT konsantrasyonlarına (% 0.0005) ihtiyaç duyulmaktadır ve nisin-EDTA ile kombine kullanıldığında *Salmonella* suşlarını 24 saat sonunda tamamen inhibe ettiği saptanmıştır. Nisin ile kombine kullanımı sonucu, KHDGT MİK konsantrasyonu 2 ila 4 kat azalmıştır. Düşük klorheksidin diglukonat konsantrasyonları, hücre membranlarında bulunan anyonik bölgelere sıkıca bağlanır. Bu tür etkileşimlerin membran akışkanlığını azalttığı, hücre zarlarının osmotik basınç düzenlenmesi ve fizyolojik fonksiyonlarının yanı sıra biyofilm gelişimini etkilediği kanıtlanmıştır (Ebrahimi vd. 2014). KHDGT uygulandığı yüzeyde uzun süre kalabilen ve iritasyonu az olan bir antimikrobiyal bileşiktir. *Salmonella* suşlarına karşı çalışmamızla birlikte Gram negatif bakterilere karşı ilk kez denenen nisin ve KHDGT kombinasyonunun etkinliği, KHDGT'nin nisin gibi bakteriyosinler ile kullanımıyla uygulama konsantrasyonlarının çok daha aza çekilmesinin mümkün olabileceğini ve insan sağlığı üzerindeki yan etkilerinin tamamen ortadan kaldırılabilceğini

göstermektedir. Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde bulgularımızın literatüre katkı değeri ve uygulama potansiyeli taşıdığı görülmektedir.

Son yıllarda yapılan nisin-antibiyotik araştırmaları Gram negatif bakterilere yönelmiştir. Örneğin nisinin, *P. fluorescens*'e karşı penisilin, streptomisin, kloramfenikol ve rifampisin antibiyotikleri ile; *S. Choleraesuis*, *P. aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* ve *E. coli*'ye karşı kolistin ile sinerjik bir etki gösterdiği belirlenmiştir (Naghmouchi vd. 2012, 2013). Benzer şekilde nisin-seftriakson ve nisin-sefotaksim ile, *S. Typhimurium*'un klinik izolatlarına karşı uygulandıklarında, dama tahtası ve zaman öldürme testleri ile belirgin şekilde sinerjik oldukları bulunmuştur (Rishi vd. 2014). Çalışmamızda antibiyotik ve nisin kombinasyonlarında streptomisin-nisin kombinasyonu, sülfanomid-nisin kombinasyonuna göre daha etkili bulunmuştur. İndiferans etki görülen nisin-sülfanomid kombinasyonunda inhibisyon etkisi sülfanomid antibiyotiğinin yaptığı etki kadardır. CA etkisine benzer şekilde, streptomisin antibiyotiğinin kombinasyondaki etkisi de suşa göre (*S. Typhimurium* 14028 suşunda kısmi sinerji, *S. Typhimurium* SL1344 suşunda indiferans etki) farklılık göstermiştir. Aminoglikozid antibiyotik grubu içerisinde yer alan streptomisin antibiyotiği, ribozomun 30S alt ünitesine bağlanıp protein sentezini durdurarak etki etmektedir (Kohanski vd. 2010). Bunun dışında *P. aeruginosa*'da, aminoglikozitlerin dış zardaki Mg^{2+} ile etkileşimi ile aminoglikozid alımında membran geçirgenliğine neden olduğu belirlenmiştir. Aminoglikozid aracılı dış membran permeabilizasyonu (geçirgenlik) mekanizması LPS- Mg^{2+} çapraz köprülerinin bozulması ile ortaya çıkar ve bu bozulma aminoglikozitlerin katyonik yapısından kaynaklanır (Hancock 1981, Taber vd. 1987, Hancock vd. 1991). Bu antibiyotikler, nisinin bakteri OM'sinde permeabilizasyonunun arttırmasını sağlayabilmektedir. Bu daha fazla inhibisyona neden olan antibiyotiklerin daha fazla nüfuz etmesine izin verebilir. Antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkması, halk sağlığı açısından önemli bir konudur. Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi giderek daha pahalı ve zor hale gelmektedir. Farklı mekanizmalara sahip antibiyotik kombinasyonlarının kullanılması, bakterilerin bu kombinasyonlara dirençli hale gelmesi için birden fazla mutasyon geçirmesi zorunluluğunu ortaya çıkartmaktadır ki, bu olasılık çok düşük olduğundan, günümüzdeki ana sorun olan direnç gelişimini önleyecek bir potansiyel taşımaktadır.

Araştırma sonuçları *Salmonella* inhibisyonunda yüksek etkili antimikrobiyal madde kombinasyonunun geliştirilmesi için bir plan olarak kullanılabilir. Bu çalışma, nisin sülfanomid antibiyotiği haricindeki kullanılan diğer antimikrobiyal maddeler ile birlikte planktonik *Salmonella* suşlarına karşı çok düşük konsantrasyonlarda etki etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Kombinasyonu kullanarak daha hızlı etkiye sahip olmanın yanı sıra, antimikrobiyal maddelerin konsantrasyonunun azaltılması, patojenlerde direnç geliştirme şansının ve bununla birlikte ilacın ilgili yan etkilerinin azaltılması sağlanabilir. Ancak bu kombinasyonların bağırsak mikrobiyotasına karşı olan etkileri klinik olarak değerlendirilmelidir.

İnsan gastroenteritinin en önemli nedenlerinden biri gıda kaynaklı *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* serovaryeteleridir. Bu serovaryetelerin çeşitli çevresel koşullarda biyofilm yapıları içerisinde hayatta kalabildiği bilinmektedir ve gıda işlenen ortamlardaki çimento, plastik ve paslanmaz çelik gibi yüzeylerde biyofilm üretebildiği saptanmıştır. Gıda işleme sanayilerindeki biyofilmler, sanitizer uygulamalarından sonra bile hayatta kalabilirler ve ürün kontaminasyonu rezervuarlarını oluşturarak bozulma veya gıda güvenliği risklerine neden olabilirler. Bu durum, gıdaların raf ömürlerinin kısılmasında ve gıda kaynaklı hastalıkların yayılmasında büyük risk oluşturmaktadır (Costerton vd. 1995, Davey ve O'Toole 2000, Joseph vd. 2001, Møretro vd. 2003). Bu nedenle gıda işleme süreçlerindeki sanitasyon işlemlerinin biyofilm formasyonu dikkate alınarak yapılması önem arz etmektedir. Çalışmamızın ikinci basamağında; nisin, antimikrobiyal ajanlar ve bakteriyofajların kombine kullanılması ile *Salmonella* biyofilm yapılarının oluşumu ve eradikasyonu üzerinde etkileri araştırılarak klinik ve endüstriyel süreçlerde kullanılacak matematiksel modellerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Biyofilm ile mücadelede, seçilecek antimikrobiyal madde kombinasyonlarının tespiti ve deneysel etkinliklerinin belirlenmesi için en yüksek düzeyde üretilmiş biyofilmlere karşı denenmesi önemlidir. Bu nedenle *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin zamana bağlı değişimi ve olgun biyofilm üretme kapasitelerinin belirlenmesi kritik bir önem taşımaktadır. Çalışmada en yüksek biyofilm miktarları *S. Typhimurium* suşlarında tespit edilmiştir. 20 °C'de; *S. Typhimurium* 14028 suşu 72 saat, *S. Typhimurium* SL1344 suşu ise 24 saat sonunda olgun biyofilm üretmektedir. *S. Enteritidis*'in olgun biyofilm yapısı 37 °C'de 24 saat

sonunda oluşmaktadır ve Typhimurium serovaryetelerine göre daha az miktarda biyofilm ürettiği belirlenmiştir. Biyofilm üretim miktarı ve optimum biyofilm üretim sürecinde farklılık görülmesinin temel kaynağı, suşlar arasında değişiklik gösteren genetik ifade programlarıdır (Speranza vd. 2011, Karaca vd. 2013). 20 °C, *Salmoenalla* biyofilm oluşumu için optimum koşullardır ve iki ayrı *csg* operonunun 20 °C'de yüksek oranda eksprese edildiği bilinmektedir (Römling ve Rohde 1999). Bu sıcaklık, *Salmonella*'nın çevresel koşullar altında hayatta kalmasına katkıda bulunabilir.

Salmonella suşlarının biyofilm matriksinde kıvrımlı fimbriya ve selülozun araştırıldığı denemelerden elde edilen verilere göre; *S. Typhimurium* 14028 ve SL1344 suşlarının biyofilm yapılarının 'rdar', *S. Enteritidis* DMC8 suşunun ise 'bdar' morfotipi olarak belirlenmiştir. Kıvrımlı fimbriya (curli), 'rdar' ve 'bdar' morfotiplerinin matriksinde bulunmaktadır ve *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerin dış yüzeyinde bulunan agregatif fiber yapılarıdır. Biyotik yüzeylerin yanı sıra; cam, plastik ve paslanmaz çelik gibi abiyotik yüzeylere bakteriyel adezyonu gerçekleştirerek biyofilm oluşumuna katkı sağlamaktadır. *Salmonella* biyofilmleri içerisindeki bir diğer matriks bileşeni olan selülozun biyofilm yapılarının elastikiyetini sağlayarak çevresel stres koşullarına dayanıklılığı arttırdığı bilinmektedir (Solano vd. 2002, Barnhart ve Chapman 2006, Cegelski vd. 2009, Gonzalez-Escobedo vd. 2013). Ancak matriksinde yalnız selüloz içeren 'bdar' morfotipindeki biyofilm yapılarının; çevresel stres koşullarına, dezenfektan ve antibiyotik uygulamalarına 'rdar' morfotipine göre daha duyarlı olduğu bilinmektedir (White vd. 2006, Vestby vd. 2009). Bu nedenle, özellikle gıda üretiminde dezenfeksiyon ve sterilizasyon aşamalarının etkin bir şekilde gerçekleştirilmesinde 'rdar' morfotipinin esas alınması önem arz etmektedir. Çalışmamızdaki suşlar; biyofilm yapısının bir diğer formu olan sıvı-hava fazında oluşturdukları pelikül oluşumuna göre değerlendirildiğinde, yapısında sadece kıvrımlı fimbriya bulunduran *S. Enteritidis* DMC8 suşunun oluşan pelikül yapısı karıştırma ve çalkalama işlemleri sonrası kolayca dağılmıştır. 'rdar' morfotipinde bulunan diğer Typhimurium serovaryeteleri ise, karıştırma ve çalkalama uygulamaları sonrası pelikül yapısı rijit formda kalıp yüksek düzeyde direnç göstermiştir. Pelikül oluşturmayan, selüloz ve fimbriya üretimi bakımından mutant *S. Typhimurium* suşlarıyla, doğal tip suşların farklı stres koşullarına duyarlılıklarının araştırıldığı bir çalışmada pelikül içerisindeki hücrelerin klor ve reaktif

sodyum hipoklorit streslerine karşı planktonik fazdaki hücrelerden çok daha dirençli olduğu saptanmıştır (Scher vd. 2005). *Salmonella* serovaryetelerinin pelikül oluşturma özellikleri, mikrotitre plaklardaki oluşturdukları biyofilm miktarları ve biyofilm matriks kompozisyonları belirlendiğinde suşların abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilm yapıları içerisinde ne kadar süre varlıklarını devam ettirebilecekleriyle ilgili tahmin yürütülebilir.

Antimikrobiyal maddelerin ve bunların kombinasyonlarının minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, *S. Typhimurium* 14028 suşunun 72 saat inkübasyon süresi sonunda oluşturduğu biyofilm yapısı üzerinde kullanılan ajanların tek başlarına ve nisin ile kombinasyon etkileri araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler göstermektedir ki; CA ve KHDGT, nisin ve EDTA kombinasyonları ile hazırlanan MİK değerinin altındaki konsantrasyonlarda dahi *Salmonella* olgun biyofilmini % 80'in üzerinde eradike edebilmiştir. *Salmonella* ve *E. coli* gibi bakteriyel patojenlerin planktonik üreme ve biyofilm oluşumu üzerine klorheksidinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, planktonik hücreleri inhibe eden konsantrasyon ile biyofilm oluşumunu engelleyen konsantrasyonun aynı olduğu belirlenmiştir (Ebrahimi vd. 2014). MİK değerinden yüksek konsantrasyonlardaki klorheksidinin planktonik üreme ve biyofilm oluşumu üzerinde benzer etkilere sahip olduğundan bakteri enfeksiyonunu kontrol etmek için MİK değerinden yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulmadığı belirtilmiştir. Ancak sub-MİK değerinde kullanılan klorheksidinin de biyofilm oluşumunu indüklediği saptanmıştır (Ebrahimi vd. 2014). Biyofilm ve planktonik *Salmonella* arasındaki duyarlılığın karşılaştırılması için tasarlanan bir başka çalışmada, 3 günlük *Salmonella* biyofilmlerinin, planktonik *Salmonella*'ya kıyasla, benzalkonyum klorid, klorheksidin glukonat, sitrik asit, kuaterner amonyum bileşikleri, sodyum hipoklorit ve etanol gibi dezenfektanlardan daha az etkilendiği belirlenmiştir (Wong vd. 2010b). Bunun yanında farklı olgunluktaki biyofilmlerin (3, 5 ve 7 günlük biyofilm) dezenfektan direnci ile ilişkili olmadığı, dezenfektan konsantrasyonu ve etki süresinin sanitizasyonda daha önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Wong vd. 2010a). Genel olarak, inkübasyon sonrasında biyofilm ile ilişkili hücrelerin üremesini önlemek için yüksek dezenfektan konsantrasyonları ve artan temas süreleri gerekmektedir. Ancak çalışmamıza benzer şekilde, düşük

dezenfektan konsantrasyonlarının *Salmonella* biyofilmlerine karşı daha etkili olduğu saptanmıştır (Wong vd. 2010b, Ebrahimi vd. 2014). Bir başka çalışma, çok-türlü biyofilmler üzerinde klorheksidin etkinliğinin sınırlı olabileceğini göstermiştir. % 4 klorheksidin uygulaması sonrası tıbbi kaplamalar üzerindeki *S. aureus* tamamen ortadan kalkarken ($>8 \log_{10}$ azalma), *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* canlılığını sürdürebilmiştir ($<3 \log_{10}$ azalma) (Touzel vd. 2016). Laboratuvar koşullarının aksine doğal ortamlarda aynı biyofilm yapısı içerisinde birden çok tür bulunabildiği bilinmektedir. Bu durum, düşük konsantrasyonlarda kullanılan klorheksidin ve sitrik asit gibi ajanların, patojenlerin enfeksiyonunu ve yayılımını kontrol etme kabiliyetini tehlikeye sokabilir. Nisin gibi aynı etki mekanizmasına sahip antimikrobiyal maddeler ile kombine kullanımı farklı suşların çok-türlü biyofilmlerdeki yaşayabilirliğini sınırlandırabilir. Gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan farklı yüzeylerde biyofilm oluşturan *Salmonella*'nın planktonik hücreleri ve biyofilmleri üzerine sitrik asitin de dahil olduğu organik asitler ve ozonlu suyun kombine etkileri araştırılan bir çalışmada, planktonik hücreler üzerinde en etkili sitrik asit konsantrasyonunun % 2 olduğu belirlenirken, biyofilmin duyarlı olduğu konsantrasyon % 4 olarak belirlenmiştir (Singla vd. 2014). Klorheksidinin bitkisel yağlar ile biyofilmler üzerine birlikte kullanıldığı (Filoche vd. 2005, Karpanen vd. 2008), nisin ile birlikte planktonik *E. faecalis* suşları üzerine kullanıldığı (Tong vd. 2011) çalışmalar mevcuttur. Fakat *Salmonella* suşlarının oluşturmuş olduğu biyofilmlerin eradikasyonunda nisin ve KHDGT ajanlarının beraber kullanıldığı bir çalışma literatürde bulunmamıştır. *Salmonella* biyofilm eradikasyonu ile ilgili olan çalışmamızda KHDGT, EDTA ve nisin kombine kullanımıyla, olgun biyofilm yapısının % 86 oranında eradikasyonu sağlanmıştır. Bu açıdan çalışmamız orijinalite taşımakta olup endüstriyel ve tıbbi uygulama potansiyeli taşımaktadır.

Biyofilmlerdeki bakterileri inhibe etmek veya öldürmek için gereken antibiyotik konsantrasyonlarının, planktonik suşları inhibe etmek için gerekli olan konsantrasyonlardan 500 ila 1000 kat daha fazla olabileceği bilinmektedir (Sedlacek ve Walker 2007). Nisinin gıda kontaminantı patojenlerin oluşturduğu biyofilm üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* biyofilmlerini sırasıyla % 93, % 77 ve % 65 oranında eradike eden nisin konsantrasyonunun 4×10^4 IU/mL olduğu belirlenmiştir. Ancak gıdalardaki nisinin kabul

edilebilir konsantrasyonu uygulandığında (4×10^3 IU/mL) biyofilmdeki eradikasyon yüzdeleri sırasıyla % 87, % 57 ve % 30 oranlarında gerçekleşmiştir (Mahdavi vd. 2007). Çalışmamızda *S. Typhimurium* serovaryetesinin oluşturduğu olgun biyofilmi maksimum oranda (% 54) eradike eden minimum nisin konsantrasyonunun 9600 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Kullanılan antibiyotikler arasında en fazla eradikasyon oranını (% 89), 8192 µg/mL konsantrasyonundaki STR antibiyotiği ile sağlanmıştır. Kullanılan hiçbir antibiyotik ile biyofilm yapısı tamamen ortadan kaldırılamamıştır. *S. Typhimurium* 14028 olgun biyofilmini maksimum seviyede eradike eden antibiyotik konsantrasyonları (MBEC değerleri) MİK değerlerinden 2 ila 64 kat daha fazla oranda olarak değişkenlik göstermiştir. Tezel vd. (2016), *Salmonella* Infantis suşlarının oluşturduğu biyofilmdeki en yüksek direnç oranlarını neomisin antibiyotiği için 12xMİK, spektinomisin ve streptomisin antibiyotikleri için 10xMİK olarak belirlemiştir. İlaç eflusu, Gram negatif bakterilerde antibiyotik direncinin anahtar mekanizmasıdır. Bu sistemler çözünen maddeleri hücre dışına pompalarlar. Bakteriyel ilaç eflus pompaları; bileşen sayısı, zar boyunca geçişli bölge sayısı, pompa tarafından kullanılan enerji kaynağı ve pompalanan molekül türlerine göre altı aileye ayrılmıştır. Gram negatif bakterilerdeki klinik olarak önemli olan eflus sistemleri RND süper ailesine aittir ve tipik olarak bir sitoplazmik membran pompasından, bir periplazmik proteinden ve bir dış zar protein kanalından oluşur (Soto 2013). Son yıllarda *Salmonella*'daki çoklu ilaç dirençliliğine sebep olan eflus pompalarının biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. 9 eflus mutantının kıvrımlı fimbriya üretilmediği ve biyofilm oluşturmadığı belirlenmiştir (Baugh vd. 2012). Biyofilm tarafından sağlanan direnç sadece glikokaliksin bir sonucu değil aynı zamanda altta yatan heterojen bakteri alt popülasyonlarından da kaynaklanabilir. Bazı biyofilm alt popülasyonları antibiyotikleri bozan enzimler üretebilirken, diğer alt popülasyonlar da eflus pompalarını düzenlemektedir (Schroeder vd. 2017). Bakteriyel hücreler genetik değişikliğe uğramadan antibiyotiklerin etkilerinden kurtulabilirler ve bu hücreler persistanlar olarak bilinirler. Bu persistan hücreler üssel olarak çoğalan hücrelerin küçük bir fraksiyonudur (yaklaşık % 0.01) ancak biyofilm yapısı içerisinde ve durağan fazda önemli bir fraksiyon haline gelirler (% 1'e kadar). Bu fazda hücreler, antibiyotiklere karşı oldukça toleranslıdır ve genetik değişikliğe uğramadan bu duruma erişen bakterilerin bir alt popülasyonunu oluştururlar. Antibiyotik seviyesi

düştüğünde, persistanlar canlı kalmaya devam eder ve biyofilm popülasyonunu tekrar arttırır. Genel olarak, çoğu antibiyotığın etkinliği bakterilerin metabolik aktivitesine dayanmaktadır. Örneğin β -laktamlar aktif olarak üreyen hücrelerin hücre duvarı sentezini hedef alırken, kinolonlar DNA sentezini inhibe ederler. Dolayısıyla, üremesi durmuş veya yavaş üreyen hücreler, antibiyotik etkilerine daha az duyarlıdır. Bu durum, uzun süreli durağan bir safhaya zorlanmış kültürler kullanılarak *in vitro* olarak gösterilmiştir. Aynı antibiyotik basıncında logaritmik büyüme fazındaki hücrelere kıyasla hayatta kalma oranının arttığı persistan fenotipi, ilaç kayıtsızlığı olarak adlandırılan bir özelliği ortaya çıkartmaktadır (Finkel 2006, Wood vd. 2013, Schroeder vd. 2017). Biyofilm yapısı içerisindeki persistan hücrelerin varlığı ve eflüks mekanizmaları biyofilmin antibiyotiklere olan yüksek direncini kısmen açıklamaktadır.

Biyofilm içerisindeki kompleks polimerik matris, çoğunlukla antimikrobiyal maddenin biyofilmin en derin katmanlarına penetrasyonunu engeller. Bu nedenle, biyofilmleri hedef alan alternatif terapötik seçenekler ve etkili antimikrobiyal kombinasyonların aranmasına önem verilmektedir. Bakteriyosinlerin antibiyotiklerle kombinasyonları, bir hedef patojeni öldürmek için gereken antibiyotik konsantrasyonunu düşürebilir ve böylece antibiyotik ile ilişkili olumsuz yan etkileri azaltabilir. Ayrıca bakteriyosinlerin antibiyotiklerle sinerjik kombinasyonları, daha pahalı antibiyotiklerin sentezindeki mali yükü de azaltabilmektedir (Mathur vd. 2017). Son zamanda yapılan bir araştırmada, nisinin çeşitli antibiyotiklerle sinerjik etkileşime girdiği ve bu kombinasyonların *Staphylococcus* biyofilmlerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Field vd. 2016a). Mataraci ve Dosler (2012) tarafından yapılan ayrı bir araştırmada, nisin ile kombine edilen antibiyotiklerin metisilin dirençli *S. aureus* biyofilmi üzerine olan potensiyel etkisi araştırılmış ve antibiyotik-nisin kombinasyonlarının 1xMİK değerlerinde biyofilm oluşumunun önlenmesinde etkili olduğu saptanmıştır (Mataraci ve Dosler 2012). Gram negatif bakterilerle yürütülen bir araştırmada, nisinin *P. aeruginosa* biyofilmlerine karşı polimiksinlerle birlikte kullanıldığında etkili olduğu saptanmıştır. Örneğin; 0.25x MİK nisin ile kombine edildiğinde, *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunu önlemek için polimiksin konsantrasyonlarının (0.5x MİK veya 0.2x MİK) azaldığı belirlenmiştir (Field vd. 2016b). Çalışmamızdan elde edilen veriler literatür verilerine benzer şekilde göstermiştir ki; *S. Typhimurium* 14028 biyofilmi üzerine etkileri araştırılan

antibiyotikler, nisin ile birlikte kullanıldıklarında, tek başına eradikasyon sağlayan antibiyotiklerin MBEC değerlerini 2 ila 32 gibi değişen oranlarda azaltmakta ve bu kombinasyonlar % 80'in üzerinde eradikasyon sağlamaktadır. En yüksek sinerji, nisin ile AMP antibiyotiği arasında belirlenmiştir ve nisin ile beraber kullanıldığında MİK değerindeki AMP konsantrasyonunda (2 µg/mL) dahi % 88 oranında eradikasyon elde edilmiştir. Kullanılan antibiyotiklerin ve kombinasyonların hiçbiri biyofilmi tamamen ortadan kaldıramazken, genel olarak eradikasyon etkilerinin nisin, EDTA ve antibiyotik üçlü kombinasyonları ile arttığı belirlenmiştir. Sonuçlarımıza benzer şekilde, daha önce yapılan birçok çalışma, EDTA ile yapılan kombinasyonlarının; biyofilm yapısını bozarak biyofilmden gelen organizmalar üzerinde sinerjik olarak etki etmede kullanışlı olduğunu göstermiştir (Evans ve Holmes 1987, Raad ve Sherertz 1994, Rose 2000). Bunun yanında, SUL antibiyotiği önceki denemelerde planktonik hücrelere karşı nisin ile birlikte kullanıldığında sinerjik etki göstermemiş ve ikili ve üçlü kombinasyonlardaki antibiyotik konsantrasyonunda bir azalma sağlanmamıştır. Ancak olgun biyofilm üzerine uygulanan SUL ve nisin kombinasyonu ile MBEC değerinin (8192 µg/mL) 8 kat azalttığı belirlenmiştir ve bu değer (1024 µg/ml) MİK değerinin (4096 µg/ml) bile altındadır. Kombinasyon çalışmaları ile biyofilm eradikasyonu için antibiyotik ve dezenfektan konsantrasyonlarının daha az miktarlarda hatta MİK değerleri veya altındaki konsantrasyonlarda kullanımı sağlanabilmektedir. Bu sayede kullanılan antimikrobiyal maddelerin yan etkileri en aza indirilebilir ve antibiyotik dirençliliğinin yayılmasının önüne geçilebilir. Ancak biyofilmler için standart bir antimikrobiyal test yöntemi gereklidir, zira biyofilm antimikrobiyal direnç çalışmaları arasındaki tutarsızlık, yüzey, ortam, sıcaklık ve bakteri soyları çeşitliliğinin bir sonucudur. Bu nedenle model sistemlerin gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Landersdorfer vd. (2013), ardışık bir dozlama tasarımı kullanarak antibiyotik kombinasyonlarının sinerjik etkileşimlerini değerlendirmek için bir model geliştirmiştir. Nisin, hem linezolid hem de amikasin antibiyotikleri ile kombinasyon halinde ardışık ve eşzamanlı uygulanarak, linezolid veya amikasinin, nisine dirençli veya orta seviyede dirençli hücreleri içeren popülasyonlara karşı etkinliği değerlendirilmiştir. Sinerjik etkileşimleri modellemek için NONMEM ve S-ADAPT yazılımlarını kullanılmıştır. Bakteriyel üreme, nisine daha az duyarlı popülasyonlarda linezolid tarafından engellenirken, bu hücre popülasyonu etkili bir şekilde öldürülemediği belirlenmiştir. Amikasin ile nisin

kombinasyonu, alt popülasyonlarda sinerjik etki göstermiştir. Eşzamanlı veya sıralı antimikrobiyal dozlama modelleri gibi bu modeller, bilim insanlarının klinik uygulamalar için etkili antimikrobiyal kombinasyon stratejileri geliştirmelerini sağlayabilmektedir (Landersdorfer vd. 2013).

Biyo-kontrol yöntemlerinden bir tanesi de litik bakteriyofajların kullanılmasıdır. Fajlar zorunlu bakteriyel parazitler olan virüslerdir. Çalışmalar, fajların bakterileri rastgele seçmediğini bir ya da çok benzer bakteri türleri için yüksek özgünlüğe sahip olduğunu göstermiştir (Hyman ve Abedon 2010, Rakhuba vd. 2010, Kim ve Ryu 2011, 2013, Kim vd. 2013). Örneğin; *Salmonella*'ya spesifik ST27, ST29 ve ST35 bakteriyofajları, tüm *Salmonella* serovarlarının dış zarında bulunan hücre yüzeyi TolC reseptörlerine bağlanırlar ve bu bakteriyofajlar diğer *Enterobacteriaceae* türlerine karşı hiçbir aktivite göstermez (Ricci ve Piddock 2010). Ayrıca, bakteriyofaj konsantrasyonunun, *in vivo* olarak belirgin bir patojenik azalmaya sebep olması için bakterilerin konsantrasyonundan daha yüksek olması gerektiği önerilmiştir (Bardina vd. 2012, Wong vd. 2014). 6 günlük tavuklar, 10 Log₁₀ cfu/mL *S. Typhimurium* ve 12 Log₁₀ pfu/mL bakteriyofaj ile enfekte edildikten 6 saat sonra *S. Typhimurium* 3 Log₁₀ cfu/mL altına düşmüş, 24 saat sonra ise bakteri gözlenmemiştir (Wong vd. 2014). Bir başka çalışmada ise, tavuk göğsüne *S. Typhimurium* yapay olarak inoküle ettikten ve 4 ° C'de 48 saat kuluçkadan sonra P22 bakteriyofaj kullanılmasıyla canlı hücre sayısında yaklaşık 2 Log₁₀ azalma sağlamışlardır. Ayrıca P22 fajının uygulanan 6 *Salmonella* serovaryetesi arasından sadece *S. Typhimurium*, *S. Derby* ve *S. Enteritidis* serovaryetelerini inhibe ettiği belirlenmiştir (Zinno vd. 2014). Nisin ve listeriyofaj LH7'nin kombine etkisinin *Listeria monocytogenes* üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, nisin ve listeriyofaj karışımı sinerjik etki göstermiş ve yeniden üreme görülmeksizin hücrelerin seviyelerinde azalma görülmüştür (Dykes ve Moorhead 2002). Bir başka çalışmada, *L. monocytogenes*'e spesifik iki litik bakteriyofajın kontamine mevvelerdeki *L. monocytogenes* popülasyonları üzerine etkileri tek başlarına ve nisin ile kombine kullanılarak araştırılmıştır. Faj karışımı, popülasyonları 2 ile 4.6 log ünite azaltırken, nisin ile kombine kullanılan fajlar *Listeria* popülasyonlarında 5.7 log ünite azalma sağlamıştır (Leverentz vd. 2003).

Morfolojik olarak P22; kısa, kontraktil olmayan kuyrukları olan virüsleri kapsayan *Podoviridae* virüs ailesinin bir üyesidir. P22 enfeksiyonu, fajın gp9 kuyruk diken proteininin konakçı yüzeyindeki O-antijen lipopolisakaritine bağlanmasıyla başlar. Bu kuyruk fiberi proteini, O-antijen zincirini parçalayan endorhamnosidaz aktivitesine sahiptir (Byl ve Kropinski 2000, Prevelige 2006). *Salmonella*'nın fimbria ve selüloz ile ilişkili ekstrasellüler matriks ile O-antijen kapsülünün birlikte regüle edildiği bilinmektedir (Gibson vd. 2006).

Çalışmamızda; P22 bakteriyofajı, nisin ve EDTA'nın tek tek ve kombinasyonları halinde *Salmonella* biyofilm oluşumuna (24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon periyotlarında) etkisi ve olgun biyofilm eradikasyonu potansiyeli araştırılmıştır. Çalışılan *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşumuna etki eden faj titrelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu titreler *S. Typhimurium* 14028 suşu için 10^6 pfu/mL olurken, *S. Typhimurium* SL1344 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşları için 10^9 pfu/mL'dir ve suşların maksimum biyofilm ürettikleri saatlerde sırasıyla % 83, % 98 ve % 95 oranlarında biyofilm miktarlarında azalma sağladığı belirlenmiştir. Bunun yanında, *S. Typhimurium* 14028 suşunun 72 saatlik olgun biyofilmi üzerine faj uygulaması sonrası % 47 oranında maksimum eradikasyonu sağlayan faj titresinin 10^8 pfu/mL olduğu belirlenmiştir. Benzer sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ve Gallinarum'a spesifik olan yeni tanımlanmış SE2 bakteriyofajının planktonik ve biyofilm hücreleri üzerindeki aktivitesinin aşırı sıcaklık ve pH değerlerinde araştırıldığı bir çalışmada, biyofilm miktarında önemli bir azalma saptanmıştır. Biyofilmler içine yerleşmiş bakterileri (10^7 cfu/mL'nin üzerinde) lize eden faj titresinin 10^3 - 10^4 pfu/mL olduğu belirlenmiştir (Tiwari vd. 2013). *Salmonella* serovarlarına karşı *in vitro* en iyi etkinlik yüksek titreli (MOI, 10^6) fajlar kullanarak elde edilmiştir (Atterbury vd. 2007). Farklı inkübasyon periyotlarında ve farklı P22 titrelerinin paslanmaz çelik ve polisistren yüzeylerde oluşan *S. Typhimurium* biyofilm oluşumu ve eradikasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, yüksek titredeki faj (10^6 pfu/mL \leq) konsantrasyonu biyofilm oluşumu üzerinde önemli ölçüde azalmaya sebep olmuştur. Ancak 72 saatlik olgun biyofilm yapısı üzerinde az etki gözlenmiştir (Karaca vd. 2015). Birçok araştırmada, biyofilm yapısındaki azalmanın (1'den 6'ya kadar değişen log) biyofilmin bileşenleri, biyofilm yaşı, faj seçimi ve uygulama süresine bağlı

olduğunu gösterilmiştir (Corbin vd. 2001, Sharma vd. 2005). Sonuçlarımız literature benzer şekilde, P22 bakteriyofajı ile muamelenin biyofilm oluşumu inhibe etme potansiyeli, olgun biyofilmin ortadan kaldırılmasından daha etkilidir. Bu durum, P22 fajının özellikle gıda ve klinik ortamlarda *S. Typhimurium* biyofilm oluşumunu inhibe edebilecek önemli bir potansiyele sahip olduğuna işaret etmektedir. Faj uygulamasının süresi ve biyofilmin yaşı, biyofilm oluşumunun engellenmesi ve *S. Typhimurium*'un olgun biyofilmlerin yok edilmesi için kritik öneme sahiptir. Faj uygulaması uzatılırsa, faj titrasyonunun azalması ya da olası faj direncinin artmasından dolayı geç inkübasyon periyotlarında biyofilm oluşumunda artış gözlemlenebilir. Faj predasyonunun biyofilm oluşumunu artırabileceğini gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Hosseinidoust vd. (2013), *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunun faj uygulaması ile geliştirilebileceğini saptamıştır. Ancak, çalışmamızda P22 fajına maruz kaldıktan sonra biyofilm oluşumunun indüksiyonu gözlemlenmemiştir.

Çalışmamızda, EDTA tek başına kullanıldığında biyofilm oluşumunu tamamen engellemiştir ve suşların optimum biyofilm ürettikleri saatlerde % 99 oranında inhibisyon sağlayan konsantrasyonlar; *S. Typhimurium* 14028 suşu için 20 mM, *S. Typhimurium* SL1344 suşu için 5 mM, *S. Enteritidis* DMC8 suşu için 1.25 mM olarak belirlenmiştir. Nisin çok yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşumuna etki etmiştir. Ancak biyofilm oluşumuna olan etkileri suştan suşa farklılık göstermiştir. Nisin varlığı *S. Typhimurium* SL1344 suşunun maksimum biyofilm ürettiği saatlerde biyofilm oluşumunu inhibe ederken, ileri inkübasyon periyotlarında biyofilm oluşumu indüklemiştir. Nisin, EDTA ile kombine kullanıldığında biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi sinerjik olmasına karşın, P22 bakteriyofajı ile kombinasyonu sonucu böyle bir etki saptanmamıştır. Nisin+EDTA+P22 fajı kombinasyonu ise denenen tüm konsantrasyonlarda ve inkübasyon periyotlarında % 90'ın üzerinde azalma sağlanmıştır. Tüm *Salmonella* suşlarının maksimum biyofilm üretiminin görüldüğü saatlerde, kombinasyonda kullanılan en düşük faj konsantrasyonlarının 10^2 pfu/mL düzeyindedir. Çalışmamız nisinin, P22 bakteriyofajı ile kombine kullanılarak *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşumunun inhibisyonu ve eradikasyonunun incelenmesi bakımından literatürde bir ilktir. *S. Typhimurium* 14028 suşunun 72 saatlik olgun biyofilm yapısının nisin ile

eradikasyonunun incelendiği denemede, sub-lethal seviyede ilave edilen nisin biyofilm oluşumunu indüklemiştir. Zira sub-MİK antibiyotik dozlarının biyofilm oluşumunu indüklediği bilinmektedir (Majta'n vd. 2008, Tezel vd. 2016). Nisin+EDTA+P22 fajı kombinasyonu, biyofilm yapısında % 70 oranında eradikasyon sağlamış, ancak tamamen ortadan kaldırmamıştır. Antibakteriyel biyo-kontrol ajanı olarak bakteriyofajların kullanımı, konak spesifik özelliklerinin olması sayesinde yüksek konsantrasyonlarda antibiyotik kullanımının ve bunun sonucu olarak antibiyotik direnci yayılımının önüne geçilmesini sağlayacaktır. Ayrıca gıda endüstrisinde kullanılan kimyasal dezenfeksiyon işlemlerine göre daha ucuz ve insan sağlığı açısından daha güvenilirdir. P22 fajının, tek başına yüksek titrelerde kullanıldığında ve nisin-EDTA ile kombine edildiğinde *S. Typhimurium*'un biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeli taşıdığı çalışmamız verileri ile kanıtlanmıştır. Ancak, olgun biyofilmin ortadan kaldırılmasına etkisinin % 70 oranında olmasından dolayı antimikrobiyal ajanlar ile birlikte faj kokteyllerinin kullanımı daha efektif olacaktır. Nisin ile kombinasyon halinde kullanılan bakteriyofajların, faj kokteylleri halinde hazırlanarak uygulanması, doğal ortamdaki aynı biyofilm yapısı içerisinde bulunan birden fazla gıda patojenine etki edebilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca özel fajlar hedef patojenleri enfekte ettiklerinden, yerli mikrofloranın rekabet potansiyeli korunmuş olmaktadır.

Salmonella suşlarının biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturması üzerinde besin maddelerinin içeriği, ortam pH'sı ve çevresel sıcaklık gibi ana unsurlar etkili olmaktadır. Biyofilm üretiminin matematiksel modeli yapılacak ve biyofilm eradikasyonu için etkin mücadele stratejileri geliştirilecekse bu parametrelerin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada ayrıca, *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşumları üzerinde pH, NaCl konsantrasyonu ve sıcaklığın etkileri ve bunların nisinle kombinasyonlarına karşı biyofilm direnci araştırılmıştır. *Salmonella* biyofilm oluşum davranışı suşlara göre değişkenlik göstermektedir. *Salmonella* suşlarında besinsel ve diğer çevresel etkilerin incelendiği çalışmalarda, bazı suşlarda ideal inkübasyon sıcaklığı 20-22 °C olarak belirlenirken, bazı suşlar için bu değer 28-30 °C olarak saptanmıştır (Chavant vd. 2002, Stepanovic vd. 2003, Nguyen vd. 2014). Bazı araştırmacılar ise çeşitli *Salmonella* serovaryetelerinin 4 °C'ye kıyasla 25 °C'de daha fazla biyofilm ürettiğini belirlemişlerdir (Lianou ve Koutsoumanis 2012, Yang vd. 2016).

Aynı şekilde biyofilm oluşumu için gerekli optimum pH düzeyleri bazı çalışmalarda pH 6.6 civarında tanımlanırken, çalışma sonuçları ağırlıklı olarak ortam pH'nın 6 ve 7 olması gerektiği yönündedir (Chavant vd. 2002, Lianou ve Koutsoumanis 2012). Yang vd. (2016), *S. Enteritidis*'in biyofilm oluşumunun bakteri suşları ne olursa olsun, çevresel pH ve biyofilm yaşından etkilenmediğini saptamışlardır. Benzer sonuçlar Karaca vd. (2013), tarafından da elde edilmiştir. pH 5.5 ile 7.4 arasında *S. Typhimurium*'un biyofilm üretiminde önemli bir fark olmadığı belirlenmiş, bununla birlikte, *S. Infantis* ve *S. Roughform*'un pH 7.4'teki biyofilm oluşumu pH 5.5'teki biyofilm oluşumundan daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir (Karaca vd. 2013). Buna karşılık, Lianou ve Koutsoumanis (2012), *S. enterica* suşlarının çoğunun, pH 5.5'te, pH 7.0'den daha fazla biyofilm oluşum kabiliyeti sergilediğini saptamıştır. Bu çalışmada 'rdar' ve 'bdar' morfolojilerindeki *Salmonella* suşları ile çalışılmıştır ve literatüre benzer sonuçlar elde edilmiştir. Endüstriyel alanda kullanılan farklı inkübasyon sıcaklıkları denenmiş ve suşların 5 °C'de biyofilm üretmedikleri saptanmıştır. Maksimum biyofilm üretimleri 'rdar' morfolojisine sahip *Typhimurium* serovaryetelerinde 20 °C iken, 'bdar' morfolojisindeki *Enteritidis* serovaryetesi için 37 °C'dir. 72 saatte maksimum biyofilm üreten *S. Typhimurium* 14028 suşunun biyofilm üretimi için en uygun besin ortamı pH'ı 7.4 iken, 24 saatte maksimum biyofilm üretiminin görüldüğü *S. Typhimurium* SL1344 ve *S. Enteritidis* DMC8 suşları için pH 6.5 olduğu belirlenmiştir. pH 4.5 değerinde ise *Salmonella* suşlarının hiçbirinde biyofilm üretimi gözlenmemiştir. Çalışmamızda endüstriyel alanda kullanılan beş NaCl konsantrasyonunda (% 0.5, 2, 4, 6 ve 8 NaCl) suşların biyofilm üretim kapasiteleri artan konsantrasyonlar ile azalmaktadır. Özellikle besiyerindeki yüksek NaCl derişimi (% 6 ve % 8) hücrelerin polistiren yüzeylere tutunup biyofilm oluşturmalarını tamamen engellemiştir. Benzer şekilde araştırmacılar tutunan patojenik hücrelerin maksimum üreme hızı (kA) ve spesifik üreme oranlarının (μ A), artan NaCl konsantrasyonuyla azaldığını belirlemiştir. Farklı konsantrasyonlarda NaCl bulunduran ortamlarda, değişen hücre yüzey özellikleri ve biyofilm dağılımları arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Yüksek hidrofobisite biyofilm oluşumu için son derece önemlidir. Artan NaCl konsantrasyonu ile hücre hidrofobisitesi azalmakta ve hücre adezyonunu engellemektedir (Xu vd. 2010). Giaouris vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, yüksek sodyum klorid konsantrasyonunun (% 10.5 NaCl, aw 0.95), hücrelerin çelik kuponlara tutunmasını inhibe ettiği belirlenmiştir. Çalışmadan

elde edilen sonuçlara göre, gıdalar üzerinde de biyofilm oluşturabildiği bilinen *Salmonella*'nın gıda yüzeylerindeki biyofilmlerinin engellenmesinde tuz ilavesi ve pH değişimlerinden yararlanılarak gıda korumasına katkıda bulunulabilir. Çevresel koşulların *Salmonella* biyofilm oluşumu üzerindeki değişken etkileri, bakteri suşlarının farklı genetik kökenlerinden kaynaklanabilir. Bundan dolayı, *Salmonella* biyofilmleri ile mücadelede lokal stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızdan elde edilen veriler, nisin düşük pH değerlerinde biyofilm oluşumu üzerinde daha etkin olduğunu göstermiştir. Nötral pH'a (pH 7.4) kıyasla pH 5.5 değerinde, nisin çalışılan tüm *Salmonella* suşlarının optimum biyofilm ürettikleri saatlerde biyofilm oluşumunu engellemiştir. Kombinasyona EDTA ilavesi ile benzer inhibisyon etkisi çok daha az nisin konsantrasyonları ile elde edilmiştir. *S. Typhimurium* 14028 olgun biyofilmi üzerine nisin uygulaması denge pH değerinde biyofilm oluşumunu indüklerken, pH 5.5 değerinde 4800 µg/mL nisin konsantrasyonu biyofilmi % 38 oranında eradike etmiştir. Kombinasyona EDTA ilavesi ile nötr pH'da elde edilen % 51 oranındaki eradikasyon değeri, pH 5.5 değerinde % 84 oranına yükselmiştir. Nisinin asidik pH'da daha etkin olmasının yanı sıra, görülen inhibisyon etkisinin biyofilm matriksinin önemli bir bileşeni olan selüloz üretimindeki azalış kaynaklı olabileceği düşünülebilir. Ortamdaki pH'ın *Salmonella* biyofilmlerindeki selüloz üretimine etki ederek sanitizer uygulamasına karşı biyofilm direncini etkileyip etkilemediğini araştırılan bir çalışmada, pH 5.3'te biyofilmde bulunan düşük selüloz miktarı, sanitizer uygulamasına olan zayıf direnci ile korelasyon göstermiştir (Yang vd. 2016). Düşük pH değerinde, doymamış yağ asitlerinin azalması ve siklik yağ asitlerinin artması nedeniyle membran akışkanlığında bir azalma vardır, ancak *S. Typhimurium*'da bu adaptasyon düşük sıcaklıkta daha az yoğun olabilir ve yağ asitlerinin uzunluğunu önemli ölçüde değiştiremeyebilir (Alvarez-Ordóñez 2008, 2010). Sitoplazmik membrandaki değişiklikler, bakteriyosin etkisini etkiler ve böylece hedef mikroorganizmanın duyarlılığını değiştirir. Bunun yanında, çevresel koşulların da etkisiyle daha hassas bir LPS yapısının da oluşmasıyla nisin etkisi artabilir (Prudencio vd. 2014). Çalışmamızda nisin varlığında en yüksek oranda azalmanın görüldüğü tuz konsantrasyonunun % 0.5 olduğu belirlenmiştir. Kombinasyona EDTA ilave edildiğinde kullanılan nisin konsantrasyonunda azalma sağlanmıştır. *S. Typhimurium* 14028 olgun

biyofilmi üzerine nisin uygulaması tuzsuz ortamda biyofilm oluşumunu indüklerken, % 0.5 NaCl ve 4800 µg/mL nisin konsantrasyonunda biyofilmi % 41 oranında eradike etmiştir. Kombinasyona EDTA ilavesi ile tuzsuz ortamda elde edilen % 51 oranındaki eradikasyon değeri, % 0.5 NaCl konsantrasyonunda % 74 oranına yükselmiştir. Planktonik *Salmonella* suşlarında nisin varlığında besinsel ve diğer çevresel etkilerin (pH, sıcaklık) incelendiği matematiksel modellerin geliştirildiği çalışmalar mevcuttur (Saldaña vd. 2012, Prudencio vd. 2014). Buna karşın çalışmamız nisin EDTA ile kombine kullanarak farklı pH değerlerinde ve NaCl konsantrasyonlarında *Salmonella* biyofilm oluşumu ve eradikasyonuna etkisinin gerçekleştirildiği ilk araştırmadır.

Salmonella gıda işlenmesi ve hazırlanması esnasında çapraz kontaminasyon yoluyla gıdalara bulaşabilir ve enfeksiyonlara sebep olabilir. Çapraz kontaminasyon riskinin en aza indirgenmesi için uygun temizleme ve dezenfeksiyon şarttır. Dezenfeksiyon maddelerinin antimikrobiyal etkisini test etmek için birçok yöntem vardır. Bir dezenfektanın pratik ortamda etkili olup olmayacağını değerlendirmek için, test yöntemi gerçek yaşam durumlarını modellemelidir. Buna ek olarak, tüketicilerin kimyasal olarak türetilen antimikrobiyal maddelerin gıda içinde kullanımı konusundaki artan endişeleri, daha doğal ürünler üretmeye yöneltmiştir. Antimikrobiyal sinerjik etkileşimler, pahalı bir antimikrobik maddenin konsantrasyonunu azaltarak ve ucuz bir antimikrobiyal ile kombinasyon halinde kullanmak suretiyle uygulama maliyetlerini düşürmek açısından potansiyel finansal etkilere de sahip olabilmektedir. Bakteriyosinlerle kombinasyonel uygulamalar antimikrobiyal spektrumları genişletebilir ve toksik veya olumsuz yan etkilerin azaltılabileceği veya ortadan kaldırılacağı ölçüde etkili uygulamalar için gereken antibiyotik konsantrasyonunda azalmaya neden olabilir. Tez kapsamında yapılan denemeler göstermiştir ki; kombinasyon çalışmaları ile *Salmonella* biyofilm oluşumu engellenebilmektedir. Ancak olgun biyofilm yapılarının tamamen ortadan kaldırılması oldukça güçtür. P22 bakteriyofajı, nisin ve EDTA kombinasyonunun anti-*Salmonella* biyofilmlerinin oluşumunu inhibe etmek için en uygun biyo-kontrol ajanı olarak kullanılabilir. Diğer yandan nisin/KHDGT ve nisin/CA preparatlarının ticari kullanım potansiyellerinin araştırılması çalışmamız sonuçlarının uygulamada kullanımını belirleyecek ana unsurdur. Bu anlamda, bulgularımız ve tespit ettiğimiz etkin konsantrasyonlar söz konusu çalışmalara ivme kazandıracaktır. Ayrıca bu tez

kapsamında elde edilen model sistem ile ülkemizde gıda endüstrisinde patojen mikroorganizmalarla mücadeleye etkin katkılar sağlayacaktır. Deneysel çalışmalardan elde edilen verilere göre oluşturulan model denklemlerinin (birincil denklem), uygulanan değişkenler ışığında biyofilm miktarındaki yüzde azalma için modellenmesinde kullanılabileceği saptanmıştır. P22 bakteriyofajı, EDTA ve nisin ajanlarının tek başına kullanıldığı verilerden elde edilen değerler, model verileri ile uyum sağlamıştır. Genel olarak olgun biyofilmi ortadan kaldıran P22 faj konsantrasyonunun artmasıyla OD yüzde azalma da artmış ve bu artış doğrusal olarak tanımlanmıştır. Biyofilm oluşumunu % 99 oranında azaltan minimum EDTA konsantrasyonundan sonra arttırılan EDTA konsantrasyonunun modele göre fazladan bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Deneysel olarak, tek konsantrasyonlar araştırılmıştır, ancak modeller birçok konsantrasyon aralığını vermektedir. Kombinasyonlarda her iki ajanın ayrı ayrı etki ettikleri maksimum değerler modelin tepe noktaları kullanılarak hesaplanabilir. Elde edilen verilere göre oluşturulan model, birincil modeldir ve bu nedenle, her modelde optimum değerleri yakalamak mümkün olmamaktadır. Optimum değerleri yakalamak ve oluşturulan modelin *Salmonella* suşlarının biyofilm üretiminin klinik ve endüstriyel süreçlerde tahmininde kullanılabileceğini gösterebilmek için modelin her bir kombinasyonu için deneysel testinin yapılması ve ikincil modelin oluşturulması gerekmektedir. Modelimiz sonraki çalışmalar için katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28:169-185.
- Ahn, J.S., Kim, L., Jung, and Biswas, D. 2013. In vitro assessment of the susceptibility of planktonic and attached cells of foodborne pathogens to bacteriophage P22-mediated *Salmonella* lysates. *J. Food Prot.* 76: 2057–2062.
- Aktaş, 2014. Antibiyotik Kombinasyonları ve Sinerjistik Etkileşimleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, 44(2):47-55.
- Al-Holy, M.A., Al-Nabulsi, A., Osaili, T.M., Ayyash, M.M., and Shaker, R.R. 2012. Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat. *Food Control*, 23: 48–53.
- Al-Nabulsi, A.A., Olaimat, A.N., Osaili, T.M., Shaker, R.R., Elabedeen, N.Z., Jaradat, Z.W., Abushelaibi, A. and Holley, R.A. 2014. Use of acetic and citric acids to control *Salmonella* Typhimurium in tahini (sesame paste). *Food Microbiology*, 42, 102-108.
- Alvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A. and López, M. 2010. Acid tolerance in *Salmonella* Typhimurium induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiol* 27, 44–49.
- Alvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R. and Bernardo, A. 2008. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella* Typhimurium in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *Int J Food Microbiol* 123, 212–219.
- An, Y.H., Friedman, R.J. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*, 43: 338–348.
- Annous, B.A., Fratamico, P.M., Smith, J.L. 2009. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do, *Journal of Food Science*. Vol.74, No.1., pp. R24-R37.
- Anonymous, 1969. Expert Committee on Food Additives. Specifications for identity and purity of some antibiotics. 12th Report. WHO Technical Report Series, No. 430.
- Anonymous, 1995. EC. European Parliament and Council Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners. *Official Journal*, L 61, 18.3.1995, p 1
- Anonymous, 1996. EC. Commission Directive 96/77/EC laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners. *Official Journal*, L 339, 30.12.1996 p 1.

- Anonymous, 1998. (Food and Drug Administration). Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Fed. Reg., 53: 11247.
- Anonymous, 2001. US Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services. Agency Response Letter GRAS Notice N°. GRN 000065, April 20 2001.
- Anonymous, 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 18th informational supplement. CLSI, M100-S18 Clinical and Laboratory Standards Institute, 940, PA, USA.
- Anonymous, 2009. Multistate outbreak of *Salmonella* infections associated with peanut butter and peanut butter-containing products--United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 58: 85-90.
- Anonymous. 2011. EFSA, European Centre for Disease and Control, (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA J, 9(3):2090.
- Anonymous. 2012a. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010, EFSA Journal 10, 2597–3039.
- Anonymous. 2012b. European Centre for Disease prevention and Control (ECDC). The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. EFSA J, 10(3):442.
- Anriany, Y., Sahu, S.N., Wessels, K.R., McCann, L.M., 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. Appl Environ Microbiol, 72(7):5002-5012.
- Ariyapitipun, T., Mustapha, A., and Clarke, A.D. 2000. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin. J. Food Protect., 63: 131–136.
- Arnold, J. and Bailey, G. 2000. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. Poultry Sci, 79(12):1839-1845.
- Arnold, J.W. and Yates, I.E. 2009. Interventions for control of *Salmonella*: Clearance of microbial growth from rubber picker fingers. Poultry Science, 88(6), 1292–1298.
- Atterbury, R.J., Van, Bergen, M.A., Ortiz, F., Lovell, M.A., Harris, J.A., De Boer, A., et al. 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. Appl Environ Microbiol, 73:4543-9.

- Balcázar, J.L., Subirats, J., and Borrego, C.M. 2015. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, Volume6, Article 1216.
- Balciunas, E.M., Martinez, F.A.C., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M., Converti, A. and Oliveira, R.P.S. 2013 Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control* 32, 134–142.
- Banin, E., Brady, K.M. and Greenberg, E.P. 2006. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol*, 72:2064–2069.
- Barak, J.D., Jahn, C.E., Gibson, D.L. and Charkowski, A.O. 2007. The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(9):1083-1091.
- Bardina, C., Spricigo, D.A., Cortes, P. and Llagostera, M. 2012. Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing *Salmonella* colonization of poultry. *Appl. Environ. Microbiol*, 78, 6600-6607.
- Bari, M.L., Ukuku, D.O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K. and Kawamoto, S. 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *J. Food Prot.*, 68, 1381-1387.
- Barnhart, M.M. and Chapman, M.R. 2006. Curli Biogenesis and Function. *Ann Rev Microbiol*, 60(1):131-147.
- Bassler, B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, Vol.2, No.6, pp. 582-587.
- Bauer, R., and Dicks, L.M. 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol*, 101:201-216.
- Baugh, S., Ekanayaka, A.S., Piddock, L.J. and Webber, M.A. 2012. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. *J Antimicrob Chemother*, 67:2409-17.
- Bayles, K.W. 2007. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol*, 5(9):721-726.
- Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P. and Frankel, G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol*, 12(9):2385-2397.
- Bigwood, T., Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G.V. and Heinemann, J.A., 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol.*, 25, 400–406.
- Blaschek, H.P.H. and Wang, M.E., Agle. 2007. *Biofilms in the Food Environment*. Wiley-Blackwell, Ames, IA.

- Blenkinsopp, S.A. and Costerton, J.W. 1991. Understanding bacterial biofilms. *Trends Biotechnol*, 9:138–143.
- Bokranz, W., Wang, X., Tschape, H. and Römling, U. 2005. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol*, 54(12):1171- 1182.
- Bothwell, M.R, Smith, A.L. and Phillips, T. 2003. Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 129(5):599-60.
- Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R. and Haesebrouck, F. 2009. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Veterinary Microbiology*, Vol.135, No.3-4, pp. 187-195.
- Boziaris, I.S., and Adams, M.R. 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of gram negatives. *Int. J. Food Microbiol*, 53:105-113.
- Branen, A.L., Davidson, P.M., Salminen, S. and Thorngate, J. 2001. *Food Additives: Edition 2*. CRC Press.
- Briers, Y., Walmagh, M., Grymonprez, B., Biebl, M., Pirnay, J. P., Defraigne, V., et al. 2014a. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 58, 3774–3784.
- Briers, Y., Walmagh, M., Van Puyenbroeck, V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A., et. al. 2014b. Engineered endolysin-based “Artilynsins” to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *MBio*, 5: e1379-14.
- Budnik, W. 1990. *Salmonella*, the organism, its occurrence and prevention in foods, p. 189-218. In B. H. Nga and Y. K. Lee (eds.), *Microbiology applications in food biotechnology*. Elsevier, New York, NY.
- Byl, C.V. and Kropinski, A.M. 2000. Sequence of the Genome of *Salmonella* Bacteriophage P22. *Journal of Bacteriology*, Vol. 182, No. 22, p. 6472–6481.
- Cabo, M.L., Torres, B., Herrera, J.J., Bernardez, M., and Pastoriza, L. 2009. Application of nisin and pediocin against resistance and germination of *Bacillus* spores in sous vide products. *J. Food Prot.*, 72:515-523.
- Campion, A., Morrissey, R., Field, D., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. 2017. Use of enhanced nisin derivatives in combination with food-grade oils or citric acid to control *Cronobacter sakazakii* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.*, 65:254-263.
- Carneiro de Melo, A.M., Cassar, C.A. and Miles, R.J. 1998. Trisodium phosphate increase sensitivity of Gram-negative bacteria to lysozyme and nisin. *J Food Prot.*, 61, 839–844.

- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duche, D., Kleanthous, C., Lloubes, R., Postle, K., et al. 2007. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 158-229.
- Casjens, S. and Hayden, M. 1988. Analysis in vivo of the bacteriophage P22 headful nuclease. *Molecular Biology*. 199, 467-474.
- Castelijin, 2013. *Salmonella* biofilms, PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, NL. ISBN 978-94-6173-733-5.
- Cegelski, L., Pinkner, J.S., Hammer, N.D., Cusumano, C.K., Hung, C.S., Chorell, E., Åberg, V., Walker, J.N., Seed, P.C., Almqvist, F., Chapman M.R. and Hultgren, S., C. 2009. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chemical Biology*, Vol. 5; pp. 913-919.
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., and Buret, A. 1999. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms, *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1771-1776.
- Chandra, M.S., Thakur, S.S., Chougule, D., Narang, G., Kaur, and N.S., Sharma. 2015. Combined effect of disinfectant and phage on the survivality of *Salmonella* Typhimurium and its biofilm phenotype. *Int. J. Food Safety*, 17:25–31.
- Chang, Y., Gu, W., McLandsborough, L. 2012. Low concentration of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) affects biofilm formation of *Listeria monocytogenes* by inhibiting its initial adherence. *Food Microbiol*, 29:10–17.
- Chaudhary, M., and Payasi, A. 2012. Comparative efficacy of antibiotics in biofilms eradication formed by ESBL and non ESBL producing micro-organisms, *International Journal of Drug Development & Research.*, Vol. 4, 2, 138-147.
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.N., Hebraud, M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl Environ Microbiol*. 68:728–737.
- Chia, T.W.R., Goulter, R.M., McMeekin, T., Dykes, G.A., Fegan, N. 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiol*, 26, 8, 853-859.
- Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A. and Degraeve, P. 2008. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, 19: 982-989.
- Chung, W. and Hancock, R.E.W., 2000. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 60: 25-32.

- Çoban, A.Y., Bilgin, K., Uzun, M., Durupınar, B. 2009. Çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* klinik izolatlarına karşı linezolidin izoniazid ve rifampisin ile kombine etkisi. *Mikrobiyol Bul*, 43(2): 293-7.
- Corbin, B.D., Mclean, R.J.C., and Aron, G.M. 2001. Bacteriophage T4 multiplication in a glucose-limited *Escherichia coli* biofilm. *Can. J. Microbiol.*, 47, 680-684.
- Cortesi, M.L., Panebianco, A., Giuffrida, A., Anastasio, A. 2009. Innovations in seafood preservation and storage. *Vet. Res. Commun.*, 33, S, 15-23.
- Costerton, J.W. 2007. Replacement of acute planctonic by chronic biofilm diseases. In: Eckey C(ed) *The biofilm primer*. Springer, New York.
- 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.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1994. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418):1318–1322.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.
- Crump, J.A., Griffin, P.M., and Angulo, F.J. 2002. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness, *Clin Infect Dis.*, 35, 859-865.
- Cutter, C.N. and Siragusa, G.R. 1995. Population reduction of Gram negative pathogens Following Treatments with Nisin and Chelators. *J Food Prot.*, 58, 977– 983.
- D'Aoust, J.Y., 1989. *Salmonella*, p.p. 327-445. In M. P. Doyle (ed.), *Foodborne bacterial pathogens*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- 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, A. 1973. The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontol*, 8:68-75.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J., W., Greenberg, E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, Vol.280, No.5361, pp. 295-298.
- Davies, E.A., Bevis, H.E., and Delves-Broughton, J. 1997. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24: 343–346.
- Davies, E.A., Milne, C.F., Bevis, H.E., Potter, R.W., Harris, J.M., Williams, G.C., Thomas, L.V., and Delves-Broughton, J. 1999. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *J. Food Protect.*, 62: 1004-1010.

- de Jong H.K., Parry, C.M., van der Poll, T., Wiersinga, W.J. 2012. Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog*, 8(10):4.
- de Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., et al. 2008. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. *Aquaculture*, 277: 125–137.
- De Vuyst, L., Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13(4):194–199.
- Delves-Broughton, J. 2005. Nisin as a food preservative. *Food Aust.*, 57: 525-527.
- Dodd, H.M., Horn, N., Gasson, M., J. 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol.*, 136(3):555–566.
- Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.*, 8(9):881-90, 155-166.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 167-193.
- Doyle, M.E and Glass, K.A. 2010. Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality, and Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1):44-56.
- Doyle, M.P., and D.O., Cliver. 1990. *Salmonella*, p. 185-204. In D. O. Cliver (ed.), *Foodborne diseases*. Academic Press Inc., San Diego, CA.
- Dunne, W.M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*, 15: 2, p. 155–166.
- Dutreux, N., Notermans, S., Góngora-Nieto, M.M., Barbosa-Cánovas, G.V., and Swanson, B.G. 2000. Effects of combined exposure of micrococcus luteus to nisin and pulsed electric fields. *Int. J. Food Microbiol.*, 60:147-152.
- Dykes, G.A. and Moorhead, S.M. 2002. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. *Int. J. Food Microbiol.*, 73: 71-81.
- Ebrahimi, A., Hemati, M., Dehkordi, S.H., Bahadoran, S., Khoshnood, S., Khubani, S., Faraj, M.D., Alni, R.H. 2014. Chlorhexidine Digluconate Effects on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Some Field Isolates of Animal Bacterial Pathogens. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*, 9(2): e14298.
- Edmiston, C.E., Bruden, B., Rucinski, M.C., Henen, C., Graham, M.B., Lewis, B.L. 2013. Reducing the risk of surgical site infections: Does chlorhexidine gluconate provide a risk reduction benefit? *Am. J. Infect. Control*, 41:S49–S55.
- Esteban, M., Aznar, A., Ferná'ndez, P.S., and Palop, A. 2012. Combined effect of nisin, carvacrol and a previous thermal treatment on the growth of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella senftenberg*, *Food Science and Technology International*, 19(4) 357–364.

- Evans, R.C. and Holmes, C.J. 1987. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 31, 889–894.
- Ferreira, M. and Lund, B. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22: 433-438.
- Field, D., O'Connor, R., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C. 2016a. In vitro activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against *Staphylococcus* biofilms. *Front. Microbiol*, 7:508.
- Field, D., Seisling, N., Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C. 2016b. Synergistic Nisin-Polymyxin combinations for the control of *Pseudomonas* biofilm formation. *Front. Microbiol.* 7:1713.
- Filoche, S.K., Soma, K., Sissons, C., H. 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiol Immunol*, Aug;20(4):221-5.
- Finkel, S.E. 2006. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 113–120.
- Finnegan, S., Percival, S.L. 2015. EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care. *Adv. Wound Care*, 4(7):415–421.
- Fischetti, V.A. 2008. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11, 393–400.
- Fu, W.T., Forster, O., Mayer, J.J., Curtin, S.M., Lehman, and R.M., Donlan, 2010. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:397–404.
- Fukao, M. et al. 2008. Complete covalent structure of nisin Q, new natural nisin variant, containing post-translationally modified amino acids. *Biosci. Biotech. Bioch.*, 72: 1750- 1755.
- Gálvez, A., López, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E. and Ben Omar, N. 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 28: 125-152.
- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A. and Martínez, B. 2010. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins, *Trends in Food Science & Technology*, 21, 373-382.
- Garcia, K.C.O.D., Corrêa, I.M.O., Pereira, L.Q., Silva, T.M., Mioni, M.S.R., Izidoro, A.C.M., Bastos, I.H.V., Goncalves, G.A.M., Okamoto, A.S., and Filho, R.L.A. 2017. Bacteriophage use to control *Salmonella* biofilm on surfaces present in chicken slaughterhouses. *Poultry Science*, 0:1–7

- Gerstel, U. and Römling, U. 2003. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. *Res Microbiol*, 154(10):659-667.
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C. and Degraeve, P. 2015. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Volume 56, Issue 8.
- Giaouris, E., 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, No. 10, p, 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., Surette, M., Kay, W.W. 2006. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *J Bacteriol*, 188(22):7722-7730.
- Gilbert, P., Maira-Litran, T., McBain, A.J., Rickard, A.H. and Whyte, F. 2002. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv. Microb. Physiol.*, 46, 203–256.
- Gill, A.O. and Holley, R.A. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 251-259.
- Gong, C., and Jiang, X. 2017. Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* attachment and biofilms on hard surfaces, *Poultry Science* 0:1–11
- Gonzalez-Escobedo, G., Gunn, J.S. 2013. Identification of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Genes Regulated during Biofilm Formation on Cholesterol Gallstone Surfaces. *Infect Immun.*, 81(10):3770–80.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P.S. 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *Int J Food Microbiol.*, 137, 175–180.
- Grant, A., Hashem, F., Parveen, S. 2016. *Salmonella* and *Campylobacter*: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. *Food Microbiology* 53, 104-109.
- Guenther, S., Herzig, O., Fielser, L., Klumpp, J., Loessner, M.J. 2012. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int. J. Food Microbiol.*, 154, 66–72.

- Guerra, B., Junker, E. and Helmuth, R. 2004. Incidence of the Recently Described Sulfonamide Resistance Gene *sul3* among German *Salmonella enterica* Strains Isolated from Livestock and Food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 48, No. 7, p. 2712–2715.
- Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A. and García, P. 2016. Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Front. Microbiol.*, 7:825.
- Hancock, R.E.W. 1981. Aminoglycoside uptake and mode of action with special reference to streptomycin and gentamicin. II. Effects of aminoglycosides on cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 8, 429-445.
- Hancock, R.E.W., Farmer, S.W., Li, Z. and Poole, K. 1991. Interaction of Aminoglycosides with the Outer Membranes and Purified Lipopolysaccharide and OmpF Porin of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 1309-1314.
- Hannan, T.J., Mysorekar, I.U., Hung, C.S., Isaacson-Schmid, M.L., Hultgren, S.J. 2010. Early severe inflammatory responses to uropathogenic *E. coli* predispose to chronic and recurrent urinary tract infection. *PLoS Pathog*, 6: e1001042.
- Hannu, T., Inman, R., Granfors, K., Leirisalo-Repo, M. 2006. Reactive arthritis or post-infectious arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 20(3):419-433.
- Hansen, J.N., Chung, Y., and Liu, W. 1991. Biosynthesis and mechanism of the action of nisin and subtilin. In: *Nisin and novel lantibiotics*, pp. 287-302. Leiden., ESCOM Science Publishers.
- Heng, N.C.K. and Tagg, J.R. 2006. What is in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4. doi:10.1038/nrmicro1273-c1. Correspondence.
- Henry, M. and Debarieux, L. 2012. Tools from viruses: bacteriophage successes and beyond. *Virology* 434, 151–161.
- Hermans, K., Nguyen, T.L, Roberfroid, S, Schoofs, G., Verhoeven, T., De Coster, D., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C. 2011. Gene expression analysis of monospecies *Salmonella* Typhimurium biofilms using differential fluorescence induction. *J Microbiol Methods*, 84(3):467-478.
- Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H.R., and Mattick, A. 1951. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. *J. Dairy Res.*, 18: 205.
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. and Ciofu, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322-332.
- Hosseinidoust, Z., Tufenkji, N. and van de Ven, T.G.M. 2013. Predation in homogeneous and heterogeneous phage environments affects virulence

- determinants of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol, 79, 2862-2871.
- Humphrey, T. 2000. Chapter 15: Public Health Aspects of Salmonella Infections. In *Salmonella in Domestic Animals*. Wray, C., and Wray, A. (eds). New York: CABI Publishing, pp. 245-259.
- Hurst, A. 1981. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27: 85-123.
- Hussain, G., Rahman, A., Hussain, T., Uddin, S., Ali, T. 2015. Citric and Lactic Acid Effects on the Growth Inhibition of *E. coli* and *S. Typhymurium* on Beef during Storage. Sarhad Journal of Agriculture, Volume 31, Issue 3, Page 183.
- Hyman, P. and Abedon, S.T. 2010. Bacteriophage host range and bacterial resistance. Adv. Appl. Microbiol., 70, 217e248.
- Iqbal, A. 2012. Antimicrobial Irrigants in the Endodontic Therapy, International Journal of Health Sciences, Qassim University, Vol. 6, No.2, 153-158.
- Irie, Y., and Parsek, M.R. 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol.322, pp. 67-84
- Jaglic, Z., Desvaux, M., Weiss, A.G., Nesse, L.L., Meyer, R.L., Demnerova, K., Schmidt, H., Giaouris, E., Sipailiene, A., Teixeira, P., Kacaniova, M., Riedel, C.U. and Knochel, S. 2014. Surface adhesins and exopolymers of selected foodborne pathogens. Microbiology, 160: 2561-2582.
- Jay, J.M. 2000. Modern Food Microbiology, 6th ed. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg, Maryland. 679.
- Jensen, P.O., Givskov, M., Bjarnsholt, T. and Moser, C. 2010. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 59(3), 292-305.
- Jones, C.G. 2000. Chlorhexidine: is it still the gold standard? Periodontology, Vol. 15, 1997, 55-62.
- 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.
- Kalmokoff, M., Lanthier, P., Tremblay, T.L., Foss, M., Lau, P.C., Sanders, G. et al. 2006. Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. J Bacteriol, 188: 4312-4320.
- Karaca, B., Akcelik, N., and Akcelik, M. 2015. Effects of P22 Bacteriophage on *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* Serovar Typhimurium DMC4 Strain Biofilm Formation and Eradication. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 67(4), 1361-1367.

- Karaca, B., Buzrul, S., Tato, V., Akçelik, N., Akçelik, M. 2013. Modeling and predicting the biofilm formation of different *Salmonella* strains. *J Food Safety*, 33:503-508.
- Karpanen, T.J., Worthington, T., Hendry, E.R., Conway, B.R., and Lambert, P.A. 2008. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 1031–1036.
- Khan, A., Vu, K.D., Riedl, B., Lacroix, M. 2015. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria, *LWT - Food Science and Technology*, 61, 124-129.
- Khan, I., Oh, D. 2016. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.013.
- Khare, A.K., Biswas, A.K., Sahoo, J. 2014. Comparison study of chitosan, EDTA, eugenol and peppermint oil for antioxidant and antimicrobial potentials in chicken noodles and their effect on colour and oxidative stability at ambient temperature storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 286-293.
- Kiffer, C.R, Sampaio, J.L, Sinto, S, et al. 2005. In vitro synergy test of meropenem and sulbactam against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 52(4): 317-22.
- Kim, M., Kim, S., Park, B., Ryu, S. 2013. Core lipopolysaccharide-specific phage SSU5 as an auxiliary component of a phage cocktail for *Salmonella* biocontrol. *Appl. Environ. Microbiol*, 80, 1026-1034.
- Kim, M., Ryu, S. 2011. Characterization of a T5-like coliphage, SPC35, and differential development of resistance to SPC35 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*, 77, 2042-2050.
- Kim, M., Ryu, S. 2013. Antirepression system associated with the life cycle switch in the temperate *Podoviridae* phage SPC32H. *J. Virology*, 87, 11775-11786.
- Kirketerp-Moller, K., Jensen, P.O., Fazli, M., Madsen, K.G., Pedersen, J., Moser, C., Tolker-Nielsen, T., Høiby, N., Givskov, M., Bjarnsholt, T. 2008. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol.*, 46(8):2717-2722.
- Kjelleberg, S. and Molin, S. 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Current Opinion in Microbiology*, Vol.5, No.3, pp. 254-258.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12:39-85.

- Knezevic, P., and Petrovic, O. 2008. A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J. Microbiol. Methods*, 74:114–118.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., and Collins, J.J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.*, 8(6): 423–435.
- Kokare, C., Chakraborty, S., Khopade, A, et al. 2009. Biofilm: Importance and applications. *Indian J Biotechnol*, 8: 159–168.
- Kumar, C.G., Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol.*, 42: 9–27.
- Kutter, E., Raya, R., and Carlson, K. 2004. “Molecular mechanisms of phage infection,” in *Bacteriophages: Biology and Applications*, eds E. Kutter and A. Sulakvelidze (BocaRaton, FL: CRC press), 165–222.
- Kuwano, K., Tanaka, N., Shimizu, T., Nagatoshi, K., Nou, S., and Sonomoto, K. 2005. Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26:396-402.
- Landersdorfer, C.B., Ly, N.S., Xu, H., Tsuji, B.T., and Bulitta, J.B. 2013. Quantifying subpopulation synergy for antibiotic combinations via mechanism-based modeling and a sequential dosing design. *Antimicrob. Agents Chemother*, 57, 2343–2351.
- Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R.O., Vuilleumard, J.C., Lacroix, C., and Fliss, I. 2003. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *Int. Dairy J.*, 13:325–336.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J-M., Gamazo, C., Penadés, J.R., Lasa, I. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol*, 58(5):1322-1339.
- Lazar, V. 2011. Quorum sensing in biofilms-How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe*, in press.
- Le, Minor., L., Veron, M., and Popoff, M. 1982. A proposal for *Salmonella* nomenclature. *Ann Microbiol*, 133: 245-254.
- Ledeboer, N.A., Frye, J.G., McClelland, M., 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. *Infect Immun*, 74(6):3156-3169.
- Lee, J. and Kaletunç, G. 2010. Inactivation of *Salmonella* Enteritidis strains by combination of high hydrostatic pressure and nisin. *Int. J. Food Microbiol.*, 140: 49-56.
- Lee, S.H., and Kim, H.U. 1985. Studies on the antibiotic nisin produced by *Streptococcus lactis* IFO12007. *Korean J. Anim. Sci.*, 27:480-483.

- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., and Sulakvelidze, A. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 8, p. 4519–4526.
- Li, H., Zhao, L., Wu, J., Zhang, Y., and Liao, X. 2012. Inactivation of natural microorganisms in litchi juice by high-pressure carbon dioxide combined with mild heat and nisin. *Food Microbiol.*, 30: 139–145.
- Lianou, A., Koutsoumanis, K., P. 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol*, 160, 171-178.
- Lin, C., H., Hou, R., F., Shyu, C., L., Shia, W., Y., Lin, C., F., et al. 2012. In-vitro activity of mastoparan-AF alone and in combination with clinically used antibiotics against multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from animals. *Peptides*, 36, 114–120.
- Mahdavi, M., Jalali, M. and Kasra, R., Kermanshahi. 2007. The effect of nisin on biofilm forming foodborne bacteria using microtiter plate method. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2, 2, 113-118.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., and Hoekstra, R.M. 2010. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Oxford Journals*, 50(6), 882-889.
- Majtan, J., Majtanova, L., Xu, M., Majtan, V. 2008. In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Slovakia. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1294–1301.
- Maka, L., Mackiw, E., Sciezynska, H., Modzelewska, M., and Popowska, M. 2015. Resistance to Sulfonamides and Dissemination of *sul* Genes Among *Salmonella* spp. Isolated from Food in Poland. *Foodborne Pathogens and Disease*, Volume 12, Number 5, 383-389.
- Mangalappalli-Illathu, A.K. and Korber, D.R. 2006. Adaptive resistance and differential protein expression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3588–3596.
- Mangalappalli-Illathu, A.K., Vidovic, S., Korber, D.R. 2008. Differential adaptive response and survival of *Salmonella enterica* serovar enteritidis planktonic and biofilm cells exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10), 3669–3680.
- Mangalassary, S., Han, I., Rieck, J., Acton, J., Jiang, X., Sheldon, B., and Dawson, P. 2007. Effect of combining nisin and/or lysozyme with in-package pasteurization on thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey bologna. *J. Food Prot.*, 70:2503-2511.

- Mani-López, E., García, H.S., López-Malo, A. 2012. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Res. Int.*, 45, 713-721.
- Mantovani, H.C. and Russell, J.B. 2001. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:808–813.
- Martínez, B.J.M., Obeso, A., Rodríguez, and García, P. 2008. Nisin bacteriophage crossresistance in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 122: 253–258.
- Mataraci, E., and Dosler, S. 2012. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56, 6366–6371.
- Mathur, H., Field, D., Rea, M.C., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. 2017. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Frontiers in Microbiology*, Volume 8, Article 1205.
- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L. et al. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413: 852-856.
- McLaughlin, M.R. 2007. Simple colorimetric microplate test of phage lysis in *Salmonella enterica*. *J. Microbiol. Methods*, 69: 394–398.
- Meireles, A., Gonçalves, A.L., Gomes, I.B., Simões, L.C., and Simões, M. 2015. Methods to study microbial adhesion on abiotic surfaces, *AIMS Bioengineering*, 2(4): 297-309.
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, Vol.55, pp. 165-199.
- Millette, M., Smoragiewicz, W., and Lacroix, M. 2004. Antimicrobial potential of immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. *J. Food Prot.*, 67:1184-1189.
- Misselwitz, B, Kreibich, S.K., Rout, S., Stecher, B., Periaswamy, B., Hardt, W.D. 2011. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium binds to HeLa cells via Fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking. *Infect Immun*, 79(1):330-341.
- Moak, M. and Molineux, I.J. 2004. Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. *Mol. Microbiol.*, 51, 1169–1183.
- Møretrø, T., Heir, E., Nesse, L.L., Vestby, L.K., Langsrud, S. 2012. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International*, 45, 532–544
- 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.

- Moretro, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Storheim, S.E., Kotlarz, K., Langsrud, S. 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, 106(3), 1005–1012.
- Mørretø, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Storheim, S.E., Kotlarz, K., and Langsrud, S. 2008. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1005–1012.
- Murdock, C.A., Cleveland, J., Matthews, K.R., Chikindas, M.L. 2007. The synergistic effect of nisin and lactoferin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol*, 44, 255–261.
- Naghmouchi, K., Baah, J., Hober, D., Jouy, E., Rubrecht, C., Sane, F., et al. 2013. Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57, 2719–2725.
- Naghmouchi, K., LeLay, C., Baah, J. and Drider, D. 2012. Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. *Res. Microbiol.*, 163, 101–108.
- Nazer, A.I., Kobilinsky, A., Tholozan, J.-L., Dubois-Brissonnet, F. 2005. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microbiology*, 22, 391–398.
- Nde, C.W., Jang, H.-J., Toghrol, F., and Bentley, W.E. 2009. Global transcriptomic response of *Pseudomonas aeruginosa* to chlorhexidine diacetate. *Environ. Sci. Technol.* 43, 8406–8415.
- Ndoti-Nembe, A., Vu, K.D., Doucet, N., Lacroix, M. 2013. Effect of combination of essential oils and bacteriocins on the efficacy of gamma radiation against *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Radiation Biology*, 89(10): 794–800.
- Nguyen, H.D.N., Yang, Y.S., Yuk, H.G. 2014. Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT Food Sci Technol.*, 55:383-388.
- Nguyen, P. and Mittal, G. 2007. Inactivation of naturally occurring microorganisms in tomato juice using pulsed electric field (PEF) with and without antimicrobials. *Chem. Eng. Process.*, 46: 360-365.
- Nishino, K., Nikaido, E., Yamaguchi, A. 2009. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1794(5), 834–843.
- Norhana, M.N.W., Poole, S.E., Deeth, H.C., Dykes, G.A. 2012. Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 °C. *Food Microbiology*, 31, 43-50.

- Nykänen, A., Weckman, K. and Lapveteläinen, A. 2000. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked rainbow trout by nisin and sodium lactate. *Int. J. Food Microbiol.*, 61: 63–72.
- O'Connor, P.M., O'Shea, E.F., Guinane, C.M., O'Sullivan, O., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. 2015. Nisin H is a new nisin variant produced by the gut-derived strain *Streptococcus hyointestinalis* DPC6484. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(12), 3953–3960.
- Ogasawara, H., Yamamoto, K., Ishihama, A. 2011. Role of the Biofilm Master Regulator CsgD in Cross-Regulation between Biofilm Formation and Flagellar Synthesis. *J Bacteriol.*, 15:193(10):2587–97.
- Oliveira, F.A., Brandelli, A., Tondo, E.C., 2006. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *New Microbiologica*, 29, 49–54.
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 86–92.
- Parente, E., Giglio, M.A., Ricciardi, A. and Clemente, F. 1998. The combined effect of nisin, leucocin F10, pH, NaCl and EDTA on the survival of *Listeria monocytogenes* in broth. *Int J. Food Microbiol.*, 40:65-75.
- Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, Vol.13, No.1, pp. 27-33.
- Pathanibul, P., Taylor, T.M., Davidson, P.M. and Harte, F. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin. *Int. J. Food Microbiol.*, 129: 316-320.
- Paul, D., Cotter, R., Ross, P., Hill, C. 2013. Bacteriocins- a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*, 11: 95–105.
- Pelludat, C., Prager, R., Tschape, H., Rabsch, W., Schuchhardt, J. and Hardt, W.D. 2005. Pilot study to evaluate microarray hybridization as a tool for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain differentiation. *J Clin Microbiol*, 43: 4092-4106.
- Penna, T.C.V., and Moraes, D.A. 2002. The influence of nisin on the thermal resistance of *Bacillus cereus*. *J. Food Protect.*, 65: 415–418.
- Petersen, P.J., Labthavikul, P., Jones, C.H. and Bradford, P.A. 2006. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57:573–576.

- Pires, D.P., Oliveira, H., Melo, L.D., Sillankorva, S. and Azeredo, J. 2016. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100, 2141–2151.
- Pol, I.E., and Smid, E.J. 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl. Microbiol.*, 29:166-170.
- Poulsen, L.V. 1999. Microbial biofilm in food processing. *Lebensm Wiss u Techn.*, 32 (6):321-326.
- Prevelige, P.E. 2006. The Bacteriophages, Bacteriophage P22, Chapter 29, Oxford University Press, UK.
- Prouty, A.M., Gunn, J.S. 2003. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infect Immun*, 71(12):7154-7158.
- Prudencio, C.V., Mantovani, H.C., Cecon, P.R., and Vanetti, M.C.D. 2014. Differences in the antibacterial activity of nisin and bovicin HC5 against *Salmonella* Typhimurium under different temperature and pH conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 18-26.
- Prudencio, C.V., Mantovani, H.C., Cecon, P.R., Prieto, M., Vanetti, M.C.D. 2016. Temperature and pH influence the susceptibility of *Salmonella* Typhimurium to nisin combined with EDTA. *Food Control*, 61, 248-253.
- Raad, I. and Sherertz, R.J. 1994. M-EDTA pharmaceutical preparations and uses thereof. U.S. patent 5,362,754.
- Raad, I., Chatzinikolaou, I., Chaiban, G., Hanna, H., Hachem, R., Dvorak, T., Cook, G. and Costerton, W. 2003. In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 3580–3585.
- Raetz, C.R.H. and Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, 71: 635–700.
- Rakhuba, D.V., Kolomiets, E.I., Szwajcer, Dey, E., Novik, G.I. 2010. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol. J. Microbiol.*, 59, 145-155.
- Razavi Rohani, S.M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S., and Griffiths, M.W. 2011. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *LW - Food Sci. Technol.*, 44: 2260–2265.
- Ricci, V., Piddock, L.J. 2010. Exploiting the role of TolC in pathogenicity: identification of a bacteriophage for eradication of *Salmonella* serovars from poultry. *Appl. Environ. Microbiol*, 76, 1704e1706.
- Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Mileu, (RIVM). 2011. Staat van zoönosen.

- Rishi, P., Preet Singh, A., Garg, N. and Rishi, M. 2014. Evaluation of nisin-beta-lactam antibiotics against clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J. Antibiot.*, 67, 807–811.
- Rishi, P., Preet, S., Kaur, P. 2011. Effect of *L. plantarum* cell-free extract and cotrimoxazole against *Salmonella* Typhimurium: a possible adjunct therapy. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10:9.
- Rodrigues, D., Teixeira, P., Oliveira, R., Azeredo, J. 2011. *Salmonella enterica* Enteritidis biofilm formation and viability on regular and triclosan-impregnated bench cover materials. *Journal of Food Protection*, Vol.74, No.1, pp. 32-37.
- Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Donovan, D.M., Rodríguez, A. and García, P. 2013. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics. *Crit. Rev. Microbiol.*, 39, 427–434.
- Rogers, L.A. and Whittier, E.O. 1928. Limiting factors in lactic fermentation. *J. Bacteriol.*, 16: 211-229.
- Römling, U. 2005. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Sci*, 62(11).
- 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., Olsén, A., Normark, S., and Reinköster, 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., Sierralta, W.D., Eriksson, K., Normark, S. 1998. Multicellular and aggregative behavior of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol*, 28(2):249-264.
- 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.
- Rose, R.K. 2000. The role of calcium in oral streptococcal aggregation and the implications for biofilm formation and retention. *Biochim. Biophys. Acta*, 1475:76–82.
- Russel, 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations, *Lancet Infect Dis.*, 3(12):794-803.
- Russell, A.D. and Day, M.J. 1993. Antibacterial activity of chlorhexidine. *Journal of Hospital Infection*, 25, 229-238.
- Ryan, C.A., Nickels, M.K., Hargrett-Bean, N.T., Potter, M.E., Endo, T., Mayer, L. et al. 1987. Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. *Jama*, 258: 3269-3274.

- Ryan, R.P. and Dow, J.M. 2008. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, Vol.154(Pt 7), pp. 1845-1858.
- Rychlik, I., Barrow, P.A. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol Rev*, 29(5):1021-1040.
- Saldaña, G., Monfort, S., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I. 2012. Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields. *Food Research International*, 45, 1080-1086.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G. Bassler, B.L. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*, Vol.41, No.2, pp. 463-476.
- Scher, K., Romling, U. and Yaron, S. 2005. Effect of Heat, Acidification, and Chlorination on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells in a Biofilm Formed at the Air-Liquid Interface. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71(3); pp. 1163-1168.
- Schroeder, M., Brooks, B.D. and Brooks, A.E. 2017. The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance. *Genes*, 8, 39; doi:10.3390/genes8010039.
- Sedlacek, M., J., and Walker, C. 2007. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol*, 22(5): 333–339.
- Sharma, M., Ryu, J.H., and Beuchat, L.R. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *J. Appl. Microbiol*, 99, 449-459.
- Sheldon, A.T. 2005. Antiseptic “resistance”: Real or perceived threat? *Clinical Infectious Diseases*, 40(11), 1650–1656.
- Shia, X. and Zhua, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries, *Trends in Food Science & Technology*, 1-7.
- Singh, A.P., Prabha, V., Rishi, P. 2013. Value Addition in the Efficacy of Conventional Antibiotics by Nisin against *Salmonella*, *PLoS ONE*, 8(10): e76844.
- Singla, R., Goel, H., and Ganguli, A. 2014. Novel synergistic approach to exploit the bactericidal efficacy of commercial disinfectants on the biofilms of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, VOL. 118 No. 1, 34-40.
- Smith, J.L., Fratamico, P.M. Novak, J.S. 2004. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*, Vol.67, No.5, pp. 1053-1070.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C. and Pandey, A. 2006. New Perspectives for Citric Acid Production and Application, *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 141–149.

- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J., Gamazo, et al. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43(3):793-808.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., and Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiol.*, 25:120-127.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Sci*, 80, 159–166.
- Solomon, E.B., Niemira, B.A., Sapers, G.M., Annous, B.A. 2005. Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *J Food Protect*, 68:906-912.
- Sonne-Hansen, J. and Jenabian, S.M. 2005. Molecular serotyping of *Salmonella*: identification of the phase 1 H antigen based on partial sequencing of the *fliC* gene. *Apmis*, 113: 340-348.
- Sopirala, M.M., Mangino, J.E., Gebreyes, W.A., Biller, B., Bannerman, T., Balada-Llasat, J. and Pancholi, P. 2010. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 54, No. 11, p. 4678–4683.
- Soto, S.M. 2013. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4:3, 223–229.
- Speranza, B., Corbo, M.R., Sinigaglia, M. 2011. Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. *Journal of Food Science*, 76: M12–M16.
- Spricigo, D.A., Bardina, C., Cortes, P., Llagostera, M. 2013. Use of bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 165, 169-174.
- Srikanth, C.V., Mercado-Lubo, R., Hallstrom, K., McCormick, B.A. 2011. *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. *Cell Mol Life Sci*, 68(22):3687-3697.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., de Keersmaecker, S.C.J. 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res Int*, 45(2):502-531.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Mijac, V., Svabic-Vlahovic, M. 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol.*, 20:339-343.

- Stepanovic, S., Irkovi, I., Ranin, L., Svabi-Vlahovi, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*, 38(5):428-432.
- 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.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 57, 3613–3615.
- Stewart, P.S., Rayner, J., Roe, F., Rees, W.M. 2001. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *Journal of Applied Microbiology*, 91:525-532.
- Stickler, D. 1999. Biofilms. *Current Opinion in Microbiology*. 2(3), 270-275.
- Su, L., Chiu, C., Chu, C., and Ou, J.T. 2004. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge. *Antimicrobial Resistance*, 39, 546-551.
- Tabak, M., Scher, K., Chikindas, M.L., Yaron, S. 2009. The synergistic activity of triclosan and ciprofloxacin on biofilms of *Salmonella* Typhimurium. *FEMS Microbiology Letters*, 301(1), 69–76.
- 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*, 267(2), 200–206.
- Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F., And Arrow, A.S. 1987. Bacterial Uptake of Aminoglycoside Antibiotics. *Microbiological Reviews*, p.p. 439-457.
- Teplitski, M., Barak, J.D., Schneider, K.R. 2009. Human enteric pathogens in produce: un-answered ecological questions with direct implications for food safety. *Curr Opin Biotechnol*, 20(2):166-171.
- Tezel, B.U., Akçelik, N., Yüksel, F.N., Karatuğ, N.T., Akçelik, M. 2016. Effects of sub-MIC antibiotic concentrations on biofilm production of *Salmonella* Infantis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2016.1224981>.
- Tiwari, B.R., Kim, S., and Jungmin, K. 2013. A Virulent *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Phage SE2 with a Strong Bacteriolytic Activity of Planktonic and Biofilmed Cells. *Journal of Bacteriology and Virology*, Vol. 43, No. 3 p.186 – 194.
- Tong, H.S., Townsend, K.M., Fenwick, S.G., Maker, G., Trengove, R.D., and O’Handley, R.M. 2010a. Comparative susceptibility of *Salmonella* Typhimurium biofilms of different ages to disinfectants. *Biofouling*, 26, 7, 859–864.

- Tong, Z., Ni, L., Ling, J. 2014a. Antibacterial peptide nisin: A potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria, *Peptides*, 60, 32–40.
- Tong, Z., Zhang, Y., Ling, J., Ma, J., Huang, L., Zhang, L. 2014b. An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *PLoS One*, 9:e89209.
- Tong, Z., Zhou, L., Jiang, W., Kuang, R., Li, J., Tao, R., Ni, L. 2011. An in vitro synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against *Streptococcus mutans*. *Peptides*, 32, 2021–2026.
- Touchon, M., Rocha, E.P.C. 2010. The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*. *PLoS One*, 5, e11126.
- Touzel, R.E., Sutton, J.M., Wand, M.E. 2016. Establishment of a multi-species biofilm model to evaluate chlorhexidine efficacy. *Journal of Hospital Infection*, 92,154-160.
- Tu, L. and Mustapha, A. 2002. Reduction of *Brochothrix thermosphacta* and *Salmonella* serotype Typhimurium on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin and nisin combined with EDTA. *J. Food Sci.*, 67: 302-306.
- Ueda, S. and Kuwabara, Y. 2007. Susceptibility of Biofilm *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* to Detergents and Sanitizers. *Biocontrol Science*, Vol.12, No.4, 149-153.
- Ukuku, D.O., Bari, M.L., Kawamoto, S., Isshiki, K. 2005. Use of hydrogen peroxide in combination with nisin, sodium lactate and citric acid for reducing transfer of bacterial pathogens from whole melon surfaces to fresh-cut pieces. *Int. J. Food Microbiol.*, 104, 225-233.
- Ukuku, D.O., Zhang, H., and Huang, L. 2009. Growth parameters of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and aerobic mesophilic bacteria of apple cider amended with nisin-EDTA. *Foodborne Pathog. Dis.*, 6:487-94.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev*, 56: 395–411.
- 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 Veterinary Research*, Vol. 5(20); pp. 1-6.
- Walters, M. and Sperandio, V. 2006. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*, Vol.296, pp. 125-131
- Wandling, L.R., Sheldon, B.W. and Foegeding, P.M. 1999. Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. *J. Food Protect.*, 62: 92-498.
- Watnick, P., Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*, 182: 2675–2679.

- White, 2011. Antibacterial efficacy of phosvitin, carvacrol, or nisin alone or combined against foodborne human enteric pathogens. Graduate Theses and Dissertations, Paper 10151.
- 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.
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J. Salmond, G.P. 2001. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Reviews, Vol.25, No.4, pp. 365-404.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., et al. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. Journal of Biological Chemistry, 276, 1772-1779.
- Wong, C.L., Sieo, C.C., Tan, W.S., Abdullah, N., Hair-Bejo, M., Abu, J., Ho, Y.W. 2014. Evaluation of a lytic bacteriophage, F st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. Int. J. Food Microbiol, 172, 92-101.
- Wong, H.S., Townsend, K.M., Fenwick, S.G., Maker, G., Trengove, R.D., and O'Handley, R.M. 2010a. Comparative susceptibility of *Salmonella* Typhimurium biofilms of different ages to disinfectants. Biofouling, Vol. 26, No. 7, October 2010, 859–864.
- Wong, H.S., Townsend, K.M., Fenwick, S.G., Trengove, R.D., and O'Handley, R.M. 2010b. Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella* Typhimurium biofilms to disinfectants. Journal of Applied Microbiology, 108, 2222–2228.
- Wood, T.K., Knabel, S.J. and Kwan, B.W. 2013. Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. Appl. Environ. Microbiol., doi:10.1128/AEM.02636-13
- Woodward, M.J., Sojka, M., Sprigings, K.A. and Humphrey, T.J. 2000. The role of sef 14 and sef17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. J Med Microbiol, Vol. 49; pp. 481-487.
- Xie, L. and van der Donk, W.A. 2004. Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. Current Opinion in Chemical Biology, 8, 498-507.
- Xu, H., Zou, Y., Lee, H. and Ahn, J. 2010. Effect of NaCl on the Biofilm Formation by Foodborne Pathogens. Journal of Food Science, Vol. 75(9); pp. 580-585.
- Yalçın, B., Kalkancı, A., Gürelik, F., Fidan, I., Kuştimur, S., Özdek, Ş. 2010. Moksifloksasin ve amfoterisin B kombinasyonunun *Candida* türleri üzerine in vitro sinerjistik etkisi. Mikrobiyol Bul, 44(1): 65-70.
- Yang, Y., Miks-Krajnik, M., Zheng, Q., Lee, S.B., Lee, S.C., Yuk, H. 2016. Biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis under food-related environmental stress

- conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. *Food Microbiology*, 54, 98-105.
- Yuste, J., Mor-Mur, M., Capellas, M., Guamis, B. and Pla, R., 1998. Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. *Food Microbiol.*, 15:407–414.
- Zakikhany, K., Harrington, C.R., Nimtz, M., Hinton, J.C.D., Römling, U. 2010. Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, 77(3):771-786.
- Zhao, L., Wang, S., Liu, F., Dong, P., Huang, W., Xiong, L., and Liao, X. 2012. Comparing the effects of high hydrostatic pressure and thermal pasteurization combined with nisin on the quality of cucumber juice drinks. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* In press.
- Zinno, P., Devirgiliis, C., Ercolini, D., Ongeng, D., Mauriello, G. 2014. Bacteriophage P22 to challenge *Salmonella* in foods. *Int. J. Food Microbiol*, 191, 69-74.
- Zobell, C.E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol*, 46(1):39-56.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., 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(6):1452-1463.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma Neslihan YÜKSEL

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 08.07.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Bahçelievler Deneme Lisesi (2003)

Lisans : Kırıkkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2008)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2012)

Doktora : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2017)

Yayınlar (SCI)

Yuksel, F.N., Akcelik, N., Akcelik, M. 2015. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains, isolated from traditional cheeses in Turkey. Molecular Genetics, Microbiology and Virology, Volume 30, Issue 4, pp 206-215.

Tezel, B.U., Akçelik, N., **Yuksel, F.N.**, Taskale Karatug, N., Akçelik, M. 2016. Effects of Sub-MIC antibiotic concentrations on biofilm production of *Salmonella* Infantis. Biotechnology & Biotechnological Equipment. VOL. 30, NO. 6, 1184–1191.

Hakemli Dergiler

Diani, M., Esiyok, O.G., Ariafar, M.N., **Yuksel, F.N.**, Altuntas, E.G. and Akcelik, N. 2014. The interactions between *esp*, *fsr*, *gelE* genes and biofilm formation and pfge analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains. African Journal of Microbiology Research. Vol. 8(2), pp. 129-137.

Yuksel, F.N., Akçelik, M. 2015. Mikrobiyal biyosürektenler: yüzey aktif bileşikler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. November, 31(3):

Uluslararası Kongre Sunum

31 March -03 April 2012 - ECCMID 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London, U.K. Poster Number: R2436 - Abstract (publication only) Name of Poster: B. Karaca*, **F.N. Yuksel**, O. Gunay, M. Diani, M.N. Badali, B. Yavas, N. Akcelik, M. Akcelik, Biofilm Producing Ability of *Salmonella* Typhimurium BK4, isolated from Turkey

27-30 April 2013 - ECCMID 23 rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany. Poster number: P1107- Abstract (poster session). Name of poster: B. Karaca*, M. Akcelik, N. Taskale Karatug, **N. Yuksel**, The efficacy of P22 bacteriophage as a method of *Salmonella* Typhimurium biofilm eradication

27-30 April 2013 - ECCMID 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Berlin, Germany. Poster Number: R2538- Abstract (publication only). Name of poster: M. Diani, Ö. Günay, M.N. Badali, **F.N. Yüksel**, B. Buyer, E. Gunes Altuntas, N. Akçelik*, Difference in biofilm-forming abilities among faecal, urine and blood enterococcal isolates of human origin.

10-13 May 2014 - ECCMID 24nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain. Poster Number: R255- Abstract (publication only) Name of poster: Gunay Esiyok, O. (1); **Yuksel, F. N.** (2)*; Diani, M.(1); Ariaifar, M.N.(1); Akcelik, N.(1), Determination of genetic diversity among vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and identification of virulence genes by polymerase chain reactions (PCR).

02-06 June 2014 - 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. Oral presentation: **YÜKSEL, F. N.**, TAŞKALE KARATUĞ, N., KARACA, B., AKÇELİK, N., AKÇELİK, M. Comparison of PCR-RFLP and PFGE for determining the genetic diversity of *Salmonella* isolates. p.49.

02-06 June 2014 - 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. Name of poster: TAŞKALE KARATUĞ, N., **YÜKSEL, F.N.**, BUYER, B., AKÇELİK, N., AKÇELİK, M. Genetic Nature of Plasmids Derived from Multiple Drug Resistant *Salmonella* Strains. p. 112.

25-28 April 2015 - 25nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark. Poster Number: P0059 - Abstract (poster session). Name of poster: Karaca, Basar; Özdemir, Caner; **Yüksel, Fatma Neslihan**; Akçelik, Mustafa. More powerful *Salmonella* biofilms: a new scenario directed by the subinhibitory antibiotic concentrations?

9-12 April 2016 - 26nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands. Poster Number: EV0416 - Abstract (e-poster) Name of poster: **F. N. Yüksel**, N. Taskale Karatug, N. Akçelik, M. Akçelik. Determination the efficiency of Nisin against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344.

19-22 July 2016 - 25th International ICFMH Conference - FoodMicro 2016- Dublin, Ireland. Poster Number: PO1-AB-030. Name of poster: I. Abay, N. AKCELIK, M. N. ARIAFAR, **F. N. YUKSEL**. The Effect of Certain Disinfectants on Biofilm Producer *E. faecalis* Isolates.

19-22 July 2016 - 25th International ICFMH Conference - FoodMicro 2016- Dublin, Ireland. Poster Number: PO1-AB-033. Name of poster: B. UYMAZ TEZEL, N. Akçelik, **F. N. Yüksel**, N. Taşkale Karatug, P. Şanlıbaba, M. Akçelik. Effects of Sub-Mic Antibiotic Concentrations on Biofilm Production of Food Originated *Salmonella* Infantis Strains.

22-25 April 2017 - 27nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria. Poster Number: P0574 - Abstract (poster session). Name of poster: Neslihan Taskale Karatug, **Fatma Neslihan Yuksel**, Caner Ozdemir, Cansu Gürcan, Sinem Ugur, Çiğdem Elif Çelik, Mustafa Akçelik. Anti-biofilm potential effect of *Lactococcus lactis* CNM81 strain isolated from raw milk on *Salmonella* Typhimurium SL1344 biofilm.

Ulusal Kongre Sunum

21-23 October 2016 - International Conference on Biological Sciences, Konya, Turkey. Oral presentation: OP-26- Neslihan Taskale Karatug, **Fatma Neslihan Yuksel**, Caner Ozdemir, Nefise Akcelik, Mustafa Akcelik. Does sub-inhibitory concentrations of clinically important antibiotics induce biofilm production of *Enterococcus faecium* strain?