

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**YÜKSEK MİKTARDA BİYOFİLM OLUŞTURAN TERMOFİLİK BASİLLERİN
ÇEŞİTLİ YÜZEYLERDEKİ BİYOFİLM YAPILARININ ANALİZİ VE BİYOFİLMİN
GİDERİMİ İLE BİYOKOROZYONUN ÖNLENMESİ**

Tuğba KILIÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2016**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Tuğba KILIÇ tarafından hazırlanan “**Yüksek Miktarda Biyofilm Oluşturan Termofilik Basillerin Çeşitli Yüzeylerdeki Biyofilm Yapılarının Analizi ve Biyofilmin Giderimi ile Biyokorozyonun Önlenmesi**” adlı tez çalışması 20/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ
Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Rektör Yardımcısı

Üye: Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ
Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Can ÖZEN
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim DEMİR

Enstitü Müdürü V.

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.

20.12.2016

Tuğba KILIÇ

ÖZET

Doktora Tezi

YÜKSEK MİKTARDA BİYOFİLM OLUŞTURAN TERMOFİLİK BASİLLERİN ÇEŞİTLİ YÜZEYLERDEKİ BİYOFİLM YAPILARININ ANALİZİ VE BİYOFİLMİN GİDERİMİ İLE BİYOKOROZYONUN ÖNLENMESİ

Tuğba KILIÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Tez kapsamında biyofilm oluşumu ve giderimi çalışmalarına *Aeribacillus pallidus* E334 izolatu ve *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127 suşu dahil edilmiştir. E334 ve DSM 17127 optimum biyofilm oluşumu değerleri sırasıyla, 60°C, pH 7.5, %1.5 NaCl ve 60°C, pH 8.0, %0 NaCl olarak belirlenmiştir. E334 ekstraselüler polimerik maddelerinin (EPS) çoğunlukla protein ve ekstraselüler DNA (eDNA) bileşenlerinden oluştuğu, fakat DSM 17127 EPS içeriğinin protein, karbonhidrat ve eDNA açısından daha zengin olduğu görülmüştür. E334 ve DSM 17127 genomik DNA ve eDNA'larının moleküler ağırlıkları sırasıyla 24.5 kb ile 27.6 kb ve 21.4 kb ile 20.9 kb olarak hesaplanmıştır. eDNA'lar, DNaz I enzimine duyarlı bulunmuş, E334 ve DSM 17127 olgun biyofilmlerinde yaklaşık %80.0 giderim sağlanmıştır. DNaz I saflaştırılan genomik DNA'yı parçalarken, saflaştırılan eDNA'ları etkilememiştir. Bu da, karbonhidrat ve proteinlerinden arınmış eDNA'ların muhtemelen daha ileri katlanmaları sonucu enzim dirençliliğiyle açıklanabilir. E334 ve DSM 17127 biyofilm oluşumu sırasıyla, polipropilen ile cam ve polikarbonat ile çelik yüzeylerde en iyi sonucu vermiştir. E334 ve DSM 17127 biyofilmleri sırasıyla, alkalen proteaz (ALP) ile SDS ve ALP ile tripsin ile giderilebilmiştir. Daha ileri giderim çalışmaları E334 ile yürütülmüştür. Konfokal Mikroskop (CLSM) analizlerinde, polipropilen yüzeyinde 17 µm biyofilm kalınlığı, EPS içeriğinin yoğun floresan özelliği ve EPS'nin mikrokolonileri ağa benzer yapıyla sardığı gözlenmiştir. Cam yüzeyinde, daha ince oluşum görülmüştür. Polipropilen yüzeyde E334 canlı hücrelerin ALP ile tamamı ve cam yüzeyden biyofilm kütlelerinin (CLSM) %100'ü SDS ve ALP ile giderilebilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma güçlü biyofilmler üretebilen E334 izolatının endüstriyel süreçler için bir risk oluşturduğu ve pek çok temizleme rejiminin yeniden ele alınması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Aralık 2016, 180 sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik basil, Biyofilm oluşumu ve giderimi, EPS, Konfokal Lazer Taramalı Mikroskopisi (CLSM)

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

ANALYSES OF BIOFILM STRUCTURES ON VARIOUS SURFACES PRODUCED BY HIGH AMOUNTS OF BIOFILM-FORMING THERMOPHILIC BACILLI AND PREVENTION OF BIOCORROSION WITH BIOFILM REMOVAL

Tuğba KILIÇ

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

In this thesis, the biofilm formation and removal works have been conducted with *Aeribacillus pallidus* E334 and *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127. The optimum biofilm formation values of strain E334 and DSM 17127 have been determined as 60°C, pH 7.5, 1.5 % NaCl and 60°C, pH 8.0, 0% NaCl, respectively. It has been found that the extracellular polymeric materials (EPS) of strain E334 are mostly composed of protein and extracellular DNA (eDNA) components, but the content of EPS of strain DSM 17127 is richer in terms of protein, carbohydrate and eDNA. The molecular weights of genomic DNA and eDNA of strains E334 and DSM 17127 were calculated as 24.5 kb with 27.6 kb and 21.4 kb with 20.9 kb, respectively. eDNAs were found to be sensitive to DNase I, and approximately 80.0% of the mature biofilms of strains E334 and DSM 17127 were removed. DNase I has cleaved the purified genomic DNA, but not the purified eDNAs. This is probably due to the further folding of carbohydrates and protein-free eDNAs, resulting in enzyme resistance. The biofilm formation of strains E334 and DSM 17127 gave the best results on polypropylene with glass and polycarbonate with steel surfaces, respectively. The biofilms of strains E334 and DSM 17127 were removed by alkaline protease (ALP) with SDS and ALP with trypsin, respectively. Further biofilm removal works have been carried out with strain E334. In confocal microscope (CLSM) analyzes, a 17 µm biofilm thickness on the polypropylene surface, the intense fluorescence of the EPS content were observed as well as wrapped microcolonies with a network-like structure by EPS. On the glass surface, thinner formation was observed. On the polypropylene surface, 100% of E334 viable cells were completely removed with ALP and 100% of the biofilm mass (CLSM) from the glass surface was removed by SDS and ALP. In conclusion, this study shows that the E334 isolate, which produces strong biofilms, poses a risk for industrial processes and it is necessary to reconsider many cleaning regimes.

December 2016, 180 pages

Key Words: Thermophilic bacilli, Biofilm formation and removal, EPS, Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince, değerli bilgi, öneri ve deneyimlerini aktaran, engin fikirleriyle her daim katkıda bulunan, akademik tecrübesini esirgemeyen, kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D),

Doktora sürecim boyunca desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ'e (Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi Rektör Yardımcısı), değerli katkılarından dolayı TİK üyesi Sayın Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ'a (Gazi Üniversitesi, Biyoloji A.B.D), konfokal lazer taramalı mikroskop çalışmaları için yardımlarından dolayı Doç. Dr. Can ÖZEN'e (ODTÜ, Biyoteknoloji A.B.D) ve ODTÜ Merkez Laboratuvarı uzman araştırmacısı Nalan BABACAN'a, yakın arkadaşlıklarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarındaki değerli çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Başar KARACA (Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D), Araş. Gör. Ergin ŞAHİN (Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D), Araş. Gör. Hümeysra TAŞKIN (Erzincan Üniversitesi, Biyoloji A.B.D), Pırıl Beste ÖZEL, Emine DEREBAY, Elif GELGEÇ'e, her aşamada beni yalnız bırakmayıp her zaman yanımda olan dostum Araş. Gör. Gülizar AYDOĞDU'ya (Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D), stereo mikroskop çalışmalarında yardımlarından dolayı Prof. Dr. Münevver PINAR (Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D) ve Araş. Gör. Aydan ACAR'a (Ankara Üniversitesi, Biyoloji A.B.D), yakın arkadaşlarım Bahar ÇINAR ve Bürge ŞİRİN'e,

Bu doktora tezi, 14B0430003 kodlu, "Termofilik basillerin çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşturmaları ve biyofilm yapılarının giderimiyle biyokorozyonun önlenmesi" başlıklı Bağımsız Proje ve 14H0430007 kodlu, "Termofilik basillerde biyofilm oluşumu ve giderimi" başlıklı Hızlı Destek Projesi ile desteklenmiş olup, katkılarından dolayı Ankara Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Hayatım boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, hep yanımda olduklarını hissettiren aileme,

Saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tuğba KILIÇ
Ankara, Aralık 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2.1 Biyofilmin Tanımı ve Oluşum Sebepleri	7
2.2 Biyofilmin Oluştığı Yerler	8
2.3 Biyofilm Matriks Bileşeni Ekstraselüler Polimerik Maddeler (EPS)	10
2.3.1 EPS'nin karbonhidrat içeriği.....	15
2.3.2 EPS'nin protein içeriği	16
2.3.3 EPS'deki ekstraselüler enzimler	17
2.3.4 EPS'de ekstraselüler DNA (eDNA) içeriği.....	19
2.3.5 EPS'deki lipid içeriği	22
2.3.6 EPS'deki iyonik bileşikler	22
2.4 Biyofilmlerin Tutundukları Yüzeylerle Olan Etkileşimleri	23
2.5 Biyofilm Yaşam Döngüsü	24
2.6 Biyofilm Oluşumunda Hareket.....	31
2.7 Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler	34
2.8 Biyofilmlerin Geliştikleri Yüzeyler.....	39
2.9 eDNA'nın Biyofilm Oluşumundaki Önemi.....	41
2.10 DNaz I Enzimi Çalışmaları ile eDNA'nın Varlığının Tespit Edilmesi.....	43
2.11 Biyofilmin Giderimi	44
2.12 Biyofilm Çalışmalarında Uygulanan Mikroskopi Temelli Metodlar	53
2.13 Termofilik Bakteriler	57
2.13.1 <i>Bacillaceae</i> familyasının termofilik üyeleri	60
2.13.2 Termofilik basiller ve biyofilm üretimleri	61
2.13.3 <i>Aeribacillus pallidus</i> türü ile ilgili yapılan çalışmalar	68
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	71
3.1 Materyal	71
3.1.1 Bakteri izolatları ve referans suşlar	71
3.1.2 Besiyerleri	73
3.1.3 Çalışmalarda kullanılan çözeltiler.....	74
3.2 Yöntem	77
3.2.1 Bakterilerin ön aktifleştirilmeleri.....	77
3.2.2 Bakterilerde flagella varlığının belirlenmesi	77
3.2.3 Kongo kırmızısı içeren besiyerinde bakterilerin biyofilm morfolojularının tayini	78
3.2.4 Kalkoflorlu besiyerinde EPS bileşeni olan selülozun tayini.....	78
3.2.5 Sıvı besiyerlerinde pelikül oluşumunun gözlenmesi	78

3.2.6 Polistiren mikrotitrasyon plakalarında biyofilm oluşum miktarlarının spektrofotometrik tayini	79
3.2.7 Bakterilerin sıvı besiyerine konulan paslanmaz çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşumlarının incelenmesi	81
3.2.8 Bakterilerin optimum pH, tuz ve sıcaklıklarının spektrofotometrik tayini ...	83
3.2.9 Bakterilerin biyofilm oluşum miktarlarının farklı pH, tuz ve sıcaklıklarda spektrofotometrik tayini	84
3.2.10 Bakterilerin optimum şartlarda paslanmaz çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşumlarının incelenmesi	84
3.2.11 Bakterilerin ekzopolisakkarit bileşenlerinin belirlenmesi	84
3.2.11.1 EPS bileşenlerinden karbohidrat içeriğinin tayini	85
3.2.11.2 EPS bileşenlerinden protein içeriğinin tayini	86
3.2.11.3 EPS bileşenlerinden eDNA içeriğinin tayini	87
3.2.12 Biyofilm hücrelerinin genomik DNA izolasyonu.....	88
3.2.13 Bakterilerin oluşturduğu olgun biyofilmlerin DNaz I enzimi ile muamelesi sonucu eDNA'nın fonksiyonunun belirlenmesi	88
3.2.14 Genomik DNA ve eDNA'nın RAPD-PCR ile incelenmesi.....	89
3.2.15 DNaz I, RNaz A ve Proteinaz K enzimlerinin genomik DNA ve eDNA üzerindeki etkilerinin belirlenmesi	90
3.2.16 Bakterilerin çeşitli abiyotik yüzeylerde oluşturdukları biyofilm yapılarının incelenmesi.....	90
3.2.17 Polistiren mikrotitrasyon plakalarında geliştirilen bakterilerin biyofilm yapılarının çeşitli kimyasal maddeler ile giderimi	91
3.2.18 <i>Aeribacillus pallidus</i> E334'ün en uygun iki abiyotik yüzeyde oluşturduğu biyofilmlere giderim öncesi ve sonrası uygulanan işlemler	94
3.2.19 Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile mikroskobik inceleme...	96
3.2.20 İstatistik analizler	97
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	98
4.1 Biyofilm Üreticisi Bakterilerin Taranarak Seçilmeleri İçin Tez Çalışmaları Öncesi Yürütülen Tez Kapsamı Dışındaki Araştırmalar	98
4.2 Ön Çalışmalarda Belirlenen ve Tez Çalışmasına Dahil Edilen İki Biyofilm Üreticisi Termofilik <i>Basilin</i> Genel Biyofilm Üretim Karakteristikleri.....	101
4.3 Bakterilerin Mikrotitrasyon Plakalarında Gelişimleri ve Biyofilm Oluşumları İçin Gerekli Optimum pH, Tuz ve Sıcaklık Gereksinimlerinin Saptanması	106
4.4 Bakterilerin Optimum pH, Tuz ve Sıcaklık Konsantrasyonlarında Paslanmaz Çelik Kupon Yüzeylerinde Biyofilm Oluşturmaları	111
4.5 Bakterilerin Biyofilmlerindeki EPS Bileşenlerinin Belirlenmesi.....	112
4.5.1 Karbohidrat miktarı tayini	112
4.5.2 Protein miktarı tayini	113
4.5.3 Genomik DNA ve ekzopolisakkarit bileşenlerinden eDNA içeriği.....	115
4.6 Bakterilerin Oluşturduğu Olgun Biyofilmlerin DNaz I Enzimi ile Muamelesi Sonucu eDNA'nın Fonksiyonunun Belirlenmesi	116
4.7 Genomik DNA ile eDNA'nın RAPD-PCR Analizleri ve DNaz I, RNaz A ve Proteinaz K Enzimlerine Duyarlılıkları	118
4.8 Bakterilerin Mikrotitrasyon Plakalar İçinde Bulunan Çeşitli Abiyotik Yüzeylerde Oluşturdukları Biyofilm Yapılarının İncelenmesi.....	120

4.9 Bakterilerin Polistiren Mikrotitrasyon Plakalar Yüzeyinde Oluşturduğu Biyofilmlerin Kimyasal Olarak Giderimi	124
4.10 <i>Aeribacillus pallidus</i> E334 İzolatının Polipropilen ve Cam Yüzeyler Üzerinde Oluşturduğu Biyofilm Yapısının CLSM ile Görüntülenmesi.....	127
4.11 <i>Aeribacillus pallidus</i> E334 İzolatının Polipropilen ve Cam Yüzeylerdeki Biyofilmlerinin Giderimi ve Bununla İlişkili CLSM Sonuçları	130
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	134
KAYNAKLAR	144
ÖZGEÇMİŞ.....	180

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
∞	Sonsuz
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
Ca^{+2}	Kalsiyum
CaCl_2	Kalsiyum Klorür
Cd^{+2}	Kadmiyum
CFU	Koloni Oluşturan Birim
Cm^2	Santimetrekare
CuSO_4	Bakır Sülfat
DH_2O	Distile Su
H^+	Hidrojen
HCl	Hidroklorik Asit
IU	International Unit
Kb	Kilo Baz Çifti
KCl	Potasyum Klorür
KHz	Kilohertz
Log	Logaritma
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
Mg	Miligram
ML	Mililitre
Mg^{+2}	Magnezyum
MgCl_2	Magnezyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
$\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$	Sodyum Tartarat
NaOH	Sodyum Hidroksit
Ni^{+2}	Nikel
Nm	Nanometre
OH^-	Hidroksil
Zn^{+2}	Çinko

Kısaltmalar

3D	Üç Boyutlu
A.	<i>Anoxybacillus, Aeribacillus</i>
Al-2	Otoindükleyici 2
B.	<i>Bacillus</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
CIP	Yerinde Temizlik
CLSM	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop
DDAO	Dodesil Dimetil Amin Oksit

Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz Enzimi
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDNA	Ekstraselüler DNA
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EPS	Ekstraselüler Polimerik Madde
FISH	Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon
<i>G.</i>	<i>Geobacillus</i>
Gfp	Green Fluorescent Protein
G	Gram
H	Saat
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
L	Litre
MI	Medium I
mM	Milimolar
M	Molarite
Ng	Nanogram
OD	Optik Dansite
QS	Quorum Sensing
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
pH	Hidrojenin Gücü
PE	Polietilen
PK	Polikarbonat
Pmol	Pikomol
PP	Polipropilen
Propidyum iyodür	PI
PS	Polistiren
PVC	Polivinil Klorür
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz Enzimi
rRNA	Ribozomal RNA
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SF	Serum Fizyolojik
Sn	Saniye
TCA	Trikloroasetik Asit
TE	Tris EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
U	Unit
UV	Ultraviyole
<i>V.</i>	<i>Vibrio</i>
V	Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Almanyanın Berlin şehrinde 80 yıldan daha fazladır kullanılmakta olan demir dökümden yapılmış içme suyu borularında oluşan biyofilmler	9
Şekil 2.2 Biyofilm görüntüleri	9
Şekil 2.3 Biyofilm oluşumunda gerekli olan moleküler mekanizmalar ve faktörler.	12
Şekil 2.4 DNA bağlayıcı DDAO (Dodesil Dimetil Amin Oksit) boyası ile boyanan ve yeşil floresan (Gfp) ile proteinleri etiketlenen <i>P. aeruginosa</i> 'ya ait iki günlük olgun biyofilm örneklerinde yatay optik kısım görüntüsü.....	20
Şekil 2.5 eDNA'nın filamentli yapısının görüntüsü	21
Şekil 2.6 <i>S. epidermidis</i> bakterisinin iki günlük inkübasyondan sonra Syto 9 ve Propidyum iyodür ile boyanmasının ardından CLSM ile görüntülenmesi .	22
Şekil 2.7 Biyofilm gelişiminin beş aşaması ve her bir aşamanın şekli, <i>P. aeruginosa</i> biyofilminin fotomikrografı ile eşleştirilme görüntüsü	24
Şekil 2.8 <i>Geobacillus</i> spp. H11 izolatu tarafından Nutrient Broth'da oluşan biyofilmlerin dağılmasının SEM görüntüsü	30
Şekil 2.9 Biyofilm göçü.....	32
Şekil 2.10 Yüzeyler üzerinde bakteriyel olayların mekanik etkilerinin çeşitliliği	34
Şekil 2.11 <i>E. coli</i> 'nin hava-sıvı ara yüzde oluşturduğu biyofilm yapısının şematik görüntüsü ve her bir biyofilm bölgesinin SEM mikrografı.....	35
Şekil 2.12 Biyopolimerlerde zayıf fiziko-kimyasal etkileşim modeli.....	36
Şekil 2.13 Bakteriyel popülasyonların 304, 2B tipi paslanmaz çelik yüzeyler üzerindeki SEM mikrografları	41
Şekil 2.14 Türler arası sinyalizasyon ve klonal ilişkiler	51
Şekil 2.15 <i>B. subtilis</i> biyofilmlerinin CLSM ve SEM görüntüsü	54
Şekil 2.16 Cam yünü iplikleri üzerinde 28°C'de, 24 saatlik <i>B. cereus</i> biyofilmlerinin BacLight boyaları ile boyanarak elde edilen CLSM görüntüsü	55
Şekil 2.17 Sıcak su kaynakları.....	59
Şekil 2.18 <i>Anoxybacillus calidus</i> faz-kontrast mikrografı	60
Şekil 2.19 55°C'de Skim Milk besiyerinde paslanmaz çelik üzerinde <i>Geobacillus</i> sp. izolatının SEM görüntüsü	64
Şekil 2.20 <i>A. flavithermus</i> B12-C ^m bakterisinin bulunduğu ortamda kuponların kenarlarında oluşan biyofilm ve biyofilmi çevreleyen inhibisyon zonu görüntüsü	65
Şekil 2.21 Pepton-Yeast Ekstrakt Agar üzerinde <i>A. pallidus</i> 418 tarafından 24 saat sonundaki cıvıksı yapı (slime) üretimi	69

Şekil 3.1 Polistiren mikrotitrasyon plaka ve Eliza okuyucusu görüntüsü	80
Şekil 3.2 Paslanmaz çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşumlarının incelenmesi	83
Şekil 3.3 Farklı konsantrasyonlarda standart olarak kullanılan glukoz çözeltileri	85
Şekil 3.4 Protein konsantrasyonu için standart olarak kullanılan BSA'nın kalibrasyonu.....	87
Şekil 3.5 Çalışmalarda kullanılan abiyotik yüzeyler	91
Şekil 4.1 E334 ve DSM 17127 bakterilerinin koloni morfolojileri	102
Şekil 4.2 <i>A. pallidus</i> E334 izolatının pelikül görüntüsü.....	103
Şekil 4.3 <i>A. pallidus</i> E334 izolatının kristal viyole görüntüleri.....	103
Şekil 4.4 E334 izolatının ve DSM 17127 suşunun optimum çalışma öncesi çelik kupon yüzeylerinde oluşan biyofilmlerin koloni sayım sonuçları ile yüzey alana düşen koloni oluşturan birimlerinin logaritmik olarak hesaplanmasına ilişkin dilüsyon fotoğrafları.....	105
Şekil 4.5 E334 izolatının gelişim ve biyofilm üretimi için gerekli optimum pH grafiği	108
Şekil 4.6 DSM 17127 suşunun gelişim ve biyofilm üretimi için gerekli optimum pH grafiği.....	108
Şekil 4.7 E334 izolatının gelişimi ve biyofilm üretimi için gerekli optimum tuz grafiği	109
Şekil 4.8 DSM 17127 suşunun gelişimi ve biyofilm üretimi için gerekli optimum tuz grafiği.....	109
Şekil 4.9 E334 izolatının gelişimi ve biyofilm üretimi için gerekli optimum sıcaklık grafiği	110
Şekil 4.10 DSM 17127 suşunun gelişimi ve biyofilm üretimi için gerekli optimum sıcaklık grafiği.....	110
Şekil 4.11 Karbonhidrat miktarı ölçümü için hazırlanan kalibrasyon grafiği.....	112
Şekil 4.12 Bakterilerin karbonhidrat miktarlarının karşılaştırmalı grafiği	113
Şekil 4.13 Protein miktarı ölçümü için hazırlanan kalibrasyon grafiği.....	114
Şekil 4.14 Bakterilerin protein miktarlarının karşılaştırmalı grafiği	114
Şekil 4.15 Genomik DNA ve eDNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntülerine göre molekül ağırlıklarının hesaplanması.....	115
Şekil 4.16 Olgun biyofilmlerin DNaz I enzimi ile 2-12 saat muamele edilmeleri sonrası mikrotitrasyon plakalarında ölçülen biyofilm miktarları.....	117
Şekil 4.17 Olgun biyofilmlerin DNaz I enzimi ile 2-12 saat muamele edilmeleri sonrası biyofilm miktarlarındaki yüzde azalma grafiği.....	117
Şekil 4.18 RAPD-PCR sonrası, <i>A. pallidus</i> genomik DNA (gDNA) ve eDNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....	118

Şekil 4.19 Bakterilerin genomik DNA ve eDNA'larının DNaz I, RNaz A ve Proteinaz K muamelesi sonrası elde edilen agaroz jel görüntüleri.....	119
Şekil 4.20 Bakteri eDNA'larına daha yoğun DNaz I uygulanmasına karşın, enzim dirençlerini gösteren agaroz jel görüntüleri	120
Şekil 4.21 E334 kodlu izolatın farklı abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilmlerdeki koloni sayılarının yüzey alanına oranları	122
Şekil 4.22 DSM 17127 kodlu suşun farklı abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilmlerdeki koloni sayılarının yüzey alanına oranları	123
Şekil 4.23 E334 izolatının ve DSM 17127 suşunun en iyi tutundukları iki abiyotik yüzeyde oluşturdukları biyofilm koloni sayılarının yüzey alanına oranı ve koloni sayımının yapıldığı petri görüntüleri	123
Şekil 4.24 E334 biyofilmlerinin, etken maddelerle muamelesi sonucunda, spektrofotometrik olarak ölçülen biyofilm miktarlarındaki % giderim grafiği.....	125
Şekil 4.25 DSM 17127 biyofilmlerinin, etken maddelerle muamelesi sonucunda, spektrofotometrik olarak ölçülen biyofilm miktarlarındaki % giderim grafiği.....	125
Şekil 4.26 Kullanılan 15 kimyasalın her iki bakteri üzerindeki genel etkilerini gösteren grafik	126
Şekil 4.27 20 h geliştirilen <i>A. pallidus</i> E334 biyofilmlerinin üç boyutlu CLSM projeksiyonları	129
Şekil 4.28 E334 izolatının 20 h geliştirilmesi sonrası polipropilen yüzeyden alınan 3D CLSM kesitinin görüntüsü	130
Şekil 4.29 E334 izolatının 20 h geliştirilmesi sonrası, polipropilen ve cam yüzeylerde oluşturulan biyofilmlerinin giderim öncesi ve sonrası CLSM görüntüleri	131
Şekil 4.30 Polipropilen ve cam yüzeyleri üzerinde geliştirilen E334 biyofilmlerinin, SDS ve alkalin proteaz ile muamelesi sonrası biyofilm kütlesi ve canlı hücreler üzerindeki etkilerinin gösterildiği giderim yüzdeleri	132

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bakteriyel biyofilmlerde bulunan EPS bileşenlerinin fonksiyonları	13
Çizelge 2.2 Doğada ve insan yapımı sucul çevrelerde bulunan biyofilm kökenli enzimler	19
Çizelge 2.3 Biyofilm tabakasına etki eden faktörler	35
Çizelge 2.4 Süt endüstrisinde biyofilmlerin giderimi ve kontrolü için en çok kullanılan yaklaşımlar	46
Çizelge 2.5 CLSM’de kullanılan floresan boyalar ve lazer kaynakları	56
Çizelge 2.6 Mikroorganizmaların sıcaklık isteklerine göre sınıflandırılması	58
Çizelge 3.1 Ön çalışmalarda kullanılan bakteriler ve sayıları.....	71
Çizelge 3.2 Yüksek miktarda biyofilm oluşturma kapasitesine sahip bakteri izolatları ve referans suş	72
Çizelge 3.3 Biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan “cut off” dönüşümleri ve formülü	80
Çizelge 3.4 Uygulanan pH, tuz ve sıcaklık aralıkları.....	83
Çizelge 3.5 Protein tayininde kullanılan A ve B reaktifi içerik ve miktarları.....	86
Çizelge 3.6 RAPD-PCR reaksiyon konsantrasyonları	89
Çizelge 3.7 RAPD-PCR reaksiyon koşulları	89
Çizelge 3.8 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal temizleme prosedürleri ve kullanım amaçları	93
Çizelge 4.1 Ön çalışmalarda kullanılan izolat ve referans suşlar.....	98
Çizelge 4.2 Ön çalışmalarda seçilen 6 termofilik basilin genel biyofilm üretim karakteristikleri	100
Çizelge 4.3 Çelik kupon yüzeylerinde oluşan biyofilmlerin koloni sayım sonuçları (CFU/mL) ile yüzey alana (cm ²) düşen koloni oluşturan birimlerinin logaritmik olarak hesaplanması (log _{CFU/cm²})	104
Çizelge 4.4 Bakterilerin optimum pH, tuz ve sıcaklık istekleri	106
Çizelge 4.5 Bakterilerin biyofilm oluşumları için optimum pH, tuz ve sıcaklık istekleri	107
Çizelge 4.6 Bakterilerin biyofilm üretimlerinin optimizasyon öncesi ve sonrası polistiren mikrotitrasyon plaka yüzeylerinde oluşturdukları biyofilm miktarlarının karşılaştırılması.....	111
Çizelge 4.7 Bakterilerin biyofilm üretimlerinin optimizasyon öncesi ve sonrası çelik kupon yüzeylerinde oluşturdukları biyofilm miktarlarının karşılaştırılması	111
Çizelge 4.8 Genomik DNA ve eDNA konsantrasyonları ve büyüklükleri	115

Çizelge 4.9 E334 kodlu bakterinin farklı abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilm miktarı.....	121
Çizelge 4.10 DSM 17127 kodlu bakterinin farklı abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilm miktarı	121
Çizelge 4.11 E334 kodlu izolatin giderim öncesi ve sonrası canlı hücre sayımı ve CLSM sonuçları	133

1. GİRİŞ

Biyofilmler, kendi sentezledikleri ekstraselüler polimerik maddelerle (EPS) bir matriks oluşturarak onun içine gömülü halde bulunan ve bir yüzeye tutunmuş mikrobiyal topluluklar olarak tanımlanır (Abee vd. 2011). Biyofilmler, tıp, çevre, ticaret ve endüstriyel işlemlerde büyük problemler yaratmaktadırlar (Madigan ve Martinko 2010). Dahası, biyofilmlerin bizzat kendisi birer kontaminasyon ve/veya enfeksiyon kaynağı olabilir ve bazı durumlarda yüzeylerden giderilmeleri oldukça zorlaşır (Abee vd. 2011).

Biyofilmlerin doğal çevresel ortamlardaki varlıklarına ait ilk farkındalık 1970'lerde başlamıştır (Costerton vd. 1978). Angst (1923), gemilerin altında bakterilerin neden olduğu slime (cıvıksı yapı) oluşumunu rapor etmiştir. 1933'lerin başlarında, 'film' terimi, bakteriyel tutunma, yüzeyler üzerinde agregasyon ve çoğalma, olarak refere edilmiş ve serbest yüzen 'planktonik' bakterilerden farklı olarak yüzeye tutunan 'sesil' bakteriler terimi ilk defa deniz mikrobiyolojisinde kullanılmıştır. ZoBell ve Allen (1935), deniz suyunda, su altındaki cam yüzeyler üzerinde bakterilerin gelişimi ve tutunmasını, Characklis ise, 1973'lerin başlarında endüstriyel su sistemlerinde mikrobiyal cıvıksı yapı oluşumunu çalışmıştır (Donlon 2002). İlk 'biyofilm' terimi kullanılarak rapor edilen ilk biyofilm yayını, 1975'de Mack vd. tarafından yayınlanmıştır. 1977'de biyofilmin ilk mikroskopik görüntüsü yayınlanmıştır ve ilk defa yoğun cıvıksı yapının, tutunan bakterileri çevrelediği gösterilmiştir. Biyofilm terimi, tıp alanında Costerton tarafından 1985'de tanımlanmış olup, biyofilm enfeksiyonları kavramı ve onların önemi 40 yıl önce, Jendresen tarafından dental peliküllerin yapısı ve Høiby'nin kronik olarak enfekte olmuş kistik fibrozis hastalarının tükürük ve akciğerinde *Pseudomonas aeruginosa* hücrelerini gözlemlemesi ile başlamıştır (Høiby 2014).

Biyofilm oluşum süreci tutunma, olgunlaşma ve dağılma aşamalarını içermektedir (Monroe 2007). Biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan bakteriyel tutunma süreci, bakteri türleri, yüzey bileşenleri, çevre faktörleri ve gerekli bazı gen ürünleri gibi temel faktörlere ihtiyaç duymaktadır. Bakteriler ve abiyotik yüzeyler arasında ilk tutunma

genellikle hidrofobik bağlar gibi spesifik olmayan etkileşimlerle meydana gelirken, canlı veya cansızlaştırılmış dokulara tutunma, biyofilm hücrelerinin ürettiği lektin, ligand veya adhezin gibi spesifik moleküller aracılığıyla meydana gelmektedir (Carpentier ve Cerf 1993). Hemen hemen her canlı veya cansız yüzey, bakteriyel kolonizasyon ve biyofilm oluşumu için kolay bir hedefdir. Bu yüzeyler, gemi gövdeleri, süt ve petrol boru hatları, akıntılardaki kayalar ve çeşitli biyomedikal implantlar olabilir (Carpentier ve Cerf 1993, Elder vd. 1995).

Mikroorganizmaların bazıları yüzeylere tutunurken (sesil), bazıları da su içinde serbest halde dağılmış (planktonik) olarak bulunurlar. Planktonik bakterilerin sucul bir ekosistemde toplam bakterilerin yaklaşık %0.1'ini temsil ettiği düşünülmektedir (Saravia ve Mele 2003). Bir biyofilm yapısı farklı türler içerdiğinde, her bir organizmanın kendisinin ürettiği metabolik ürünler, başka bir türün tutunmasını ve gelişimini destekleyebilir mahiyette olabilirler (Costerton 1987, Wolfaardt vd. 1994, Marsh 1995, Leung vd. 1998). Bunun aksine, biyofilme tutunan ilk koloni tarafından üretilmiş toksik maddelerin birikimi ve besin yarışı gibi sebepler ise bir biyofilm içindeki tür çeşitliliğini sınırlayabilmektedir (Marsh 1995).

Biyofilm hücreleri, genomlarındaki gen regülasyon mekanizmalarında çok sayıda değişiklik meydana getirmelerinden dolayı, planktonik hücrelerden metabolik ve fenotipik olarak farklılık gösterirler (Kuckma ve O'Toole 2000, Watnick ve Kolter 2000, Whiteley vd. 2001, Stoodley vd. 2002). Bilindiği üzere prokaryotlar, ortam koşullarına genetik düzenlemeler ile çok kolay uyum sağlarlar ve yüzeye yaklaşırken düzenleyici genlerin çalışmasıyla dakikalar içerisinde sesil yaşam fenotipine dönebilirler. Bu adaptasyon sonucunda planktonik ve sesil hücrelerin birbirinden farklı protein sentezlediklerini ortaya koyan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Gilbert vd. 1990, Hall-Stoodley ve Stoodley 2002, Stoodley vd. 2002). Değişim esnasında bazı genlerin ifadesi teşvik edilirken bazıları da baskılanmaktadır (Hall-Stoodley ve Stoodley 2002). Biyofilm tabakası oluşturmak üzere genler, polisakkarit, peptidoglikan, hücre içi adezin, otolizin, haberleşme sinyalleri, yüzey ve kontrol proteinleri gibi maddelerin sentezini başlatırlar. Dolayısıyla, planktonik faza göre önemli farklılıklar görülmesi,

“biyofilm yaşam modu” tanımını kuvvetle desteklemektedir (Jefferson 2004). Yine, evrensel gen regülasyonlarının ekstraselüler sinyaller ile yönetilebildiği ve bu dış sinyallerin konsantrasyonunun planktonik hücelere kıyasla çok daha yüksek oranlara ulaşabildiği bilinmektedir (Molin ve Tolker-Nielsen 2003).

Bir yüzey üzerine tutunmuş biyofilmdeki bakteriler, planktonik hücelerle karşılaştırıldığında antimikrobiyal ajanlara, biositlere ve temizleme ajanlarına genellikle daha çok dirençlidir (Das vd. 1998, Joseph vd. 2001, Donlon ve Costerton 2002, Dunne 2002). Oluşan bu intrinsik direnç, insan vücudunda nazokomiyal enfeksiyonlara ve endüstriyel süreçlerde korozyon sorunlarına sebep olmaktadır (Donlon ve Costerton 2002, Dunne 2002). Biyofilm tarafından sergilenen antimikrobiyal dirençlilik, biyofilmin 3 boyutlu yapısı (3D) ile ilişkilidir ve dirençlilik bu yapı bozulur bozulmaz kaybolur (Hoyle vd. 1992). Bu yüzden, biyofilm oluşumu ve gelişimi süresince bakterilerin aşırı miktarda ürettiği ekzopolisakkaritler, antimikrobiyal maddelerin hedefi olan en içteki biyofilm hücelerini koruyabilir ve bu da antimikrobiyal maddelerin etkisini azaltır (Farber vd. 1990, Hoyle vd. 1990, Stewart 1996).

Pek çok endüstriyel işlemden kullanılan metalik yüzeylere bakteriyel hücelerin tutunarak biyofilm oluşturması biyokorozyona neden olabilmektedir. Biyokorozyon, boru hatları ve sanayide kullanım alanı olan metalik yüzeylere zarar verebilmektedir. Bu yüzden, günümüzde biyokorozyonun kontrol ve giderimi için milyonlarca dolar harcanmaktadır (Beech ve Sunner 2004). Biyofilmlerdeki bakteriyel metabolizma, humik asit gibi zararlı maddeler üretebilir. Biyofilmlerin karmaşık ve düzensiz doğası, bu tür asitlerle beraber çelik yüzeyler üzerinde çeşitli oksijen konsantrasyonlarının mevcudiyetinde farklı biyofilm oluşum bölgeleri meydana getirmektedir. Sonuçta, tüm bu özellikler korozyonun birer sebebi olarak bilinmektedir (Borenstein 1994).

Endüstriyel süreçlerde biyofilmler, cihazların arızalanmasına, verimliliğin düşmesine ve gıda endüstrisinde ürün kalitesinin ve güvenliğinin azalmasına neden olmaktadır (Carpentier ve Cerf 1993, Flemming 2002). Ayrıca, biyofilm yapısında uçucu organik bileşiklerin varlığı (geosmin, beta-iyonon, menton vb.) suda kötü koku oluşmasına

sebebiyet vermektedir (Skjevrak vd. 2004). Biyofilmin zararlı etkilerinin yanısıra, atık su arıtımında kullanılan biyoreaktörlerde, toprakta var olan çevreye zararlı maddelerin parçalanmasında, minerallerden kömür partiküllerinin ayrıştırılması işleminde, sudaki ağır metallerin temizlenmesinde olduğu gibi faydalı kullanım alanları da bulunmaktadır (Bos vd. 1999). Ayrıca, doğal çevrede su kalitesinin devamlılığı, biyofilmlerdeki mikrobiyal metabolizmanın bir sonucu olarak korunur. Bu biyofilmlerde bulunan bakteriler, toksik bileşiklerin çoğunu ayrıştırır ve kirliliğin çoğalmasını engeller. Bu yüzden, çevre kirliliğine yol açan maddelerin izlenmesinde ve çevre kirliliğinin tespitinde önemli bir rol oynar (Fuchs vd. 1996). Biyofilmler, organik besinlerin tutulmasına ve atık suların organik içeriğinin azalmasına da yardımcı olmaktadır. Mikrobiyal biyofilmler, çeşitli endüstriyel atık suların biyoremediasyon süreçlerinde de önemlidir (Sarnaik ve Kanekar 1995). Biyofilmler aynı zamanda doğal bir hücre immobilizasyonu oluşturduklarından, biyofilme tutunan mikroorganizmalar, fermentasyon süreçlerinin stabilitesini ve verimliliğinin artırılması için biyoreaktörlerde başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar (Demirci ve Pometto 1995).

Endospor oluşturan termofilik basillerin biyofilm oluşumları hakkında 8 sınırlı sayıda bilgi mevcuttur. Termofilik basiller, 45°C ila 60°C sıcaklık aralıklarında ve termal adaptasyon yetenekleri sebebiyle yaygın olarak toprak, sucul ve insan yapımı habitatlarda gelişebilirler (Flint vd. 2001b, Nazina vd. 2001, Vieille ve Zeikus, 2001). Termofilik basiller, bazı endüstriyel uygulamalarda endişe verici çok ciddi problemlere neden olabilirler. Bu da onların hem endospor oluşturmaları hem de çoğu ortamda termal stabilite göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Termofilik basillerin vejetatif hücreleri ve sporları, zor koşullarda dahi endüstriyel olarak kullanılan çok çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşumuna sebep olabilirler. Ayrıca, onların içsel termostabiliteyi nedeniyle elemine edilebilmeleri oldukça zordur ve sporları çoğu fiziksel ve kimyasal ajanlara dirençli olup, biyofilm oluşturmaları da buna katkı sağlamaktadır (Etoa ve Michiels 1988, Flint vd. 2001a). Termofilik basiller, jeotermal enerji santralleri, sıcak su boru hatlarının iç yüzeyleri, süt ürünleri ile temas halinde olan yüzeyler, meyve suları ve glukoz şurupları gibi endüstriyel olarak önemli ürünlerin üretiminde kullanılan paslanmaz çelik fermentörler gibi çeşitli insan yapımı habitatların kontaminantları olabilirler. Termofilik basillerin çoğu ciddi problemlere neden olabilmelerine rağmen,

farklı yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturmaları, biyofilm yapıları ve biyofilm giderim ve kontrol stratejileri hakkında çok az bilgi rapor edilmiştir. Bu araştırmalar çoğunlukla süt endüstrisinde kontaminant olarak bilinen termofilik basiller ile ilgilidir (Flint vd. 1999, 2001a, Ronimus vd. 2003, Rueckert vd. 2005, Burgess vd. 2009, Somerton vd. 2015). Flint vd. (2001), paslanmaz çelik yüzeyinde, sütte gelişen *Geobacillus stearothermophilus* B11 izolatını incelemişlerdir. Süt ürünleri ile ilişkili *Anoxybacillus flavithermus* CM biyofilmlerinin spor oluşumu Burgess vd. (2009) tarafından da çalışılmıştır.

Bacillaceae familyasına ait termofilik *Geobacillus* cinsinin tam taksonomik pozisyonu ilk defa Nazina vd. (2001) tarafından tanımlanmış olup, daha sonrasında pek çok yeni endospor oluşturabilen termofilik basil tanımlanmıştır. *Aeribacillus* cinsinden *Aeribacillus pallidus* türü bu basillerden birisidir. *Aeribacillus* cinsinin taksonomik pozisyonu 2010 (Miñana-Galbis vd. 2010) yılına kadar doğru şekilde sınıflandırılmadığından, muhtemelen literatürde *Aeribacillus* türlerinin biyofilm oluşumu üzerine doğrudan bir çalışma bulunmamaktadır. *A. pallidus* ile ilgili çalışmalardan biri Radchenkova vd. (2013) tarafından gerçekleştirilmiş olup, pepton-yeast ekstrakt agar üzerinde cıvıksı yapı (slime) üreten termofilik *A. pallidus* 418 izolatının EPS'indeki ekzopolisakkarit üretimini çalışmışlardır. *A. pallidus* TD1 izolatı da ekstraselüler pektat liyaz üreticisi olarak rapor edilmiştir (Yasawong vd. 2011). Yine *A. pallidus* türüne ait sporları, Miller vd. 2015 tarafından süt endüstrisindeki çiğ süt ve süt tozu örneklerinde kontaminant olarak saptanmıştır. Ancak, bu çalışmaların hiçbiri doğrudan biyofilmle ilişkili olmayıp, dolaylı olarak bu türün EPS içeriği veya gıda endüstrisindeki kontaminasyonu üzerine odaklanmıştır.

Sonuç olarak, yukarıda açıklanan bu çalışmalar, *Aeribacillus* cinsine ait termofilik basillerin biyofilm oluşum kapasitesi hakkında temel bilgiler vererek, *Aeribacillus* cinsi türlerin biyofilm oluşum karakteristikleri ve giderilmeleri hakkındaki incelemeler için iyi bir aday olabileceklerini göstermiştir. Bu yüzden bu tez çalışması, termofilik *Aeribacillus pallidus* E334 izolatının biyofilmlerinin detaylı olarak tanımlanmasının yapıldığı, ardından oluşturulan bu biyofilmlerin uygun bulunan polipropilen ve cam yüzeylerde Alkalen proteaz ve SDS temizleme ajanları ile gideriminin gerçekleştirildiği

ilk çalışmadır. Bunların yanı sıra, tez kapsamında endüstriyel ve ticari öneme sahip uygulamalarda sorun teşkil eden termofilik basillere ait biyofilm yapılarının nasıl oluştuğu ve nasıl giderilebileceklerinin belirlenmesi, enerji, turizm, sağlık ve gıda sektörlerini yakından ilgilendiren endüstriyel uygulamalara çözüm odaklı yaklaşımlar sağlayacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyofilmin Tanımı ve Oluşum Sebepleri

Carpentier ve Cerf (1993) biyofilmi “bir yüzeye tutunmuş, organik polimer matrikse gömülü mikrobiyal birlik”, Elder vd. (1995) “yoğun bir ekzopolimer matriks içinde, mikroorganizmalar tarafından organize olmuş fonksiyonel ortaklık”, Costerton vd. (1999) “canlı veya cansız bir yüzeye yapışık olarak kendi ürettikleri polimerik matriks içinde yaşayan bakteri hücrelerinin oluşturduğu topluluk” olarak farklı ifadeler kullanarak tanımlamışlardır (Dunne 2002). Mikroorganizmalar, doğal koşullarında çoğunlukla yaygın tek hücre popülasyonundan oluşan saf kültürler halinde yaşayamazlar; ancak onun yerine ara yüzlerde öncelikle polimikrobiyal kümeler oluşturarak birikebilirler (Wingender vd. 1999). Bakteriler, sulu ortamlarda ise, serbest yüzme yerine bir yüzeye tutunmayı tercih etmektedirler (Beveridge vd. 1997). Bunun sebebi, tutundukları yüzeyin besin kaynağı oluşturması, suyun akışıyla tutunduğu yere besin maddesi taşınması ya da su akışı sayesinde bol oksijen bulunmasıdır (Melo ve Bott 1997). Biyofilmler aslında dinamik ve kompleks yapılardır ve turbulans akışı veya besin kıtlığı gibi olumsuz koşullarda bakteriler için bir üreme, korunma ve hayatta kalma mekanizmasıdır (Costerton vd. 1987, Davey ve O’Toole 2000).

Mikroorganizmalar yaşam kalitelerini ve gelişimlerini artırarak pozitif yönde etkilendikleri için biyofilm oluştururlar. Biyofilm oluşumu için en az dört neden mevcuttur. Birincisi, biyofilm bir korunma mekanizmasıdır. Biyofilmler, tutunmamış hücrelerin uzaklara sürüklenmesine sebep olan fiziksel kuvvetlere, bağışıklık sistemi hücrelerinin fagositozuna, antibiyotikler gibi toksik maddelerin penetresyonuna karşı hücreleri korumaktadır. İkincisi, biyofilm oluşumu hücrelerin uygun bir nişte kalmasını sağlamaktadır. Hayvan dokuları gibi besince zengin yüzeylere veya nehirdeki bir kaya gibi akışkan sistemlerdeki yüzeylere tutunmuş biyofilmler, besinlerin genellikle daha bol olduğu veya sürekli olarak besin akışının olduğu bir bölgede, bakteriyel hücreleri bir yüzeye sabitlemektedir. Üçüncü olarak, bakteriyel hücrelerin birbirleri ile yakın ilişki içerisinde yaşamalarını sağlamaktadır. Böylece, *P. aeruginosa*’da gördüğümüz üzere, hücrelerin yararına olan sinyal moleküller sayesinde hücreler arası iletişim

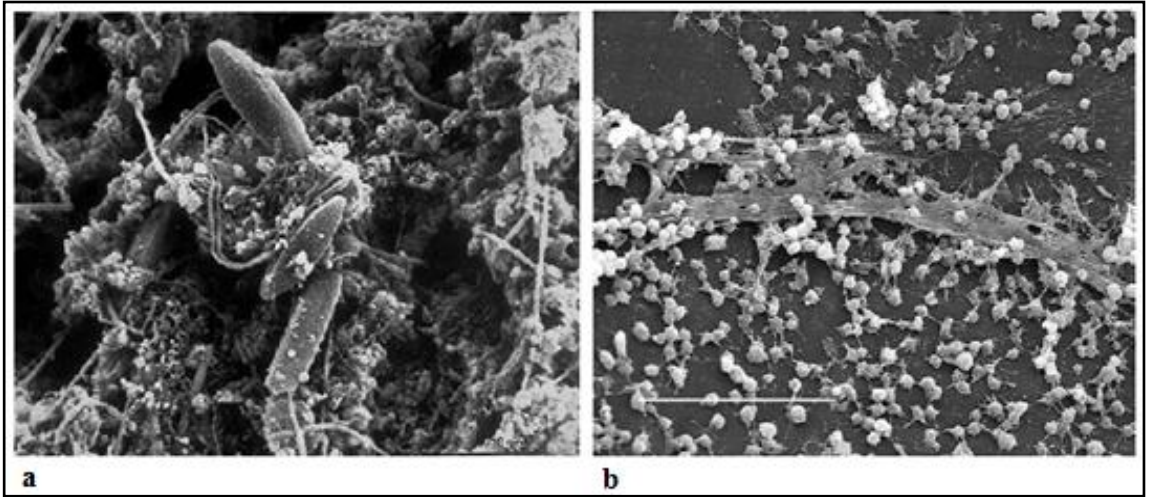
kolaylaşmaktadır. Dahası, hücreler birbirleriyle daha yakın temasta olduklarından yatay gen transferi ile genetik bilgi akışı fırsatı ortaya çıkmaktadır. Dördüncüsü ise, biyofilmlerin, kültür besiyerindeki gibi zengin besin konsantrasyonu içermeyen doğal koşullarda görülen bakteriyel hücre büyümesinin tipik bir şekli olmasıdır. Diğer bir deyişle, biyofilm laboratuvarında görülen zengin sıvı kültür yaklaşımına karşı doğada prokaryotlar için büyümenin “olağan” şeklidir. Böylece, mikroorganizmalar korunma, savunma, iletişim kurma, hücrelerinin uygun bir nişte kalmalarını sağlama ve doğal ortamları içinde birbirleri ile yakın ilişkide olabilme sebepleri ile biyofilm oluştururlar (Madigan ve Martinko 2010).

2.2 Biyofilmin Oluştığı Yerler

Biyofilmler tıpta ve endüstriyel süreçlerde çok ciddi sorunlara sebep olmaktadır. Endüstriyel koşullarda biyofilmler boruların içindeki suyun, petrolün veya diğer sıvıların akışını yavaşlatabilmekte ve boruların korozyonunu arttırabilmektedir. Biyofilmler ayrıca, açık deniz platformları, gemiler ve kıyılardaki batık nesnelere parçalanmasını başlatabilir. İçme suyu güvenliği, su dağıtım şebekelerinde bulunan borularda gelişen biyofilmler de tehlikeye girebilmektedir. Su borularındaki biyofilmler çoğunlukla patojen olmayan bakterileri içermelerine rağmen, eğer patojenler başarıyla patojenite göstermeyen mevcut biyofilmlere kolonize olurlarsa onları öldürmek için standart klorlama işlemi yetersiz kalmaktadır (Madigan ve Martinko 2010), (Şekil 2.1) Endüstriyel kuruluşlarda istenmeyen biyofilmler çoğunlukla soğutma su kulelerinin, su borularının, gıda imalat fabrikaları veya membran donanımlarının kirlenmesinden sorumludur (Jass ve Walker 2000). Enfeksiyonların nedeni olan *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* gibi organizmalar tarafından medikal cihazların yüzeylerinde de biyofilmler oluşabilmektedir (Huebner ve Goldmann 1999), (Şekil 2.2).



Şekil 2.1 Almanyanın Berlin şehrinde 80 yıldan daha fazladır kullanılmakta olan demir dökümden yapılmış içme suyu borularında oluşan biyofilmler (Szewzyk vd. 2011)



Şekil 2.2 Biyofilm görüntüleri (Donlan 2002)

- a. Endüstriyel süreçlerde kullanılan su sistemlerinde paslanmaz çelik bir yüzey üzerinde 8 hafta boyunca gelişen doğal bir biyofilmin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü,
b. Medikal cihazların iç yüzeylerinde stafilokokal biyofilmlerin SEM görüntüsü

Gıda paketlenmesi amacıyla temizlenmiş kağıt ürünlerin imal edildiği fabrikalarda, gıda güvenliği ve hijyen sürecini tehdit eden en önemli faktör, spor oluşturan bakterilerin ve enterobakterilerin oluşturduğu kontaminasyondur (Raaska vd. 2002). Bu tür kuru kağıt ürünlerinin kontaminasyonuna, genellikle spor oluşturan *Bacillus*, *Brevibacillus* ve *Paenibacillus* cinsleri sebep olmaktadır (Hughes-van Kregten 1988, Pirttijärvi vd. 1996, Suominen vd. 1997, Väisänen vd. 1998, Raaska vd. 2002).

Filtrasyon sistemlerinde biyofilm oluşumu aynı zamanda membranların geçirgenliğini de büyük oranda azaltmaktadır (Flemming vd. 1992). Son yıllarda ters ozmoz (RO) ve ultrafiltrasyon (UF) gibi membran teknolojileri, süt ve gıda endüstrisi ile atık su arıtım süreçlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Glover 1985, Cheryan 1986). Atık su muamelesi için ters ozmoz sürecinde mikrobiyal biyofilm oluşumu, su akışında önemli bir azalmaya ve tüm membran performansının bozulmasına neden olmaktadır (Ridgway vd. 1983).

İçme suyu dağıtım sistemlerinde biyofilmlerin oluşumu; su hızını ve taşıma kapasitesinin düşmesine, boruların tıkanmasına, enerji kullanımında artışa ve işletmenin verimliliğinin azalmasına sebep olmaktadır (Ridgway ve Olson 1981, LeChevallier vd. 1987). Bu mikrobiyal gelişme, temel olarak su kaynağındaki besin kalıntıları yüzündendir, fakat yüksek klor kalıntısı biyofilm oluşumunu önleyemeyebilmektedir (Block 1992, Marshall 1992).

Yüzeylerde canlı organizmaların birikmesi olarak bilinen biofouling, uzun yıllardır ısı değiştiricileri ve soğutma kulelerinde büyük bir problem teşkil etmektedir. Bu bakteriyel tutunma, aletlerin verimli çalışmasını ve ısı geçişini büyük oranda azaltmaktadır (Bott 1992, Lehmann vd. 1992, Wirtanen ve Mattila-Sandholm 1992). Biyofilmlerde mikrobiyal aktivite, özellikle sülfat indirgeyen veya asit üreten bakteriler tarafından metal yüzeylerin korozyonuna sebep olmaktadır (Costerton ve Lappin-Scott 1989). Ayrıca, tüm denizel ve sucül çevrelerin su altındaki yüzeyleri, mikrobiyal biyofilm birikimi olan bölgelerdir. Gemi teknelerinin kirlenmesi, temel olarak bakteriler, deniz algleri, tek hücreli algleri içeren, biyofilmlerin oluşması ile meydana gelmektedir (Lewin 1984). Pek çok antifouling (canlı organizmaların birikiminin önlenmesi) boyalar üretilmektedir; ancak hiçbiri biyofilm oluşumunu doğrudan önleyememektedir (Cooksey ve Wigglesworth-Cooksey 1992).

2.3 Biyofilm Matriks Bileşeni Ekstraselüler Polimerik Maddeler (EPS)

Biyofilmler başlıca; bakteriler, mikrobiyal orijinli EPS ve diğer partiküllü maddelerden oluşmaktadır. EPS yapısı, bakteriyel hücrelerin ürettikleri ve gömülü oldukları bir

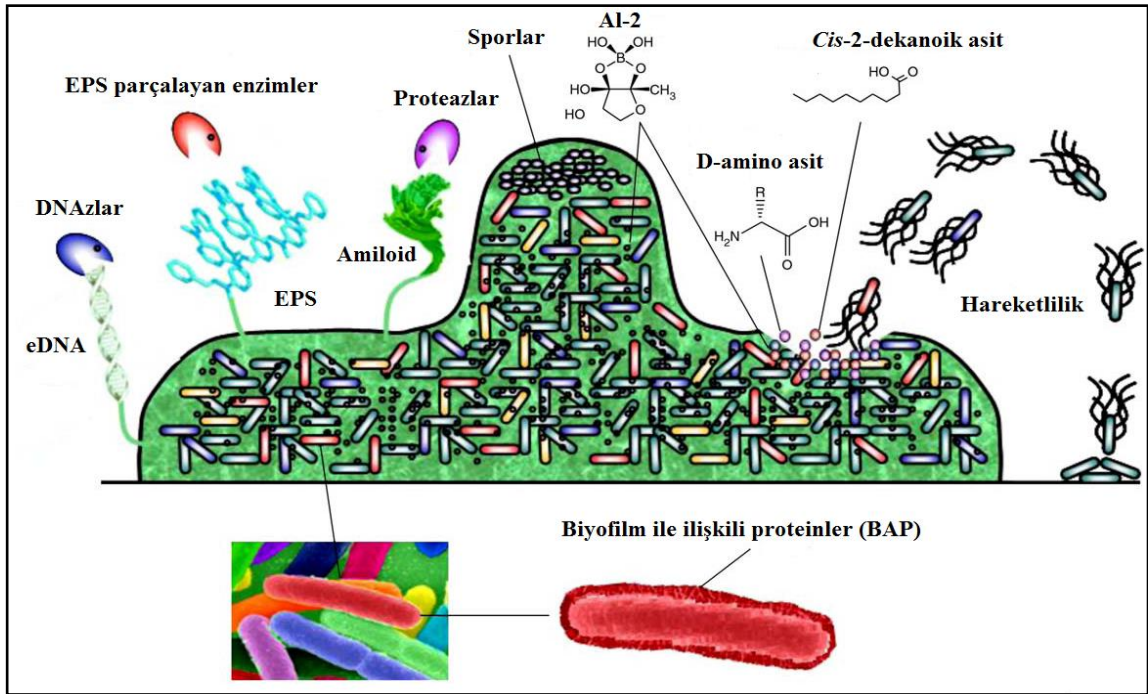
matriksdir (Wingender vd. 1999). Dolayısıyla, mikrobiyal biyofilmlerin karakteristik özelliği, hücre bileşenleriyle gömülü bu ekzopolisakkarit matriksin varlığıdır (Boyd ve Chakrabarty 1995).

Biyofilmler genelde, %10'dan az bakteri hücrelerinden ve %90'dan fazla matriksten oluşmaktadır (Flemming ve Wingender 2010). Ayrıca, biyofilm matriksi %90-97 oranında su içerir (Sutherland 2001). Çoğu EPS, su tutar ve böylece fazlaca sulu bir ortam oluşur (Or vd. 2007). Bakteriler aslında kurumaya karşı EPS üreterek aktif olarak cevap verirler (Roberson ve Firestone 1992). Çoğu bakteride EPS, biyofilm oluşumu için vazgeçilmezdir ve mutantlar yani ekzopolisakkarit sentezlemeyenler olgun biyofilmler oluşturamazlar (Watnik ve Kolter 1999, Danase vd. 2000, Byrd vd. 2009). Ancak karışık kültür türlerdeki biyofilmlerde sadece bir türün EPS üretimi dahi diğer türlerin mikrobiyal topluluklar halinde bir araya gelmesini sağlayabilir (Sutherland 2001). Ayrıca, karışık türler içeren biyofilmlerde bir tür tarafından üretilen EPS biyofilm içindeki diğer türlerin stabilitesini arttırabilmekte ve/veya stabil etkileşimler farklı türlerin polimerleri arasında meydana gelebilmektedir (Sutherland 1982, McEldowney ve Fletcher 1987).

EPS, toprak ve sedimentlerde karbon indirgeyen rezervlerin, tatlı su ve okyanuslardaki sedimentlerin büyük bir kısmını temsil eder ve buralarda besin kaynağı olarak işlev gördüğünden, mikrobiyal ekolojide önemli bir rol oynamaktadır (Decho 1990, Ortega-Morales vd. 2007). Aynı zamanda mevcut hücre lizisi sonucu oluşan bütün bileşenleri tutarak adeta bir geri dönüşüm merkezi olarak rol oynamaktadır (Flemming ve Wingender 2010). Bu ekzopolisakkarit matriks; difüzyon bariyeri, moleküler elek ve tutucu olarak çeşitli görevlerde de rol oynayabilir (Boyd ve Chakrabarty 1995). EPS, özellikle yapışkanlıkta ve tutunan mikrobiyal toplulukların diğer fiziksel özelliklerinde önemli rollere sahiptir (Wingender vd. 1999). Ayrıca, EPS yoğun DNA içeriği sebebiyle yatay gen transferi için genlerin bir deposu olabildiğinden, bu durum mikrobiyal toplulukların rekabetini arttırır. Matriks organizmaları kurumaya, oksitlenmeye, yüklü biyositlere, bazı antibiyotiklere, metalik katyonlara, UV radyasyonuna, çoğu ot yiyen protozoonlara ve konakçının immün sistemine karşı koruyabilir (Flemming ve Wingender 2010). EPS, 'biyofilmlerin karanlık maddesi'

olarak da tanımlanmıştır, bunun sebebi analizlerdeki zorluklar ve matriks biyopolimerlerinin çok çeşit arz etmesindedir (Flemming vd. 2007). EPS bileşenlerinin fonksiyonları çizelge 2.1’de verilmiştir.

Biyofilm hücreleri, genellikle katı-sıvı ara yüzde birikir ve oldukça sulu, çoğunlukla kendi ürettikleri, farklı tipte biyopolimer yığımları içeren EPS matriksi içinde gömülü halde bulunurlar (Flemming ve Wingender 2010). EPS, çeşitli ekstraselüler biyopolimerler (ekstraselüler polisakkaritler, biyofilm ile ilişkili proteinler-BAP, eDNA, lipitler, amiloid yapılar) içerebilir. DNaz, proteaz ve ekstraselüler polisakkariti parçalayan enzimler, biyofilm oluşumunu engeller veya çoktan oluşan biyofilmlerin dağılma hareketini teşvik eder. Biyofilm oluşumu ve ayrılması boyunca hücreler arasında iletişim, quorum sensing sistemlerine ve otoindükleyici 2 (AI-2), D-aminoasitler ve *cis*-2-dekanoik asit gibi moleküllere bağlıdır. Hareketlilik, yeni biyofilmlerin inşasında ve olgun biyofilmlerin dağılmasında önemli bir faktördür. Bu polimer yapılar şekil 2.3’de gösterilmiştir (Abee vd. 2011).



Şekil 2.3 Biyofilm oluşumunda gerekli olan moleküler mekanizmalar ve faktörler (Abee vd. 2011)

Çizelge 2.1 Bakteriye biyofilmlerde bulunan EPS bileşenlerinin fonksiyonları (Flemming ve Wingender 2010)

Fonksiyonu	İlgili EPS bileşenleri	Biyofilmlerdeki fonksiyonu
Adhezyon	Polisakkaritler, proteinler, DNA ve ampifilik moleküller	Planktonik hücreler ile canlı ve cansız yüzeylerin kolonizasyonunda ilk basamağa ve yüzeylere tüm biyofilmlerin uzun süre bağlanmasına izin verir.
Bakteriyel hücrelerin agregasyonu	Polisakkaritler, proteinler ve DNA	Bakteriyel popülasyonların geçici immobilizasyonunu, yüksek hücre yoğunluklarının gelişimini, hücrelerin birbirini tanımasını ve hücreler arasında köprü sağlar.
Kohezyon	Nötral ve yüklü polisakkaritler, proteinler (amiloid ve lektin vb.) ve DNA	Sulu polimer ağ oluşumu (biyofilm matriksi), biyofilmin mekanik stabilitesine aracılık eder (sık sık çok değerlikli katyonlar ile bağlanması) ve EPS yapıları (kapsül, cıvıksı yapı, kılıf) vasıtasıyla biyofilm yapısını saptar, hücreden-hücreye iletişime izin verir.
Suyun tutulması	Hidrofilik polisakkarit ve proteinler	Biyofilm organizmaları çevresinde, fazla sulu mikroçevrelerin devamını sağlar, su yetersiz çevrelerde kuruma toleransına sebep olur.
Koruma bariyeri	Polisakkaritler ve proteinler	Enfeksiyon süresince spesifik ve nonspesifik konak savunmalarına direnç sağlar ve çeşitli antimikrobiyal ajanlar (örneğin dezenfektanlar ve antibiyotikler) tolerans sağlar.
Organik bileşiklerin emilimi	Yüklü ve hidrofobik polisakkaritler ve protein	Çevreden besinlerin birikimine ve ksenobiyotiklerin emilimine izin verir (Bu sebeple çevre detoksifikasyonuna katkı sağlar).
İnorganik iyonların emilimi	Yüklü polisakkaritler, proteinler, inorganik maddeler (fosfat ve sülfat vb.)	Polisakkarit jel oluşumunu, iyon değişimini, mineral oluşumunu ve toksik metal iyonların birikimini yönetir (Bu sebeple çevre detoksifikasyonuna katkı sağlar).
Enzimatik aktivite	Proteinler	Besin kazancı için dış kaynaklı makromoleküllerin sindirimine olanak sağlar ve EPS yapılarının yıkımını sağlar. Biyofilmlerden hücrelerin serbest bırakılmasına izin verir.
Besin kaynakları	Potansiyel olarak bütün EPS bileşenleri	Karbon, nitrojen, fosfor kaynaklarını sağlar, biyofilm topluluğu tarafından kullanımı için bileşimleri içerir.
Genetik bilginin aktarımı	DNA	Biyofilm hücreleri arasında yatay gen transferini kolaylaştırır.
Elektron verici veya alıcı	Proteinler ve humik asitler	Biyofilm matriksinde redoks aktivitesine izin verir.
Hücresele bileşiklerin dışarıya verilmesi	Membran vezikülü içeren nükleik asitler, enzimler, lipopolisakkaritler ve fosfolipidler	Metabolik iş hacminin sonucu olarak hücresele maddelerini serbest bırakır.
Aşırı enerji için depolama	Polisakkaritler	Nitrojen oranları karbon dengesizliğinde fazla karbonu depolar.
Enzimlerin bağlanması	Polisakkaritler, enzimler	Polisakkaritler ile onların etkileşimi boyunca enzimlerin stabilizasyonunu, tutulmasını ve birikimine sebep olur

EPS tamamen geçirimsiz bir tabaka değildir, ancak kimyasal ajanların difüzyonunu yavaşlatarak konsantrasyonlarını düşürmektedir (Mah ve Q'Toole 2001). Aşırı besinsizlik durumunda, bakterilerin kendilerinin ya da diğer türlerin ürettiği EPS tabakasını yıkarak beslenme amacıyla tükettikleri de bilinmektedir (Zhang ve Bishop 1994). Yaşamsal olan besinler ya da oksijen varlığı için rekabet, biyofilmin içinde farklı ekolojik katmanların oluşmasına yol açmaktadır (Zhang vd. 1999). Hibiya vd. (2004) yaptıkları çalışmada biyofilm tabakasında derine indikçe çözülmüş oksijen miktarının hızla azaldığını göstermişlerdir. Bu koşullar anaerobik bakteriler için biyofilm tabakasının derinlerinde bir yaşam alanı oluşturmaktadır. Biyofilm içindeki bakterilerin oluşturdukları bu katmanlar çeşitli metabolik ve fizyolojik düzenlemeler sonucunda farklı besin ve oksijen gradiyentleri göstermektedirler. Biyofilm içinde bulunan hücrelerin, biyofilm yüzeyindeki hücrelerden daha az besin ve oksijene gereksinim duyduğu belirlenmiştir (Brown vd. 1988). Ayrıca, elverişli koşullarda bazı yüzeylerde canlı organizmaların birikmesi olarak tanımlanan biofouling oluşumu artarak kalın biyofilmler oluşur ve bu katmanların çoğu metabolik olarak dormant ve/veya ölü hücreler içerebilirler. Bu durum, bakteri hücrelerinin değişen büyüme oranına ve fizyolojisine bağlı olarak, antimikrobiyal ajanlara karşı dirençliliğin artmasına sebep olmaktadır (Gilbert vd. 1990, Evans vd. 1991, McFeters vd. 1995).

EPS'ler, bakteriler ve arkelere ait asidofilik ve termofilik türlerin ekstrem çevrelerde bir adaptasyon stratejisi olarak ve/veya biyotik rekabet, abiyotik sıcaklık, ışık şiddeti, pH ve tuzluluk gibi stres faktörlerine cevap olarak da üretilmektedir. EPS biyosentezi üç temel faz içerir: karbon substratının asimilasyonu, polisakkaritlerin intraselüler sentezi ve onların hücre dışına verilmesini kapsar (Finore vd. 2014). Ayrıca, EPS bir türün suşları arasında da farklılık gösterebilir. Örneğin *Streptococcus thermophilus*'un çeşitli suşları farklı moleküler ağırlıklı, farklı monomer içerikli ve farklı oranlarda heteropolisakkaritler üretirler (Vaningelgem vd. 2004). Bazı denizel termofilik basil türleri, örneğin *Geobacillus thermodenitrificans* B3-72, EPS üreticisi olarak rapor edilmiştir (Finore vd. 2014). Ayrıca, *Bacillus licheniformis* T4, B3-15 ve *Geobacillus tepidamans* V264, *Geobacillus* sp. 4001, *Geobacillus* sp. 4004, *Geobacillus thermoantarcticus*, *Geobacillus thermodenitrificans* B3-72 ve *Brevibacillus thermoruber* 423 türlerinden EPS üretilerek karakterize edilmiştir. Son olarak,

Aeribacillus pallidus 418, Bulgaristan'daki Rupi hidrotermal su kaynaklarından izole edilmiş ve yeni bir EPS içeriğinin sentezi ve karakterizasyonu yapılmıştır (Finore vd. 2014, González-García vd. 2015, Kambourova vd. 2016).

2.3.1 EPS'nin karbonhidrat içeriği

EPS, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından bulunduğu ortama bağlı olarak farklılık gösterse de, çoğunlukla β -1,3 veya β -1,4 bağlı heksoz ile pentoz şekerlerden oluşan karbonhidrat içerikli elastik bir polimerdir. EPS'nin molekül ağırlığı birkaç binden milyona kadar değişmektedir. Çoğu, uzun molekülü, lineer veya dallıdır ve moleküler ağırlığı 0.5×10^6 dalton ile 2×10^6 dalton arasındadır (Sutherland 2007). Yapısında karboksil, amino ve fosfat gibi fonksiyonel gruplar bulundurmaktadır (Tsuneda vd. 2003). Çok yaygın olarak monosakkaritler, güçlü β -1,3, β -1,4 veya β -2,6 bağları veya daha esnek olan α -1,2 veya α -1,6 glikozidik bağları ile ana omurgaya bağlanmaktadır (Kambourova vd. 2016). Birçok ekzopolisakkarit homopolisakkarittir. Ancak çoğu ekzopolisakkarit ise, heteropolisakkarit veya nötral olup, yüklü şeker kalıntılarının bir karışımını içermektedir. Genellikle organik ve inorganik atomlar içerebilirler. Üronik asitlerin veya bazı durumlarda ketal bağlantılı pirüvat veya nadiren sülfatların varlığı nedeniyle, bilinen çoğu ekzopolisakkarit; alginat, ksantan ve kolanik asit içerikli çoklu anyonikler olarak tanımlanır. Polikasyonik ekzopolisakkaritler ise, hücre içi adhezin gibi, kısmen asetillenmiş kalıntılar ile β -1,6 glikozidik bağlı N-asetilglukozamin bileşenleri içerirler. Bu adhezin özellikle nozokomiyal patojenlerde keşfedilmiştir ki, bu patojenler çoğunlukla tıbbi implantlarda ve biyofilm ile ilişkili hastalıklarda kolonize olabilmektedir (Götz 2002).

Biyofilm matriksi çok fazla miktarda polisakkarit ve önemli oranda da protein ve ekstraselüler DNA (eDNA) içerebilir (Frølund vd. 1996, Conrad vd. 2003, Yang vd. 2007, Coughlan vd. 2016). EPS matriksinin büyük bir kısmını (%65) polisakkaritler oluşturmaktadırlar (Horan ve Eccles 1986, Frølund vd. 1996, Wingender vd. 2001). EPS matriksinin yapışkanlığında polisakkaritlerin önemi kanıtlanmıştır (Boyd ve Chakrabarty 1995, Hughes vd. 1998). Biyofilm polisakkaritleri özellikle olumsuz koşullarda hayatta kalma ve devamlılık için önemlidir (Rinker ve Kelly 1996).

Ekstraselüler polisakkaritler, proteinler ve DNA oldukça sulu olup hidrofilik moleküllerdir, ancak diğer EPS bileşenleri hidrofobik özelliktedir (Neu ve Poralla 1988). EPS'nin hidrofobik özelliği, polisakkaritlere bağlı metil ve asetil gruplarının atomlarından kaynaklanmaktadır (Neu vd. 1992).

Bazı EPS'ler bakteriyel kapsüller oluştururlar ve hücre yüzeyi ile daha sıkı ilişkiler kurarlar. Kapsül oluşumu ve bu yapının devamlılığı çok hücreli mikrobiyal topluluklar için aslında doğrudan EPS'nin miktarı ve üretimine bağlıdır (Sutherland 2001). Bakteriyel kapsül yapısı, polisakkarit veya bazen de protein tabiatlı bir ekstraselüler hücre salgısı olup, bakteriyel hücreleri sınımsız sararak yapışkan özelliğiyle bakterilerin yüzeylere tutunmasında ve korunmalarında iş görür (Flemming ve Wingender 2010).

2.3.2 EPS'nin protein içeriği

Ekstraselüler proteinlerin, bir grubu *S. aureus*'daki BAP proteinleri gibi biyofilm ile ilişkili yüzey proteinleridir. Bakteriyel hücrelerin yüzeyinde yüksek moleküler ağırlıklı proteinler bulunmaktadır ve bu proteinlerin bir kısmı, farklı bakteriyel türlerin biyofilm oluşumunu teşvik etmektedir (Lasa ve Penadés 2006). Matriksin diğer yaygın proteinli bileşeni amiloidlerdir. Amiloidler, cansız yüzeylere ve konakçı hücrelere tutunmada gerekmektedir ve ayrıca bakteriler ve bitki hücreleri için sitotoksin olarak işlev görmektedir (Otzen ve Nielsen 2008). Amiloid aslında çeşitli klinik bozukluklarda görülen ve vücudun pek çok dokusundaki hücreler arasında depolanan ve çözünmeyen protein agregatlarıdır. Katı, dallanma göstermeyen ve belirli bir uzunluğu olmayan fibrillerden oluşan amiloid, proteolitik sindirime dirençli ve kolay çözünmeyen bir yapıdadır (Merlini ve Bellotti 2003).

Proteinler gibi organik moleküllerin yüzeylere adsorpsiyonu bakteriyel tutunmada önemli bir rol oynayabilir. Bu moleküller yüzeylerin fiziko-kimyasal özelliklerini değiştirebilir. Dolayısıyla abiyotik substrata tutunma aşamasında yüzeyin serbest enerjisi, hidrofobisitesi ve elektrostatik yükü gibi faktörler etkilidir (Dickson ve Koohmarare 1989).

Yapılan çalışmalarda paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde süt tozu varlığının, termofilik basillerin spor ve vejetatif hücrelerinin tutunmasının %1 kadar azalttığını göstermişlerdir (Parkar vd. 2001). Süt tozunun aynı zamanda paslanmaz çeliğe *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Serratia marcescens*'in de tutunmalarını azalttığı belirlenmiştir (Barnes vd. 1999). Ancak, Speers ve Gilmour (1985) farklı olarak paslanmaz çelik ve kauçuk yüzeylerin, proteinler veya laktoz ile muamele edilmesiyle süt ile ilişkili mikroorganizmaların tutunmasında artış olduğunu göstermiştir.

Matrikste bulunan enzimatik olmayan yapısal proteinler, hücre yüzey ile ilişkili proteinler ve lektinler olarak adlandırılan ekstraselüler karbonhidrat bağlantılı proteinler olup, özellikle polisakkarit matriksin stabilizasyonu ve oluşumunda gerekmektedir. Bu proteinler, ekstraselüler EPS ve bakteri yüzeyi arasında doğrudan bir bağlantı oluşturmaktadır (Lynch vd. 2007). Lektinler, bitki, hayvan veya mikrobiyal kökenli glikoprotein veya proteinler olup, karakteristik özgünlükleriyle karbonhidratlara bağlanırlar. Floresan olarak etiketlenen lektinler, prob olarak kullanılabilirlerinden EPS bileşenlerinin incelenmesine ve EPS'nin mikroskobik olarak *in situ* tayinine olanak sağlarlar (Flemming ve Wingender 2010). Yine *Bacillus subtilis* biyofilmlerinin yapısal bütünlüğü için gerekli olduğu düşünülen ekstraselüler Tas A buna örnek olarak verilebilir (Lux vd. 2004).

2.3.3 EPS'deki ekstraselüler enzimler

Biyofilmlerde çeşitli ekstraselüler enzimler saptanmış olup, matrikse hapsedilmiş halde bulunurlar. Bu enzimlerin çoğu biyopolimerlerin ayrışmasına yol açmaktadır. Bu ekstraselüler enzimlerin substratları genellikle suda çözünen polimerler, polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitlerdir. Suda çözünmeyen bileşikler ise selüloz, kitin ve lipitler ve ayrıca organik partiküllerdir. Çeşitli ekstraselüler enzimler çizelge 2.2'de sunulmuştur. Bu enzimlerin varlığı, yukarıda sözü geçen EPS bileşen substratları parçalar ve adeta bir dış sindirim sistemi görevi görür ve düşük moleküler ağırlıklı ürünleri oluşturmak üzere biyopolimerleri yıkarlar. Böylece, bu ürünler karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilirler. Ayrıca bazı enzimler, biyofilmlerden bakterilerin ayrılmasını düzenlemede ve EPS yapılarının degradasyonunda gerekebilir. Diğer

enzimler ise, enfeksiyon kaynaklı medikal biyofilmlerde virülans faktörleri olarak rol oynarlar (Flemming ve Wingender 2010). Ekstraselüler redoks enzimleri, mikrobiyal olarak etkili korozyonda önemli bir rol oynarlar (Busalmen vd. 2002). Ekstraselüler enzimler, polisakkarit etkileşimleri ile biyofilmlere tutunabilir (Wingender vd. 1999). Matrikste bulunan ekzopolisakkaritler, enzimler tarafından biyokimyasal olarak aktive edilmektedir. Enzimler ve yapısal ekzopolisakkaritler arasında ki bu etkileşimler, enzimlerin termostabilitesini arttırmakta ve aynı zamanda proteazlara karşı direncini arttırmaktadır (Skillman vd. 1999).

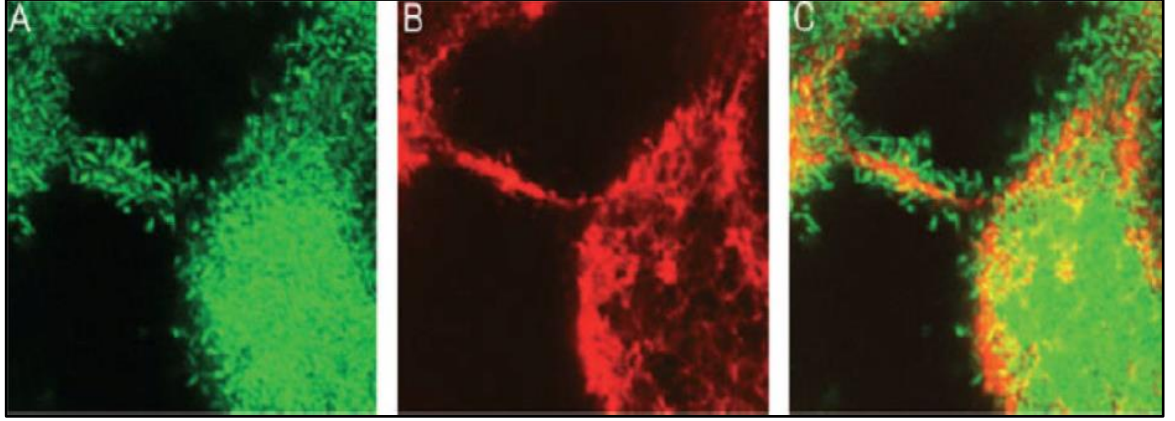
Biyofilmle ilişkili enzimler, EPS bileşenleri yokluğunda potansiyel olarak parçalanır. (Wingender vd. 2001, Zhang ve Bishop 2003). EPS içeriğindeki ekzopolisakkaritler ise temel olarak hidrolaz ve liyaz enzimleri tarafından parçalanır (Laue vd. 2006, Ude vd. 2006), ancak bu süreç genellikle yavaştır (Flemming ve Wingender 2010).

Çizelge 2.2 Doğada ve insan yapımı sucul çevrelerde bulunan biyofilm kökenli enzimler (Wingender ve Jaeger 2002)

Enzim	Biyofilmin çeşidi
Protein parçalayan enzimler	
Proteaz	Nehir biyofilmleri ve etkin çamur
Peptidaz	İçme suyu, nehir, atık su, lağım biyofilmleri, deniz birikintileri ve etkin çamur
Polisakkarit veya oligosakkarit parçalayan enzimler	
Endoselülaz	Nehir biyofilmleri
Kitinaz	Nehir biyofilmleri ve nehir ağız sediment biyofilmleri
α -glukozidaz	Nehir, lağım, akarsu sediment, göl sediment, atık su biyofilmleri, deniz birikintileri ve aktif çamur
β -glukozidaz	Nehir, damlatmalı biyofiltre, lağım, akarsu sediment, göl sediment biyofilmleri, deniz birikintileri ve aktif çamur
β -ksilosidaz	Nehir ve göl sediment biyofilmleri
N-asetil- β -D glukozaminidaz	Nehir biyofilmleri, deniz birikintileri ve etkin çamur
Kitobiosidaz	Deniz birikintileri
β -glukuronidaz	Aktif çamur
Lipit parçalayan enzimler	
Lipaz	Deniz birikintileri ve aktif çamur
Esteraz	Nehir, göl sediment, içme suyu, lağım, akarsu sediment biyofilmleri ve aktif çamur
Fosfomonoesterazlar	
Fosfotaz	Nehir, lağım, akarsu biyofilmleri, deniz birikintileri ve aktif çamur
Oksidoredüktazlar	
Fenol oksidaz	Nehir biyofilmleri
Peroksidaz	Nehir biyofilmleri
Ekstraselüler redoks aktivite	Aktif çamur

2.3.4 EPS'de ekstraselüler DNA içeriği

Farklı mikrobiyal kökenden gelen çok çeşitli biyofilmler incelendiğinde eDNA içeriklerine sahip oldukları görülmüştür. Özellikle atık su biyofilmlerinde büyük miktarlarda eDNA içeriği bulunduğu belirtilmiştir (Frølund vd. 1996), (Şekil 2.4).

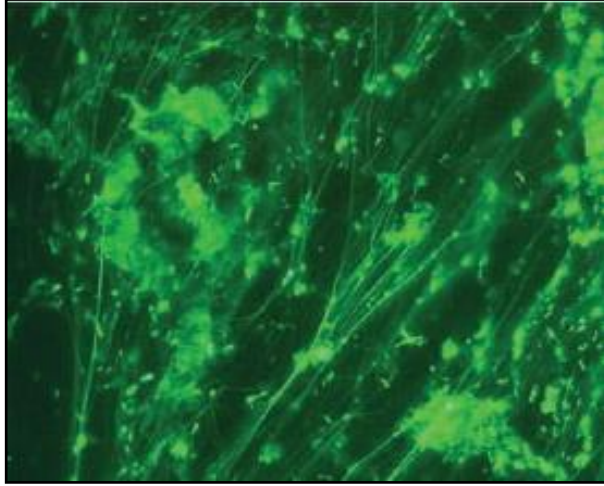


Şekil 2.4 DNA bağlayıcı DDAO (Dodesil Dimetil Amin Oksit) boyası ile boyanan ve yeşil floresan (Gfp) ile proteinleri etiketlenen *P. aeruginosa*'ya ait iki günlük olgun biyofilm örneklerinde yatay optik kısım görüntüsü (Karatan ve Watnick 2009)

a. Yeşil floresan ile boyanan bakteri, b. Kırmızı floresan ile boyanan eDNA, c. Bakteri ve eDNA

Ortamda eDNA içeriğinin bulunması ve hücrelerin birbirlerine yakın temasta olabilmelerinden dolayı, biyofilm yapısı ile konjugasyon veya transformasyon gibi çeşitli yatay gen transferi olasılıkları arttırılmış olur (Madigan ve Martinko 2010). eDNA, ilk başta parçalanan hücelere ait kalıntı materyaller olarak görülmesine rağmen, aslında matriksin (Wingender vd. 1999) ve biyofilm yaşamının tamamlayıcı bir parçasıdır (Molin ve Tolker-Nielsen 2003). Aynı zamanda *P. aeruginosa* biyofilmlerinde eDNA büyük bir matriks bileşenidir ve hücreler arası bağlayıcı olarak iş görmektedir (Yang vd. 2007). eDNA, negatif yüklü olması sebebiyle, içerdiği organik kationlar tarafından hücre lizisine neden olabilecek antimikrobiyal bir aktiviteye sahiptir ve bakteriyel dış membranı ile lipopolisakkaritleri stabile edip sağlamlaştırmaktadır. Ayrıca, Mg^{+2} , Ca^{+2} gibi pek çok iyonun matrikste tutunmasında da rol oynar (Mulcahy vd. 2008).

Biyofilmler arasında eDNA'nın lokalizasyonu oldukça çeşitlidir. Suda yaşayan bakteriyel bir izolat filamentli bir ağ oluştururken, *P. aeruginosa* biyofilmlerinde eDNA örümcek ağı gibi yapılar oluşturmaktadır (Allesen-Holm vd. 2006, Böckelmann vd. 2006), (Şekil 2.5).



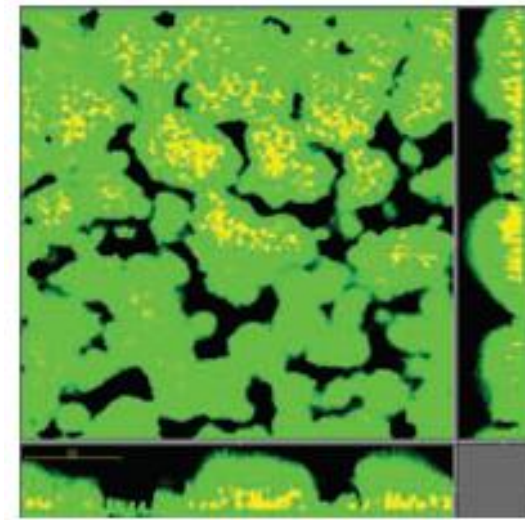
Şekil 2.5 eDNA'nın filamentli yapısının görüntüsü (Flemming ve Wingender 2010)

Nükleik asitler için spesifik boyalar ile eDNA saptanabilmektedir. Örneğin, tatlı su bazal besiyeri agarında *Gammaproteobacter* F8 bakterisinin oluşturduğu 4 günlük olgun biyofilm Syto 9 boyası ile boyanmıştır. Bakteriler, DNA iplikleri arasında küçük çubuklar olarak görülmektedir.

Haemophilus influenzae biyofilmlerinde, ince şeritler şeklindeki eDNA yoğun ve özgün bir ağ oluşturarak, kalın 'halatlar' halini alıp su kanalları oluştururlar (Jurcisek ve Bakaletz 2007). eDNA'lar genellikle biyofilmlerde mantar şeklindeki mikrokolonilerin saplarında zamana bağlı olarak lokalize olurlar. Özellikle eDNA'nın yüksek konsantrasyonları sapın dış kısımlarında bulunmuştur. Bu yüzden *P. aeruginosa* biyofilmlerinin alt kısmındaki popülasyonlarının, baş ve sap kısımları ile bir sınır oluşturduğu bilinmektedir (Allesen-Holm vd. 2006).

eDNA'nın kaynağı farklı türler arasında çeşitlilik göstermektedir. *Gammaproteobacter* F8 suşunda yürütülen çalışmalarda, genomik DNA ve eDNA arasında benzerlikler yanında, belirgin farklılıklar da saptanmıştır (Böckelmann vd. 2006). Ancak, *P. aeruginosa* ve *P. putida* biyofilmlerinde eDNA ve genomik DNA'nın aynı kökenden geldiği görülmektedir (Steinberger ve Holden 2005). *S. epidermidis* biyofilmlerinde ise eDNA, bakterilerin alt popülasyonlarındaki lizisleri boyunca iki fonksiyonlu otolizin (AtlE) tarafından üretilmektedir (Molin ve Tolker-Nielsen 2003). Qin vd. (2007), *S. epidermidis* biyofilmlerinde AtlE otolizini bağlantılı DNA'nın hücre dışına salınım mekanizması incelemiştir. Bu çalışmaya göre, Syto 9 (yeşil) ve Propidyum iyodür (kırmızı) floresan boya kullanılarak, yeşille boyanan canlı hücrelerin oluşturduğu

mikrokolonilerin ortasında bulunan sarı renkteki eDNA'nın varlığını CLSM ile görüntülemiştir. eDNA'ların otolizin etkisi ile, ölen hücrelerden kaynaklı olduğunu ifade etmişlerdir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 *S. epidermidis* bakterisinin iki günlük inkübasyondan sonra Syto 9 ve Propidyum iyodür ile boyanmasının ardından CLSM ile görüntülenmesi (Qin vd. 2007)

Canlı hücreler yeşil ve ölü hücrelerden kaynaklı eDNA ise sarı görünmektedir. Bars, 50 μ m.

2.3.5 EPS'deki lipid içeriği

Lipidler de birer biyofilm matriks bileşenidir (Conrad vd. 2003). Lipopolisakkaritler, termofilik *Thiobacillus ferrooxidans*'in demir-sülfür yüzeylere tutunması için önemlidir (Sand ve Gehrke 2006) ve *Serratia marcescens* yüzey aktif özellikleri ile ekstrasellüler lipitler üretmektedirler (Matsuyama ve Nakagawa 1996). EPS bileşeni olan bu lipopolisakkaritler ve lipidler, matrikste tutunan lipaz ve esteraz enzimleri ile parçalanıp monomerlerine ayrıştırılabilmektedir (Wingender ve Jaeger 2002).

2.3.6 EPS'deki iyonik bileşikler

EPS matriksi gerçekte kanyonları, anyonları, apolar bileşenleri ve su fazındaki partikülleri ayıran, moleküler bir elek olarak rol oynamaktadır (Flemming ve Leis

2002). EPS; apolar bölgeler, hidrojen bağlayan gruplar, anyonik gruplar (üronik asit ve proteinler) ve katyonik gruplar (amino şekerler vb.) içerdiğinden, matriksin bu yapışkanlığına bağlı olarak partükülleri ve nanopartükülleri tutup biriktirebilmektedir (Van Hullebusch vd. 2003). Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Ni^{+2} gibi ağır metaller, benzen, toluen ve ksilen gibi hidrofobik bileşiklerin aksine aktif çamurda bakterilerin hücre duvarlarına bağlanırlar (Wuertz vd. 2001). Bu emilen maddelere biyofilmlerin cevabı kompleksdir. Örneğin *P. putida* biyofilmlerinde artan karboksil grupların üretimi, ortamda biriken toluen tarafından indüklenmektedir (Schmitt vd. 1995).

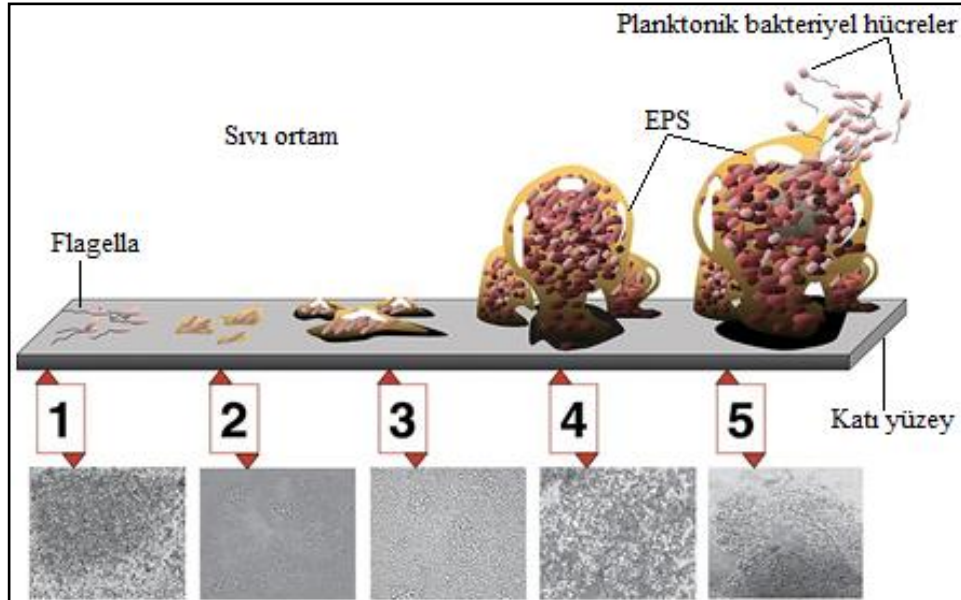
2.4 Biyofilmlerin Tutundukları Yüzeylerle Olan Etkileşimleri

Biyofilmlerin tutundukları yüzeyler abiyotik substratlar olarak da adlandırılır. İşte bu hücre ve biyofilm oluşumu için uygun yüzey arasındaki etkileşim çeşitli fiziko-kimyasal değişkenler ile belirlenir ve bu durum iki farklı teori ile açıklanmaktadır (Korber vd. 1995). Birinci teori olan, yüzey serbest enerji/hidrofobisite teorisi, yüzey termodinamiğine dayanmaktadır. Eğer sistemin toplam serbest enerjisi, bir yüzey ile hücre teması sonucu azalır, yüzeye tutunma meydana gelecektir. Bu teori de, bakteri ve abiyotik substratın yüzey gerilimi saptanır ve bu hesaplama elektrostatik etkileşimler katılmaz (Carpentier ve Cerf 1993). İkinci teori olan DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) teorisinde ise, bağlanan partiküllerin hareketinde itici ve çekici güçler eşit olarak kabul edilir (Korber vd. 1995, Busscher vd. 1998, Poortinga vd. 2001). DLVO teorisi, hücre çeşidi ya da yüzey farklılığı gözetmeden tamamen hücre yüzey özellikleri ile ilişkilidir. Cam ya da polimer bazlı yüzeylerde, mikrobiyal yapışma süreci, itici ve çekici güçlerin eşit olduğu durumda dengededir (Bos vd. 1999, Hermansson 1999, Francolini vd. 2003). Mikrobiyal adezyon, van der Waals güçleri, elektrostatik güçler, kısa zincirli Lewis asit-baz etkileşimleri ve Brownian hareket güçleri arasında bir denge olarak tanımlanmaktadır (Poortinga vd. 2001). Elektrostatik etkileşimler, itici ya da çekici olabilir, bu birbirlerini etkileyen iki yüzeyin yüküne bağlıdır (Palmer vd. 2007). Bakteriyel yüzey ve hareketsiz yüzey, nötral pH'da negatif olarak yüklüdür. Elektrostatik etkileşimler, bakteriyel yüzey ve hareketsiz yüzey arasında nötral pH'da genellikle iticidir (Rijnaarts vd. 1995, 1999). Bakteriyel hücrenin yüzey yükü, proton itici güç oluşumu esnasında oluşan karboksil, fosfat ve amino

gruplarının varlığından kaynaklanır ve bu nedenle yüzey yükü ortamın pH (Poortinga vd. 2002) ve/veya iyonik konsantrasyonuna (Van der Wal vd. 1997) bağlıdır. Poortinga vd. (2002), fizyolojik pH değerlerinde (pH 5.0 ve 7.0) bakteriyel hücrelerin genellikle amino ve fosfat gruplarının varlığı yüzünden negatif yüklü olduklarını öne sürmüşlerdir. Bu çevresel değişiklikler (pH, iyonik konsantrasyon vb.), hücre tutunmasında önemli olabilen flagella ve fimbria gibi yüzey yapılarının konformasyonun değişmesini indükleyebilmektedir (Palmer vd. 2007). DLVO teorisinde önemli bir etken solüsyonun iyonik gücüdür. Düşük iyonik güce sahip solüsyonlarda (örneğin < 0.001 M) uzun aralıklı elektrostatik itici güçler bakteriyel tutunmada baskındır, ancak yüksek iyonik güce sahip solüsyonlarda (örneğin > 0.1 M) hidrofobisite gibi diğer yapısal etkileşimler etkilidir (Rijnaarts vd. 1995, 1999).

2.5 Biyofilm Yaşam Döngüsü

Biyofilm oluşum sürecinde beş önemli aşama bulunmaktadır. Bu aşamalar; ilk tutunma, geri dönüşümsüz tutunma, olgunlaşma I, olgunlaşma II ve dağılma'dır (Monroe 2007), (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Biyofilm gelişiminin beş aşaması ve her bir aşamanın şekli ve *P. aeruginosa* biyofilminin fotomikrografi ile eşleştirilme görüntüsü (Monroe 2007)

Serbest formdaki mikroorganizmalar hareketlerini yavaşlatarak yüzeye yaklaşırlar, yüzeye veya yüzeye daha önceden tutunmuş olan organik maddelerle ya da diğer mikroorganizmalarla geçici bir ilişki kurarlar. Bu geçici ilişki, bakterilere yüzeyde kendilerine uygun bir yer bulma olanağı sağlamaktadır. Yüzeye tutunan bakteriler, hücre dışına saldıkları polimerlerle diğer mikroorganizmaların da o bölgeye yapışmasını sağlayarak biyofilm ilk tabakasını oluşturmaya başlarlar. EPS matriks, moleküler bir filtre olarak davranıp bakterileri bir örtü gibi sarar (Dunne 2002). Ekzopolisakkaritlerden oluşan bu jelsi tabaka, negatif yüklüdür ve bir iyon değişim reçinesi gibi davranarak büyük miktarlarda ki besin moleküllerini kendilerine bağlayabilirler (Anwar vd. 1992).

Bir bakteriyel hücrenin yüzeye ilk tutunmasında önemli olan çok sayıda faktör mevcuttur. Bunlar, yüzey şartları, kütle transportu, hidrofobisite, yüzey pürüzlülüğü ve yüzey mikrotopografisidir (Palmer vd. 2007). Yang vd. (1999), paslanmaz çelik borularında yüzey doğrultusunda konvektif kütle transportunun meydana gelebileceğini göstermiştir. Bu transport, bir yüzeye bakterilerin yaklaşmasını kolaylaştırdığından, ilk bakteriyel tutunmada önemli bir rol oynar. İlk tutunma, van der Waals güçleri, elektrostatik güçler ve hidrofobik etkileşimleri kapsar (Van Loosdrecht vd. 1987, Gilbert vd. 1991, Carpentier ve Cerf 1993). Bunun yanı sıra yüzeyin çeşidi, fimbria varlığı, pH, besin miktarı, su akış hızı, sıcaklık da yüzeye yapışmada etkili rol oynar (Pompermyer ve Gaylarde 2000, Liu ve Tay 2001, Donlon 2002). Bakteri, sahip olduğu fimbria ya da salgıladığı polimerler ile yüzeye tutunur. Bu bağlanma fimbria ile gerçekleşirse bakteri tutunduğu yüzeyden kendini ayırabilir, ancak EPS ile yüzeye tutunursa bu bağlanma geri dönüşümsüz olmaktadır (Donlon 2002, Pasmore vd. 2002). Cansız bir yüzey ile ilk etkileşim için hareketlilik önemlidir, ancak kemotaksisin bakteriyel tutunmada hiçbir rol oynamadığı da kanıtlanmıştır (Pratt ve Kolter 1998). Buna karşın, Klausen vd. (2003), *P. aeruginosa*'nın flagellasının katı bir yüzeye ilk tutunmada gerekli bir faktör olmadığını, ancak biyofilm gelişiminde önemli bir rol oynadığını rapor etmişlerdir. Hareketsiz bakteriler bu ilk temas boyunca Brownian hareketi gösterirler ve sıvı kayma kuvvetleri ile kolaylıkla yer değiştirebilirler (Marshall vd. 1971). O'Toole ve Kolter (1998) ise, besiyerine karbon kaynağı olarak glukoz yerine sitrat eklenmesi gibi çevre koşullarında değişiklik meydana geldiğinde, bunun

tutunmayı etkileyebileceğini göstermişlerdir. Biyofilm oluşumunda mikroorganizmaların uygun yüzeylere bağlanması, aktif ya da pasif olabilir ve bakterilerin hareketliliğine, yoğunluğuna, difüzyonuna ve sıvının dinamik güçleri ile planktonik hücrelerin taşınmasına bağlıdır. Bakteriyel hücre yüzeylerinin fizikokimyasal özellikleri bu ilk tutunma boyunca hücrelerin yapışmasında önemlidir (Van Loosdrecht vd. 1990). Bu bakteriyel tutunma aynı zamanda ortamdaki besin mevcudiyeti ile de etkilenmektedir (Kumar ve Anand 1998). Yüzey ile ilk temastan sonra mikroorganizmaların ince iplikler üretmeye başlaması taramalı elektron mikroskop (SEM) incelemeleri ile de kanıtlanmıştır (Firstenberg-Eden vd. 1979). Ayrıca, biyofilm tabakasının oluşumunda yüzeye ilk tutunan ve çoğalan bakterinin türü de önemlidir. Yerleşik bir biyofilm tabakasının varlığı yeni bakteri türlerinin girişini engellemektedir. Çünkü biyofilmdeki yerleşik mikroorganizmalar elektrik yükü farklılığı, besin rekabeti ya da salgıladığı kimyasal maddeler ile diğer mikroorganizmaları uzaklaştırabilirler (Pompermaye ve Gaylarde 2000).

Birinci aşama, olan ilk tutunma geri dönüşümlü bir tutunma olarak adlandırılır ve hücreler yeniden yüzeylerden kolaylıkla ayrılabilir (Zottola 1991). Bakteriyel hücreler ve yüzey arasında gelişen ilk zayıf etkileşimler geri dönüşümlü tutunma olarak ifade edilmektedir. Geri dönüşümlü tutunma sürecini etkileyen çeşitli uzun zincirli etkileşimler, van der Waals çekim güçleri, elektrostatik güçler ve hidrofobik etkileşimlerdir. Bu aşama boyunca bakteriler Brownian hareketi gösterir ve kolaylıkla akışkan kuvveti ile hareket edebilir (Marshall vd. 1971). Hücre yüzeyi ve biyofilm tabakası arasında elektron transferi de, inorganik ve organik yüzeylere bakteriyel tutunmada önemli bir rol oynar (Poortinga vd. 2001).

Abiyotik substratlar olan cansız yüzeyler ve bakteriler arasında ilk tutunma, genellikle hidrofobik gibi spesifik olmayan etkileşimler aracılığı ile olmaktadır. Canlı yüzeylere tutunma ise, genellikle spesifik moleküller aracılığıyla olmaktadır. Biyofilm gelişimi süresince cansız yüzeyler üzerinde hücre-hücre tutunması ise spesifik adezinler ile sağlanabilmektedir (Dunne 2002). Tutunma gerçekleşince bakteri bir takım adaptasyon evreleri geçirir. Bunlar içinde EPS üretimi ve antimikrobiyal ajanlara direnç gelişimi en önemli olanlarıdır (O'Toole vd. 2000). Bakterilerin geri dönüşümlü bir biçimde

bağlanmalarının ardından bakteriyel hücreler çoğalır ve EPS üretirler (Kumar ve Anand 1998).

İlk tutunma boyunca, organik ve inorganik moleküllerce bir yığın akışı olmaktadır. Bu moleküller, difüzyon veya türbülanslı akış ile yüzey boyunca taşınmaktadır (Kumar ve Anand 1998). Türbülans akışında, aniden oluşabilecek küçük türbülans dönüşleri, yüzeye paralel doğrultuda bakteriyel hücrelerin içerdiği küçük partikülleri sürükleyebilmektedir ve bir yüzey ile iletişime geçen bakteri tarafından gerekli Gibbs enerji bariyerini bu küçük partiküller etkisiz kılabilir ve bu Gibbs enerji bariyeri; gerçekte van der Waals etkileşimleri, yaygın çekici güç ve elektrostatik etkileşimlerin tamamını kapsar (Vadillo-Rodríguez vd. 2005).

Mikroorganizmaların yapışma yeteneklerinin logaritmik üreme fazında daha yüksek olduğu tespit edilmiş ve bunun nedeninin de hücre duvarının üreme fazında artan hidrofobik özelliğinden ileri geldiği belirtilmiştir (Van Loosdrecht vd. 1990).

Hücrelerin geri dönüşümsüz tutunması ise, biyofilm gelişiminde bir sonraki önemli aşamadır. İtici güçler çoğunlukla bakteriyel hücrelerin yüzey ile direk temas yapmasını önler, ancak bu temas flagella, fimbria, pili ve EPS fibrilleri gibi bakterilerin hücre yüzey uzantıları aracılığıyla meydana gelmektedir (Jones ve Isaacson 1982, Hancock 1991). Geri dönüşümlü tutunmadan geri dönüşümsüz tutunmaya geçiş için, dipol-dipol etkileşimler, hidrojen, iyonik ve kovalant bağlar ve hidrofobik etkileşimleri içeren çeşitli kısa zincirli etkileşimler gerekmektedir. Bu polimerik fibriller arasında oluşan etkileşimler sayesinde bakteriyel hücreler ve yüzey arasında bir köprü oluşur ve sonuçta yüzey ile geri dönüşümsüz bir ilişki sağlanır (Marshall vd. 1971, Kumar ve Anand 1998).

Geri dönüşümlü tutunmadan geri dönüşümsüz tutunmaya geçiş karşılaştırmalı olarak çok az çalışılmıştır. Ancak, Meinders vd. (1995), *Streptococcus*'un tutunmasının 10 dakikadan daha kısa bir sürede yüz kereden daha az geri dönüşümlü şekilde olduğunu göstermişlerdir. Parkar vd. (2004), temizlenen bir yüzeyde hücrelerin geri dönüşümsüz olarak tutunmalarının, *A. flavithermus* B12-C^m hücrelerini içeren taze süspansiyona

maruz bırakıldıktan sonra 30 dk içinde meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Flint vd. (1997), *S. thermophilus* ve *Bacillus cereus* kültürlerinin 60 saniyeden az bir sürede paslanmaz çeliğe geri dönüşümlü olarak tutunduğunu bulmuşlardır. Dunne (2002) tarafından, ekzopolisakkaritler ve/veya spesifik ligandlar, pili veya fimbriaların üretimi ile yüzeylerin bakterileri kilitlemesini ve yüzey ile kompleks oluşturduğunu tanımlanmıştır. Bu aşamadan sonra yüzeylerden bakterilerin giderilmesi için kazıma, fırçalama veya kimyasal temizleyiciler gibi çok güçlü fiziksel veya kimyasal güçler gerekmektedir (Marshall vd. 1971, Palmer vd. 2007).

Geri dönüşümsüz tutunan bakteriyel hücreler gelişir ve olgun biyofilm katmanlarında sunulan besinlerin kullanımı ile bölünür ve sıvı ile çevrelenir. Bu da mikrokolonilerin oluşumuna sebep olur ve hücrelerle kaplanan yüzey genişleyerek bütünleşmiş bir katman oluşturur. Bu süreç boyunca tutunan hücreler aynı zamanda EPS üretir ve EPS yüzey hücrelerinin sabitlenmesine ve çevresel hareketlere karşı koloniyi stabil hale getirmeye yardımcı olur (Characklis ve Marshall 1990). Geri dönüşümsüz basamak olarak adlandırılan bu olay da, bakteriler ekzopolisakkarit ürettiği için tutunan mikroorganizmalar yüzeylerden çok zor kopar ve sonuçta tam bir biyofilm matriksi oluştuğunda yüzeye sıkıca tutunurlar (Zottola 1991).

Üçüncü ve dördüncü aşama olan biyofilmin olgunlaşması, su kanalları içeren kompleks yapının oluşması ile sonuçlanır ve bu yapı hidrodinamik özellikler ve hücre-hücre sinyalleri, bakterilerin büyüme oranı, EPS üretimi, bakteri hareketliliği gibi biyolojik faktörlerden etkilenmektedir (Stoodley vd. 2002). Olgunlaşan biyofilmler hayatta kalmak ve yeni nişlerde koloni oluşturabilmek için biyofilmlerden ayrılır ve dağılılabirler (Rittmann 1989, Applegate ve Bryers 1991). Olgun biyofilm tabakasında mikrobiyal çoğalma hiçbir zaman durmaz. Özellikle suyun akış gücü ile kopan hücre ya da hücre kümelerinin yeri hemen doldurulur. Tek bir hücre kopabildiği gibi 500 µM çapında bir hücre kümesi de yüzeyden ayrılabilir. Biyofilmden kopma süreci, enfeksiyonların yayılması ve su sistemlerinin uzak uçlarının kontaminasyonunda klinik ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır (Percival vd. 1999, Stoodley vd. 2001, Telgmann vd. 2004). Biyofilmlerdeki bakteriler çoğunlukla bağlı oldukları hücre topluluklarından tek tek (erozyon) veya parçalanarak ayrılırlar. Parçalanma farklı bir

süreçtir ve biyofilmden biyokütlenin oldukça büyük bir kısmının periyodik olarak dağılması olup, akış dinamikleri, sıvı hacminin kayma etkisi, sıvı çevresinde belirli kimyasalların varlığı, bakterilerin veya tabakanın yüzey özelliklerinin değişmesi gibi çeşitli faktörler yüzünden olabilir (Rittmann 1989, Applegate ve Bryers 1991) Serbest kalan bakteriler yeni bölgelere taşınabilir ve biyofilm süreci tekrar başlar (Marshall 1992). Biyofilmden ayrılma çoğunlukla erozyon ile gerçekleşirken, parçalanmada kopan hücre sayısının türüne bağlı olarak 10 ila 300 hücre arasında değiştiği bildirilmiştir (Wilson vd. 2004).

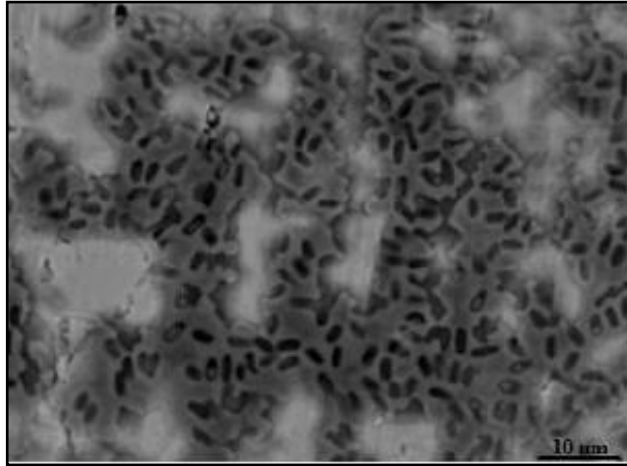
Çoğu biyofilm dağılma ve ayrılmaya maruz kaldıktan sonra, planktonik bakteriler salınır ve bu bakteriler diğer yüzeylere kolonize olur. Bu süreçte bir kaç farklı mekanizma vardır. Bunlar, hücre ölümü, matriksi parçalayan enzimler ve hücre hareketliliğinin indüklenmesidir (Karatan ve Watnick 2009, Kaplan 2010). Birkaç antibiyofilm polisakkaritinin de biyofilm ayrılmasını arttırdığı veya başlattığı gösterilmiştir (Jiang vd. 2011). Antibiyofilm polisakkaritleri tıpta ve endüstriyel ortamlarda uygulanabilmektedir. Çoğu bakteriyel antibiyofilm polisakkaritleri aynı zamanda biyofilmi inhibe eden geniş spektrumlu bir aktivite sergilerler ve bazıları önceden oluşmuş biyofilmleri dahi dağıtabilmektedir (Rendueles vd. 2012).

Olgun biyofilmlerin üç boyutlu yapılarında bakteriyel kümeler arasında su dolu kanallar bulunmaktadır, bu su dolu kanallar ilkel bir dolaşım sistemine analog olacak şekilde metabolik süreçlerde üretilen toksik maddelerin atılmasında ve besinsel öğelerin alınmasında görev yapmaktadır. Biyofilmlerin ilerleyen safhalarında biyofilmden kopmalar görülebilir (Aparna ve Yadav 2008).

Bir yüzeye bakteriyel hücrelerin devamlı tutunması ve art arda gelişimi EPS üretimi ile doğrudan bağlantılıdır ve sonuçta olgun bir biyofilm oluşur. Biyofilm içinde EPS içeren matriks miktarı artar ve çok tabakalı bakteri hücreleri EPS içine gömülür. Biyofilm oluşumu oldukça yavaş bir süreçtir ve kültür şartlarına bağlı olarak günler sonra ancak milimetrik bir kalınlığa ulaşabilmektedir (Melo vd. 1992). Biyofilmin içindeki mikroorganizmalar eşit oranda dağılmazlar. Aslında biyofilm hücreleri fazlasıyla geçirgen su kanalları içinde matriks ile çevrelenmiş mikrokoloniler halinde gelişirler

(Costerton vd. 1994). Biyofilmin yapısı, farklı besinsel gereksinimlere sahip farklı mikroorganizmaların kolonizasyonu yüzünden değişken olabilir. Yüzey boyunca tek bir tabaka olmak zorunda değildir. Biyofilmin hacmindeki artış, organik ve inorganik çözünen maddelerin tutunması veya depolanması ile meydana gelmektedir (Melo vd. 1992).

Biyofilm hücre topluluğundan köken alan yavru hücreler, hayatta kalabilmek ve yeniden kolonize olabilmek için biyofilmden ayrılabilirler (Aparna ve Yadav 2008). Beşinci aşama olan, biyofilmlerden sesil hücrelerin ayrılması biyofilm gelişiminde çok önemli bir aşamadır. Böylece yeni biyofilmlerin oluşmasına katkı sağlanır (Ma vd. 2009, Sauer vd. 2004), (Şekil 2.8). Bu dağılma çevresel değişikliklere bir cevap olarak meydana gelmektedir. Bunlar, besin kıtlığı, yeni besin kaynaklarının kullanılabilirliği ve bakteriler tarafından salgılanan enzimler tarafından matriksin modifikasyonu gibi sebepler olabilir (Sauer vd. 2004, Gjermansen vd. 2005). Örneğin, ekzopolisakkaritlerin parçalanmasına neden olan N-asetil- β -heksozaminidaz enzimi (dspB) biyofilm hücrelerinin dağılmasına neden olmaktadır. Bu enzim patojen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* tarafından üretilmektedir (Kaplan vd. 2004).



Şekil 2.8 *Geobacillus* spp. H11 izolatı tarafından Nutrient Broth'da oluşan biyofilmlerin dağılmasının SEM görüntüsü (Malek 2016)

Dağılma, matriks parçalanması veya büyük yapılarda merkezi boşlukların oluşumu ile gerçekleşmektedir.

Yüzeye tutunan bakteri çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokoloniler de yatay planda genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturmaktadır. Bakteriyel hücrelerin bir yüzeyden ayrılması, arkasında bakteriyel yüzey polimerlerinin veya bakteri izlerinin geride kalmasına sebep olabilir ve bu da başka bakteriyel hücrelerin tutunmasında önemli bir rol oynayabilir (Palmer vd. 2007). *Bacillus subtilis* bakterilerinin ayrılmasını, amiloid yapılarında ortaya çıkan D-amino asit karışımlarının tetiklediği rapor edilmiştir (Kolodkin-Gal vd. 2010). Bölgesel kanallar ve oluşturulan porlar, biyofilm bakterileri tarafından kullanılan bir stratejidir ve biyofilm içinde güçlü bir şekilde kütle transportuna neden olabilmektedir. Yağ asidi atomu olan *cis*-11-metil-2-dekanoik asit dağılmada bir sinyal faktör olarak görev alır ve *B. subtilis* gibi belirli türlerde biyofilm dağılımında gereken stres düzenleyicilerini kodlayarak oluşan biyofilmin dağılmasını başlatabilir (Davies ve Marques 2009).

2.6 Biyofilm Oluşumunda Hareket

Biyofilm tabakasının en küçük birimleri mikrokolonilerdir. Mikrokoloniler ince biyofilm tabakalarında yatay, kalın biyofilm tabakalarında ise dikey planda düzenlenir. Bu düzenlenmede en önemli etkenler su akış hızı ve yüzey gibi çevre koşullarıdır (Percival vd. 1999). Suyun akış hızının artması EPS üretimi ile mikroorganizma sayısını arttırmakta ve daha ince bir biyofilm tabakası oluşmasına yol açmaktadır (Percival vd. 1999, Liu ve Tay 2001, Cloete 2003). *P. aeruginosa* ve *Escherichia coli* bakterileri sahip oldukları flagella ile yüzeye yaklaşım tutunarak mikrokoloni oluştururlar. Bu bakterilerin flagella oluşturmayan mutantlarının sadece tek sıralı biyofilm tabakası meydana getirdikleri ve tutunma sürecini daha uzun zamanda tamamladıkları tespit edilmiştir. *Vibrio cholerae* ise, flagella hareketiyle yüzeyde hızla ilerleyebilirken, flagella içermeyen mutantlar aynı yüzeyde birbirinden çok uzak adacıklar halinde gelişen zayıf mikrokoloniler oluştururlar (Hall-Stoodly ve Stoodley 2002). *P. aeruginosa*'nın bir yüzey üzerinde hareketi için tip IV piliye gereksinim duyduğu bilinmektedir (O'Toole vd. 2000). Bakteriyel mikrokoloniler düzenli kayma kuvveti altındayken yüzeyler boyunca yuvarlanma hareketi gözlenir (Rupp vd. 2005), (Şekil 2.9).

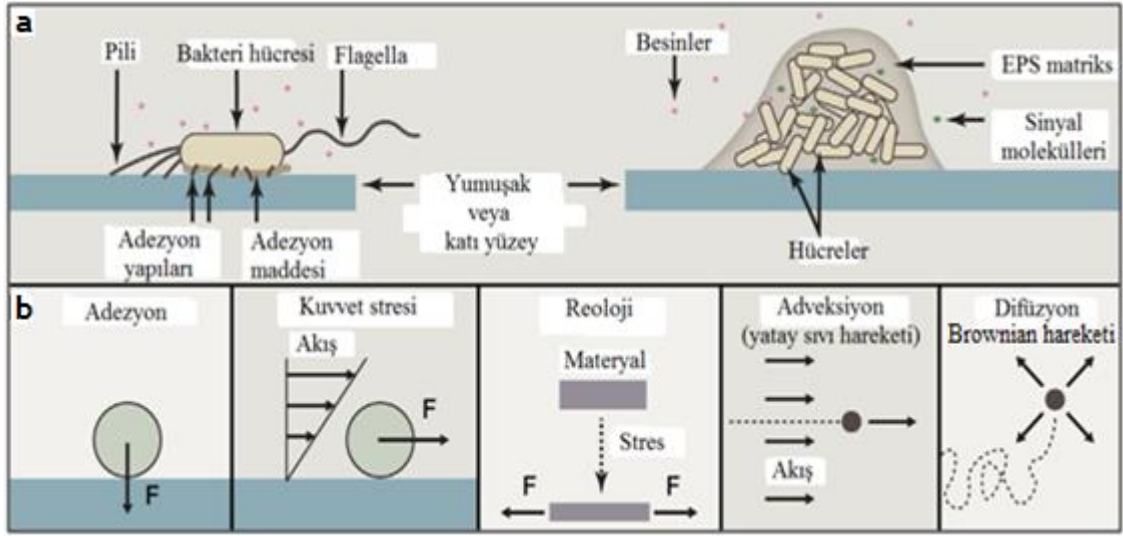


Şekil 2.9 Biyofilm göçü (www.cs.montana.edu 2003a)

Planktonik hücrelerin suda hareket ederken protonlar ve sinyal moleküller saldıği kanıtlanmıştır. Bu protonlar ve sinyal molekülleri bakteri herhangi bir yüzeye uzak iken radyal olarak yayılırlar. Mikroorganizmalar difüzyon, Brownian hareketi, aktif hareket ya da su akışı ile tutunacağı yüzeye yaklaşır. Bakteri yüzeye yakınsa proton ve sinyal moleküller yüzeye çarpıp geri döner ve bakteri ile yüzey arasında bu moleküllerin konsantrasyonları artar (Morisaki vd. 1999). Yüzeye kritik uzaklıkta olduğu anda (yaklaşık 1 nm), bakteri itici ve çekici güçlerin etkisiyle ya yüzeye yapışır ya da itilir. Bu itici ve çekici güçler; elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, hidrojen ve van der Waals bağlarının kuvveti, asit-baz etkileşimi, mikrotopoloji gibi sterik etkileşimler, hidrodinamik güçler olarak tanımlanmaktadır ve bunlar non-spesifik bağlanmada işlev görürler. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir. Çünkü bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklüdür. Bakterilerin negatif yüküde genellikle sahip oldukları mikrobiyal polisakkaritlerden ileri gelmektedir (Christensen 1989).

Fimbria, organizmaların yüzeylere yapışmasını sağlar. Yüzeylerde pelikül ve biyofilm oluşumları fimbria aracılığı ile olur. Pili, yapısal olarak fimbriaya benzer, ancak daha uzundur ve yüzeyde sadece bir ya da birkaç tanedir. Tutunmaya da yardımcı olmakla birlikte pilinin prokaryotlardaki asıl görevi konjugasyona aracılık etmektir (Madigan ve Martinko 2010). Fimbria yapısı, flagellin adlı bir veya birkaç protein monomerinin biraraya gelerek oluşturduğu polimer bir protein yapısıdır. *V. cholerae*'nin biyofilm oluşumu için flagella, pili ve ekzopolisakkarit biyosentezinin gerektiği bilinmektedir (Seper vd. 2011).

Pili, fimbria ve flagella gibi protein yapıları uzantılar biyofilm matriksinin diğer EPS bileşenleri ile etkileşiminde yapısal elementler olarak rol oynayabilmektedir. Örneğin *P. aeruginosa*'nın Tip IV pilisi, çapraz bağlantılı yapılar olarak rol oynayabilmektedir (Van Schaik vd. 2005). *Salmonella typhimurium* ve *E. coli*'de fimbria ve selülozun ortak üretimi, sert, hidrofobik ekstraselüler matriksin oluşumunu sağlamaktadır (Zogaj vd. 2001). Ayrıca, adezyon maddeleri yüzeylere bireysel bakteri hücrelerin tutunması için kullanılır. Bakteriler komünite içindeki etkileşimler ile yayılabilmek için, sinyal molekülleri, kimyasal ajanları ve çözülebilir maddeleri kullanır (Şekil 2.10.a). Bir yüzeye bir hücrenin tutunması yüzeye dik yönde bölgesel adezyon güçlerinin oluşmasına neden olmaktadır. Sıvı akışı yüzünden oluşan kuvvet stresleri hücre üzerinde, yüzeye paralel bir güç oluşturur. Bakteriler onları çevreleyen ekstraselüler matriksin reolojik özelliklerini deneyimler. Bu özellikler, akış ve/veya uygulanan güçlerin deformasyonudur. Sıvı akışı ve Brownian hareketi (difüzyon), bakteriler tarafından serbest bırakılan ve/veya özümlenen çözülebilir bileşikler taşımaktadır (Şekil 2.10.b) (Persat vd. 2015). Sonuç olarak, biyofilm oluşumu, biyofilmlerin reolojik ve adhesif özelliklerinden etkilenmektedir (Malhotra vd. 2015).



Şekil 2.10 Yüzeyle ilgili bakteriyel olayların mekanik etkilerinin çeşitliliği (F=güç) (Persat vd. 2015)

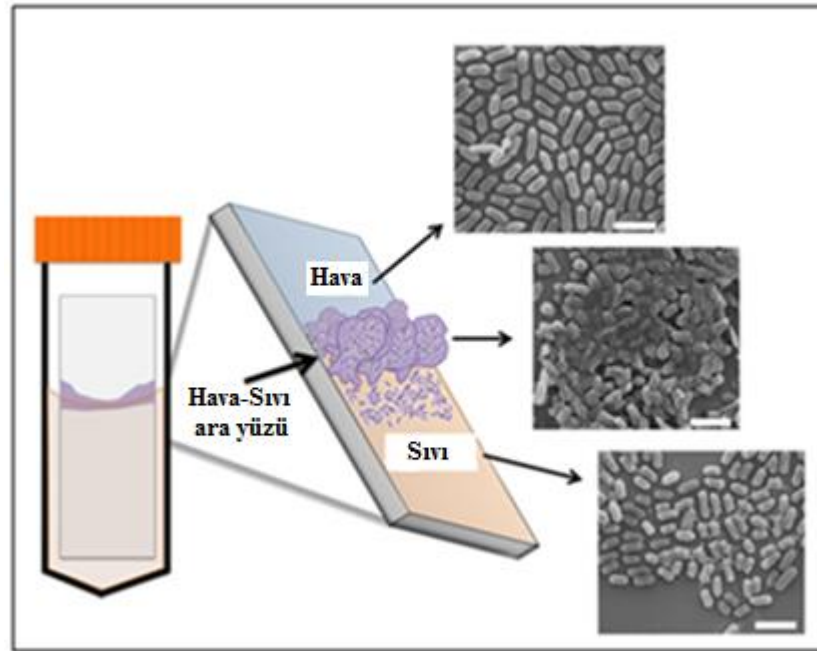
2.7 Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Biyofilmlerin yapısı, pek çok faktörden etkilenebilir (Çizelge 2.3). Bunlar, hidrodinamik şartlar, besinlerin konsantrasyonları, bakteriyel hareket, hücre içi iletişimi içerir. Ayrıca ekzopolisakkaritler ve proteinlerin, biyofilmin morfolojisini değiştirdiği, EPS'yi eksik sentezleyen mutant bakterilerle çalışılarak da gösterilmiştir. Örneğin *V. cholerae*'nin ekzopolisakkaritleri (Watnik ve Kolter 1999) ve *E. coli*'nin kolanik asiti (Danese vd. 2000) 3D biyofilm yapısının oluşumunda gereklidir. *B. subtilis* biyofilm matrisi ekzopolisakkarit içerir ve Tas A proteinini salgılar. Her ikisinde matrisin yapısal bütünlüğü ve gelişimi için gereklidir (Branda vd. 2006). *P. aeruginosa* biyofilm oluşumu için çalışılan en iyi modellerden biridir ve en az üç (alginat, Pel, Psl) farklı ekzopolisakkarit üretir. Bu ekzopolisakkaritler biyofilm gelişimine ve üç boyutlu yapısına katkı sağlarlar (Ryder vd. 2007). Alginat, *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumu için gerekli değildir (Wozniak vd. 2003); ancak biyofilm yapısı üzerinde önemli bir etkisi vardır (Flemming ve Wingender 2010). Dahası, alginat biyofilm oluşumunun başlangıcındaki mikrokolonilerin oluşumunda gereklidir. Aynı zamanda olgun biyofilmlerin mekanik stabilitesi için bir cevap niteliğindedir. Ancak, mukoid olmayan yaban tip suşlarda alginat biyosentezinden sorumlu genler ifade edilemez ve bunun için Pel ve Psl polisakkaritleri biyofilmin oluşumu için gereklidir. Bunlardan Pel hava-sıvı

ara yüzde oluşan pelikül oluşumu için gereklidir. Psl ise, biyofilm yapısının devamlılığında ve canlı ve cansız yüzeylere tutunmada gereklidir. Tutunma boyunca Psl'nin hücre-hücre iletişimini yönettiği düşünülmektedir (Ma vd. 2009), (Şekil 2.11).

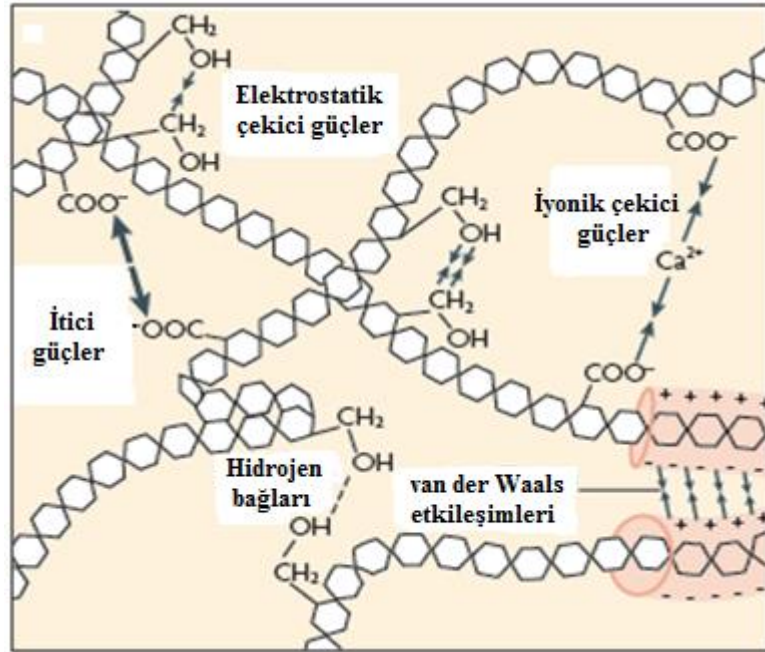
Çizelge 2.3 Biyofilm tabakasına etki eden faktörler (Wimpenny 2000)

Faktörler	
Genotipik faktörler	Türlerin dağılımı, hücre-hücre sinyalizasyonu, yapışma, hareket
Yüzey özellikleri	Malzeme tipi, serbest yüzey enerjisi, yüzey pürüzlülüğü
Mekanik faktörler	Hidrodinamik, koparma gücü, aşındırma
Fiziko-kimyasal çevre	pH, iyonik güçler, çözülmüş oksijen, ozmolarite, radyasyon vb.
Tabakanın fiziksel özellikleri	Kalınlık, konsantrasyon ve gradiyent
Bakterilerin kolonizasyonu	Rastgele yeni tür girişi ya da sinyalleşme ile yeni türlerin katılımı
Yıkıcı süreçler	Avlanma, antimikrobiyal ajanlar, fajlar
Giriş ve çıkış	Organik-inorganik maddeler, hücre erozyonu veya parçalanma



Şekil 2.11 *E. coli*'nin hava-sıvı ara yüzde oluşturduğu biyofilm yapısının şematik görüntüsü ve her bir biyofilm bölgesinin SEM mikrografı (Skala = 2.5 µm.) (Floyd vd. 2015)

Asetil gruplar, ekzopolisakaritlerin yaygın yan grupları olup, EPS'nin adhezif ve kohezif özelliklerini artırır ve biyofilm yapısını değiştirirler. Asetil gruplar ile alginatın modifikasyonu mikrokolonilerdeki bakterilerin agregasyonunu güçlü bir şekilde etkiler ve olgun biyofilmlerin farklı yapıları üzerinde etkilidirler (Franklin ve Ohman 1993, Watnik ve Kolter 1999). Biyofilm yapısı, anyonik EPS'nin karboksil grubu içeren çok değerlikli katyonlar ile etkileşiminden önemli ölçüde etkilenebilir. Örneğin, Ca^{+2} polianyonik alginat molekülleri arasında bir köprü oluşturarak biyofilm kalınlığının artışı uyarır ve mekanik stabilitesi artan biyofilmler kompakt hale gelebilir (Körstgens vd. 2001), (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 Biyopolimerlerde zayıf fiziko-kimyasal etkileşim modeli (Flemming ve Wingender 2010)

Fletcher (1976) albumin, jelatin ve fibrinojen gibi proteinlerin varlığının, polistiren yüzeylere bir deniz *Pseudomonas*'ın tutunmasını inhibe ettiğini rapor etmiştir. Jeong ve Frank (1994), bir yüzey üzerinde uygun biyofilm oluşumu için proteinlerin varlığının bakterilere besin kaynağı oluşturabileceğini öne sürmüştür. Whitehead ve Verran (2006) ise, iç yüzeyler üzerinde Bovin Serum Albumin (BSA) gibi protein içerikli materyallerin varlığının yüksek oranda bakteri hücrelerini tuttuğunu rapor etmiştir.

Bakteriyel hücreler nötral pH'da hücre duvarlarında genellikle net bir negatif yüke sahiptirler (Rijnaarts vd. 1999). Ancak, yük türden türe önemli oranda değişiklik gösterir ve kültürel koşullar (Gilbert vd. 1991, Kim ve Frank 1995), kültürün yaşı (Walker vd. 2005), iyonik güçler (Dan 2003) ve pH (Husmark ve Rönner 1990) tarafından etkilenebilir. Hücre yüzeyinin net yükü genellikle onun zeta potansiyeli olarak belirlenmektedir. Zeta potansiyeli, belirli bir pH ve tuz konsantrasyonu altında elektrikli bir alan varlığında bakteriyel hücrenin hareketliliğinden hesaplanır. Çoğu bakterinin fizyolojik pH'da (pH 7.0) zeta potansiyeli negatiftir (Gilbert vd. 1991, Millsap vd. 1997, Lerebour vd. 2004). Bakteriyel hücre yüzey yükü, hücre yüzeyinde bulunan temel grupların yanısıra, karboksil, fosfat ve amino grupları gibi asidik grupların ayrılmasından da kaynaklanmaktadır (Jucker vd. 1996, Van der Wal vd. 1997). Bakteriyel hücrelerin zeta potansiyeli ortamdaki iyonik güçlere bağlıdır. Bu yüzden hücre yüzeyinin yükü nötralizedir. Bir bakterinin toplam hücre yüzey yükü, Elektrostatik Etkileşim Kromatografisi (ESIC) kullanılarak ölçülebilir (Palmer vd. 2007). Yüzey yükü aynı zamanda ortamın pH'ından da etkilenebilir (Husmark ve Rönner 1990).

Sıcaklık ve pH da, mikroorganizmaların tutunma aşamasında etkilidir (Stanley 1983). Dahası, Giaouris vd. (2005), %10.5 gibi yüksek bir NaCl konsantrasyonunun paslanmaz çelik kuponlara *Salmonelle enterica*'nın tutunmasını engellediğini rapor etmişlerdir.

Biyofilmin oluştuğu abiyotik yüzeylerin hidrofobisitesi, katı yüzeylere bakteriyel tutunmada önemli bir anahtar faktördür ve yüzey yükü, yüzey hidrofobisitesinin minimum olduğu durumda önemlidir. Bunun aksine, polistiren yüzeyler çok hidrofobiktir ve bu durum hidrofobik etkileşimlerin lehine olabilir (Van Loosdrecht vd. 1987). Hidrofobisite, yüzeylere hücrelerin tutunmasında güçlü bir belirleyici olup, yüzeylere hücrelerin tutunması ile hücrelerin hidrofobisitesi arasında güçlü bir korelasyon vardır (Van Loosdrecht vd. 1987, Gilbert vd. 1991, Peng vd. 2001, Iwabuchi vd. 2003, Liu vd. 2004). Diğer yandan, bazı araştırmalarda, bakteriyel hücre tutunması ve hidrofobisite arasında doğrudan bir bağlantı olmadığı sonucuna varılmıştır (Sorongan vd. 1991, Parment vd. 1992, Flint 1997, Parkar vd. 2001). Yine de, hidrofobisitenin, yüzeylere mikroorganizmaların ilk tutunmasında gerekli olduğu kanısı yaygındır

(Palmer vd. 2007). Hidrofobisite, ara yüz ile ilişkili bir olaydır (Doyle vd. 1990). Husmark ve Rönner 1992, bakteriyel sporların yüzeylere vejetatif hücrelerden genellikle daha yüksek bir oranda tutunduğunu, sporların daha yüksek hidrofobisite gösterdiğini ve sporların yüzeyleri kapladığını belirtmiştir. Farklı bakteriyel hücrelerin yüzey hidrofobisitesindeki farklılıklar, protein ve lipit gibi hücrel moleküllerin özelliklerinden kaynaklanır. Hücrelerin hidrofobisitesinin, hücre yüzeyinde bulunan proteinlerle ilgili olabileceği de kanıtlanmıştır (Davies 2000).

Araştırmacılar, çok pürüzlü yüzeylere hücre tutunmasının daha fazla olduğunu gözlemlemişler ve pürüzlü yüzeylerin bakteriyel tutunmayı arttırdığı sonucuna varmışlardır (Pedersen 1990, Leclercq-Perlat ve Lalande 1994). Diğer taraftan Mafu vd. (1990), Vanhaecke vd. (1990) ve Flint vd. (2000), yüzeylere bakteriyel tutunma ile yüzey pürüzlülüğü arasında hiçbir korelasyon olmadığını rapor etmişlerdir.

Bunların yanısıra, yapılan fiziksel ölçümler ve direk olarak bakteriyel antibiyofilm polisakkaritlerinin, cansız yüzeylerin özelliklerini değiştirebildiği gösterilmiştir (Valle vd. 2006). Bu antibiyofilm polisakkaritler, sadece cansız yüzeyleri değil aynı zamanda Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre yüzeylerinin fiziksel özelliklerini de değiştirebilmektedir (Sayem vd. 2011).

Sonuç olarak, yüzey yükleri, hidrofobisite, ıslanabilirlik ve yüzeylerin pürüzlülüğünün biyofilm oluşumu için hücrelerin tutunma gücünü direk olarak etkilediği düşünülmektedir (Van Houdt ve Michiels 2010). Düşük yüzey enerjili materyaller hidrofobik, pozitif veya negatif olarak zayıf yüklü ve çoğunlukla plastik organik materyallerin genel özellikleridir. Dahası, cam ve paslanmaz çelik gibi yüksek yüzey enerjili materyaller çoğunlukla hidrofildir (Carpentier ve Cerf 1993, Kumar ve Prasad 2006).

2.8 Biyofilmlerin Geliştikleri Yüzeyler

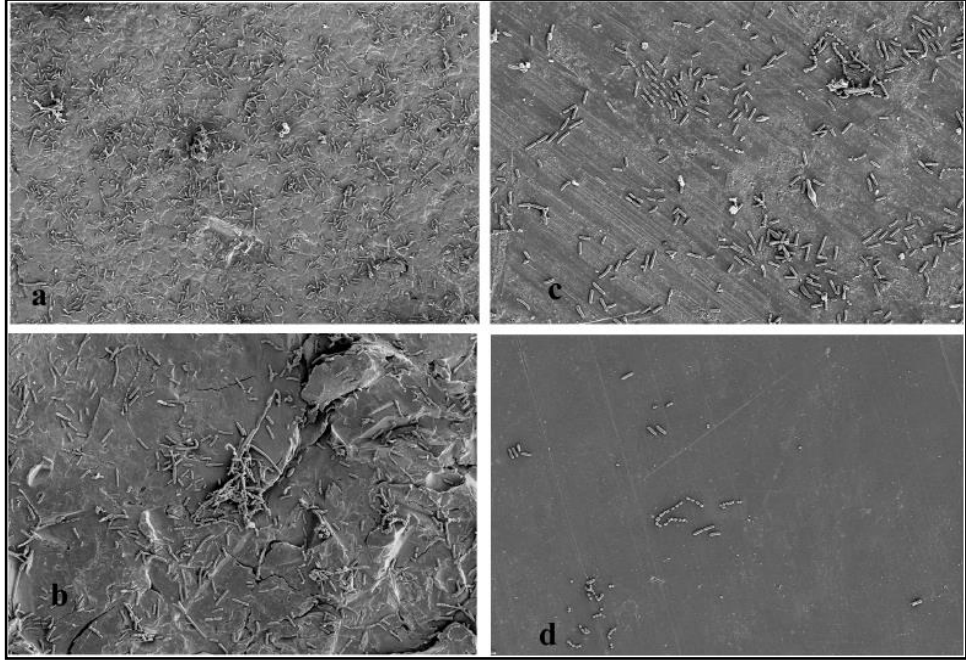
Mikroorganizmalar laboratuvar şartlarında hidrofobik, apolar özellikte olan teflon ve diğer plastik malzemelere tutunmaya, cam veya metal benzeri hidrofilik malzemelere göre daha büyük bir ilgi duymaktadırlar (Veenendaal ve Kooij 1999, Donlon vd. 2002). Yapı itibarıyla polipropilen (PP) yüksek derecede hidrofobik iken, polietilen (PE) ve polivinil klorür (PVC) orta düzeyde hidrofobiktir. Araujo vd. (2004), yüzey hidrofobitesinin primer yapışmayı değiştirmedeğini ve hidrofobik PP ile hidrofilik cam yüzeylerin, Robbins cihazında aynı mikrobiyal kompozisyon ve sayıya sahip olduklarını göstermişlerdir.

Çoğu bakterinin hücre yüzeyinin net yükü negatiftir; ancak bunun istisnaları da mevcut olup, *S. maltophilia*'nın fizyolojik pH'da pozitif yüzey yüküne sahip olduğu bilinmektedir (Dunne 2002). *Stenotrophomonas maltophilia*'ın negatif bir yüzey yüküne sahip cam ve teflona yüksek bir verimlilikle tutunduğu gösterilmiştir (Jucker vd. 1996). Flint vd. (1997) bütün termofilik *Streptococci* hücrelerinin pH 7.0'de negatif bir hücre yüzey yükü gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bu da muhtemelen paslanmaz çelik gibi negatif yük içeren yüzeylerden bakterilerin geri itilmesine neden olmuştur. Fukuzaki vd. (1995), pH 7.0'de paslanmaz çelik partikülerinin zeta potansiyelinin zayıf negatif ve çeliğin izoelektrik noktasının pH 4.0 ve 4.5 olduğunu rapor etmişlerdir.

Farklı yüzeyler ve farklı bakteri türleri kullanılarak bakteriyel tutunma çalışmaları mevcuttur. Örneğin, *Bacillus* spp.'nin adezyonu, süt endüstrisinde istenmeyen bir kontaminant olması sebebiyle geniş olarak çalışılmıştır. *Bacillus* sporlarının çok çeşitli yüzeyler üzerine tek tabaka halinde tutunduğu görülmüştür. *B. cereus*'un hidrofobik sporlarının ise, çok yapışkan olabildiği saptanmıştır (Husmark 1993). Dagang vd. (2016), paslanmaz çelik ve cam yüzeylere *P. fluorescens* biyofilmlerinin tutunmasını çalışmışlar ve biyofilmlerin 96 h sonra paslanmaz çelik yüzeyin çoğunu kapladığını bulmuşlardır. Biyofilm oluşumunun polipropilen yüzeylerde, paslanmaz çelik gibi hidrofilik yüzeylerden daha etkili olduğu belirtilmiştir (Kim vd. 2016).

Gündelik hayatta biyofilmin biriktiği yaygın kaynaklar, paslanmaz çelik yüzeyler, tahta, atık su boruları, boru kıvrımları, kauçuk contalar, taşıyıcı kayışlar, BunaN ve teflon kapaklardır (Fletcher 1985, Mafu vd. 1990, Blackman ve Frank 1996). Herald ve Zottola (1988) paslanmaz çeliğe *L. monocytogenes*'in tutunmasını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, bu patojenin cam, polipropilen ve kauçuk yüzeylere de tutunduğu belirtilmiştir (Mafu vd. 1990). Dahası, biyofilmlerin oluşturduğu abiyotik yüzeyler; medikal cihazları, endüstriyel veya içilebilir su sistemi borularını, gıda imalatında kullanılan paslanmaz çelik ekipmanları veya doğal sucul sistemleri de içerebilir (Donlan 2002).

Arnold ve Bailey (2000), electropolished (elektrokimyasal süreç yoluyla objenin yüzeyinden metallerin giderilmesi) paslanmaz çelikler kullanarak yaptıkları çalışma sonucunda, metal iyonların giderimiyle yüzeylerde kimyasal tepkiselliğin azaldığını ve böylece bakteriyel tutunmanın daha az miktarda olduğunu gözlemlemişlerdir. Metal iyonların giderimi, yüzeyin kimyasal tepkimesini azalttığından, mikroorganizma ve yüzey arasındaki elektrostatik etkileşimlerin değiştiği ve bu yüzden yüzeyin bakteriyel tutunmaya karşı az duyarlı hale geldiğini göstermişlerdir (Şekil 2.13). Parkar vd. (2003) ise, electropolished paslanmaz çeliklerin termofilik basillerin ilk tutunmasında düşük oranda bir azalma sağladığını, ancak normal 316 L paslanmaz çelikde oluşturulan biyofilmlere göre düzensiz ve daha az yoğun biyofilmlerin oluştuğunu belirtmişlerdir.



Şekil 2.13 Bakteriyel popülasyonların 304, 2B tipi paslanmaz çelik yüzeyler üzerindeki SEM mikrografları (x1000) (Arnold ve Bailey 2000)

a. Kontrol grubu, b. Kum püskürterek temizlenmiş yüzey, c. Zımpara ile düzeltilmiş yüzey, d. Electropolished yüzey

2.9 eDNA'nın Biyofilm Oluşumundaki Önemi

Ekstraselüler DNA, *Streptococcus* sp., *Enterococcus faecalis*, *L. monocytogenes*, *Neisseria meningitidis* ve *Helicobacter pylori* gibi birbirinden farklı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin biyofilmlerinde tespit edilmiş olup (Moscoso vd. 2006, Thomas vd. 2008, Grande vd. 2010, Harmsen vd. 2010, Lappann vd. 2010), bu çalışmaların her biri biyofilmlerdeki eDNA'nın farklı görevlere sahip olduklarını rapor etmiştir. eDNA'nın, ilk tutunmaya aracılık ettiği, stabil biyofilm matriksin yapısal parçası olarak rol oynadığı veya besin kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Aksine, *Caulobacter crescentus* eDNA'sı, kümeleşmiş hücrelerin polar desteğini kendine bağladığından, biyofilmlere polar bağların tutunmalarını inhibe eder (Berne vd. 2010). *Bordetella* eDNA'sı, *in vivo* ve *in vitro* biyofilm bütünlüğünün devamı için önemlidir (Conover vd. 2011). Biyofilmlerdeki eDNA'nın fizyolojik rolleri değişken olabilir. Hala biyofilmin bir parçası olarak nasıl rol aldığı net bir şekilde aydınlatılamamasına rağmen, biyofilmlerdeki eDNA'nın fizyolojik görevlerinin çok amaçlı olduğu görülmektedir

(Seper vd. 2011). Biyofilm oluşumunun ilk fazında, eDNA'nın hücre-yüzey adezyonunda ve/veya hücre-hücre adezyonunda işlev görebildiği belirtilmiştir (Whitchurch vd. 2002). Dahası, eDNA sucul ekosistemlerde verimli bir polimerdir (Paul vd. 1987, Trevors 1996, Dell'Anno ve Danovaro 2005). eDNA'ya, sadece toprakta değil, aynı zamanda deniz ve tatlı su habitatlarında da rastlanır. Buralarda eDNA'nın konsantrasyonu 88 µg/L'ye varabilmektedir (Vlassov vd. 2007). Ayrıca, memeli bağırsak mukuslarının önemli bir bileşeni olarak da bilinir (Ferencz vd. 1980). Bu yüzden, bu tür ortamlarda eDNA, *V. cholerae* için önemli bir besin kaynağı olabilir. *P. aeruginosa* için ekstraselüler nükleazlar, karbon, nitrojen ve fosfat yönünden temel kaynak olarak eDNA'yı parçalarlar (Mulcahy vd. 2010). eDNA'nın parçalanması, hem bir fosfat kaynağı olarak nükleotidleri hem de serbest nükleozitleri sağlayabilir. eDNA miktarı ve biyofilm oluşumu arasındaki korelasyon, bir plazmidin varlığında biyofilm üretiminde artış şeklinde gözlenebilir. Bunun sebebi, plazmid DNA'sının biyofilmdeki eDNA'ya katkı sağlayabilmesi olup, plazmid varlığında daha fazla eDNA ve daha fazla biyofilm oluşumu görülmektedir (Seper vd. 2011). eDNA, aynı zamanda dinamik bir gen havuzudur. Bakteriler bu yolla yatay gen transferi sonucu genetik bilgi alışverişi yapabilirler (Vlassov vd. 2007).

eDNA'nın salınma mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır, ancak otoliziz hipotezi en çok kabul gören hipotezlerdendir. *E. faecalis*'de iki ekstraselüler proteaz ve *S. aureus*'da *cid/Irg* operonları otolizize bağlı eDNA salınımında gerekmektedir (Thomas vd. 2008, Mann vd. 2009). *N. meningitidis*'de biyofilm oluşumunun başlaması için eDNA önemlidir ve otolizizin azaldığı *ampD* mutantlarında, biyofilm oluşumunun azalmasında önem arz etmektedir (Lappann vd. 2010). İkinci bir hipotez ise, *V. cholerae* gibi çeşitli Gram negatif bakteriler tarafından doğal olarak salgılanan dış membran vezikülleri (OMVs) aracılığıyla salındığıdır (Chatterjee ve Das 1967, Kondo vd. 1993, Whitchurch vd. 2002, Schild vd. 2008). eDNA'nın veziküller aracılığıyla salınması *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Neisseria gonorrhoeae*'de de gözlemlenmiştir (Dorward vd. 1989, Yaron vd. 2000, Renelli vd. 2004).

Streptococcus cinsinin biyofilm oluşumunda eDNA'nın önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. *Streptococcus gordonii* ile biyofilm oluşumu için *comD* gereklidir (Loo

vd. 2000) ve *Streptococcus mutans*'ın *comA*, *comB*, *comC*, *comD* ve *comE* genleri yönünden mutant olan suşlarında biyofilm oluşumunun azaldığı görülmüştür (Li vd. 2002, Yoshida ve Kuramitsu 2002). *S. epidermidis*'de *AtlE* genleri büyük bir otolizin kodlar ve mikrotitrasyon plakaların duvarlarında biyofilm gelişimi ve ilk tutunma için gereklidir (Heilmann vd. 1997). *AtlE* proteini, salınan eDNA ile *S. epidermidis* biyofilm oluşumunda indirekt rol oynamaktadır. Ayrıca, *S. aureus*'da *ArlS-ArlR*'nın, hem otoliziz oranını hem de biyofilm oluşumunu kontrol ettiği kanıtlanmıştır (Fournier ve Hooper 2000). *ArlS* mutantında otoliziz artışı görülmüş ve ekstraselüler proteolitik aktivitenin önemli derecede azaldığı saptanmıştır. Mutant *S. aureus* otolizin gen ifadesini arttırmamış, ancak *Atl* aktivitesi salgılanan serin proteazın varlığında artış sağlanmıştır. Sonuç olarak, otolitik aktivite eDNA oluşumuna katkı sağlayabilir ve hücrelerin bir yüzeye veya birbirlerine bağlanmasında aracılık edebilir (Molin ve Tolker-Nielsen 2003).

2.10 DNaz I Enzimi Çalışmaları ile eDNA'nın Varlığının Tespit Edilmesi

Biyofilmlerin EPS matriksinde mevcut nükleik asitler, eDNA olarak adlandırılmıştır (Whitchurch vd. 2002, Steinberger ve Holden 2005). Whitchurch vd. (2002), *P. aeruginosa*'da alginat sentezi çalışmaları esnasında, ekstraselüler materyallerin çoğunluğu karbazol kolorimetrik analizlere pozitif reaksiyon göstermiş ve böylece eDNA keşfedilmiştir. Dahası, eDNA'nın *P. aeruginosa* biyofilmlerinde fonksiyonel bir rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir. Birçok çalışma DNaz enzimlerinin biyofilm oluşumunu engelleyebildiğini göstermektedir (Whitchurch vd. 2002, Tetz vd. 2009, Harmsen vd. 2010, Martins vd. 2010, Nijland vd. 2010). Whitchurch vd. (2002), kültür ortamına DNaz I enziminin eklenmesi ile biyofilm oluşumunun güçlü bir şekilde önlendiğini rapor etmişlerdir. Molin ve Tolker-Nielsen (2003) da, mikrotitrasyon plakaları üzerinde *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunun DNaz I varlığında azaldığını belirtmişlerdir. Diğer taraftan, mezofilik bakterilerde, eDNA içeren, ancak DNaz enzimlerine dirençli birçok biyofilm örnekleri de tespit edilmiştir (Grande vd. 2010, Lappann vd. 2010, Shields vd. 2013).

Seper vd. (2011) yaptıkları çalışma sonuçlarına göre, eDNA ve ekstraselüler nükleazların, tipik bir biyofilm yapısının gelişimini içeren çeşitli süreçlerde, besin elde edilmesinde, biyofilmden ayrılmada ve uygun biyofilm kütlelerinin kolonizasyonunda gerektiğini belirtmişlerdir.

2.11 Biyofilmin Giderimi

Biyofilm yaşam biçimi, dış kaynaklı strese yüksek bir tolerans gösterdiğinden, antibiyotik veya diğer biyositler ile biyofilmlerin muamele edilmesi, onların yok edilmesi neredeyse imkansızdır (Hall-Stoodley ve Stoodley 2009). Biyofilm oluşumu endüstriyel korozyon ve biofouling gelişimine sebep olduğundan, bu süreçlerde büyük problemlere yol açar (Lopez vd. 2010).

Biyofilm kontrolü, istenmeyen kontaminantların ortamdan uzaklaştırılması adına önemli bir iştir ve bu işi başaracak sınırlı düzeyde strateji mevcuttur. Boruları ve diğer yüzeyleri biyofilmlerden arındırmak için birçok endüstri kuruluşu her yıl milyarlarca dolar harcamaktadırlar (Madigan ve Martinko 2010). Biyofilmlerin giderimi çok zordur ve emek, zaman ve maliyet gerektiren bir süreç olduğundan doğru ve düşük maliyetli temizleme prosedürleri geliştirilmelidir (Pontefract 1991, Wirtanen ve Mattila-Sandholm 1992, Zottola ve Sasahara 1994). Genellikle etkili bir temizleme ve sanitasyon programı, sürecin çok başındayken ekipman yüzeylerinde bakteriyel hücrelerin ve partiküllerin birikimini ve bunu takip eden biyofilm oluşumunu engelleyebilmektedir (Dunsmore vd. 1981, De Goederen vd. 1989, Czechowski ve Banner 1992). Ancak, uygun olmayan temizleme stratejilerinin biyofilm oluşumuna ve biyotransfer potansiyeli artışına sebep olduğu da bilinmektedir (Dunsmore vd. 1981, De Goederen vd. 1989, Czechowski ve Banner 1992, Hood ve Zottola 1995).

İstenmeyen biyofilmlerin giderilmesinde biyofilmin karakteristiğine bağlı olarak, farklı stratejiler kapsayan belirli sistemler uygulanabilir. Bunlar (i) mekanik temizlik, (ii) antimikrobiyal ajanların kullanımı, (iii) gerekli besinlerin sağlanmaması ile biyofilm gelişiminin durdurulması, (iv) bir yüzeye mikrobiyal tutunmanın inhibe edilmesi ve (v) biyokütlelerin ayrılmaya teşvik edilmesidir. Mekanik temizleme ve antimikrobiyal

ajanların kullanımı en çok kullanılan metodlardır (Stewart vd. 2000). Biyofilm matriksinin fiziksel bütünlüğünün tahrip edilmesi veya direk olarak biyofilm gideriminde teşvik edici maddelerin kullanımı ise medikal ve endüstri uygulamalarında ilgi çekici alternatifler yaratmaktadır (Chen ve Stewart 2000).

Biyofilmler, gıda hijyeni açısından önemlidir. Uygun şartlar altında gıda ve gıda ile temas eden yüzeylerde mikroorganizmalar, gelişme ve tutunma yeteneğindedir. Biyofilm oluşumu dinamik bir süreçtir ve bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ve gelişmeleri için farklı mekanizmalar gerekmektedir. Eğer mikroorganizmalar gıda temaslı yüzeylerden tamamen giderilemez ise zamanla biyofilm oluşur ve bu da biyotransfer potansiyelini artırır. Bu nedenle, fabrika planı ve cihazlarının hijyenik amaçlara uygun dizaynı, materyallerin seçimleri, doğru kullanılması, fiziksel metodların yanı sıra kimyasal giderimde doğru deterjanların ve dezenfektanların seçimi gibi çeşitli önlemler ve kontrol stratejileri ile gıda temaslı yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumunun kontrolü uygun bir şekilde yapılabilmektedir. Ayrıca, bakteriyosinler ve enzimler de biyofilmlerin giderimi ve etkin şekilde biyokontrolü için gıda endüstrisinde giderek önem kazanmaktadır. Bu biyokontrol stratejileri, gıdanın güvenliği ile kalitesi için ve ayrıca sistemlerin devamlılığı için önemlidir. Gıda endüstrisinde biyofilmler fiziksel ve kimyasal metodlar gibi farklı stratejiler ile elimine edilebilmektedir. Bunlardan farklı olarak, bakteriyel biyofilmlerin biyokontrolü için son yıllarda gündeme gelen biyolojik metodlar yeni yaklaşımlardır (Kumar ve Anand 1998), (Çizelge 2.4). Buna ilaveten, gıda paketlenme materyallerine eklenmiş antimikrobiyal bileşikler de mikrobiyal kontaminasyonu elimine etmektedir (Halek ve Garg 1988). Biyofilm kontrolleri artık yüzey modifikasyonu, biyolojik kontrol veya spesifik formüle edilen temizleyiciler gibi yeni yaklaşımlar içermektedir (Boulangue-Petermann 1996). Bu amaçla, son zamanlarda proteaz ve karbohidrazların biyolojik olarak aktif enzimatik karışımlarını içeren özel temizleyiciler kullanılmıştır (Johansen vd. 1997). Hidrofobisite veya yüzey pürüzlülüğü gibi yüzey ile ilgili değiştirilen özellikler bakteriyel tutunmayı minimuma indirir (Boulangue-Petermann 1996).

Çizelge 2.4 Süt endüstrisinde biyofilmlerin giderimi ve kontrolü için en çok kullanılan yaklaşımlar (CIP = yerinde temizlik), (Gopal vd. 2015)

Kontrol stratejileri	Örnekler
Fiziksel yaklaşım	
CIP	Asidik (nitrik asit vb.) ve alkalen (sodyum hidroksit vb.) deterjanların kombinasyonları
(a) Kimyasal CIP	Süfaktanlar, organik madde bileşikleri, emülsiyon yapan ajanlar veya kompleks ajanların eklenmesi ile spesifik CIP
(b) Biyolojik CIP	Enzim ilavesiyle spesifik CIP
Ultrasonikasyon	Düşük frekans/yüksek yoğunlukta ultra ses (≥ 20 kHz)
Biyolojik yaklaşım	
Biyolojik biyositler	Enzimler (proteaz ve polisakkariti parçalayan enzimler vb.) ve bakteriyosinler (nisin, laktisin 3147 veya pediosin PA1 vb.)
Bakteriyofajlar	Enfekte bakterilere litik veya lizogenik yol aracılığı ile
Kimyasal yaklaşım	
Kimyasal biyositler	Oksitleyici ajanlar (hidrojen peroksit), klora dayalı ajanlar (sodyum hipoklorit), yüzey aktif bileşikler (kuaterner amonyum bileşikler vb.), iyodoforlar
Ozon	Moleküler ozon veya onun ayrılmış türevleri (hidroksil radikaller vb.)

Süt endüstrisinde biyofilmlerin kontrollerinde birçok yaklaşım kullanılabilir, fakat çok yaygın olarak kullanılanlar; hücre tutunmasını önlemek için yüzey kimyasını değiştirmek, antimikrobiyal ajanlarla yüzeylerin muamelesi, işlemin optimizasyonu ve ekipman dizaynı veya yoğun temizleme rejimlerinin kullanımınıdır (Bower vd. 1996). Ayrıca, yerinde temizlik (CIP) süreçleri özellikle önemlidir. Bu süreç, temizlik ve sterilizasyonda kullanılan kimyasalların performansını arttırmak için antimikrobiyal maddeler ile sütün işlendiği yüzey ve boruların temizlenmesini gerektirir. CIP'in 1950'lerden beri faydalı bir strateji olduğu ispatlanmasına rağmen (Bremer vd. 2009), bakteriyel genetik, biyolojik sistemler, materyal ve mekanik mühendisliği ile biyokimyanın daha iyi anlaşılmasıyla yeni stratejiler geliştirilmesinin önü açılmıştır (Tan vd. 2014). CIP prosedürleri genellikle süt işleme sürecinde kullanılmaktadır (Dunsmore vd. 1981). Ancak, CIP prosedürlerinin sınırlı olması ve ekipman yüzeyleri üzerinde mikroorganizmaların birikmesi sonucu biyofilm oluşumu kaçınılmaz olmaktadır (Maxcy 1964, Mattila vd. 1990). Biyofilmin oluşumu esnasında biriken

mikroorganizmaların devamlılığı süreç sonrası kontaminasyona neden olabildiğinden, ürünün raf ömrü düşmektedir (Zottola 1994).

Biyofilm oluşumunun biyokontrolü için tasarlanan yeni stratejiler, bakteriyel tutunmanın inhibisyonu amacıyla, gıda ile temas eden yüzeylerin bakteriyosinler gibi biyoaktif bileşiklerle muamele edilmesidir. Bakteriyosinler, bakterisidal özellikler sergileyen protein tabiatlı antimikrobiyal bileşiklerdir (Tagg vd. 1976). İyi bilinen ve en çok uygulanan antimikrobiyal peptit olan nisin, özellikle çoğu sporlu bakteriler ve gıda patojenleri üzerinde inhibitör etkisi yaratmaktadır (Hurst 1981, Ray 1992). Nisin, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından üretilen bir bakteriyosindir ve sporlu Gram pozitif mikroorganizmalara karşı etkilidir (Vaara 1992). 1998'de nisin, peynir yapımında kullanılan *Clostridium botulinum* sporlarının kontrolü için gıdaya eklenmesi, GRAS (Generally Recognized As Safe) seviyesinde FDA tarafından da uygun bulunmuştur (Food ve Drug Administration 1988). Nisin absorbe edilmiş gıda temaslı yüzeylerde *L. monocytogenes* bakterisinin neden olduğu yüzey kontaminasyonunun oluş sıklığının azaldığı rapor edilmiştir (Daeschel vd. 1992, Bower vd. 1995). Bakteriyosinlerin uygulanması, etler üzerinde *L. monocytogenes*'in biyokontrolü için gıda paketlenme materyalleri üzerinde de denemiştir (Ming vd. 1997). Dahası, nisin konserve ürünlerin ve süt ve süt ürünlerinin raf ömrünün uzatılmasında endospor oluşturan termofilik bakterilerin inaktivasyonunda kullanılmaktadır. Nisinin bakterisidal aktivitesi, vejetatif hücrelerin sitoplazmik membranında meydana gelmektedir. Gram negatif bakteriler ise, dış membranlarının bariyer oluşturması nedeniyle, genellikle nisine duyarlı değildir (Stevens vd. 1991). Ancak, Kordel ve Sahl (1986), ozmotik şok gibi muameleler sonucu dış membranı geçirgenliği değiştiğinde, *E. coli*'nin nisine duyarlılık gösterdiğini belirtmiştir. Dahası, Boziaris ve Adams'ın (1999) çalışmalarına göre, düşük nisin konsantrasyonunda bile (100 IU/ml) membran geçirgenliği değişmiş *E. coli*'nin gelişimi tamamen inhibe edilmiştir.

Bilindiği üzere bakteriyel biyofilmlerin oluşum, tutunma ve stabilizasyonu için gerekli olan bakteriyel ekstraselüler polisakkaritlerin, hücre-hücre ve hücre-yüzey etkileşimlerinin çoğuna aracılık ettiği gösterilmiştir. Ancak, son çalışmalar birçok bakteriyel polisakkaritin biyofilm oluşumunu engellediğini göstermiştir (Rendueles vd.

2012). Şimdiye kadar otuzdan fazla farklı biyofilm matriks polisakkariti karakterize edilmiştir (Flemming ve Wingender 2010). İlk antibiyofilm polisakkaritler, karışık *in vitro* biyofilmlerdeki *E. coli*'nin ticari suşları ve enteropatojenik suşları arasındaki etkileşimler çalışılırken keşfedilmiştir. Valle vd. (2006), ticari MG1655 suşunun ürettiği biyofilmlerin biyokütlesinin, enteropatojenik CFT073 suşu varlığında azaldığını bulmuşlardır. Tanımlanan antibiyofilm polisakkaritlerin hiçbiri bakteriyostatik veya bakteriyosidal aktivite sergilememiştir. Bu yüzden onların antibiyofilm aktivitesine muhtemelen büyüme inhibisyonundan başka mekanizmaların aracılık etmiş olabileceği düşünülmektedir. Biyosidal olmayan hareket biçimini açıklayan üç hipotezi vardır. (i) En iyi antibiyofilm polisakkaritler sürfaktan moleküllerdir ve cansız yüzeylerdeki bakteriyel hücrelerin fiziksel karakterizasyonlarını değiştirmektedir. Bazı çalışmalar aynı zamanda polisakkaritlerin sinyal molekülleri olarak rol oynayabildiğini göstermiştir, bu da duyarlı olan bakterinin gen ifadesini regüle etmektedir (Kim vd. 2009). (ii) Diğer bir olasılık, biyofilm hareketinin biçimi olup, bu aşamada önemli olan karbonhidrat-protein etkileşiminin inhibisyon yarışıdır (Wittschier vd. 2007). (iii) Son hipotez de, antibiyofilm polisakkaritlerin, bakterilerin yüzeyindeki lektinleri ve şeker bağlayan proteinleri veya adhezyondan sorumlu fimbria ve piliyi bloke etmesidir (Zinger-Yosovich ve Gilboa-Garber 2009). Biyofilmin polisakkarit matriksini etkileyen kimyasallar, biyofilm hücrelerinin giderimi ve öldürülmesinde özellikle etkilidir.

Enzimler, biyofilm matriksinde oluşan ekstraselüler polimerleri temizlemede etki sağlamaktadır ve bu yüzden biyofilmlerin giderimine yardım ederler (Kumar 1997). Spesifik enzimleri çoğunlukla biyofilmi oluşturan mikrofloranın tipine göre çeşitlendirmek gerekir (Wiatr 1991). Parkar vd. (2003), lizozimin biyofilm hücrelerini öldürdüğünü, böylece lizozimin termofilik basillerde biyofilm için alternatif bir kontrol potansiyeli olduğunu önermişlerdir. Proteaz, α -amilaz ve β -glukanaz içeren karışık enzimlerin kağıt hamuru ile muamelesi sonrasında, endüstriyel imalathanelerde biyofilm oluşumunun giderimi için önemli bir başarı sağlamaktadır (Wiatr 1991). Amerika'da Genencor Uluslararası şirket çalışanları, canlı organizmaları büyük ölçüde dağıtan glikoproteinler gibi deglikosilat biyopolimerleri olan endoglikozidaz enzimleri geliştirmişlerdir. Bu şirket, temizleme ajanı olarak Endo- β -N-asetil-glukozaminidaz H (Endo H) oluşumu için rekombinant DNA teknolojisini kullanmışlardır. Endo H,

tampon ve deterjan solüsyonları ile beraber kullanıldığında cam yüzeylerden, *Staphylococcus* ve *E. coli* bakterilerinin giderimi için özgün bir niteliğe sahiptir (Lad 1992). Ekzopolisakkarit parçalayan enzimleri kapsayan enzimatik preparasyonlar, özellikle kolonik asit parçalayan enzimler, *Streptomyces* izolatlarından kaynaklanan biyofilm oluşumunun önlenmesi ve giderilmesi için kullanılmıştır (Van Speybroeck vd. 1996). Proteolitik enzimler ile hücrelerin muamelesinin, *Vibrio proteolytica*'nın hidrofobitesini azalttığı ve polistiren gibi hidrofobik yüzeylere tutunmasını azalttığı belirlenmiştir (Paul ve Jeffrey 1985). Oakley vd. (1985), *Streptococcus sanguis* hücrelerinin tripsin ile muamele edildiğinde ise, yüksek hidrofobik bir sıvı olan hekzadekanca tutunmasının azaldığını ve bunun büyük ihtimalle hidrofobik proteinlerin hücre yüzeyinden uzaklaşmasından dolayı olduğunu rapor etmişlerdir.

Paslanmaz çelik kuponların yüzeyleri üzerinde termofilik bakterilerin kontrolü ve *A. flavithermus* B12-C^m izolatının biyofilmlerinin giderimi ile ilgili çalışmalardan birinde, Paradigm olarak adlandırılan proteolitik bir enzim temizleyici preparatı kullanarak canlı biyofilm hücrelerinin sayısının azalması sağlamıştır; ancak mikroskop altında hala hücre materyal kalıntısı (%11) görülmüştür. Ayrıca, Purafect olarak adlandırılan bir subtilizin türevi ile biyofilmlerin %100 öldürülmesinde başarı sağlanamamış; ancak canlılığın azaldığı saptanmıştır (Parkar 2004).

Hücre yüzey proteinleri, paslanmaz çeliğe termofilik basillerin vejetatif hücrelerin tutunmasında anahtar bir rol oynamaktadır. Proteinlerin giderimi, yapılarındaki değişiklikler veya ekstraselüler proteinlerde çentiklerin oluşumu amacıyla, paslanmaz çelik yüzeyindeki hücrelerin sodyum dodesil sülfat (SDS) ve tripsin ile muameleleri sonrası biyofilmdeki canlı vejetatif hücrelerin sayısında azalma sağlanmıştır (Flint vd. 1997). SDS, anyonik bir deterjan ve nemlendirme ajanı olup hem asidik hem de alkalin solüsyonlarda etkilidir. Çoğunlukla proteinlerin çözülmesinde ve denatürasyonunda kullanılır. Proteinlerin çoğu SDS'e bağlandığı zaman yüzeylerinde belirgin bir negatif yük artışı görülmektedir. Protein konformasyonu ve aktivitesindeki değişiklikler, proteinin SDS ile denatüre olup üç boyutlu yapısını kaybettiğini göstermektedir (Zubay 1988). Parkar vd. (2003) yaptıkları çalışmaya göre, *A. flavithermus* B12-C^m suşu için en az iki farklı paslanmaz çelik kupon yüzeyi üzerindeki 18 saatlik biyofilmleri, %2'lik

SDS ile 10 dk kaynatmışlar ve hücre canlılığının %80 azaldığını ve sadece sporların hayatta kaldığını bulmuşlardır. Tripsin ise, biyofilm hücrelerinin ölmesinde sadece %50 etki sağlamıştır ve paslanmaz çelik kupon yüzeyinde toplam hücre sayısının %2'si kalmıştır. Ayrıca, Chen ve Stewart (2000), *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* bakterilerine uygulanan 500 mg/L lizozim ile canlı hücre sayısında %87, biyofilm proteini gideriminde ise %40 başarı elde etmişlerdir. Yine SDS (1000 mg/L) ile muamele sonucunda da önemli bir giderim sağlanmış; ancak tüm canlı hücreleri öldürememiştir.

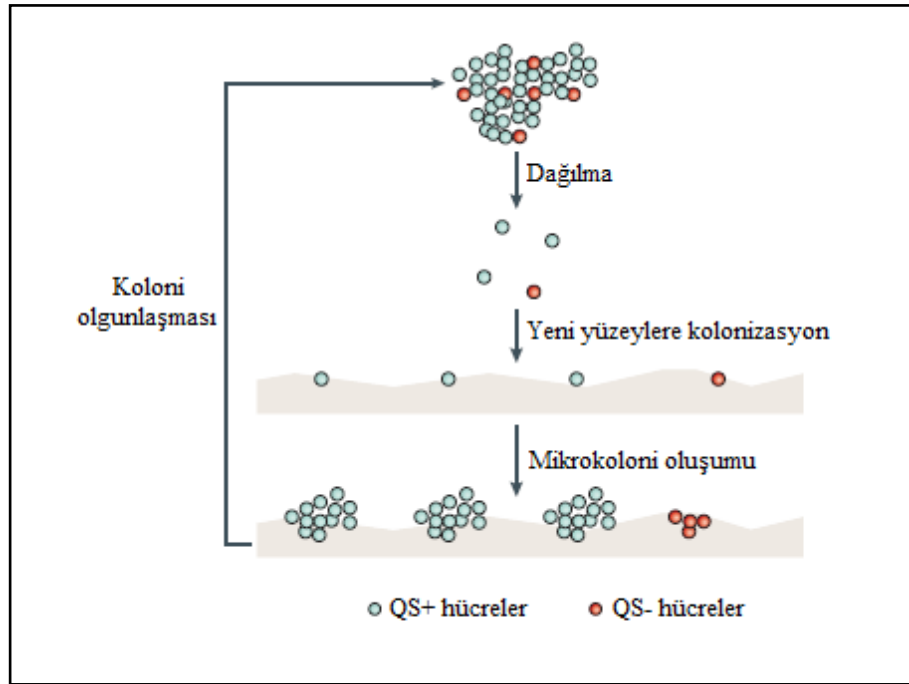
Biyosümfaktanlar, antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahiptirler ve bakteriyel tutunma ve ayrılma için önemlidir (Ron ve Rosenberg 2001). Biyosümfaktanlar, havasız ara yüzde mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir (Leck ve Bigg 2005). *P. aeruginosa*'nın EPS matriksinde bulunan ramnolipitler sümfaktan olarak rol oynayabilmektedir (Davey vd. 2003). Bu türdeki biyosümfaktanlar, yüzey aktivitesiyle ilişkili ilk mikrokoloni oluşumunda, yüzeyle ilgili bakteriyel göçü kolaylaştırmada, mantar şekilli yapıların oluşumunda, kanallardaki kolonizasyonun önlenmesinde ve biyofilmin dağılmasında etkilidir (Boles vd. 2004, Pamp vd. 2007). Yüksek biyofouling potansiyeline sahip endüstriyel sistemlerde, ilave sümfaktan madde kullanımı ile yüzeye tutunmuş bakterilerin ayrılması kolaylaşmaktadır. Özellikle iyonik olmayan yapıdaki sümfaktanların, biyofilm tabakasını anlamlı seviyede depolimerize ettiği bildirilmiştir (Cloete ve Jacobs 2001).

Su sistemlerine uygulanan dezenfeksiyonun etkinliği biyofilmin derinlerine gittikçe azalmaktadır (Lu vd. 1999) ve biyofilmin içinde veya su fazında bulunan organik moleküllerin dezenfektanlara bağlanmasıyla sudaki etkin konsantrasyonları düşmektedir. Özellikle serbest klorun çok hızlı bir şekilde EPS ile reaksiyona girerek sudaki etkinliğinin azaldığı belirtilmektedir (Momba vd. 1999).

Takehara ve Fukuzaki (2002), paslanmaz çeliği nitrik asit, ozon, krom ve demir oksitlerin farklı oranlarıyla muamele edilerek 300°C sıcaklığa tabi tutuktan sonra inceleme yapmışlardır. Paslanmaz çelik yüzeylere uygulanan farklı muameleler, H⁺ ve OH⁻ titrasyonları için farklı oransal emilim eğrileri göstermiştir. Bu da yüzey

muamelesinin, paslanmaz çeliğin yüzey yükünde ve bakterilerin tutunmasında önemli bir rol oynayabildiğini göstermiştir.

Quorum sensing (QS) terimi, mikrobiyal sinyalizasyon aracılığıyla kendinden olanı tanıyarak, otoindükleyici olarak bilinen moleküller salgılayarak iletişim kurmak olarak ifade edilmiştir (Fuqua vd. 1994), (Şekil 2.14). QS, biyofilm oluşumunun beş aşamalı olan tüm fazlarında gerekli olabilir. Besin ihtiyaçları ve mevcut kaynakları uygun olgun biyofilmler içinde popülasyon yoğunluğu ve metabolik aktivite QS tarafından düzenlenir. Biyofilm içindeki bakteriler, aynı türlerin serbest yaşayan planktonik bakterilerinden önemli oranda farklı transkripsiyonel programlara sahiptir. QS inhibisyonu biyofilm oluşumunu engelleyebilir (Bai ve Rai 2011). Böylece, QS biyofilm yapısının kontrolünde önemli bir rol oynar. *P. aeruginosa* QS mutantları, yaban tipi biyofilmlerle karşılaştırıldıklarında, substrata daha gevşek bağlanan basık ve farklılaşmamış biyofilmler oluşturmuşlardır (Rice vd. 2005).



Şekil 2.14 Türler arası sinyalizasyon ve klonal ilişkiler (Keller ve Surette 2006).

Gıda endüstrisinde biyofilm kontrolü için diğer bir yol, bakterilerin QS aracılı iletişimini engelleyen enzimlerin kullanımınıdır. Deterjan amaçlı belirli enzimler anti-QS

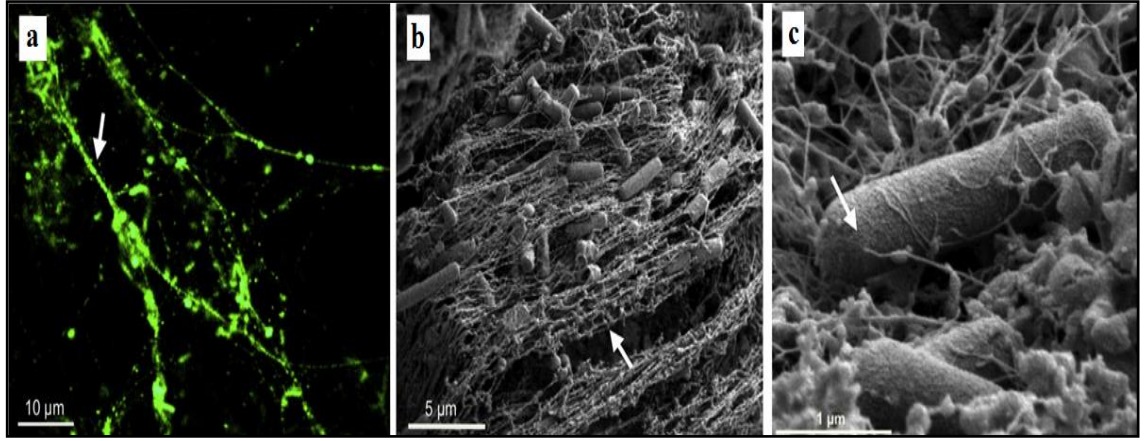
ajanlar olarak kullanılabilir. Ayrıca, anti-QS deterjan ile enzimlerin, antimikrobiyal ilaçların ve beraberinde sürfaktanların kullanımı sonucu sinerjistik bir etki sağlanabilmiştir (Malhotra vd. 2015). Gıda kaynaklı bakterilerle ilgili bazı çalışmalar, çeşitli dezenfektanlara karşı olgun biyofilmlerin (24 saat'den daha fazla) yeni gelişmekte olanlardan daha fazla dirençli olduklarını göstermiştir (Anwar vd. 1990, Lee ve Frank 1991, Wirtanen ve Mattila-Sandholm 1992). QS mekanizmasını inhibe eden ajanlardan biri olan furanonlar, abiyotik yüzeylerde kimyasal olarak gerçekleştirilen giderim testlerinde biyofilm önleyicisi olarak umut vermiştir. Furanonlar kararlı oldukları ve insanlar üzerinde toksik olmadıkları için, onların ayrıca tıpta antibiyofilm ajanlar olarak da uygulamaları mümkün olabilmektedir (Madigan ve Martinko 2010). Wu vd. (2004), sentetik furanonların birçok bakteriyel QS mekanizmasını engellediğini rapor etmişlerdir. Ponnusamy vd. (2010), quorum inhibisyon aktivitesi için gerekli 2(5H)-furanonun minimum konsantrasyonunun 0.4 mg/mL olabileceğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca, C12-HSL ve C14-HSL sinyal moleküllerinin, 2(5H)-furanon (1 mg/mL) ile ardışık muamele edilmeleri sonrasında, QS inhibisyonunun sırasıyla %52 ve %46 olduğunu göstermişlerdir. Lynch vd. (2002), 1 mg/mL furanon konsantrasyonu kullanıldığında QS aracılı biyofilm oluşumunda önemli oranda azalma (%32) olduğunu rapor etmişlerdir. Triklosan ise, bisfenol bir antimikrobiyal ajandır ve geniş bir aktivite çeşitliliğine sahiptir (Russell 2004). Triklosan, 0.025 ile 100 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarda bakteriyostatik ve daha yüksek oranlarda ise bakterisidal özellik gösterir (Suller ve Russell 1999, Escalada vd. 2005). Triklosan türevlerinin farklı çeşitleri, koruyucu, antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılmıştır. Yaygın kullanımı ve stabilitesi yüzünden triklosan ve türevleri atık su, çevre sedimentlerindeki birikintiler ve konsantre sucul biyotalarda bulunabilmektedir (Adolfsson- Erici vd. 2002). Triklosan katılmış plastikler gıda endüstrisinde kullanılmak üzere yoğun olarak pazarlanmaktadır, ancak gıdaların ambalajlandığı triklosan içeren plastiklerin etkileri hakkında çok az bilgi mevcuttur (Yazdankhah vd. 2006).

Son zamanlarda ise, paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde oluşan biyofilmlerin önlenmesi için elektrokimyasal metodlar geliştirilmiştir (www.savcor.com 2003b). Ayrıca, son yıllarda, termosonikasyon veya yüksek şiddetli ultra ses (high intensity ultrasound = HIU) uygulamaları, vejetatif ve spor oluşturan bakteriyel popülasyonların inaktivasyonu

için incelenmektedir. Beatty ve Walsh (2016), süt tozu yapımı boyunca buharlaştırıcı aygıt olarak da bilinen evaporatörlerdeki *Geobacillus stearothermophilus* vejetatif hücrelerinin ve sporların inaktivasyonu için HIU uygulamasının etkisini incelemişler ve hücre ve sporların inaktivasyonunda etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

2.12 Biyofilm Çalışmalarında Uygulanan Mikroskopik Temelli Metodlar

Biyofilm çalışmalarında kullanılan mikroskopik teknikler arasında, özellikle yüzeylerin taranmasında taramalı elektron mikroskobu (SEM) önemli bilgiler elde edilmesine katkı sağlamaktadır (Notermans vd. 1991, Zottola 1991), (Şekil 2.15). Çalışmaların bazılarında ayrıca Acridine orange ile boyanmış preparatlar epifloresan mikroskobu ile de incelenmektedir (Holah vd. 1989). Interferens kontrast mikroskobu, atomik güç mikroskobu (AFM) ve konfokal lazer taramalı mikroskobu (CLSM) çalışmaları da biyofilm araştırmalarında kullanılan önemli mikroskopik tekniklerdir (Ladd ve Costerton 1990, Caldwell vd. 1992, Beech 1996, De beer vd. 1997, Wang vd. 2016). AFM'da ince bir uzantı örneğe çok yaklaştırılır. Böylece prob ile örnek arasında zayıf atomik güçler oluşturulur. Bu mikroskobun SEM mikroskobuna göre avantajı fiksatif ya da kaplama maddesi gerektirmemesidir. FISH (floresan *in situ* hibridizasyon) zenginleştirilmiş organizmaları izlemek veya tanımlamak için kovalent olarak floresans boya bağlı özgül bir nükleik asit probu kullanılarak yapılan bir yöntemdir. FISH teknolojisi mikrobiyal ekolojide, gıda endüstrisinde ve klinik tanıda spesifik patojenlerin tanımlanmasında çok kullanılmaktadır. FISH, ekolojide mikroskopik teşhiste ve organizmaları yaşam ortamlarında direk olarak izlemek amacıyla kullanılabilir. FISH aynı zamanda mikrobiyal toplulukların kompozisyonunu direk olarak mikroskopta belirlemede kullanılan bir yöntemdir (Madigan ve Martinko 2010). Ayrıca biyofilm sayımı için yaygın olarak çevresel taramalı elektron mikroskobu (ESEM) kullanılmaktadır (Little vd. 1991, Hodgson vd. 1995). Ancak, biyofilm örneklerinde oluşan çizikler, çatlaklar, ölü hücre kalıntıları ve korozyon parçaları gibi bazı istenmeyen sınırlandırmaları vardır. Bu yüzden bu gibi alanların örnekleri çok zor görüntülenmektedir (Wong ve Cerf 1995).



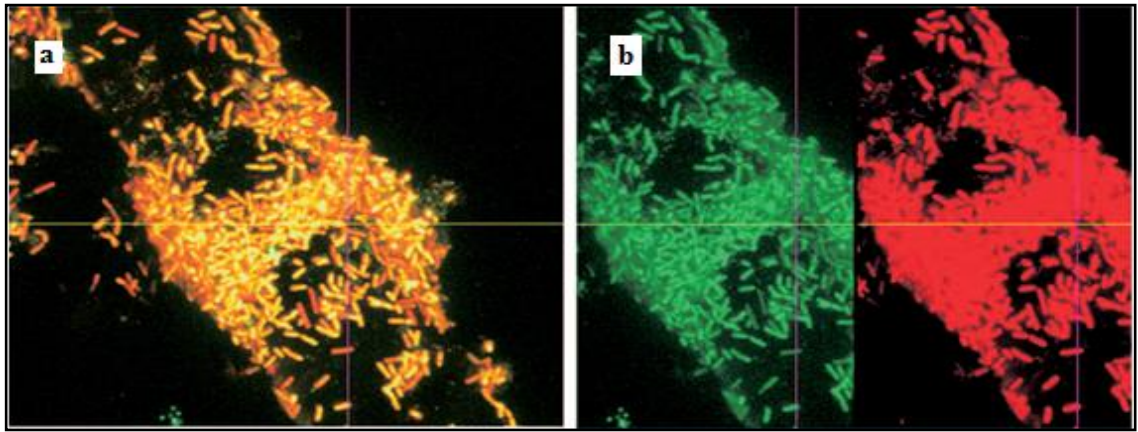
Şekil 2.15 *B. subtilis* biyofilmlerinin CLSM ve SEM görüntüsü (Bridier vd. 2013)

a. Tiyoflavin T ile etiklendikten sonra elde edilen fibrilli CLSM görüntüsü, b ve c. Farklı büyütmelerde biyofilm ve hücre morfolojisinin SEM görüntüsü

Konfokal mikroskopisi öncülüğü 1955’de Marvin Minsky tarafından yapılmış olup, biyofilmdeki EPS bileşenlerine zarar vermeden onların *in situ* olarak incelenmesinde floresens boyalar kullanılan en önemli mikroskopik yöntem CLSM’dir (Semwogerere ve Weeks 2005, Lawrence vd. 2007). Diğer ışık mikroskopu metodları ile CLSM karşılaştırıldığında, biyofilm çalışmaları için CLSM çok uygun bir tekniktir (Donlan ve Costerton 2002, Dunne 2002, Mattila 2002, Neu vd. 2001, Tolker-Nielsen vd. 2000). Canlı biyofilmlerin ilk CLSM görüntüleri, mikrokoloniler arasında açık su kanallarının varlığını göstermiştir (Lawrence vd. 1991). CLSM biyofilm çalışmalarında birçok önemli avantajlar sağlar. Bunlar; örneklerin dehidrasyon ve fiksasyon işlemlere gerek duyulmadan, onları doğal sulu durumunda inceleyebilir, odaklanma biyofilmlerin derinliklerine doğru ince optik kesitler halinde kaydedilebilir (Wimpenny ve Colasanti 1997). Biyofilm çalışmalarında CLSM ile FISH birleştirilirse, bir biyofilmde olduğu gibi derinliği olan bir örnekteki mikrobiyal popülasyonu araştırmak mümkün olabilecektir (Madigan ve Martinko 2010).

CSLM mikrobiyal ekolojide geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bu teknikle mikrobiyal habitatta bulunan filogenetik olarak farklı hücre popülasyonlarını tanımlamak ya da bir biyofilmdeki farklı tabakaların bileşenlerini ayırt etmek mümkündür. CLSM’de mikrobiyal film gibi nispeten kalın bir örnekte, sadece biyofilmin yüzeyindeki hücreler değil, farklı tabakalardaki hücreler de lazer ışınının odak düzlemi ayarlanarak,

gözlenebilmektedir. CLSM için hazırlanan preparatlar genellikle floresan boyalarla boyanır ve belirgin hale getirilir. CLSM, bilgisayar yazılımları ile donatılarak, daha sonra dijital görüntülerin işlenmesi sağlamaktadır. Böylece, farklı biyofilm tabakalarını oluşturan düzlemlere ait görüntüler dijital olarak üst üste getirilir ve tüm örneğin 3D görüntüsü elde edilir. Dahası, CLSM tekniği mikrobiyal bileşimin derinliğine bağlı olarak nasıl değiştiğini gözlemlemek istediğimiz kalın örnekler için kullanılabilir (Madigan ve Martinko 2010), (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 Cam yünü iplikleri üzerinde 28°C’de, 24 saatlik *B. cereus* biyofilmlerinin BacLight boya ile boyanarak elde edilen CLSM görüntüsü (Vilain vd. 2009)

a Kırmızı görünen hücreler (Propidyum iyodür), b. Farklı kanallarda görüntülendiklerinde yeşil floresanslı merkezlere (Syto 9) sahiptirler. Tek kanallı moda incelendiklerinde kırmızı renkte görüntülenen aynı hücreler, aynı zamanda yeşil kanalda yeşil renkte gözlenmektedir. Bu da (a ve b) onların yoğun kırmızı floresanla çevrili yeşil merkezlere sahip olduklarını gösterir

CLSM ile görüntüleme, tutunan bakterilerin direk boyanması ile canlı/ölü hücre DNA’sının Adenin ve Timince zengin bölgelerine bağlanan, DAPI (4’ 6-diamidino-2-phenylindole) kullanılabilir. Bu teknik, biyomateryale tutunan bakteriler için CFU sayılarını karşılaştırmada toplam bakteriyel miktarın hesaplanması ve görüntülenmesi için uygundur. Ayrıca, proteinler ve moleküller için floresan boyalar mevcuttur. Örneğin, EPS matriksi konkanavalin A gibi özel glukan boyalar kullanılarak görüntülenebilir (Hannig vd. 2010). Dahası, polisakaritlerin boyanması için, sadece β -1,3 ve β -1,4 glukanlara bağlanan, kalkoflor beyaz da kullanılır. Biyofilm matriksinde bulunan eDNA, Propidyum iyodür (PI), 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)-acridinone (DDAO), TOTO-1, TO-PRO 3, PicoGreen ve SytoX gibi hücre içine

giremeyen DNA bağlayıcı floresan boyalar kullanılarak analiz edilebilir. Ayrıca eDNA, LIVE/DEAD BacLight™ kitinde bulunan Syto ile PI'un karışımı gibi hücre içine girebilen DNA bağlayıcı boylar ile boyanmaktadır. Bu iki boyanın eşzamanlı ilave edilmesi ile bir boyanın emisyon spektrumu diğer boyanın uyarım spektrumu ile kesişirse Förster rezonans enerji transferi (FRET) oluşabilir ve bu etki Syto 9/PI boyları ile çalışmak için bir avantajdır (Schlafer ve Meyer 2016). PI düşük bir iyonik yüke sahip olduğundan, DNA için yüksek bir afiniteye sahiptir. Canlı hücreler için, küçük moleküllü Syto 9, canlı ve cansız hücreler için kullanılabilirken, buna karşın PI boyası sadece ölü hücrelerin boyanmasında kullanılır. SytoX'in, yeşil, portakal veya mavi renkleri mevcut olup, nükleik asitleri boyar ve Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere kolaylıkla nüfuz eder (Hannig vd. 2010). Biyofilm matriksinin bileşeni olan proteinler ise, FilmTracer™SyPro gibi spesifik olmayan boylar ile görüntülenebilir. Ayrıca, titoflavin (ThT), CDy11 floresan boyları gibi amiloid-spesifik boylar kullanılabilir. Diğer bir matriks bileşeni olan lipitler, genellikle Nile kırmızısı ile boyanır. Ayrıca, BODIPY, FM boyları ile de boyanabilmektedirler (Schlafer ve Meyer 2016). CLSM'de kullanılan bazı floresan boylar çizelge 2.5'de verilmiştir (Lawrence vd. 1998).

Çizelge 2.5 CLSM'de kullanılan floresan boylar ve lazer kaynakları

Boylar	Lazerler	Maksimum uyarım (nm)	Maksimum emisyon (nm)
Hoechst 33258	Ar-Uv	346	460
Hoechst 33342	Ar-Uv	346	460
DAPI	Ar-Uv	359	461
Acridine orange	Ar/Kr-Ar	487	520
Ethidyum bromür	Ar	510	595
Propidyum iyodür	Ar	536	617
TOTO 1	Ar	514	533
TOTO-3	Kr-Ar/RHeNe	642	660

EPS bileşenlerinin ve biyofilmde bulunan organizmaların çeşitliliği, CLSM ile görüntülerken lektinler ile boyanabilmektedirler (Lawrence vd. 2007). Lektin, bitki,

hayvan veya mikrobiyal orjinli bir protein ya da glikoproteindir ve karakteristik spesifiklikle karbonhidratlara bağlanır. Floresans olarak etiketlenen lektinler, EPS bileşimini, EPS'nin mikroskobik olarak *in situ* saptanmasını ve biyofilmlere katkısını saptamak için prob olarak kullanılabilir (Flemming ve Wingender 2010). EPS'deki özgül hedef olan şekerler etiketli floresan lektinler ile boyanarak görüntülenirler. Bu gibi yaklaşımlar, doğal biyofilmlerde EPS'nin karışık bileşimini ve düzenini ortaya çıkarmaktadır (Lawrence vd. 2007). Neu ve Lawrence (1999), lektinlerle özgül çoklu etiketlemeyi ve lektinler ile antikorların spesifik olmayan bağlayıcı örneklerini incelemiştir.

2.13 Termofilik Bakteriler

Thermus aquaticus 1960'ların sonlarında Yellowstone Ulusal Parkında sıcak kaynar sularda Thomas Brock ve Hudson Freeze tarafından izole edilen ilk hipertermofildir (Brock ve Freeze 1969). Miquel ise, 1881'de Seine nehrinin bakteriyolojisine dayanan çalışmalarında üst sıcaklık sınırı 75°C olan ve 60-70°C'de gelişen bakteriler izole etmiştir. Kültür edilen bu termofilik bakteriler için kullanılan sıcaklık 55°C olarak belirlenmiştir ve bu sıcaklık termofiller için ilk defa tanımlanmıştır (Brock 2001). Aerobik spor oluşturan ve 70°C'de gelişebilen *Bacillus thermophilus*'un karakterizasyonu üzerine ilk yayın ise, 1888'de Miquel tarafından yayınlanmıştır. O tarihten itibaren termofilik endospor oluşturan bakteri suşları ile ilgili bir çok çalışma yayınlanmıştır (Maugeri vd. 2001).

Polifazik yaklaşımlar ile yeni termofilik bakterilerin izolasyonu sonucu endüstriyel, biyoteknolojik ve çevreyle ilişkili türlerin belirlenmesi açısından bu bakteriler giderek dikkatleri üzerlerine toplamışlardır. Bu termofiller, yeni oligosakkaritlerin enzimatik sentezi, nişastanın glukoza hidrolizi, endüstriyel fermantasyon süreçleri, biyopolimer ve biyodizel üretimleri, tekstil ve deterjan endüstrisinde onların özgün termostabil enzimlerinin kullanımı gibi uygulamalarda önemli bir roller üstlenmektedir. Termofilik basillerin çoğu termostabil enzimlerin doğal kaynağıdır (Koc vd. 2015). Bu termostabil enzimler arasında, amilaz, glukozidaz, proteaz, kitinaz, ksilanaz, restriksiyon endonükleaz ve DNA polimerazlar bulunmaktadır. Bu termostabil enzimler yüksek sıcaklıklarda

zor endüstriyel süreçlere karşı termal stabiliteleri ile pek çok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadırlar (Cihan vd. 2011). Dahası, termofilik mikroorganizmalar ve onların termostabil enzimleri, zorlu endüstriyel koşullar altında gösterdikleri pH ve sıcaklık stabilitesi sebebiyle biyoteknoloji için önemli avantajlar sağlarlar (Kambourova 2016). Termofillerden elde edilen enzimler, yüksek sıcaklıklarda gerçekleşmesi gereken biyokimyasal tepkimeleri katalizleyebilirler ve mezofillerden elde edilen enzimlerden daha dayanıklıdır. Dolayısıyla bu tip enzim preparasyonlarının raf ömrü daha uzundur.

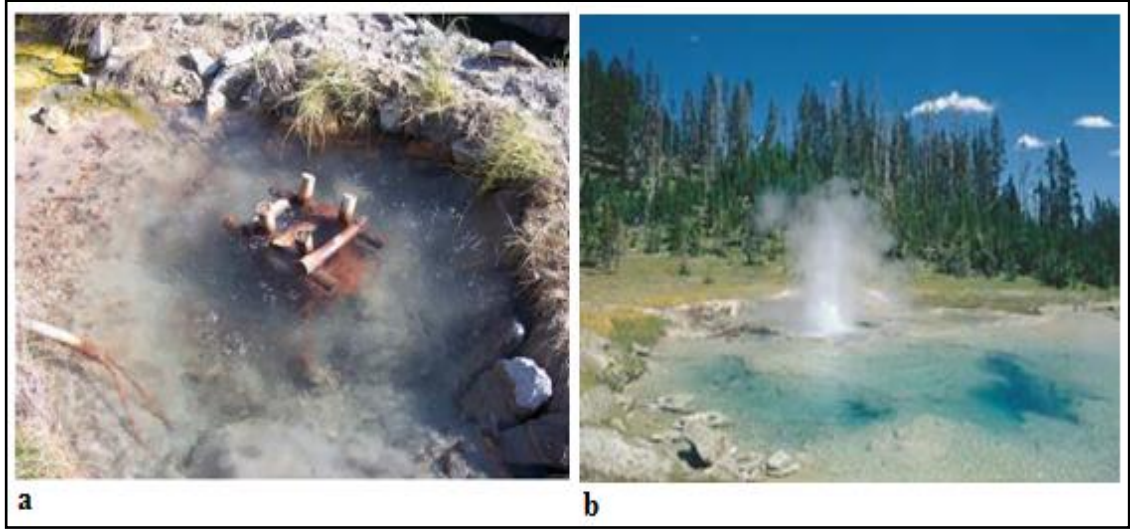
Yerel ve ticari ısıtma sistemleri, ısı değiştiricileri ve soğutma sistemlerinde termofilik basillerin aerobik ve anaerobik şartlar altında gelişebildikleri görülmüştür (Ford vd. 1987). Sıcak su kaynaklarında ve diğer termal ortamlarda optimum gelişmeleri 45-80°C olan birçok termofil bulunmaktadır (Çizelge 2.6), (Madigan ve Martinko 2010). Günümüzde çoğu termofilik mikrobiyal cins, dünyada insan yapımı (asit çıkaran atık sular, biyolojik atıklar ve atık arıtma tesisleri ve kendinden ısıtmalı kompost yığınlar) ve doğal (volkanik ve jeotermal bölgeler, karasal fümeroller, karasal kaplıcalar, derin deniz hidrotermal baca delikleri, jeotermal ısıtmalı petrol ve petrol rezervleri, güneş ısıtmalı toprak/sedimentler) termal habitatlardan izole edilmektedir (Dellagnezze vd. 2016).

Çizelge 2.6 Mikroorganizmaların sıcaklık isteklerine göre sınıflandırılması (Madigan ve Martinko 2010)

Kategori	Optimal gelişim (°C)
Psikrofiller	0-4 °C
Mezofiller	37 °C
Fakültatif termofiller	≥ 45 °C
Termofiller	≥ 60 °C
Hipertermofiller I	≥ 80 °C
Hipertermofiller II (sadece <i>Archaea</i> domaini)	≥ 90 °C

Sıcak su kaynakları Dünya'nın her yerinde bulunur, ancak özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nin batısında, Yeni Zelanda, İzlanda, Japonya, İtalya, Endonezya, Orta Amerika ve Orta Afrika'da çok sayıda sıcak su kaynağı vardır. Dünya'nın en büyük

sıcak su kaynağı Wyoming (ABD)'deki Yellowstone Milli Parkı'nda bulunur (Madigan ve Martinko 2010). Ülkemiz ise jeotermal kaynaklar bakımından dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer almaktadır. Ülkemiz sınırları içinde sıcaklığı 40°C'nin üzerinde olan 140'dan fazla sıcak su kaynağı olduğu Türkiye Maden Teknik ve Araştırma Kurumu'nca rapor edilmiştir (Erişen vd. 1996), (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 Sıcak su kaynakları

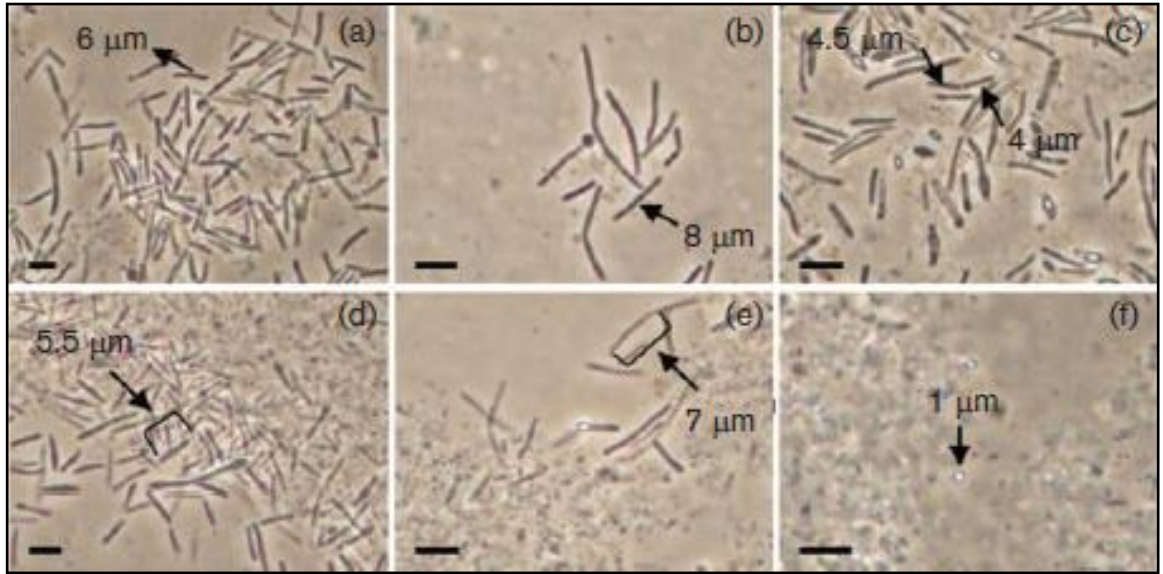
a. Nevşehir ili Kozaklı ilçesi Altınsu mevkiinde bulunan bir sıcak su kaynağı (96°C) (Çöleri 2007), b. Yellowstone Park'ta nötral pH'lı bir sıcak su kaynağı (Madigan ve Martinko 2010)

Termofilik bakterilerin yüksek sıcaklığa dayanmalarında moleküler adaptasyonları önemlidir. Termofilik, enzim ve proteinlerinin yüksek sıcaklığa dayanıklılığı mezofilik akranlarına kıyasla çok daha fazladır. Sıcakta kararlı olan çeşitli enzimler üzerinde yapılan çalışmalar, aynı reaksiyonu katalizleyen mezofilik ve ısıya duyarlı enzim formlarının amino asit dizileri açısından çok az farklılık taşıdıklarını ortaya koymuştur. Enzim yapısında sadece birkaç noktadaki kritik amino asit değişikliği, bu tür enzimlerin sıcaklığa dayanıklı üç boyutlu yapı kazanmasını sağlamaktadır. Termofillerin enzimlerine ve diğer hücre bileşenlerine ek olarak, sitoplazmik zarları da sıcaklıkta kararlı olmak zorundadır. Termofiller, zarın yüksek sıcaklıklarda kararlı ve işlevsel kalmasına olanak verecek şekilde doymuş yağ asitleri bakımından zengin lipitlere sahiplerdir. Doymuş yağ asitleri doymamış yağ asitlerine kıyasla daha güçlü hidrofobik

ortamlar oluştururlar. Bu durum zarın daha kararlı olmasını sağlar (Madigan ve Martinko 2010).

2.13.1 *Bacillaceae* familyasının termofilik üyeleri

Bacillaceae familyasına dahil mikroorganizmalar Gram pozitif ya da endospor oluşturabilen, çoğunlukla çubuk şeklinde, aerobik, fakültatif anaerobik veya anaerobik bakterilerdir (Nazina 2001), (şekil 2.18). Bu familyaya ait türlerin sporları, vejetatif hücre formlarına oranla besin yetersizliği, ısı, UV radyasyonu, dezenfektanlar ve hidrojen peroksit gibi okside edici ajanlarla muameleye karşı çok daha dirençlidirler. Stres koşullarında spor oluşturabilme yeteneklerine bağlı olarak basiller, düşük sıcaklıklardan yüksek sıcaklıklara, asidik, alkali veya tuzlu ortamlara kadar çok çeşitli habitallardan izole edilebilmişlerdir (Claus ve Berkeley 1986).



şekil 2.18 *Anoxybacillus calidus* faz-kontrast mikrografı (Cihan vd. 2014)

a. 6 saatlik genç vejetatif hücreler, b. 18 saatlik vejetatif ve spor oluşturan hücreler, c ve d. 24 saatlik spor oluşturan hücreler, e. 48 saatlik spor oluşturan hücreler, f. 72 saatlik serbest sporlar. Bars, 5 µm.

Son on yıl içinde ise, Gram pozitif veya değişken boyanan, *Bacillaceae* familyasına ait 16S rRNA gen dizilerindeki çeşitliliğin incelenmesi sonucu endospor oluşturan aerobik veya fakültatif anaerobik, çubuk şeklindeki farklı basil türleri ortaya çıkmıştır.

Bacillaceae familyasına dahil edilen *Bacillus* cinsi 1872’de Cohn tarafından tanımlandıktan sonra, termofilik olanlar da dahil pek çok tür önceleri bu cinse dahil edilmiştir. Bu basiller, filogenetik olarak çok farklı pozisyonlara sahip olmaları sebebiyle sonrasında büyük taksonomik düzenlenmelere maruz kalmışlardır. Dahası, dizi verilerinin birikimi ile, *Bacillus* cinsi daha net ve anlaşılabilir gruplara ayrılmıştır. Yeni belirlenmiş veya tekrar sınıflandırılmış cinsler arasında termofilik basillerin 16S rRNA gen dizilerine göre *Bacillus* cinsi genetik grup 1 ve 5 içerisinde yer aldığı görülmüştür. 2001’de *Bacillus* genetik 5 grubuna ait termofilik bakteriler, *Geobacillus* cinsinin üyeleri olarak yeniden sınıflandırılmışlardır (Cihan vd. 2014). Optimal gelişim sıcaklık aralığı 45–70°C olan ve endospor oluşturan termofilik basiller: *Bacillus* (Cohn 1872, Fritze 2004), *Sulfobacillus* (Golovacheva ve Karavaiko 1978), *Alicyclobacillus* (Wisotzkey vd. 1992), *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus* (Shida vd. 1996), *Anoxybacillus* (Pikuta vd. 2000), *Thermobacillus* (Touzel vd. 2000), *Geobacillus* (Nazina vd. 2001), *Ureibacillus* (Fortina vd. 2001), *Cerasibacillus* (Nakamura vd. 2004), *Caldalkalibacillus* (Xue vd. 2006, Zhao vd. 2006), *Aeribacillus* (Mişana-Galbis vd. 2010), *Caldibacillus* (Coorevits vd. 2012) ve *Thermolongibacillus* (Cihan vd. 2014) gibi yeni tanımlanan cinsler altında tekrar sınıflandırılmışlardır.

2010’da Mişana-Galbis vd., Scholz vd. (1987)’nin tanımladığı ve Banat vd. (2004)’nin sınıflandırdığı *Geobacillus pallidus* türünü *Aeribacillus pallidus* olarak tekrar sınıflandırmışlardır. Böylece tek bakteri türü ile temsil edilen *Aeribacillus* cinsi ilk defa tanımlanmış ve *Geobacillus* cinsinden ayrılmıştır (Cihan vd. 2011). Ayrıca, bu termofilik basil cinslerinden bir diğeri de *Anoxybacillus* cinsi olup, ilk defa Pikuta vd. (2000) tarafından tanımlanmıştır. *Anoxybacillus* cinsi günümüzde 21 türle temsil edilmekte olup, bu türlerden *Anoxybacillus rupiensis* ise ilk defa 2008 yılında Derekova vd. tarafından tanımlanmıştır.

2.13.2 Termofilik basiller ve biyofilm üretimleri

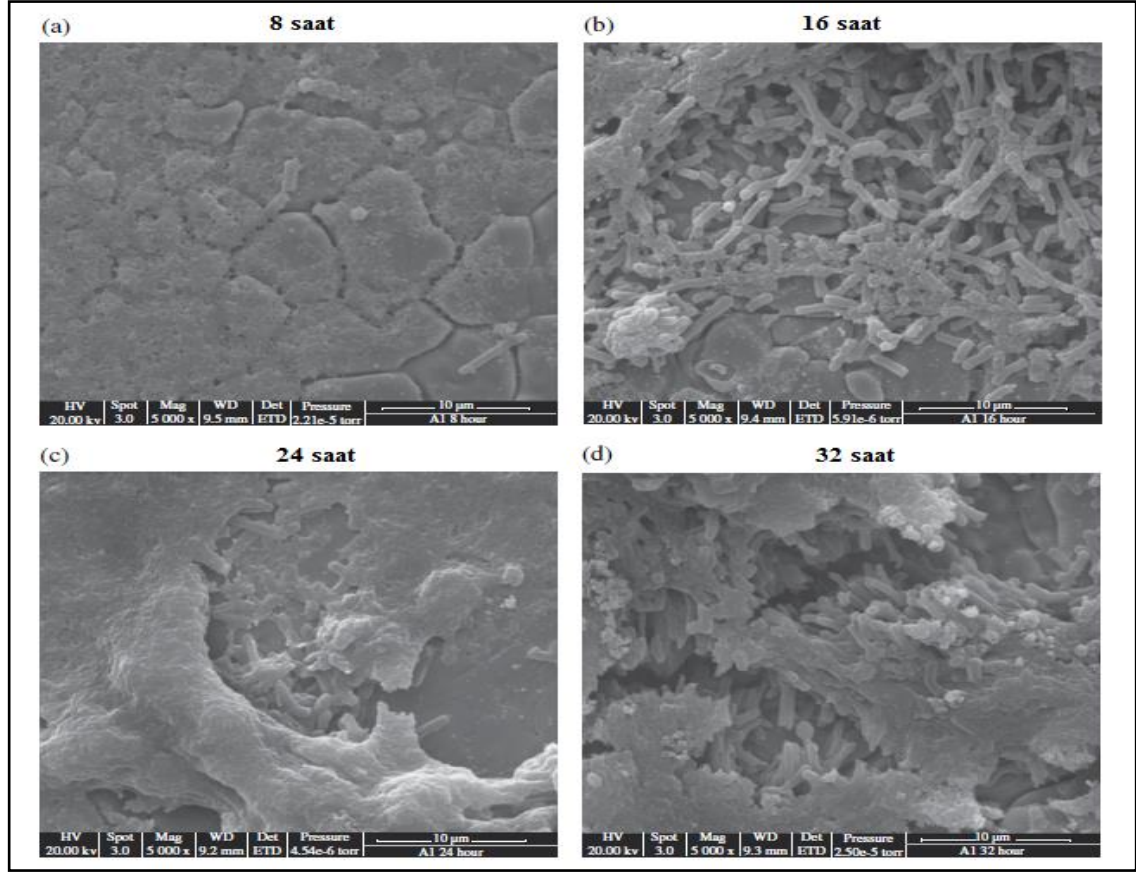
Bakteriyel kontaminantlarca, sütün bozulması veya onun ikincil ürünlerinin sütün ürünlerine karışması, hastalıklara neden olabilir. Termofilik basiller endospor oluşturmaları ve sütün pastörize edildiği sıcaklıklarda optimal gelişme göstermeleri

sebebiyle, patojen olmayan ama bilinen en önemli süt ve süt ürünü kontaminantlarıdır. *Bacillus*, *Geobacillus*, *Aeribacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina* ve *Paenisporosarcina* cinsi gibi aerobik spor oluşturan bakteriler süt ve süt ürünlerinde bilinen en önemli kontaminantlardır ve endüstriyel pastörizasyonda hayatta kalabildiklerinden, paslanmaz çelik ekipmanları ve borular içerisinde kolaylıkla biyofilm oluştururlar. Bu istenmeyen durum, tek veya birçok türün sporlarının yüzey veya gıda materyallerinde birikerek kontaminasyona ve biyofilm oluşumuna yol açar (Gopal vd. 2015, Miller 2015). Bu bakterilerin vejetatif hücreleri ve sporları hayatta kalabilir ve ısı değiştiricilerin ve soğutma sistemi evaporatörlerin (buharlaştırıcı) paslanmaz çelik yüzeylerinde biyofilm oluşturabilirler (Flint 1998). Çoğu termofilik bakteri hastalıklara neden olmamasına rağmen (Scott vd. 2007), dormant sporlar çok uygun şartlar altında tekrar çimlenerek, asitler ve enzimler gibi yan ürünler üretebilir ve bu ürünler de süt tozlarının bileşimlerini doğrudan etkilerler (Chen vd. 2004, Flint vd. 2007). Bu nedenle yeterli gözetim ve kontrol ölçümleri bozulmayı önlemek ve tüketici güvenliğini sağlamak için elzemdir. Yaygın kontrol yaklaşımları; spesifik CIP süreçlerini, kimyasal ve biyolojik biyositleri ve diğer yeni metodları içermektedir (Gopal vd. 2015). Amerika süt ihracat konseyi, süt tozlarında mezofilik (<1000 CFU/g) ve termofilik sporların (<500 CFU/g) mevcudiyeti için sıkı koşullar belirlemiştir ve bu yüzden fabrika sürecinde, sporların çimlenmeleri ve hayatta kalmaları, daha güvenilir ürünlerin eldesi için, varlıklarının azaltılması ve kontrollerinin gerekliliğini göstermektedir (Watterson vd. 2014). Gıda güvenliği ve ürün kalitesi, spor oluşturabilen mikroorganizmalar tarafından üç farklı yolla etkilenmektedir. Bunlar; (i) toksinlerin üretimi, (ii) bozulan enzimlerin üretimi ve (iii) peynir, yoğurt ve süt tozları gibi ikincil süt ürünlerin üretimidir (De Jonghe vd. 2010).

Termofilik basiller ekzopolisakkarit üretirler ve biyofilm adlı kompleks komüniteler oluşturabilmek adına ekzopolisakkarit matrikse daha çok hücre ile yapışabilmek için bölünürler (Sutherland vd. 2001). Yüzey üzerinde tutunan sporlar, vejetatif hücreler meydana getirmek üzere çimlenirler ve sonrasında oluşan vejetatif hücreler çoğalır ve daha fazla ekzopolisakkarit üretirler (Kumar ve Anand 1998). Termofilik mikroorganizmalar, metal yüzeylere tutunabilirler ve bu yüzeylerde meydana getirdikleri biyofilmlerle mikrobiyal kaynaklı korozyona sebep olurlar. Torres-Sanchez

ve Magana-Vazquez (1997), termofilik bakterilerin oluşturduğu korozyonu, 40-150°C arasında suyun kaynama noktasının üzerinde bir sıcaklığa ulaşan jeotermal bir elektrik enerji biriminin kondansöründe saptamıştır (Almeida ve França 1999). Almeida ve França (1999), petrol rafinerisinden aldıkları su örneklerinde yürüttükleri biyofilm çalışmaları sonucunda, karbon çelik kuponların yüzeyinde aerobik termofilik bakteri sayısının, mezofilik bakteri sayısından daha fazla olduğunu gözlemlemiştir.

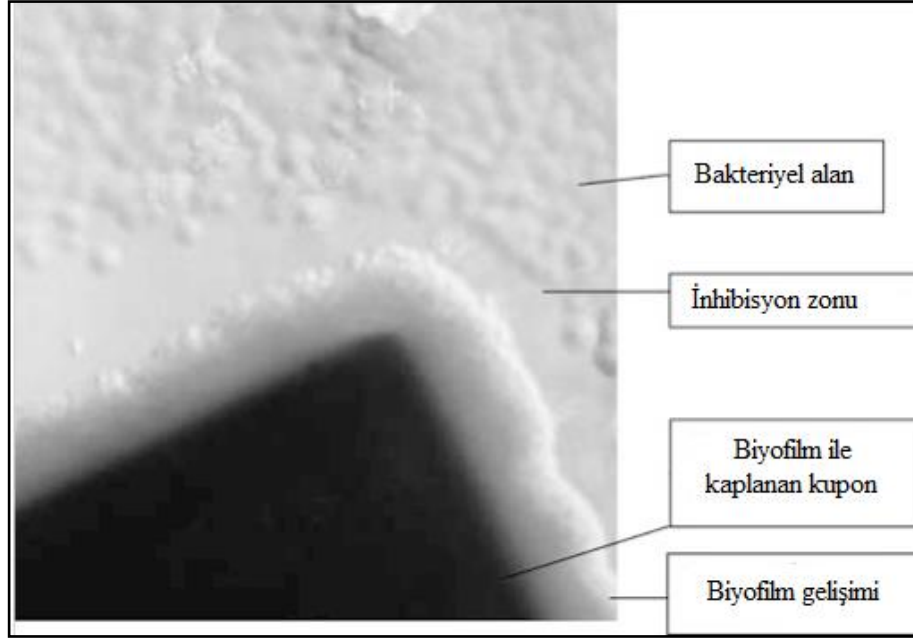
Süt endüstrisinde sporların mevcudiyeti endişe vericidir. Sporlar, vejetatif hücreler muhtemelen ölürken, geniş periyotlarda süt tozu ürünlerinde hayatta kalma yeteneğine sahiptirler (Reddy vd. 1975). Sporların, vejetatif hücrelere kıyasla paslanmaz çelik yüzeylere daha fazla tutunduğu, sıcaklığı tolere ettikleri ve kimyasallara dirençli oldukları gösterilmiştir (Rönner vd. 1990, Popham vd. 1995, Palop vd. 1999, Riesenman ve Nicholson 2000, Parkar vd. 2001). Spor oluşturan termofilik bakterilerin doğrudan biyofilm oluşturmaları ve EPS matriksleri ile ilgili çok az yayın bulunmaktadır (Husmark ve Rönner 1992). Yine, süt ve süt ürünlerinin imal edildiği ortamlarda, biyofilm oluşturan termofilik spor oluşturan bakteriler hakkında kısıtlı bir bilgi birikimi vardır (Parkar vd. 2001). Süt ve süt ürünü üretimlerinin yapıldığı fabrikalardaki biyofilmlerin giderimi, aslında ürün kalitesinin artışı ve enerji kaybının azalmasında önemlidir (Chisti 1999). Termofilik *Anoxybacillus* ve *Geobacillus* cinsi bakterilerinin sıcaklığa dirençli sporları, süt ürünlerinde kontaminasyona sebep olarak büyük bir problem yaratmaktadır (Scott vd. 2007), (Şekil 2.19). Zhao vd. (2012), Yellowstone Milli Park'ında bulunan Bath kaplıcalarından izole edilen *Geobacillus thermoglucosidans* TNO-09.020 türünün, laboratuvar koşullarında yüksek sıcaklıklarda (60-70°C) hem planktonik gelişim hem de güçlü biyofilm üretim kapasitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Termofilik endospor oluşturan basil türlerinin, paslanmaz çelik yüzey üzerinde, 6 saatte $>10^6$ hücre/cm² kadar hücre yoğunluğuna çıkabildikleri bilinmektedir (Parkar vd. 2003).



Şekil 2.19 55°C’de Skim Milk besiyerinde paslanmaz çelik üzerinde *Geobacillus* sp. izolatının SEM görüntüsü (Seale vd. 2015)

a. 8, b. 16, c. 24 ve d. 32 saatlik biyofilm gelişiminin SEM mikrografları

Parkar vd. (2003), *A. flavithermus* B12-C^m izolatının biyofilm hücrelerinin, inhibitör maddeler üreterek, paslanmaz çelik kupon çevresinde kendilerinden köken alan planktonik B12-C^m hücrelerinin gelişimini engellediğini belirtmişlerdir. Bu durumun, biyofilmin strese karşı ürettiği bir sinyal sonucu oluşmuş olabileceğini düşündürmektedir. Sonuçta, bu bakterilerin kendi türlerinden olan planktonik hücrelerin büyümesini engelleyen bakteriyosin benzeri inhibitörler ürettiği gözlenmiştir. Bu olayın biyokimyasal temeli henüz açıklanmamıştır. Bu olayın küçük moleküler ağırlıklı inhibitörlerin difüzyonu ve salınımı sonucu olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.20).



Şekil 2.20 *A. flavithermus* B12-C^m bakterisinin bulunduğu ortamda kuponların kenarlarında oluşan biyofilm ve biyofilmi çevreleyen inhibisyon zonu görüntüsü (Parkar vd. 2003)

Süt tozundaki kontamine termofilik basillerin aslında çiğ sütte bulunan çok az sayıdaki termofilin veya sporunun pastörizasyonda hayatta kalmasından kaynaklandığına inanılmaktadır. Laboratuvar deneyleri, kirli süt depoları ve paslanmaz çeliğe hem vejetatif hücrelerin hem de sporların tutunabildiğini göstermiştir (Langeveld vd. 1995, Parkar vd. 2001, Flint vd. 2001, Seale vd. 2008). *G. stearothermophilus* gibi termofilik basiller süt tozu imalat hanelerinde özellikle buharlaştırıcı aygıtlarında gelişerek, yüzeylere tutunabilirler ki burada sıcaklık yaklaşık 55°C civarındadır. *G. stearothermophilus* gibi termofilik, spor oluşturan, patojen olmayan basiller süt ve süt ürünlerinde potansiyel olarak kontaminantlardır (Murphy vd. 1999). Süt ve süt ürünlerinin imal edildiği fabrikalarda bu basiller, paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturur ve yüzeylere aktif olarak tutunabilirler (Hood ve Zottola 1997). Termofilik basil biyofilmleri ürünün ticari değerini ve hijyenini etkileyebilir. Ayrıca biyofilm oluşumu enerji kayıplarına ve cihazlarda tıkanmalara, korozyonun hızlanmasına ve cihazın sensör ve detektörlerinde materyal bozulmalarına neden olabilir (Wirtanen vd. 1996).

Sporlar yüzeye tutunduğu zaman gelişebilir ve vejetatif hücreler daha sonra uygun koşullarda çimlenebilirler. Ayrıca, biyofilm içinde de sporların mevcudiyeti ve sporulasyonun meydana geldiği de bilinmektedir. Kontaminasyon muhtemelen, biyofilmden kopuş sürecinde meydana gelmekte ve bireysel hücrelerin parçalanması ile sonuçlanmaktadır (Burgess vd. 2009). Termofilik *G. stearothermophilus* devamlı akış sağlayan laboratuvar reaktörü kullanılarak yaklaşık 6 saat inkübasyondan sonra biyofilm oluşturabilmiştir (Flint vd. 2001). *A. flavithermus* B12-C^m biyofilmleri üzerinde yapılan yayınlarda, 18 saatlik olgun biyofilmlerin fizyolojisine ve farklı temizleme rejimleri üzerine odaklanılmıştır (Parkar vd. 2003, 2004). Burgess (2009) ise, güncel bir konu olan termofilik *A. flavithermus* biyofilmlerinin spor oluşumunun dinamikleri üzerinde çalışmıştır. Burgess, 48, 55, 60°C'lik üç farklı sıcaklık çalışmış ve biyofilmin bütün sıcaklıklarda paslanmaz çelik yüzeylerde 6-8 saatte geliştiğini belirtmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre, sporlar 55 ve 60°C'de oluşmuş ve 8 saatte biyofilmin yaklaşık %10-50'sini oluşturmuştur. Ancak, 48°C'de sporlar oluşmamış ve biyofilm gelişimi diğer iki sıcaklık ile karşılaştırıldığında, 48°C'de azalma eğilimine girmiştir. Bu sonuçlara göre, *A. flavithermus* CM biyofilminin ve spor oluşumunun, çok hızlı ve eş zamanlı meydana gelebildiği söylenebilir. Ancak, Flint vd. (2001), sıcaklığın *G. stearothermophilus* B11 sporlarının paslanmaz çeliğe tutunmasında önemli bir faktör olmadığını belirtmişlerdir. Knight vd. (2004) ise, sıcaklık değişikliği ile peynir sütü pastörizasyon makinelerinde *S. thermophilus* bakterisinin biyokontrolünün sağlanabildiğini göstermişlerdir. Tüm bu değişken bulgulara rağmen, sıcaklık farklılıklarının sporların oluşumunda önemli bir etkiye sahip olduğu söylenebilir. Benzer bir yöntem termofilik *A. flavithermus* ve *Geobacillus* türlerinin sporulasyonu ve gelişiminin kontrolünde kullanılabilmektedir (Burgess vd. 2009).

Parkar vd. (2001), elde ettikleri sonuçlara göre, termofilik basillerin biyofilm oluşumunda birçok faktörün etkili olabileceğini ve hücre yüzey proteinlerinin, tutunmanın ilk sürecinde önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca, paslanmaz çeliğe sporların vejetatif hücrelerden daha çok miktarda tutunduğunu ve çeşitli muamelelerden sonra sporların, vejetatif hücrelerden daha az etkilendiğini rapor etmişlerdir. Bu sonuç, *Bacillus*'un çeşitli türleri üzerindeki gözlemler ile de doğrulanmıştır (Husmark ve Rönner 1992). Sporların hücre yüzey özelliklerinin

çalışılması vejetatif hücrelerden daha zordur. Ayrıca kullanılan hücre yüzey işlemleri, sporlar üzerine minimal etki yapmaktadır. Yüzeyin hidrofobisitesi sporların tutunmasını etkileyebilmektedir. Sporlar, hidrofobik yüzeylere tutunmaya hidrofilik yüzeylerden daha çok eğilimlidir ve vejetatif hücrelerden daha çok hidrofobik bulunmuşlardır (Rönner vd. 1990, Parkar vd. 2001). Ancak, yapılan bir çalışmada da *G. stearothermophilus* sporlarının hidrofobisitesinin çok düşük (%0-5) olduğu saptanmıştır (Flint vd. 2001). Sporların, süt ve süt ürünlerinin imalatı süreçlerinde pastörizasyon gibi sıcak işlem uygulamaları sonrası yaşamaları oldukça muhtemeldir ve paslanmaz çelik yüzeylere sporların tutunması biyofilm oluşumunda muhtemelen önemli bir başlatıcı etken olabilir. Uygun şartlar altında sporlar çimlenerek vejetatif hücreler gelişmeye başlar ve bu da biyofilmin oluşumunu başlatabilmektedir (Parkar vd. 2001).

Paslanmaz çeliğe tutunan hidrofobik sporların sayısı, daha az hidrofobik olan vejetatif hücrelere kıyasla daha fazladır. Sporların artan hidrofobisitesinin sebebi, vejetatif hücre yüzeylerindeki peptidoglikanla karşılaştırıldığında, sporun dış tabakasında ve ekzosporiumda bulunan proteinlerin çokluğu olabilir (Wienczek vd. 1990). Spor yüzeyindeki düşük zeta potansiyeli ile tutunmanın artışı yürütülen çalışmalarda korelasyon göstermektedir (Husmark ve Rönner 1990). Ancak, Parkar vd. (2001), vejetatif hücreler ile sporların tutunması ve zeta potansiyel arasında net bir korelasyon saptamamışlardır. Bunun nedeni, bu bakterilerin tutunmasında, açıl homoserin lakton gibi moleküller tarafından hücreler arasında oluşan kimyasal sinyaller ve yüzey uzantıları gibi fiziksel faktörler içeren çoklu bir sürecin olması olabilir (Stickler 1999).

Gıda imalat fabrikalarında spor oluşturan bakteriler için etkili temizleme sistemleri hakkında literatürde referans bulmak oldukça zordur. Süt ve süt ürünlerinin imal edildiği fabrikalarda biyofilm çalışmaları çoğunlukla *Pseudomonas* türleri ve gıda kaynaklı patojenler üzerine odaklanmaktadır (Dunsmore 1981, Frank ve Koffi 1990, Zottola ve Sasahara 1994). Süt tozunun imalatı boyunca evaporatörlerde ve ısı değiştiricilerin rejenarasyon bölümleri içinde termofilik bakteriler gelişebilir ve yine sporların bulunduğu rapor edilmiştir (Stadhouders vd. 1982, Warnecke 2001, Scott vd. 2007). Termofilik basillerden, özellikle *A. flavithermus* ve *Geobacillus* spp. süt tozunda bulunan en yaygın termofilik kontaminantlardır (Flint vd. 2001, Ronimus vd. 2003).

Termofilik basilleri, geniş bir sıcaklık aralığında büyüebilme özelliği, hızlı büyüme oranı, sıcaklık ve kimyasallara sporlarının dirençliliği ve biyofilm oluşturma yeteneklerinden dolayı, onları yüzeylerden gidermek zordur (Etao ve Michiels 1988, Flint vd. 2001, Parkar vd. 2003). Biyofilmdeki mikroorganizmalar, CIP rejimlerinde uygulanan kimyasallara ve temizleyicilere planktonik hücrelerden genellikle çok daha dirençlidir (Flint vd. 1999). Parkar vd. (2004), termofilik basil olan *A. flavithermus*'un vejetatif hücreleri üzerinde farklı temizleyici ajanların etkisini incelemiştir. Bu araştırma sonucunda, imalat fabrikalarında vejetatif hücrelerin baskın olduklarını ve onların da aslında spordan kaynaklı olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca, iki bileşen içeren ticari proteolitik enzim temizleyicileri kombinini 60°C'de 30 dk kullanmışlar ve test kuponlarından biyofilmi başarıyla temizlemişlerdir. Bu enzimler kullanıldığında paslanmaz çelikte hiç canlı hücre ve biyofilm biyokütlesi geride kalmamıştır. Buna karşın, subtilizin, α -amilaz ve selülaz kullandıklarında biyofilmlerin %100 ölmesinde başarı sağlanamamış, ancak yaşayabilirliği azaltılmıştır. Bu durum, düşük ıslanabilirlik ve aslında bu enzimlerin biyofilmin sadece bir bölümünü temizleyebilmesiyle açıklanabilir.

2.13.3 *Aeribacillus pallidus* türü ile ilgili yapılan çalışmalar

A. pallidus türünün gelişimi için gereksinim duyduğu sıcaklık aralığı 30-70°C, optimal sıcaklık isteğinin ise 50°C olduğu tanımlanmıştır (Banat vd. 2004, Coorevits vd. 2012). Bu termofilik basille ilgili çalışmalardan birisinde, Muhammad ve Ahmed (2015), yeni izole ettikleri termofilik *A. pallidus* SAT4 türünden, *S. aureus*, *Micrococcus luteus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı etkili, Aeritracin isimli yeni bir antibiyotik etkili molekülün karakterizasyonunu ve üretimini yapmışlardır. Radchenkova vd. (2013), *A. pallidus* 418 izolatının ekzopolisakkarit üretimi ile ilgili çalışmalar yürütmüşlerdir (Şekil 2.21). Ayrıca, Radchenkova vd. (2015), *A. pallidus* 418 izolatını kullanarak sentezledikleri EPS'yi kozmetik endüstrisinde uygulayarak, bu EPS'nin çok yararlı fiziko-kimyasal özelliklerinin, çalışmalar dahilinde kullanılan ticari kremin özelliklerini olumlu anlamda etkilediği sonucuna varmışlardır.



Şekil 2.21 Pepton-Yeast Ekstrakt Agar üzerinde *A. Pallidus* 418 tarafından 24 saat sonundaki cıvıksı yapı (slime) üretimi (Kambourova vd. 2016)

A. pallidus TD1 izolatu, ekstraselüler pektat liyaz üreticisi olarak rapor edilmiştir (Yasawong vd. 2011). *A. pallidus*'un sporları Miller vd. tarafından (2015) çiğ süt ve süt tozunda kontaminant olarak saptanmıştır. Zheng vd. (2012) ilk kez, lipit (%47.6), karbonhidrat (%41.1) ve protein (%11.3) içeren *A. pallidus* YM-1 bakterisinin yeni bir yüksek molekül ağırlıklı biyoemülgatör ürettiğini bulmuşlardır. Bu biyoemülgatörün karbonhidrat fraksiyonu glukoz (%36.6), altroz (%30.9), mannoz (%24.4) ve galaktoz (%8.1) içermektedir (Kambourova vd. 2016). Biyoemülgatörlerin moleküler ağırlığı biosümfaktanlardan daha yüksektir ve heteropolisakkaritler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler ve proteinlerin kompleks karışımlarından oluşmaktadırlar. Aslında biyoemülgatörler, yüksek moleküler ağırlıklı biyopolimerler veya EPS'ler olarak da bilinirler (Uzoigwe vd. 2015).

Miller vd. (2015), 33 işletmeden süt tanklarındaki çiğ sütlerden ve onların süt tozu şeklindeki imalat süreçlerinden endospor oluşturabilen 4 farklı tür termofilik basil izole etmişlerdir. Bu sonuçlara göre, süt ile ilişkili numunelerin %1.72'si *A. pallidus*, %10.6'si *Anoxybacillus* spp., %12.1'si *Geobacillus* spp. ve %2.8'si *Paenibacillus* spp. türleri ile kontamine bulunmuştur. Sadiq vd. (2016), 25 süt tozu örneğinden toplam 728

mezofilik ve termofilik bakteri izole etmişler ve RAPD tekniği uygulayarak, bu izolatların %0.9'inin *A. pallidus*, %43'ünün *B. licheniformis*, %21'inin *G. stearothermophilus* ve %8.5'inin *A. flavithermus* türleri olduklarını tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri izolatları ve referans suşlar

Tez çalışması öncesi yürütülen projelerle ilişkili çalışmalarda, A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda mevcut olan ve tür tanımları yapılmış *Bacillaceae* familyasının 7 farklı cinsine ait 110 izolat ve 35 referans suş olacak şekilde toplam 145 bakterinin biyofilm üretim kapasiteleri belirlenmiştir. Ön çalışmalarda kullanılan izolatların ve referans suşların sayısı çizelge 3.1’de sunulmuştur. Daha sonra, yapılan çalışmalar sonucunda 145 bakteri arasından 44 izolatın ve 21 referans suşun (toplam 65 basıl) çok yüksek miktarda biyofilm ürettikleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.1 Ön çalışmalarda kullanılan bakteriler ve sayıları

Domain = Bacteria (*Eubacteria*)

Alem = Firmicutes (Gram (+) Bakteri)

Sınıf = Bacilli

Takım = Bacillales

Familya = Bacillaceae

Cinsler	Bakteri izolatları	Referans suşlar	Bakteri sayısı
<i>Anoxybacillus</i>	66	19	85
<i>Bacillus</i>	16	3	19
<i>Brevibacillus</i>	13	-	13
<i>Geobacillus</i>	10	10	20
<i>Aeribacillus</i>	4	1	5
<i>Paenibacillus</i>	1	-	1
<i>Thermolongibacillus</i>	-	2	2
Toplam	110	35	145

Çalışılan bu tezin temelini oluşturan bu ön çalışmalarda, 145 basilin, biyofilm oluşumunda önem arz eden ve hareket yeteneğinin kaynağı olan flagella tiplerinin

belirlenmesi, kongo besiyerindeki koloni morfortiplerinin tayini, kalkoflorlu besiyerinde ekzopolisakkarit bileşeni olan selülozun kullanımı, sıvı besiyeri yüzeyinin hava-sıvı ara yüzünde pelikül oluşumu, polistiren tabiatlı mikrotitrasyon plakalarının kuyularının yüzeyinde biyofilm oluşum miktarları belirlenmiştir. Sonrasında ise, yukarıdaki kriterlere göre seçilen 44 termofilik basil ve 10 referans suşun (54 bakteri), tüpler içerisine koyulan paslanmaz çelik kuponların yüzeyinde oluşturdukları biyofilm miktarlarına bağlı olarak, yüksek miktarda biyofilm oluşturma kapasitesine sahip 5 izolat ve 1 referans aday suş belirlenmiştir. Bu 5 izolatın ve 1 referans suşun türleri birbirinden farklılık göstermekte olup, 16S rRNA gen dizi analizleri yine önceki çalışmalarda yapılarak, cinsleri ve türleri belirlenmiştir. Bu 6 basilin izole edildikleri bölgeler, sıcaklık gereksinimleri ve 16S rRNA genine ait GenBank aksesyon numaraları çizelge 3.2 sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Yüksek miktarda biyofilm oluşturma kapasitesine sahip bakteri izolatları ve referans suş

Tür adı	Kodu	Sıcaklık isteği	İzole edildiği yer	GenBank aksesyon numarası
<i>Geobacillus</i> sp.	D413	Termofil	Dikili, Çamur Ilıcısı, İzmir, Türkiye	FJ430040
<i>Geobacillus toebii</i>	E134	Termofil	Altınsu, Kozaklı, Nevşehir, Türkiye	EU477771
<i>Aeribacillus pallidus</i>	E334	Termofil	Altınsu, Kozaklı, Nevşehir, Türkiye	FJ429594
<i>Bacillus pumilis</i>	D194a	Fakültatif termofil	Dikili, Kaynarca, Kocaoba, İzmir, Türkiye	FJ430022
<i>Brevibacillus agri</i>	D505b	Fakültatif termofil	Dikili, Kaynarca, Kocaoba, İzmir, Türkiye	FJ430048
<i>Anoxybacillus rupiensis</i>	DSM 17127 ^T NBIMCC 8387 ^T	Termofil	DSMZ'den temin edilmiştir	AJ879076

Seçilen bu izolatların, polistiren mikrotitrasyon plakası kuyucuklarının yanısıra, çelik kupon yüzeylerine de iyi tutundukları saptanmıştır. Bu nihai olarak seçilen 6 bakteriden 4'ü termofilik (*Geobacillus* sp. D413, *Geobacillus toebii* E134, *Aeribacillus pallidus*

E334 ve *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127^T) ve 2'si de fakültatif termofilik (*Bacillus pumilis* D194a, *Brevibacillus agri* D505b) üreme göstermektedir. Tez öncesi yürütülen tüm bu ön çalışmalar neticesinde, bu bakteriler arasından termofilik üreme özelliği göstermeleri, ayrıca mikrotitrasyon plakalarında ve çelik kupon yüzeyinde yüksek miktarda biyofilm üretmeleri sebebiyle sadece E334 izolatu ve referans olarak da DSM 17127 suşu tez kapsamında çalışmaya alınmıştır.

3.1.2 Besiyerleri

Medium I Agar besiyeri içeriği (Suzuki vd. 1976a, 1976b)

Medium I Agar	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Nişasta	10 g	Sigma S2004
Kazein pepton	5 g	Merck 1.07213
Yeast ekstrakt	3 g	Merck 1.03753
Meat ekstrakt	3 g	Merck 1.03979
Potasyum fosfat dibazik	3 g	Sigma P8281
Potasyum dihidrojen fosfat	1 g	Scharlau PO0260
Agar	30 g	Scharlau AG0020
Distile su	1000 mL	
pH: 7.0 ± 0.2		

Tryptic Soy Agar besiyeri içeriği

Tryptic Soy Agar	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Kazein pepton	17 g	Merck 1.07213
Soya pepton	3 g	Fluka 70178
(D+) Glukoz	2.5 g	Merck 1.08342
Potasyum fosfat dibazik	2.5 g	Sigma P8281
Sodyum klorür	5 g	Merck 1.06404
Agar	30 g	Scharlau AG0020
Distile su	1000 mL	
pH: 7.3 ± 0.2		

Kongo kırmızısı içeren (40 µg/mL) TSA besiyeri içeriği

İçerik	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Kazein pepton	17 g	Merck 1.07213
Soya pepton	3 g	Fluka 70178
Potasyum fosfat dibazik	2.5 g	Sigma P8281
(D+) Glukoz	2.5 g	Merck 1.08342
Kongo kırmızısı	0.04 g	Merck 101340
Agar	30 g	Scharlau AG0020
Distile su	1000 mL	
pH: 7.3 ± 0.2		

Kalkoflor içeren (50 µg/mL) TSA besiyeri içeriği

İçerik	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Kazein pepton	17 g	Merck 1.07213
Soya pepton	3 g	Fluka 70178
Potasyum fosfat dibazik	2.5 g	Sigma P8281
(D+) Glukoz	2.5 g	Merck 1.08342
Kalkoflor	0.05 g	Sigma F3543
Agar	30 g	Scharlau AG0020
Distile su	1000 mL	
pH: 7.3 ± 0.2		

3.1.3 Çalışmalarda kullanılan çözeltiler

Serum Fizyolojik	g/L	Kimyasal marka ve kodları
Sodyum klorür	8.5 g	Merck 1.06404
Distile su	1000 mL	

Kristal viyole çözeltisi	% 1	Kimyasal marka ve kodları
Kristal viyole	1 g	Merck 1.01408
Distile su	100 mL	

Metanol çözeltisi	% 95	Kimyasal marka ve kodları
Metanol	95 mL	Merck 1.01408
Distile su	5 mL	
Etanol/Aseton çözeltisi	70:30 v/v	Kimyasal marka ve kodları
Saf etanol	70 mL	Scharlau ET0013
Aseton	30 mL	Merck 1.00013
Fenol/Kloroform/İzoamil Alkol	50 mL	Kimyasal marka ve kodları
Fenol	25 mL	Merck 1.00206
Kloroform	24 mL	Merck 1.02431
İzoamil Alkol	1 mL	Merck 1.00979
Kloroform/İzoamil Alkol	25 mL	Kimyasal marka ve kodları
Kloroform	24 mL	Merck 1.02431
İzoamil Alkol	1 mL	Merck 1.00979
Tris-EDTA (TE) Tamponu	50 mL	Kimyasal marka ve kodları
Tris	0.3 g	Sigma T6066
EDTA	4.6 g	Sigma E-5134
Distile su	50 mL	
pH: 7.0 ± 0.2		
10 mM Tris-HCl tamponu	100 mL	Kimyasal marka ve kodu
Trizma base	0.12 g	Sigma T6066
Distile su	100 mL	
pH: 8.0 ± 0.2		
50 mM Tris-HCl tamponu	100 mL	Kimyasal marka ve kodu
Trizma base	0.61 g	Sigma T6066
Distile su	100 mL	
pH: 8.0 ± 0.2		

0.02 M HCl tamponu	100 mL	Kimyasal marka ve kodu
HCl	0.167 mL	Merck 1.00314
Distile su	100 mL	
pH: 4.0 ± 0.2		

50 mM Soyum asetat tamponu	50 mL	Kimyasal marka ve kodu
Soyum asetat (3 sulu)	0.34 g	Sigma 25022
Distile su	50 mL	
pH: 5.0 ± 0.2		

Sodyum fosfat- NaCl tamponu	10 mL	Kimyasal marka ve kodları
20 mM Sodyum fosfat dibazik	0.0284 g	Sigma S7907
6.7 mM NaCl	0.0039 g	Merck 1.06404
Distile su	10 mL	
pH: 6.9 ± 0.2		

Borat - CaCl₂ tamponu	10 mL	Kimyasal marka ve kodları
0.1 M Borik asit	0.062 g	Sigma B6768
0.1 M CaCl ₂ (3 sulu)	0.147 g	Scharlau CA0193
Distile su	10 mL	
pH: 8.0 ± 0.2		

50mM Glisin-NaOH Tamponu

Glisin'den (Sigma G-8898) 0.375 g tartılarak 90 mL dH₂O'da çözülmüş, 1M'lik NaOH çözeltisi (Merck 1.06482) ile pH 9.0'a ayarlanmıştır. Daha sonra son hacim 100 mL olacak şekilde tekrar dH₂O eklendikten sonra, tampon süzülerek steril edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakterilerin ön aktifleştirilmeleri

Bütün çalışmalarda, bakterilerin biyofilm üretimlerinden önceki ön aktifleştirilmeleri, bu kısımda açıklandığı şekliyle yapılmıştır. Termofilik basillerin ön aktifleştirilmesi için, -80°C'de gliserol stok kültürlerde bulunan bakteriler, öncelikle Medium I (MI) katı besiyerine aşılansmış ve bakterinin gereksinim duydukları uygun sıcaklıkta 18-24 saat inkübe edilmişlerdir (Suzuki vd. 1976a, 1976b). Daha sonra, tuzlu Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerinde uygun sıcaklıkta 18-24 saat inkübe edilmiştir (Flint vd. 2001, Parkar vd. 2003, Burgess vd. 2009). Bu katı kültürlerden 3 mL'lik tuzlu Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine yoğun bir bulanıklık (OD: 0.5-0.7) elde edilinceye kadar aşlandıktan sonra, bakteriler yine uygun sıcaklıkta 18 saat çalkalamalı koşullarda (170 rpm) geliştirilmiştir. 3 mL'lik bu son aktif sıvı kültürden 167 µL alınarak, 5 mL'lik tuzsuz TSB besiyerine eklenmiş ve kültür çalkalamalı koşullarda uygun sıcaklıkta 6 saat inkübe edildikten sonra, biyofilm oluşumu çalışmaları için hazırlanan besiyerlerine aşlanarak, gereksinim duydukları sıcaklıklarda inkübe edilmişlerdir.

3.2.2 Bakterilerde flagella varlığının belirlenmesi

Biyofilm oluşumu sürecinde bakterilerin yüzeye tutunmasında etkili olan flagella tipleri belirlenmiştir. Flagella boyaması, ilk olarak Ryu tarafından tanımlanan uygulamayı temel almaktadır. Heimbrook vd. 1989 çalışması göz önüne alınarak, bakterilerin flagella boyaması BD Flagella Stain Droppers kit (katalog no: 261206) prosedürüne göre yapılmıştır. Flagella varlığının ve tipinin belirlenmesi için gerekli preparatları hazırlamak üzere, bakteriler MI agar besiyerinde 55°C'de 6 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, bakterilerin flagella tipleri immersiyon objektifi altında 10x100'lük büyütmede ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir (Leica DM1000).

3.2.3 Kongo kırmızısı içeren besiyerinde bakterilerin biyofilm morfolojilerinin tayini

Bakterilerin ön aktifleştirmelerinden sonra, son aktif kültürden 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL 'lik hacimlerde alınarak, 0.04 g/L (40 µg/mL) kongo kırmızısı içeren tuzsuz TSA besiyerine inoküle edilmiş ve 4 gün boyunca 55°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Römling ve Rohde 1999). Her gün gözlenen petrilerin genel görünüşleri fotoğraflanmış ve koloni çapları ölçülmüş olup, ayrıca 0.63X büyütmede koloni morfolojileri 2. ve 4. günde stereo mikroskop (Leica S6 D) ile görüntülenmiştir (Vestby vd. 2009).

3.2.4 Kalkoflorlu besiyerinde EPS bileşeni olan selülozun tayini

Bakterilerin ön aktifleştirmeleri yapıldıktan sonra, son aktif kültürden alınan örneklerden 50 µL, 0.05 g/L (50 µg/mL) kalkoflor içeren tuzsuz TSA besiyerine inoküle edilmiş ve 2 gün boyunca 55°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bakteriler, UV transillüminatör (Vilber Lourmat Quantum ST4 Jel Dökümantasyon Sistemi) ile UV ışık altında görüntülenmiş olup, selüloz veya türevi bir karbonhidratın kullanımına bağlı olarak, ışımaya yapış yapmadığına göre pozitif veya negatif olarak değerlendirilmiştir (Solana vd. 2002). Besiyeri içerisine eklenen kalkoflor, β -(1→3)-D ve β -(1→4)-D glukopiranozil bağlarını bulunduran polisakkaritlerin saptanmasında kullanılan çok kuvvetli bir indikatördür (Zogaj vd. 2001).

3.2.5 Sıvı besiyerlerinde pelikül oluşumunun gözlenmesi

Ön aktifleştirme işlemi sonrasında, son aktif kültürden 100 µL alınarak 5 mL'lik tuzsuz TSB besiyerine inoküle edildikten sonra, 55°C ve 65°C'lik sıcaklıklarda inkübe edilerek, statik koşullarda 4 gün boyunca hava-sıvı ara yüzde bulunan pelikül oluşumları gözlemlenmiştir (Römling vd. 2000).

3.2.6 Polistiren mikrotitrasyon plakalarında biyofilm oluşum miktarlarının spektrofotometrik tayini

Bakterilerin polistiren mikrotitrasyon plakalarında biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Vestby vd. (2009) ve Stepanović vd. (2000) tarafından önerilen yöntemler modifiye edilmiştir. Bakterilerin, U-tabanlı 96 kuyucuklu polistiren mikrotitrasyon plakaları (Lp Italiana Spa) üzerinde biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için ön aktifleştirilme yapıldıktan sonra, toplam hacim 200 µL olacak şekilde, kuyulara 190 µL tuzsuz TSB besiyeri ve 10 µL aktif kültür aşılanmıştır (Şekil 3.1). Bakteri süspansiyonlarını içeren mikrotitrasyon plakaları 96 saat statik olarak 55°C ve 65°C'lik sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, bağlanmayan planktonik bakteri hücrelerini gidermek için kuyular 2 defa Serum Fizyolojik (SF) ile yıkanmıştır. Plakalar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Plakanın kuyucuklarına tutunan hücreler, 200 µL %95'lik metanol ile sabitlenmiş ve 37°C'de 15 dk bekletildikten sonra kuyular boşaltılmıştır. Daha sonra plakaların her biri oda sıcaklığında 15 dk kurutularak metanolün uçması sağlanmıştır. Ardından kuyulara 200 µL (w/v)'lik filtre edilmiş kristal viyole çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilerek yüzeye tutunan hücrelerin boyanması sağlanmıştır. Boyama işleminden sonra, kuyular distile su ile boya kalıntısı kalmayacak şekilde dikkatlice yıkanmış ve kristal viyole boyasının çözünmesi için 200 µL etanol:aseton (70:30 v/v) ilave edilerek, 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon bitiminde, OD_{595nm}'de çözünen kristal viyole boyasının oluşturduğu absorbans yoğunluğu, Eliza okuyucusunda (BioTek Elisa reader, µQuant) en az 3 tekrarlı olarak okutulmuştur. Kontrol olarak boş kuyulara etanol:aseton eklenmiştir. Bakterilerin biyofilm üretim miktarları hesaplanırken, “cut off” (sınır değer) değerlerinin dönüşümleri esas alınarak, “üretici değil”, “zayıf üretici”, “orta düzey üretici” ve “güçlü üretici” olarak değerlendirilmiştir. Sınır değerleri, mikrotitrasyon plaka ölçüm esasına dayalı yöntemlerde negatif test gruplarından gelen ölçüm sonuçlarının istatistiksel sapma değerlerini ifade eden bir değerdir. Bakterilerin biyofilm üretim kapasiteleri çizelge 3.3'de ifade edilen sınır değerlerin dönüşümleriyle hesaplanmaktadır (Stepanović vd. 2000, Saxena vd. 2014). Cut off değerini hesaplamak için ise, negatif kontrol olarak tuzsuz TSB besiyeri eklenmiştir.



Şekil 3.1 Polistiren mikrotitrasyon plakave Eliza okuyucusu görüntüsü

a. U-tabanlı 96 kuyucuklu polistiren mikrotitrasyon plaka, b. Eliza okuyucusu

Çizelge 3.3 Biyofilm üretim kapasitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan “cut off” dönüşümleri ve formülü (OD^{*} : optik yoğunluk, OD_C^{**} : OD cut off değeri)

Ortalama OD [*] değerleri	Biyofilm üretim kapasiteleri
$OD \leq OD_C^{**}$	üretici değil
$OD_C < OD \leq 2 \times OD_C$	zayıf üretici
$2 \times OD_C < OD \leq 4 \times OD_C$	orta düzey üretici
$4 \times OD_C < OD$	güçlü üretici
$OD_C = \text{Negatif kontrolün OD ortalaması} + 3 \times \text{Negatif kontrolün standart sapması}$	

Kristal viyole ile biyofilmlerin boyanması, tüm biyofilm ölçümlerinde bilinen temel bir tekniktir. Bu boyanın, hücre yüzeyindeki negatif yüklü moleküllere ve ayrıca nükleik asit ve polisakkaritlere bağlandığı bilinmektedir (Li vd. 2007). Bu teknik, çeşitli Gram pozitif bakterilerin biyofilm oluşumu için standart bir tekniktir (Djordjevic vd. 2002, Stepanović vd. 2000).

3.2.7 Bakterilerin sıvı besiyerine konulan paslanmaz çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşumlarının incelenmesi

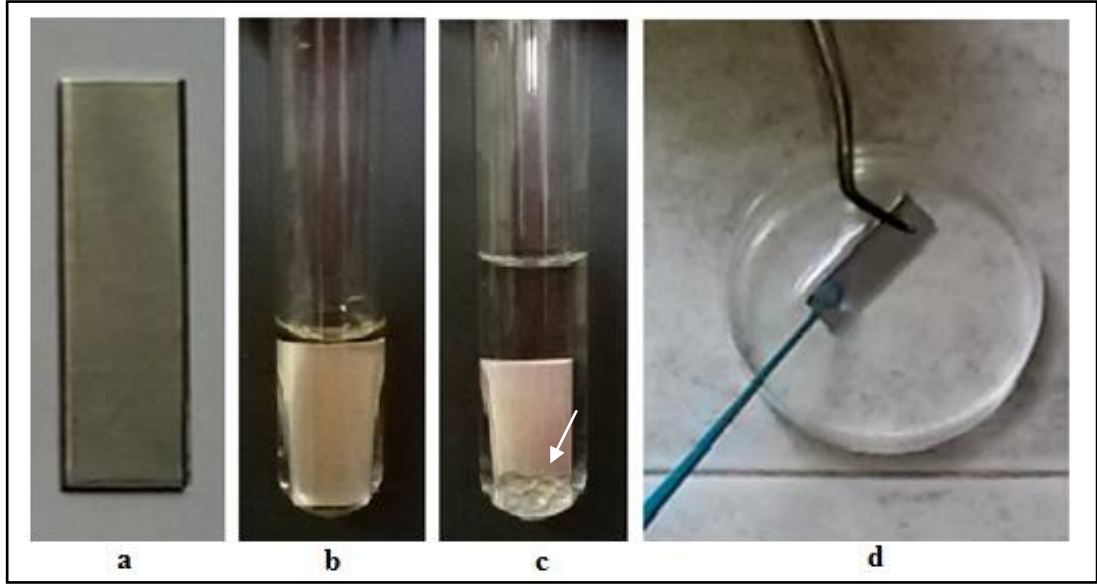
Yüzeylerde oluşan biyofilmlerdeki canlı hücrelerin sayılması için kazıma (Frank ve Koffi 1990) ve vorteksleme (Mustapha ve Liewen 1989) gibi mekanik giderim yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır.

Polistiren mikrotitrasyon plakalarının kuyularının yüzeylerinde güçlü biyofilm oluşturan bakteriler, çelik kupon deneylerine alınmıştır. Bu çalışmada, genellikle fermentörlerin ve sondaj borularının ham maddesi olan 316 L paslanmaz çelik yüzeyine bakterilerin tutunmaları ve biyofilm oluşum yetenekleri incelenmiştir. Bu amaçla, yüzey alanı 4 cm² olan 2.5x0.8x0.1 cm ebatlarında kestirilmiş 316 L pürüzsüz paslanmaz çelik kuponlar kullanılmıştır (Şekil 3.2.a). Kuponlar kullanılmadan önce, bir gece aseton içerisinde bekletilmiş olup, daha sonra 30 dk boyunca deterjanlı suda bekletilerek bir kez fırçalanmıştır. Daha sonra kuponlar, musluk suyu ile durulanmış ve üç kez distile su ile yıkanıp, kurumaya bırakılmıştır. Kuponlar kuruduktan sonra alüminyum folyoya sarılarak 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. Steril edilmiş çelik kuponlar, 3.5 mL tuzsuz TSB besiyeri içeren tüplere steril bir ortamda konulmuş ve besiyeri ile beraber ikinci kez 121°C'de 15 dk steril edilmiştir (Şekil 3.2.b). Ayrıca, kuponlar üzerinde oluşan biyofilmleri parçalamakta kullanılacak olan cam boncuklar (r: 3 mm), 4.5 mL SF içeren tüplere eklendikten sonra 121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

Bakterilerin ön aktifleştirmeye işlemleri sonrasında, son aktif kültürden 1 mL alınarak paslanmaz çelik kupon içeren besiyerine inoküle edilmiş ve 48 saat statik koşullarda uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda çelik kuponlar, aseptik koşullarda steril penslerle alınmış ve planktonik hücreleri uzaklaştırmak amacıyla, bir kez 10 mL'lik steril SF bulunduran tüplere daldırılarak yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra, paslanmaz çelik kuponlarda oluşan biyofilmler cam boncuk ile vorteksleme ve kazıma olmak üzere iki farklı işleme tabi tutularak, bu iki işlem arasındaki başarı oranı belirlenmiştir.

İlk işlem olan cam boncuk ile vorteksleme sürecinde, yıkanan kuponlar cam boncuk içeren 4.5 mL SF bulunan tüplere konulmuştur (Şekil 3.2.c). Daha sonra tüpler yüksek devirde 2 dk boyunca vortekslenmiştir. Vorteksleme işleminden sonra bakteri hücrelerini saymak için 10^{-1} 'den 10^{-5} 'e kadar seri dilüsyon yapılmıştır. Dilüsyonlardan 100 µL alınarak MI agar petrilere yayma ekim yapılarak, 18-24 saat boyunca uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 30-300 arasında koloni bulunduran petrilere sayılmıştır. Koloni sayımı hesabı yapılırken, kuponun yüzey alanı göz önünde bulundurulmuş olup, koloni oluşturma birimi (CFU) 4'e bölünmüştür. Sonuçlar, birim alana (cm^2) düşen koloni oluşturan birimin logaritması alınarak $\log_{\text{CFU}/\text{cm}^2}$ cinsinden hesaplanmıştır.

İkinci işlem olan kazıma deneyinde ise, yıkanan kuponlar aseptik koşullarda 3.5 cm'lik steril petrilere alınarak, üzerine 4.5 mL SF eklenmiş ve steril plastik öze ile kazıma işlemi yapılmıştır (Şekil 3.2.d). Kazıma işleminden sonra ilk işlemde uygulandığı üzere seri dilüsyon yapılmıştır. Dilüsyonlardan 100 µL alınarak MI agar petrilere yayma ekim yapılarak, 18-24 saat boyunca uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar yine $\log_{\text{CFU}/\text{cm}^2}$ cinsinden hesaplanmıştır. Negatif kontrol olarak sadece çelik kupon içeren test tüpleri uygun sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. Bu çalışmanın yapılmasının en önemli sebebi, mikrotitrasyon plakalarının ham maddesi polistirenin yanısıra, çelik gibi farklı bir yüzey daha deneyerek, giderim çalışmalarında kullanmak üzere doğru mikroorganizmanın seçilebilmesidir.



Şekil 3.2 Paslanmaz çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşumlarının incelenmesi

a. Çelik kupon (2.5x0.8x0.1 cm), b. Besiyerine ilave edilen çelik kupon, c. SF içerisinde bulunan cam boncuklar (8 adet) ve çelik kupon, d. Mekanik giderim yöntemlerinden kazıma işleminin uygulanışı

3.2.8 Bakterilerin optimum pH, tuz ve sıcaklıklarının spektrofotometrik tayini

Bakterilerin mikrotitrasyon plakalarında optimum pH, tuz ve sıcaklıklarının belirlenmesi için ön aktifleştirmeye sonrası, toplam hacim 200 μ L olacak şekilde, kuyulara 190 μ L TSB besiyeri ve 10 μ L aktif kültür aşılanmıştır. Mikrotitrasyon plakalar, 0., 6., 18., 24. ve 48. saatlerde Eliza okuyucusunda her parametre için üç tekrarlı olacak şekilde OD_{595nm}'de ölçülmüştür. Kontrol olarak sadece optimum koşullara ayarlanmış inokülüm içermeyen TSB besiyeri kullanılmıştır. Uygulanan optimum pH, tuz ve sıcaklık aralıkları çizelge 3.4'de belirtilmiştir. Çalışmalar 3 paralel olacak şekilde yürütülmüştür.

Çizelge 3.4 Uygulanan pH, tuz ve sıcaklık aralıkları

Optimum	Uygulanan aralıklar
pH	4.0 , 5.0 , 6.0 , 6.5 , 7.0 , 7.5 , 8.0 , 8.5 , 9.0 , 9.5 , 10.0 , 11.0
Tuz	% 0 , % 1.0 , % 1.5 , % 2.0 , % 2.5 , % 3.0 , % 3.5 , % 4.0 , % 4.5 , % 5.0
Sıcaklık	50°C , 55°C , 60°C , 65°C

3.2.9 Bakterilerin biyofilm oluşum miktarlarının farklı pH, tuz ve sıcaklıklarda spektrofotometrik tayini

Bakterilerin gelişimleri için gerekli optimum pH, tuz ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesinin ardından, onları biyofilm oluşumuna itecek optimum biyofilm gelişimi için gerekli pH, tuz ve sıcaklık değerleri, 48. saat sonunda kısımlar 3.2.6’da anlatıldığı üzere uygulanan kristal viyole boyaması sonucunda belirlenmiştir. alışmalar 3 paralelli yrtlmştir. Bu kısımdan sonra gerçekleştirilen tüm deneyler, bakterinin biyofilm oluşumu için ihtiyaç duyduğu optimum pH, tuz ve sıcaklık değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.10 Bakterilerin optimum şartlarda paslanmaz elik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşumlarının incelenmesi

Bakterilerin n aktifleştimeleri sonrası, bakterilerin belirlenen optimum pH, tuz ve sıcaklık değerlerine göre TSB besiyeri içerisindeki elik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşumları kısımlar 3.2.7’de belirtildiği üzere yapılmıştır. Bu alışma sonucunda elde edilen bulgulara göre, biyofilmin yüzeyden kaldırılması için belirlenmiş en ideal mekanik giderim yöntemi, bundan sonraki tüm çalışmalarda uygulanmak üzere seçilmiştir.

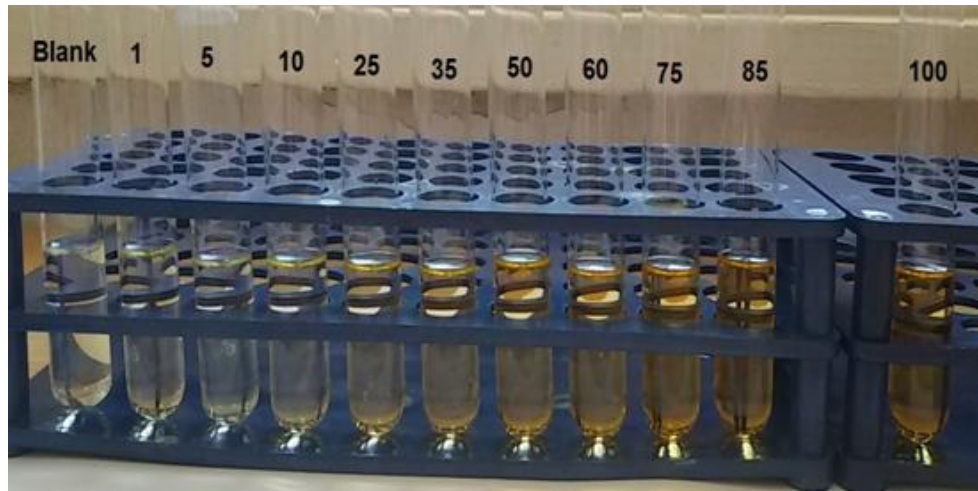
3.2.11 Bakterilerin ekzopolisakkarit bileşenlerinin belirlenmesi

Biyofilmin EPS bileşenleri olan, karbonhidrat, protein ve eDNA içerikleri çalışılmıştır. Biyofilmin EPS bileşenleri incelenirken n aktifleştirme işlemi sonrası, son aktif kültürden TSA besiyerine 200 μ L ekim yapılarak 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda TSA besiyeri yüzeyinden yaklaşık 0.1 g bakteri peleti toplanmıştır. Bu hücreler daha sonra 2 mL SF ile ezilerek ve vortekslenerek iyice zlmştir. SF ile üzülen pelet, daha sonra 13.000 rpm’de 7 dk boyunca santrifüj edilmiştir. st faz başka bir ependorfa alınarak 0.22 μ m’lik membran filtrelerden geçirildikten sonra tamamen hücrelerden arındırılmıştır. Bu filtre edilmiş süpernatant kısmı EPS içeriklerinden karbonhidrat, protein ve eDNA tayininde, pelet kısmı ise biyofilm hücrelerinin genomik DNA alışmaları için kullanılmıştır.

3.2.11.1 EPS bileşenlerinden karbonhidrat içeriğinin tayini

EPS bileşeninde bulunan karbonhidrat miktarının tayini fenol-sülfürik asit metodu ile gerçekleştirilmiştir (Dubois vd. 1956). Cam tüplere, 1 mL örnek, 0.5 mL %5'lik fenol (Merck 1.00206), 5 mL derişik sülfürik asit (Merck 1.00713) eklenmiştir. Tüpler, oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra iyice vortekslenmiş ve 30°C'lik etüvde 20 dk bekletilmiştir. Meydana gelen portakal-sarı renk değişimi, OD_{490nm}'de okutulmuştur. Standart eğri elde etmek için 5, 10, 25, 35, 50, 60, 75, 85, 100 µg/mL olacak şekilde glukoz (Merck 1.08342) çözeltileri hazırlanarak fenol-sülfürik asit metodu uygulanmıştır (Şekil 3.3). Standart eğri yardımıyla Eliza'da okunan absorbans değerine karşılık gelen karbonhidrat miktarı hesaplanmıştır. Kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Çalışmalar 3 paralelli yürütülmüştür.

Serbest metil eterleri veya potansiyel olarak serbest indirgeyici gruplar içeren basit şekerler, oligosakkaritler, polisakkaritler ve onların türevleri, fenol ve konsantre sülfürik asit ile muamele edildiğinde portakal-sarı renk verir. Bu reaksiyon çok duyarlı olup renk sabit kalır. Kullanılan bu fenol-sülfürik asit metodu şekerlerin ve ilgili maddelerin çok düşük miktarlarını dahi saptayabilmektedir (Dubois vd. 1956).



Şekil 3.3 Farklı konsantrasyonlarda standart olarak kullanılan glukoz çözeltileri

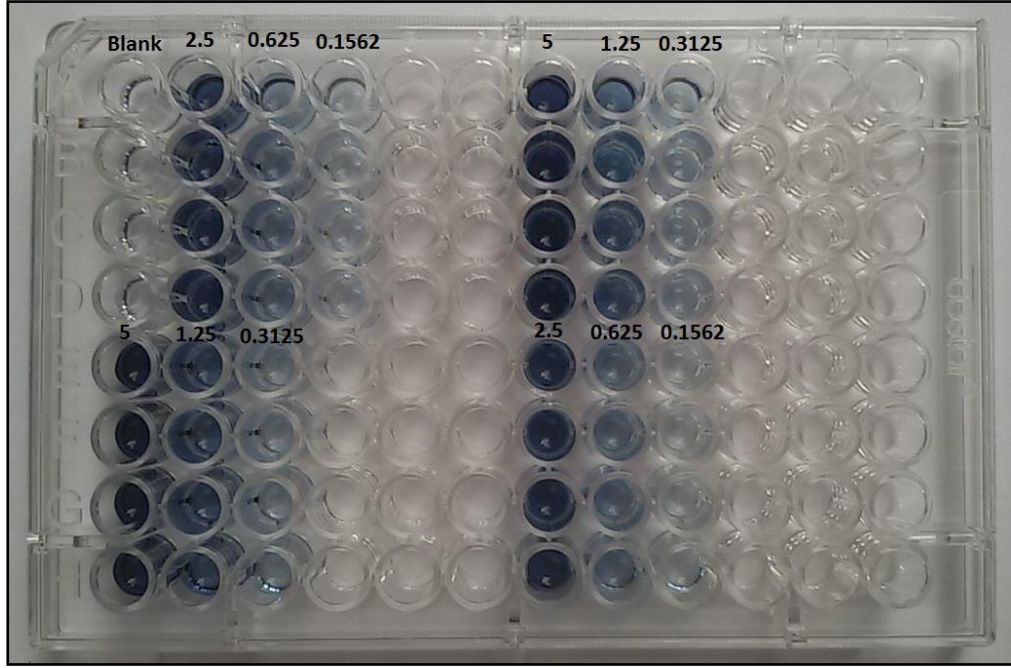
3.2.11.2 EPS bileşenlerinden protein içeriğinin tayini

EPS bileşenlerden olan, protein içeriğinin tayini için Lowry vd. (1951) tarafından tanımlanmış metod modifiye edilerek çalışılmıştır. Buna göre, ependorf tüplerine 1 mL örnek, 3 mL C reaktifi (C reaktifi 100:1 oranında A ve B reaktifi karışımından oluşur) eklenmiştir. A ve B reaktifi içerik ve miktarları çizelge 3.5’de verilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 30 dk bekletilerek, 300 µL folin-fenol reaktifi (Sigma F9252) eklendikten sonra vortekslenmiştir. Örnek tekrar oda sıcaklığında 45 dk bekletilmiş ve OD_{660nm}’de okutulmuştur. Kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Çalışmalar 3 paralelli olacak şekilde yürütülmüştür.

Çizelge 3.5 Protein tayininde kullanılan A ve B reaktifi içerik ve miktarları

Kimyasal	Miktar	Marka
A reaktifi		
Na ₂ CO ₃	% 2	Sigma S7795
NaOH (0.1 M)	% 0.4	Merck 1.06482
Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ . 2H ₂ O	% 0.16	Merck 1.06663
B reaktifi		
CuSO ₄ .5H ₂ O	% 4	Sigma C8027

Standart eğri elde etmek için, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 ve 0.1562 mg/mL oranlarında dilüsyon yapılarak Bovine Serum Albumin (Sigma A-2153) çözeltileri hazırlanmış ve Lowry metodu uygulanmıştır (Şekil 3.4). Standart eğri yardımıyla Eliza’da okunan absorbans değerine karşılık gelen protein miktarı hesaplanmıştır. Protein miktar tayininde tüm örnekler 4 tekrarlı çalışılmıştır.



Şekil 3.4 Protein konsantrasyonu için standart olarak kullanılan BSA'nın kalibrasyonu

3.2.11.3 EPS bileşenlerinden eDNA içeriğinin tayini

EPS bileşenlerden olan eDNA izolasyonu için öncelikle filtre edilen üst faza, 750 μ L kloroform-izoamil alkol (24:1 oranında) eklenmiştir. 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst faz yeni bir ependorfa alınmıştır. Üzerine 750 μ L fenol-kloroform-izoamil alkol (25:1:1 oranında) eklenerek tekrar 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst fazın üzerine hacminin 0.6'sı (yaklaşık 350 μ L) kadar izoproponal eklenmiştir. -20°C'de 20 dk bekletilmiş ve tekrar 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı dökülmüş, çökelti üstüne 350 μ L %70'lik soğuk etanol (Scharlau ET0013) eklenmiştir. Tekrar 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. eDNA içeren pelet oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra 30 μ L Tris-EDTA (TE) tamponu ile çözülerek üzerine 5 mg/mL'lik RNaz A'dan (Sigma R6513) 4 μ L eklenmiş ve 37°C'de 45 dk bekletilmiştir (Wilson 1987). eDNA konsantrasyonu (ng/ μ L) ve saflığı için 260/280 ve 260/230 oranları nanodrop cihazı (Thermo Scientific NanoDrop Lite) ile ölçülmüştür. Daha sonra, örnekler 1.5 μ L etidyum bromür (Sigma E-8751) içeren %1.5'lük agaroz (Sigma A9539) jel elektroforezinde 120 V'da 1 saat yürütülmüş ve UV translüminatör

ile görüntülenmiştir. eDNA örneklerinin moleküler ağırlıkları, Quantum-Capp software görüntüleme sistemi yardımıyla kilobaz (kb) cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.12 Biyofilm hücrelerinin genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu, Gram pozitif bakterilerin izolasyonu için uygun DNA izolasyon kiti (Genomic DNA purification kit, Thermo K0512) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA izolasyonundan sonra, örneklere 5 mg/mL RNaz A enziminden 4 µL eklenmiştir. Daha sonra, 37°C'de 30 dk inkübe edilerek RNA'lar uzaklaştırılmıştır. Ardından, 300 µL %100'lük soğuk etanol eklenerek, -20°C'de 1 gece bekletildikten sonra 13.000 rpm'de 7 dk santrifüj edilmişlerdir. Üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra, üzerine 300 µL %70'lik soğuk etanol eklenmiş ve 13.000 rpm'de 7 dk santrifüj edilmiştir. Tekrar üst kısım uzaklaştırılarak, genomik DNA içeren peletler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra örnekler, 50 µL TE tamponu ile çözülmüştür. Genomik DNA konsantrasyonu (ng/µL) ve saflığı için 260/280 ve 260/230 oranları nanodrop cihazı ile ölçülmüştür. Daha sonra, örnekler 1.5 µL etidyum bromür içeren %1.5'lük agaroz jel elektroforezinde 120 V'da 1 saat yürütülmüş ve UV translüminatör ile görüntülenmiştir. Genomik DNA örneklerinin moleküler ağırlıkları, Quantum-Capp software görüntüleme sistemi yardımıyla kb cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.13 Bakterilerin oluşturduğu olgun biyofilmlerin DNaz I enzimi ile muamelesi sonucu eDNA'nın fonksiyonunun belirlenmesi

Bu uygulama, Grande vd. (2010) tarafından önerilen yöntemle gerçekleştirilmiştir. Mikrotitrasyon plakalarına, toplam hacim 100 µL olacak şekilde, optimum koşullarda hazırlanan TSB besiyerinden 95 µL ve son aktif kültürden 5 µL eklenerek, 40 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, dolu kuyular boşaltılarak, planktonik fazdaki bakteri hücrelerini uzaklaştırmak amacıyla SF ile yıkanmıştır. Boşaltılan biyofilm kaplı kuyulara, konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde SF ile çözülmüş 100 µL DNaz I enzimi (Sigma DN25) eklenmiştir. Kontrol örneklerini (yalnızca biyofilm örneği) içeren kuyulara tampon olarak 100 µL SF ilave edilmiştir. Biyofilm örnekleri, sırasıyla 2, 4, 8

ve 12 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyular boşaltılarak, 2 kez SF ile yıkandıktan sonra Kısım 3.2.6’da anlatıldığı üzere uygulanan kristal viyole boyaması uygulanmıştır. Çalışmalar 8 paralelli yürütülmüştür.

3.2.14 Genomik DNA ve eDNA’nın RAPD-PCR ile incelenmesi

Bu çalışmada, genomik DNA ve eDNA’lar üzerinde OPR-1, OPR-2, OPR-10, OPR-13, OPR-15, OPR-20, P1254 ve P1283 primerleri kullanılarak yürütülen Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PCR (RAPD-PCR) analizi ile DNA parmak izi profilleri çıkarılmaya çalışılmıştır (Ronimus vd. 1997). Birden fazla primer denendiğinden, primere bağlı olarak OPR-13 için denenen reaksiyon bileşenleri (Çizelge 3.6) ve koşulları (Çizelge 3.7) primere bağlı olarak gerektiğinde modifiye edilmiştir.

Çizelge 3.6 RAPD-PCR reaksiyon konsantrasyonları

Reaksiyon bileşenleri	Konsantrasyonlar (1X)	Marka ve kodları
10X Taq Buffer + KCl	5.0 µL	Thermo Lot 00230606
10 mM dNTP	1.0 µL	Thermo R0192
10 pmol OPR-13 primeri	7.5 µL	Thermo
500 U Taq DNA Polimeraz	0.3 µL	Thermo #EP0402
25 mM MgCl ₂	5.0 µL	Thermo Lot 00225302
200 ng kalıp DNA	2.0 µL	
Apirojenik su	29.2 µL	
Toplam	50.0 µL	

Çizelge 3.7 RAPD-PCR reaksiyon koşulları

Başlangıç denatürasyonu	94°C’de 3 dk 45 sn	
Denatürasyon	94°C’de 15 sn	} 35 döngü
Primer bağlanması	32°C’de 15 sn	
Zincir uzaması	72°C’de 2 dk	
Son zincir sonlanması	72°C’de 4 dk	
	4°C∞	

Amplifikasyon işlemi, termal döngü cihazında (Bio-rad C1000) gerçekleştirilmiştir. PCR ürünlerindeki DNA bant profilinde bulunan farklılıklar, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo, #SM1333) kullanılarak etidyum bromür içeren %1.5'lük agaroz jelde 120 V'da 1 saat elektroforeze tabii tutulduktan sonra, jel görüntüleme ve analiz sisteminde (Vilber Lourmat Quantum ST4 Gel Documentation System) görüntülenmiştir.

3.2.15 DNaz I, RNaz A ve Proteinaz K enzimlerinin genomik DNA ve eDNA üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

İzole edilen genomik DNA ve eDNA'ların konsantrasyonları 200 ng/mL olacak şekilde ayarlandıktan sonra, DNaz I (Sigma DN25), RNaz A (Sigma R6513) ve Proteinaz K (Sigma P2308) enzimleri ile muamele edilmişlerdir. 200 ng/mL'lik eDNA ve genomik DNA örneklerinden 10 µL alınarak, DNaz I (1.45, 1.7, 2.5 ve 3.0 mg/mL), RNaz A (0.90 mg/mL) ve Proteinaz K (0.85 mg/mL) enzimleri ile 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Enzim ile muamele edilmemiş örnekler, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. DNA örnekleri, %1.5'lük agaroz jelde 120 V'da 1 saat elektroforez uygulandıktan sonra, jel görüntüleme ve dökümantasyon sisteminde görüntülenmişlerdir.

3.2.16 Bakterilerin çeşitli abiyotik yüzeylerde oluşturdukları biyofilm yapılarının incelenmesi

Çalışma için kullanılacak bütün yüzeyler, besiyeri ortamına eklenmeden önce dezenfektan olarak izoproponalde (Sigma 24137) 1 gece bekletildikten sonra, 30 dk deterjanlı suyla muamele edilmiş ve bu süre zarfında 1 defa fırçalanarak ajite edilmiştir. Daha sonra önce musluk suyu ardından distile su ile iyice durulanarak, steril edilmiştir.

Altı kuyucuklu polistiren mikrotitrasyon plakaların her bir kuyusuna daha önceden steril edilmiş polikarbonat (PK), polipropilen (PP), polistiren (PS), polivinil klorür (PVC), paslanmaz çelik ve cam tabiatında olan 6 farklı abiyotik yüzey konulmuştur (Şekil 3.5). Daha sonra, toplam hacim 4.5 mL olacak şekilde, 3.5 mL TSB besiyeri ve biyofilm oluşumu için ön aktifleştirme işleminden elde edilen son aktif kültürden 1 mL eklenerek, 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuponlar steril pens ile

alınarak, planktonik hücrelerin ortamdaki uzaklaşması için SF ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kuponlar, 4.5 mL SF ve cam boncuk içeren tüplere alınarak, steril plastik öze ile kazıma işlemi uygulanmış ve maksimum hızda 2 dk vortekslenmiştir. Daha sonra, koloni oluşturan birimi hesaplamak için, MI agar besiyerine drop plate yöntemi ile (Herigstad vd. 2001) ekim yapılmıştır. Ardından petriler 18-24 saat inkübe edilmiştir. Cam boncuk ile vorteksleme işlemi, Giaouris ve Nychas (2006) tarafından tanımlanmış metod modifiye edilerek yapılmıştır.



Şekil 3.5 Çalışmalarda kullanılan abiyotik yüzeyler

Kullanılan 14 mm çaplı kuponların her iki dairesel yüzey alanı toplam 3.08 cm^2 olarak hesaplanmıştır. Birim alana (cm^2) düşen koloni oluşturan birimin hesaplanması için de toplam koloni oluşturan birim sayısı, yüzey alanına (CFU/cm^2) bölünmüştür. Belirlenen bu (CFU/cm^2) değerinin logaritması alınarak sonuç $\log_{\text{CFU}/\text{cm}^2}$ cinsinden hesaplanmıştır. Aynı örneğe ait iki kuponun iki paralelli çalışılmasıyla tüm yüzey için hesaplanan ortalama koloni sayısı belirlenmiştir.

3.2.17 Polistiren mikrotitrasyon plakalarında geliştirilen bakterilerin biyofilm yapılarının çeşitli kimyasal maddeler ile giderimi

Bu çalışmada, antibakteriyel ve antioksidan ajanlar, proteaz ajanları, polisakkarit giderici ve parçalayan ajanlar ile sinyal reseptörleri inhibe eden ajanlar gibi çok çeşitli amaçlarda 15 farklı kimyasal madde veya enzim kullanılmıştır. Bu kimyasalların etkili dozlarının tespit edilmesinde çizelge 3.8’de atıf yapılan makalelerdeki dozlar ve süreler doğrudan kullanılmış veya daha etkili sonuçlar elde edilebilmesi adına bazı ajanlarda koşullar yeniden belirlenmiştir (Çizelge 3.8’de * ile işaretli ajanlar). Test edilen giderim

parametreleri, çeşitli kimyasal temizleyicilerin kullanım miktarına, sıcaklığına ve süresine bağlı olarak ayarlanmıştır. Her bir kimyasal ve enzim ajanı tek başına kullanılmış, ancak biyofilm örneği sadece potasyum monopersülfat ajanının ardısıra sodyum tiyosülfat ile ikili kombinasyonda muamele edilmiştir. Kontrol grubu, biyofilm yapısının kimyasal veya enzim ile muamele edilmediği kuyular olarak kabul edilmiştir.

Giderim çalışmalarında mikrotitrasyon plakalarına, toplam hacim 100 µL olacak şekilde, TSB besiyerinden 95 µL ve son aktif kültürden 5 µL eklenerek, optimum koşullarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, kuyulardaki besiyerleri boşaltılmış ve bağlanmayan hücreler ile hücre kalıntılarını gidermek için kuyular iki defa SF ile yıkanmıştır. Daha sonra, kuyularda tutunan biyofilmler, kimyasallar veya enzimler ile muamele edilmiştir. Sonrasında kuyular boşaltılmış ve bu sefer ajanların kalıntılarını gidermek için 2 defa SF ile yıkanmıştır. Ardından, biyofilmlerin miktarını belirlemek üzere mikrotitrasyon plakalarının Kısım 3.2.6'da anlatıldığı şekilde kristal viyole ile boyanması sonrası, tutunan biyofilmlere bağlanan boya miktarı Eliza'da spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Uygulanan kimyasal temizleme rejiminin başarısı, bakterilere uygulanan her kimyasal veya enzim için % giderim oranı cinsinden hesaplanmıştır. Enzim aktivitesine bağlı olarak biyokütle miktarında meydana gelecek olası değişimler $[(C-B)-(T-B)] / [(C-B)] \times 100$ formülü esas alınarak hesaplanmıştır (C; biyofilm içeren kontrol kuyuları, B; sadece besiyeri içeren kuyular, T; kimyasal veya enzim ile muamele edilmiş kuyular), (Pitts vd. 2003).

Çizelge 3.8 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal temizleme prosedürleri ve kullanım amaçları

Kimyasal – Enzimatik Ajan	Marka ve kodları	Referansta uygulanan ajan miktarı	Tezde çalışılan miktar	Çözüldüğü tampon	Ortam sıcaklığı	Süre	Referans
Karbonhidratlara etki eden ajan							
Sodyum metaperiodat*	Sigma 71859	50 mM	100 mM	dH ₂ O	22 °C	60 dk	Parkar vd. 2003
Makromolekülleri çöktüren ajan							
Trikloroasetik asit	Sigma 27242	% 10	% 10	dH ₂ O	100 °C	15 dk	Parkar vd. 2003
Hücre duvarı bütünlüğünü bozan ajan							
Lizozim	Sigma L-7651	% 2	% 2	10 mM Tris-HCl	37 °C	60 dk	Parkar vd. 2003
Proteinleri parçalayan ajan							
Sodyum dodesil sülfat *	Sigma L-5750	% 2	% 3	dH ₂ O	100 °C	10 dk	Parkar vd. 2003
Tripsin	Sigma T2600000	% 2	% 3	50 mM Tris-HCl	37 °C	3 saat	Parkar vd. 2003
Pro-oksidanlar							
Potasyum monopersülfat *	Sigma 228036	1 mg/mL	2 mg/mL	SF	22 °C	30 dk	Parkar vd. 2003
Sodyum tiyosülfat*	Sigma 72049	9 mg/mL	10 mg/mL	dH ₂ O	22 °C	5 dk	
Antibakteriyel bakteriyosin ajan							
Nisin*	Sigma N5764	1 mg/mL	2 mg/mL	0.02 M HCl	37 °C	24 saat	Bozianis ve Adams 1999
Enzime dayalı temizleyiciler							
a. Proteaz ajanları							
Alkalen proteaz*	Sigma P4860	% 0.08	0.16 U/g	50 mM Glisin-NaOH	37 °C	60 dk	Parkar vd. 2004
Proteaz*	Sigma P3111	% 0.09	0.16 U/g	50 mM Sodyum asetat	37 °C	60 dk	Parkar vd. 2004
Subtilizin*	Sigma P5380	% 0.5	% 1	0.1 M Borat, 0.1 M CaCl ₂	37 °C	30 dk	Parkar vd. 2004
b. Polisakkarit parçalayan ajanlar							
α-Amilaz*	Sigma A4551	% 0.5	% 1	20 mM Sodyum fosfat, 6.7 mM NaCl	37 °C	30 dk	Parkar vd. 2004
Selülaz*	Sigma C1184	% 0.3	% 1.66	50 mM Sodyum asetat	37 °C	30 dk	Parkar vd. 2004
Bakteriler arası iletişimi engelleyen ajanlar							
a. Sinyal reseptörleri inhibe edenler							
Furanon	Sigma 283754	1 mg/mL	1 mg/mL	dH ₂ O	22 °C	60 dk	Ponnusamy vd. 2010
b. Sinyal molekülü yapımını engelleyenler							
Trikloran*	Sigma PHR1338	1 mg/mL	2 mg/mL	% 50 Etanol	22 °C	60 dk	Tabak vd. 2007

*Giderim için kullanılan kimyasal veya enzim konsantrasyonu, referans makalelerdeki miktarlardan farklı olarak modifiye edilmiştir.

3.2.18 *Aeribacillus pallidus* E334'ün en uygun iki abiyotik yüzeyde oluşturduğu biyofilmlere giderim öncesi ve sonrası uygulanan işlemler

Yapılan çalışmalar doğrultusunda, termofilik olması ve yüksek miktarda biyofilm üretebilmesi nedeniyle biyofilmin giderim öncesi ve sonrası daha detaylı kültürel ve mikroskopik çalışmalar sadece *Aeribacillus pallidus* E334 izolatu ile yürütülmüştür. İzolatu en iyi biyofilm ürettiği iki yüzey (polipropilen, cam) ve giderim ajanı (alkalen proteaz, SDS) kullanılarak, giderim öncesi ve sonrası olmak üzere, canlı ve ölü hücre yoğunlukları, üç boyutlu biyofilm kalınlığı ve biyofilm morfolojileri Konfokal Lazer Taramalı Mikroskobu (CLSM) ile incelenmiştir.

Bakterinin ön aktifleştirme işlemi, son aktif kültürden 6 kuyucuklu plakalara inokülasyon, koloni sayımı için yapılan seri dilüsyon ve koloni sayımı ekimleri ile kuponların sterilizasyonu, kısım 3.2.16'da anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Biyofilm oluşumu için aynı materyalden oluşan her bir kupondan 5'er tekrar olacak şekilde 20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuponlar steril pens ile alınarak, planktonik hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması için SF ile yıkanmıştır.

Yıkama işleminden sonra her biri aynı cins materyalden oluşan kupona, 4 farklı işlem uygulanmıştır. Bu kuponlardan ilk ikisi biyofilm oluşumu (herhangi bir giderim ajanı uygulanılmayan), diğer ikisi ise biyofilmin giderimi için kullanılmıştır. Beşinci kupon ise çalışmada negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Birinci işlemde, polipropilen ve cam yüzeylerde oluşan biyofilmlerdeki canlı hücre sayılarını belirlemek amacıyla, hem kazıma hem de cam boncukla vorteksleme işleminden sonra doğrudan koloni sayımına geçilmiştir. Yüzeye tutunabilen ve koloni sayımında canlı kalabilen bakteriler, \log_{CFU/cm^2} cinsinden hesaplanmıştır. Bu kısımda kupon yüzeyinde hesaplanan \log_{CFU/cm^2} sayısı, kontrol grubu olarak giderim çalışmalarında kıyaslama amacıyla kullanılmıştır.

İkinci işlemde, polipropilen ve cam yüzeylerde oluşan biyofilm yapısı herhangi bir giderim ajanı uygulanmadan doğrudan CLSM ile incelenmiştir. Bu kısımda

mikroskopta belirlenen biyofilmdeki 3D canlı/ölü hücre yoğunluğu ve biyofilmin kalınlığı (μm cinsinden), kontrol grubu olarak giderim çalışmalarında kullanılmıştır.

Üçüncü işlemde, polipropilen ve cam yüzeylerde oluşan biyofilm yapısı, alkalen proteaz (ALP) ve SDS ile Çizelge 3.8'de belirtilen süre, miktar ve sıcaklıkta muamele edilmiştir. Süre sonunda kupon yüzeyi SF ile yıkandıktan sonra koloni sayımına alınmıştır. Yüzeye tutunabilen ve canlı olan bakteriler $\log_{\text{CFU}/\text{cm}^2}$ cinsinden hesaplanmıştır. Giderim stratejisinin başarısını belirlemek adına, birinci işlemde saptanmış olan $\log_{\text{CFU}/\text{cm}^2}$ değeri, kıyaslama amacıyla pozitif kontrol olarak alınmıştır. Bu üçüncü işlemde elde edilen $\log_{\text{CFU}/\text{cm}^2}$ değeri, birinci işlemdeki kuponun sonucundan çıkarılarak, koloni sayım sonucu neticesine bağlı olarak canlı hücrelerin yüzde giderim oranı olarak hesaplanmıştır.

Dördüncü işlemde ise, polipropilen ve cam yüzeylerde oluşan biyofilm yapısı ALP ve SDS ile çizelge 3.8'de belirtilen süre, miktar ve sıcaklıkta muamele edildikten sonra, CLSM ile incelenmiştir. Bu kısımda giderim sonrası mikroskopta belirlenen biyofilmdeki canlı/ölü hücre yoğunluğu, kontrol grubu olan ikinci işlemdeki hücre kütlesi oranları ile kıyaslanmıştır. Bu dördüncü kısımdan elde edilen canlı/ölü hücre yoğunluğu, ikinci işlemde elde edilen canlı/ölü hücre kütlelerinden çıkarıldıktan sonra, elde edilen nihai sonuç, mikroskobik olarak biyofilm kütleindeki % giderim oranı olarak belirlenmiştir.

Ayrıca, birinci işlemde hiç kimyasal ve mekanik ajan kullanılmadan oluşturulmuş doğal biyofilmlerdeki hücre ve biyofilm kütlesi yoğunlukları, pozitif kontrol olarak kabul edilmiş, bu ajanlarla muamele edilen biyofilmlerdeki oranlar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılık, biyofilm gideriminin bir başarı ölçütü olarak görülmüştür. Sonuçta, çalışılan yüzeylerde oluşan biyofilmin kütleindeki (μm) ve canlı hücre sayısındaki ($\log_{\text{CFU}/\text{cm}^2}$) azalma, biyolojik giderimin boyutu için bir indikatör olarak kullanılmıştır.

3.2.19 CLSM ile mikroskobik inceleme

Giderim öncesi (ikinci işlem) ve sonrası (dördüncü işlem) CLSM ile incelenecek kupon yüzeyleri, yıkama işleminin sonrası, eş zamanlı olarak 5 µM Syto 9 (Molecular probes, S34854) ve 15 µM Propidyum iyodür (PI, Molecular probes, P1304MP) ile boyandıktan sonra, 30°C'lik etüvde karanlık bir ortamda 20 dk bekletilmiş ve distile su ile yıkanmıştır (Bridier vd. 2010, Grande vd. 2010). Syto 9 boyası (floresan uyarı, 488 nm; emisyon, 498 nm), direk olarak canlı hücrelerle etkileşime girerek yeşil floresan ışık verirken, PI (floresan uyarı, 543 nm; emisyon, 617 nm), hücre zarı zarar görmüş ölü hücreler tarafından emilerek onların kırmızı spektrumunda floresan özellik göstermelerini sağlar (Vilain vd. 2009). PI aynı zamanda EPS matriksindeki eDNA'ların kırmızı floresan ile boyanmasında da iş görür (Mulcahy vd. 2008). Boyama işleminden sonra, kuponlar steril distile su ile iki kere yıkandıktan sonra, CLSM ile incelenene kadar karanlıkta 4°C'de saklanmıştır (Kolari vd. 1998). Negatif kontrol olarak, bakteri inoküle edilmemiş yüzeyler Syto 9 ve PI ile boyanarak kullanılmıştır.

Biyofilm örnekleri Carl Zeiss marka ve LSM 510 model CLSM ile incelenmiştir. Çalışmada Plan-Neofluar 40X/1.3 DIC yağ immersiyon objektif lensleri kullanılmıştır. Syto 9'un yeşil floresanı 488 nm'de argon lazer kaynağı, PI'nın ise kırmızı floresanı 543 nm'de helyum/neon lazer kaynağı kullanılarak uyarılmıştır. İki lazer kaynağını ayırmak için floresan iki farklı diakronik aynada BP 488/543 and LP 585 nm'de kaydedilmiştir. Biyofilm örneği için iki (yalnız x veya y eksenini: 230.34 x 230.34 µm) veya üç boyutlu yatay düzlem (x: 230.34 µm, y: 230.34 µm ve z eksenini: 1 µm) görüntülerini içeren her bir preparat için 4 farklı mikroskobik alan belirlenmiştir. 1 µm kalınlığında ince optik kesitlerle fotoğraflanan dijital görüntülerin analizleri, görüntü işlenmesi ve bu görüntülerin üç boyutlu yapılandırılması 'Carl Zeiss LSM Image Browser version 4.2.0.121' bilgisayar programı ile gerçekleştirilmiştir. CLSM ile görüntülenen en az 4 farklı alan sayesinde, canlı/ölü hücre yoğunlukları pozisyonları, üç boyutlu biyofilm kalınlığı (µm) ve biyofilm morfolojileri belirlenmiştir.

3.2.20 İstatistik analizler

Elde edilen sonuçların SPSS 17.0 istatistik programı ile değerlendirilmesinde, değerlerin ortalamaları arasındaki farkı anlamlandırmak için Tek yönlü varyans analizleri (ANOVA) ile bu analizlerin ileri aşamaları olan ve her bir grubu ikili olarak karşılaştırmak için ise, Tukey ve Dunnet testleri uygulanmıştır. $p < 0.05$ olasılık düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Biyofilm Üreticisi Bakterilerin Taranarak Seçilmeleri İçin Tez Çalışmaları Öncesi Yürütülen Tez Kapsamı Dışındaki Araştırmalar

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan endospor oluşturan 145 basil tez çalışmasından önceki ön çalışmalar kapsamında biyofilm üretim karakteristikleri açısından taranmışlardır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Ön çalışmalarda kullanılan izolat ve referans suşlar

Cinsler	Bakteri izolatları	Referans suşlar	Bakteri sayısı
<i>Anoxybacillus</i>	66	19	85
<i>Bacillus</i>	16	3	19
<i>Brevibacillus</i>	13	-	13
<i>Geobacillus</i>	10	10	20
<i>Aeribacillus</i>	4	1	5
<i>Paenibacillus</i>	1	-	1
<i>Thermolongibacillus</i>	-	2	2
Toplam	110	35	145

Bu ön çalışma kapsamında tür tanımları yapılmış *Bacillaceae* familyasının 7 farklı cinsine ait 110 izolat ve 35 referans suş olacak şekilde toplam 145 bakterinin biyofilm üretim kapasiteleri taranmıştır. Bu bağlamda, basillerin biyofilm oluşumunda önem arz eden ve hareket yeteneğinin kaynağı olan flagella tipleri belirlenmiş, kongo besiyerindeki koloni morfolojileri tayin edilmiş, kalkoflorlu besiyerinde ekzopolisakkarit bileşeni olan selülozun kullanımına bakılmış ve sıvı besiyeri yüzeyinin hava-sıvı ara yüzlerde pelikül oluşumunun varlığı gözlenmiş ve polistiren tabiatlı mikrotitrasyon plaklarının kuyularının yüzeyinde güçlü düzeyde biyofilm oluşturan bakteriler

belirlenmiştir. Daha sonra, yapılan çalışmalar sonucunda, 145 bakteri arasından 44 izolatın ve 21 referans suşun (65 izolat) mikrotitrasyon plakalarında çok yüksek miktarda biyofilm ürettikleri belirlenmiştir. Sonrasında ise yukarıdaki kriterlere göre seçilen 44 termofilik basil ve 10 referans suşun (54 bakteri), tüpler içerisine koyulan paslanmaz çelik kuponların yüzeyinde oluşturdukları biyofilm miktarlarına bakılmıştır.

Tezin temelini oluşturacak bu ön çalışmalar neticesinde, 54 basil arasından pelikül oluşturan, polistiren ve çelik yüzeylerde yüksek miktarda biyofilm üretebilen, kalkoflor katkılı besiyerinde EPS bileşenindeki karbonhidrat türevi polimerin varlığına bağlı olarak UV'de ışımaya yapan ve kongo kırmızılı besiyerinde koloni morfolojisi ile yayılımı yönünden farklılık gösteren, farklı türlere dahil olan nihai 6 aday bakteri seçilebilmiştir. Bu bakterilerden dördü termofilik üreme (*Geobacillus* sp. D413, *Geobacillus toebii* E134, *Aeribacillus pallidus* E334 ve *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127), ikisi ise fakültatif termofilik üreme (*Bacillus pumilis* D194a ve *Brevibacillus agri* D505b) yeteneğine sahiptir. Bu 6 bakterinin genel biyofilm üretim karakteristikleri çizelge 4.2'de sunulmuştur.

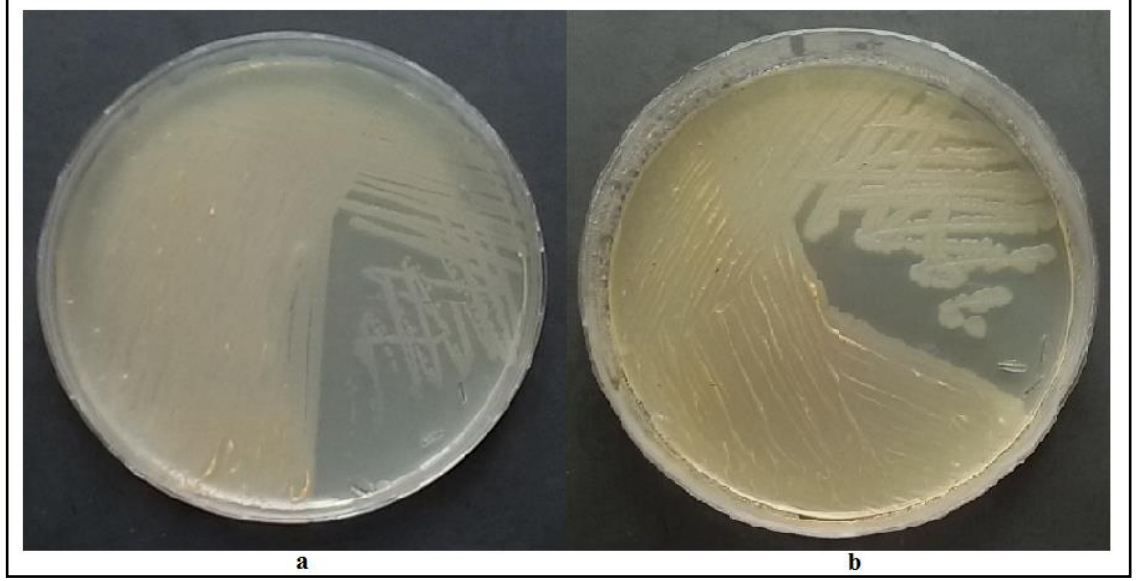
Çizelge 4.2 Ön çalışmalarda seçilen 6 termofilik basilin genel biyofilm üretim karakteristikleri

Analizler		Biyofilm üreticisi bakteriler					
		<i>Aeribacillus pallidus</i>	<i>Anoxybacillus rupiensis</i>	<i>Geobacillus</i> sp.	<i>Geobacillus toebii</i>	<i>Bacillus pumilis</i>	<i>Brevibacillus agri</i>
		E334	DSM 17127	D413	E134	D194a	D505b
TSB besiyerinde hava-sıvı ara yüzde pelikül oluşumu (96 h)							
Kongo besiyerinde koloni morfolojisi	Genel görünüm (1. gün)						
	Stereomikroskop görünümü (0.63 X) (2. gün)						
Kongo besiyerinde koloni morfolojisi	Genel görünüm (4. gün)						
	Stereomikroskop görünümü (0.63X) (4. gün)						
Kongo besiyerinde 4 günlük üreme sonunda koloni çapındaki değişim		0.5 cm	1.2 cm	0.55 cm	0.55 cm	0.2 cm	0.4 cm
Kalkoflor besiyerinde selüloz kullanımına bağlı ışımaya (UV görüntüsü) (24 h)							
Kalkoflor besiyerinde EPS bileşeni olarak selüloz veya türevinin kullanımı		+	+	+	+	+	+
Flagella tipi (6 h)		 Monotriş	 Lofotriş		 Monotriş	 Peritriş	 Lofotriş
Polistiren mikrotitrasyon plakalarındaki biyofilm oluşum miktarları (48 h)		0.308 (55°C) (Güçlü üretici) 1.116 (65°C) (Güçlü üretici)	0.190 (55°C) (Güçlü üretici) 0.006 (65 °C) (Üretici değil)	0.528 (55°C) (Güçlü üretici) 0.862 (65°C) (Güçlü üretici)	0.340 (65°C) (Güçlü üretici) 0.148 (55°C) (Güçlü üretici)	3.051 (45°C) (Güçlü üretici)	3.365 (45°C) (Güçlü üretici)
		65°C	55°C	65°C	55°C	65°C	45°C
Paslanmaz çelik yüzeylerde oluşturdukları biyofilmlerdeki canlı hücre sayıları (48 h), (log _{CFU} /cm ²)	Kazıma	4.79	4.30	4.80	3.67	2.77	6.34
	Cam boncuk ile vorteksleme	4.33	4.24	3.93	2.88	2.01	5.37

4.2 Ön Çalışmalarda Belirlenen ve Tez Çalışmasına Dahil Edilen İki Biyofilm Üreticisi Termofilik Basilin Genel Biyofilm Üretim Karakteristikleri

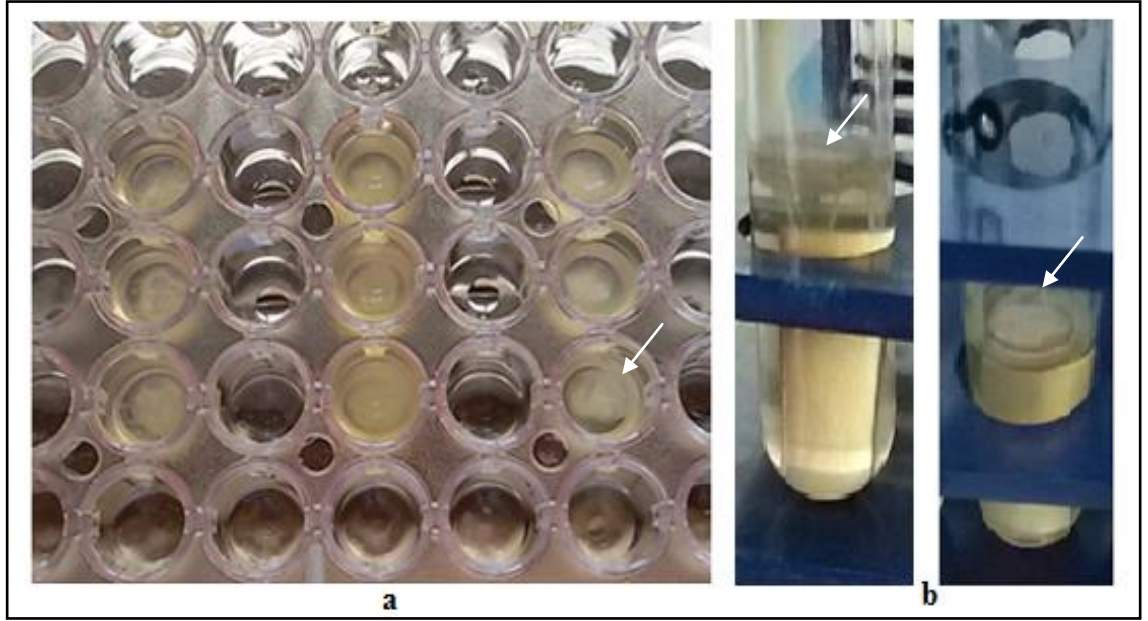
D413, E134, E334, DSM 17127, D194a ve D505b kodlu 6 aday bakteri arasından tez çalışmasına sadece *Aeribacillus pallidus* E334 ve *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127 seçilerek dahil edilmiştir. Tez çalışması kapsamına alınan bu bakteriler termofilik üreme göstermeleri, mikrotitrasyon plakası kuyucuklarının yanısıra çelik kupon yüzeylerine de iyi tutunabilmeleri ve çizelge 4.2’de sunulan diğer genel biyofilm üretim karakteristikleri de değerlendirilerek, giderim çalışmalarında daha etkili olacakları sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla, bundan sonra tez kapsamında olan tüm çalışmalar, *A. pallidus* E334 izolatu ve sonuçların kıyaslanması amacıyla referans olarak da *A. rupiensis* DSM 17127 suşu ile yürütülmüştür (Şekil 4.1). Çizelge 4.2’de sunulan sonuçlara göre hem E334 izolatu hem de DSM 17127 suşunda 55°C ve 65°C’de sıvı besiyerinde pelikül oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Ancak, pelikül oluşumunun yaklaşık 36 saatten sonra tüpün dibine doğru çöküntü oluşturduğu tespit edilmiştir. Her iki termofilik basilin de sıvı-hava ara yüzde kırılğan peliküller oluşturdukları belirlenmiştir. Kalkoflorlu besiyerinde her iki bakteri UV ışığı altında pozitif sonuç vermiş olup, ekzopolisakkarit bileşeni olan selüloz veya onun bir türevini üretebildikleri görülmüştür. Kongo kırmızısı besiyerindeki koloni morfolojileri sonuçlarına göre ise, 1. gün ve 4. gün arasındaki kolonilerin çap büyüklüğü ve renginin koyulaşması biyofilm çalışmaları için önemli kriterler arasındadır. E334 kodlu izolatu 1. ve 4. gün arasındaki koloni çapındaki artış 0.5 cm ölçülürken, DSM 17127 kodlu suşun çapı 1.2 cm olarak ölçülmüştür. Kongo kırmızılı besiyerinde E334 izolatının kolonisi yuvarlak, basık, kenarları dalgalı, yüzeyi düz ve parlak bir morfotip sergilemiş olup, koloninin kenarında kırmızı bir halka oluşumu mevcuttur. DSM 17127 suşu ise bu besiyerinde eşsiz bir koloni morfotipi göstermiştir. Portakal rengi ile kırmızı arası, yuvarlak ancak loblu kenarlara sahip, göbekli ve yüzeyi çok pürüzlü bir koloni yapısı sergilemiştir. Koloni ortasında çok belirgin bir halka oluşumu mevcut olup, yayılımcı özelliği yüksektir ve yüzeyinde ise bundle denilen çok miktarda pürüzlü oluşumlar söz konusudur. Mikrotitrasyon plakalarda 96 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen sonuçlara göre, her iki bakteri de 55°C’de güçlü biyofilm üreticisi olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3); ancak E334 kodlu izolatu 65°C’de (OD_{595nm} 1.116), DSM 17127 kodlu suşun ise 55°C’de (OD_{595nm} 0.190) daha iyi biyofilm ürettikleri gözlemlenmiştir. Ayrıca, DSM

17127 suşunun paslanmaz çelik yüzeye tutunan canlı hücre sayısı 55°C’de 4.30 $\log_{\text{CFU/cm}^2}$ bulunurken, E334 izolatu 65°C gibi daha yüksek bir sıcaklıkta 4.79 $\log_{\text{CFU/cm}^2}$ olacak şekilde hesaplanan canlı hücre sayısına ulaşmıştır. Biofoulingde önemli olan ve hareket yeteneklerini oluşturan flagella yapılarının E334 kodlu izolatuın monotriş, DSM 17127 kodlu suşun ise lofotriş tipte flagellaya sahip olduğu tespit edilmiştir.



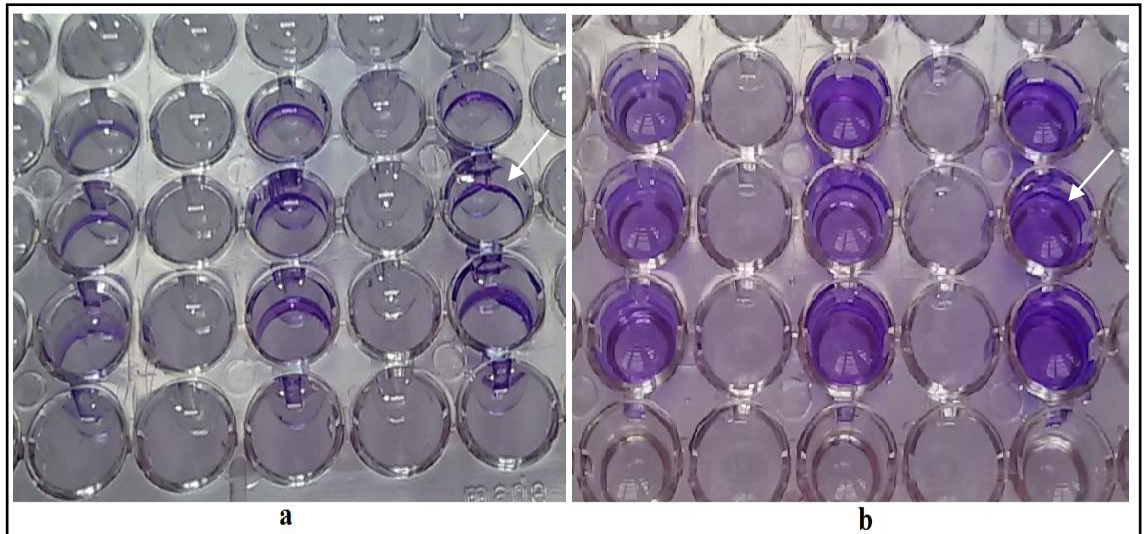
Şekil 4.1 E334 ve DSM 17127 bakterilerinin koloni morfolojileri

a. E334, b. DSM 17127 bakterilerinin MI besiyerinde oluşturdukları 24 saatlik koloni morfolojileri



Şekil 4.2 *A. pallidus* E334 izolatının pelikül yapısı

a. 65°C'de 48 saatlik inkübasyon sonunda mikrotitrasyon plakasının kuyularının yüzeyinde oluşturduğu pelikül yapısı, b. Çelik kupon deneylerinde optimum şartlarda hava-sıvı ara yüzde oluşan pelikülün solda yandan ve sağda ise üstten görüntüsü



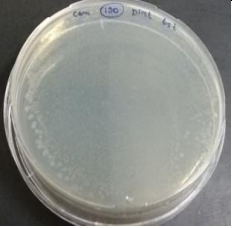
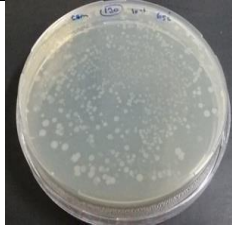

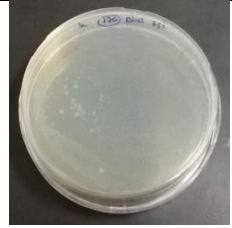
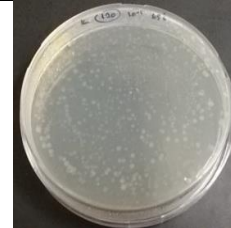
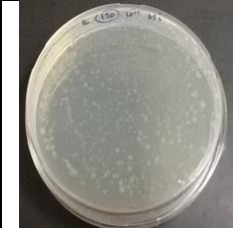



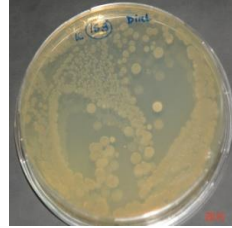
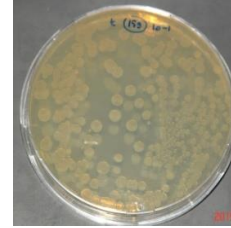
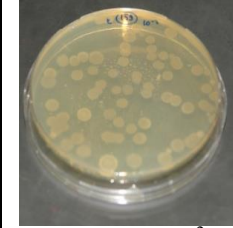
Şekil 4.3 *A. pallidus* E334 izolatının kristal viyole deneyi görüntüleri

a. Polistiren mikrotitrasyon plakaların duvarlarında 65°C'de 48 saatlik inkübasyon sonunda oluşturduğu biyofilmin, üç tekrarlı kristal viyole boyamasının, etanol-aseton çözeltisi ile çözülmeden önceki ve, b Sonraki görüntüsü

Cam boncukla vorteksleme ve yüzeyden doğrudan kazıma işlemleri, biyofilmlerin yüzeyden kaldırılmasında en çok kullanılan yöntemlerdendir. Seçilen iki bakterinin paslanmaz çelik kupon yüzeyinde oluşturdukları biyofilmlerin cam boncuk ile vorteksleme ve kazıma işlemlerinden sonra ajite edilmesi sonucu hesaplanan canlı hücre sayım sonuçları çizelge 4.3’de sunulmuştur. Koloni sayım sonuçlarına göre, her iki bakteri için de kazıma yönteminin daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, bu bakterilerin canlı hücre sayılarının yapıldığı petri dilüsyonu sonuçları Şekil 4.4’de sunulmuştur. Sonuç olarak, paslanmaz çelik yüzeylerde E334 izolatının, DSM 17127 suşundan daha yüksek sıcaklıkları tercih ederek biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.3 Çelik kupon yüzeylerinde oluşan biyofilmlerin koloni sayım sonuçları (CFU/mL) ile yüzey alana (cm²) düşen koloni oluşturan birimlerinin logaritmik olarak hesaplanması (log_{CFU/cm²})

Bakteriler	Yüzey alana düşen koloni sayım sonucunun logaritması					
	Kazıma			Cam boncuk ile vorteksleme		
	CFU/mL	CFU/cm ²	Log _{CFU/cm²}	CFU/mL	CFU/cm ²	Log _{CFU/cm²}
E334 (65°C)	247500	61875	4.79	86500	21625	4.33
DSM 17127 (55°C)	80000	20000	4.30	69000	17250	4.24

	Cam boncuk ile parçalama sonucu yapılan seri dilüsyon fotoğrafları			Kazıma ile parçalama sonucu yapılan seri dilüsyon fotoğrafları		
Bakteri	Direk	10 ⁻¹	10 ⁻²	Direk	10 ⁻¹	10 ⁻²
E334 65°C			 4.33 log CFU/cm ²			 4.79 log CFU/cm ²
DSM 17127 55°C			 4.24 log CFU/cm ²			 4.30 log CFU/cm ²

Şekil 4.4 E334 izolatının ve DSM 17127 suşunun optimum çalışma öncesi çelik kupon yüzeylerinde oluşan biyofilmlerin koloni sayım sonuçları (CFU/mL) ile yüzey alana (cm²) düşen koloni oluşturan birimlerinin logaritmik olarak hesaplanmasına (log_{CFU/cm²}) ilişkin dilüsyon fotoğrafları

4.3 Bakterilerin Mikrotitrasyon Plakalarında Gelişimleri ve Biyofilm Oluşumları İçin Gerekli Optimum pH, Tuz ve Sıcaklık Gereksinimlerinin Saptanması

Bakterilerin gelişimleri için gereksinim duydukları optimum pH, tuz ve sıcaklık istekleri 0., 6., 18., 24. ve 48. saatlerde OD_{595nm}'de okutulmuştur. Bu değerler, tüm sonuçların bir arada gösterildiği çizelge 4.4'de sunulmuştur.

Çizelge 4.4 Bakterilerin optimum pH, tuz ve sıcaklık istekleri

Bakteri kodu	Optimum pH	Optimum tuz (NaCl)	Optimum sıcaklık
E334	pH 9.5	%1.0	65°C
DSM 17127	pH 8.0	%1.0	55°C

Bakterilerin gelişimleri için gerekli optimum pH, tuz ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesinin ardından, bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere onları biyofilm oluşumuna zorlayacak optimum koşullardaki biyofilm gelişimi için gereken pH, tuz ve sıcaklık değerleri aynı plakanın, 48. saat sonundaki kristal viyole boyaması sonucunda, belirlenmiştir. Bu değerler, sonuçların topluca gösterildiği çizelge 4.5'de sunulmuştur.

A. pallidus E334 izolatu pH 7.0-11.0 değerleri arasında gelişebilmekte olup, optimal olarak pH 9.5'da üremektedir. Bu değerler biyofilm oluşumunda ise, pH 7.0-9.0 olup, optimal biyofilm gelişimi pH 7.5'da görülmüştür (Şekil 4.5). İzolat gelişiminin aksine daha nötral pH'da ve dar bir aralıkta biyofilm üretmektedir. Alkali pH biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. DSM 17127 suşunun biyofilm üretimi ve gelişimi için gereken pH değeri 8.0'dir. Her ne kadar gelişimi için pH 5.5-10.5 aralıkları uygunsa da, biyofilm üretimi daha dar bir aralıkta gerçekleşmektedir (Şekil 4.6).

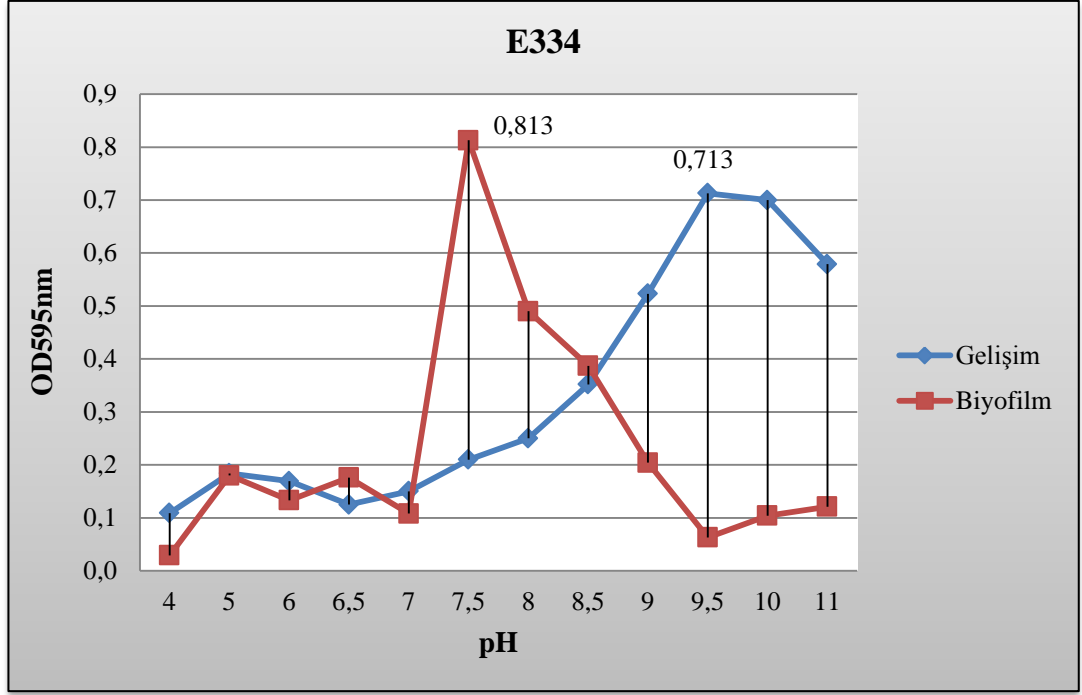
E334 izolatu %0.5-4.0 aralığındaki tuz konsantrasyonlarında gelişebilmektedir. İzolatu optimal gelişimi %1, optimal biyofilm oluşumu ise %1.5'dur. Ayrıca, biyofilm oluşum aralığı %0.5-3.0 gibi daha dar bir sınırdadır (Şekil 4.7). DSM 17127 suşunda ise, bakteri sadece %0-2 tuz konsantrasyonlarına dayanabilmekte ve gelişimi için sadece

%1 NaCl istemektedir. Ancak, suş biyofilm üretebilmek için hiç tuz istememektedir (Şekil 4.8).

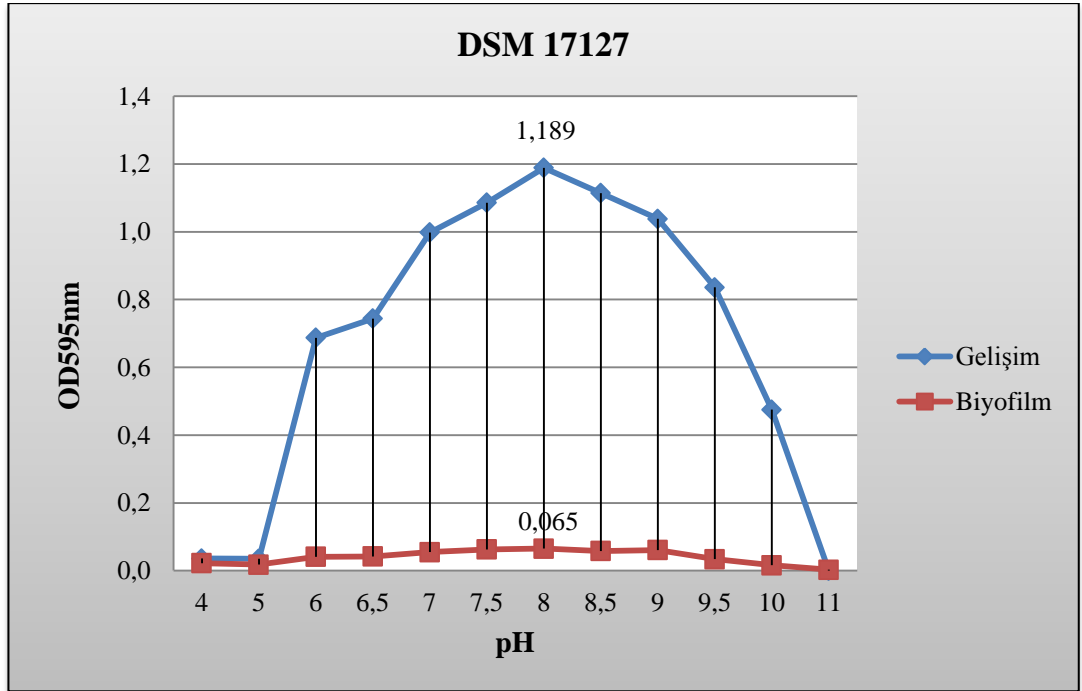
E334 izolatu hem gelişimini hem de biyofilm üretimini 50-65°C'ler arasında yapabilmektedir. Ancak, bakterinin optimal üremesi için gerekli sıcaklık olan 65°C biyofilm üretimi için sınırlandırıcı olup, biyofilm oluşumu 60°C gibi daha düşük bir sıcaklıkta gerçekleşmektedir (Şekil 4.9). DSM 17127 suşu da E334 izolatu gibi 50-65°C aralığında gelişerek biyofilm üretebilmektedir. Ayrıca, yüksek sıcaklık yine biyofilm üretimini kısıtlamakta olup, optimal gelişimi E334 izolatına benzer şekilde 65°C iken, biyofilm 60°C'de optimal olarak üretilmiştir (Şekil 4.10).

Çizelge 4.5 Bakterilerin biyofilm oluşumları için optimum pH, tuz ve sıcaklık istekleri

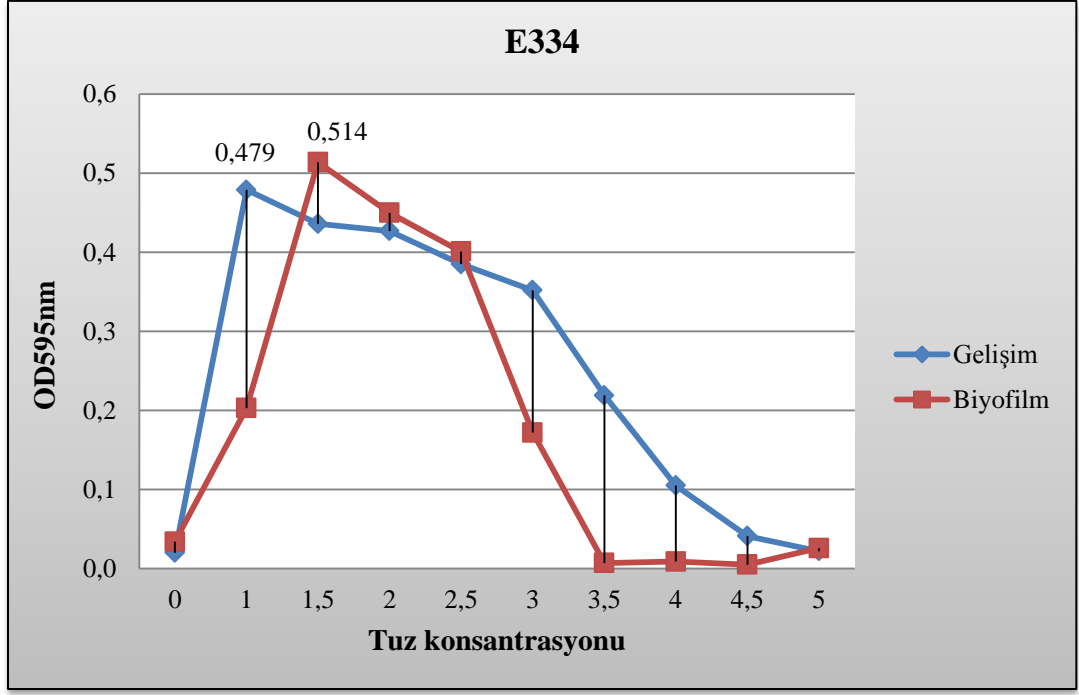
Bakteri kodu	Biyofilm pH	Biyofilm tuz (NaCl)	Biyofilm sıcaklık
E334	pH 7.5	% 1.5	60°C
DSM 17127	pH 8.0	%0	60°C



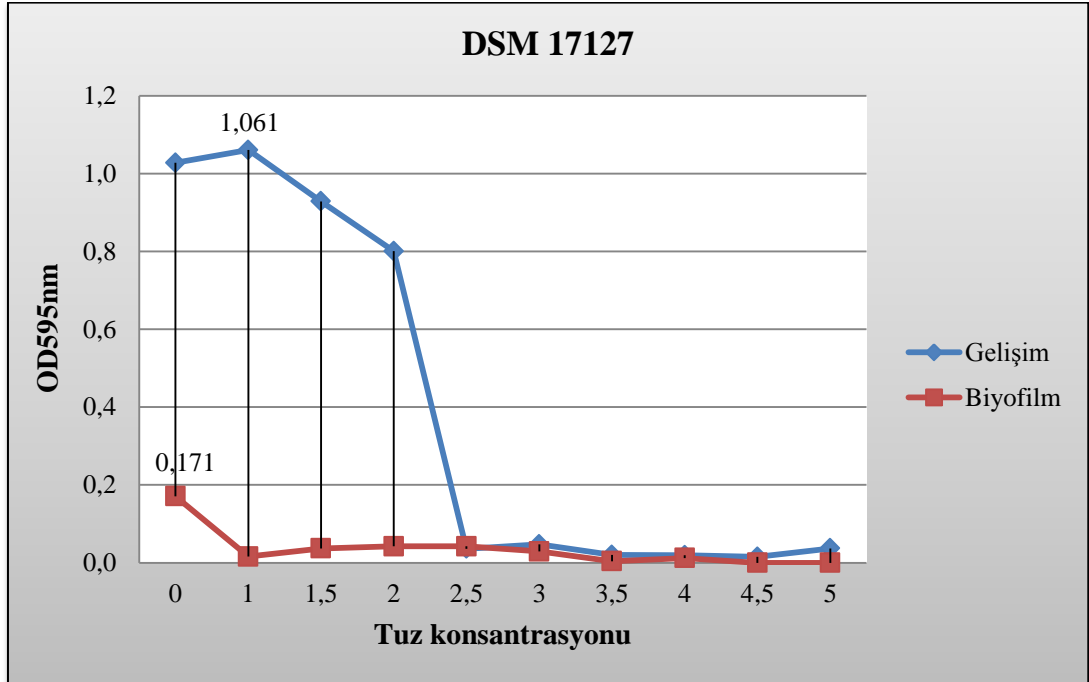
Şekil 4.5 E334 izolatının gelişim ve biyofilm üretimi için gerekli optimum pH grafiği



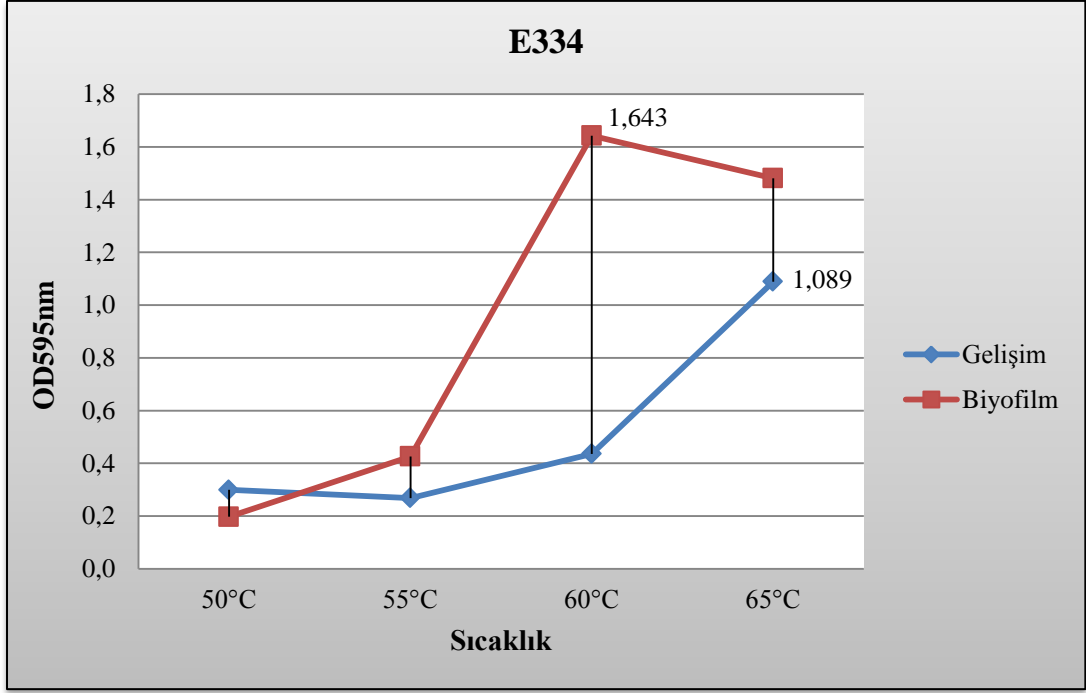
Şekil 4.6 DSM 17127 suşunun gelişim ve biyofilm üretimi için gerekli optimum pH grafiği



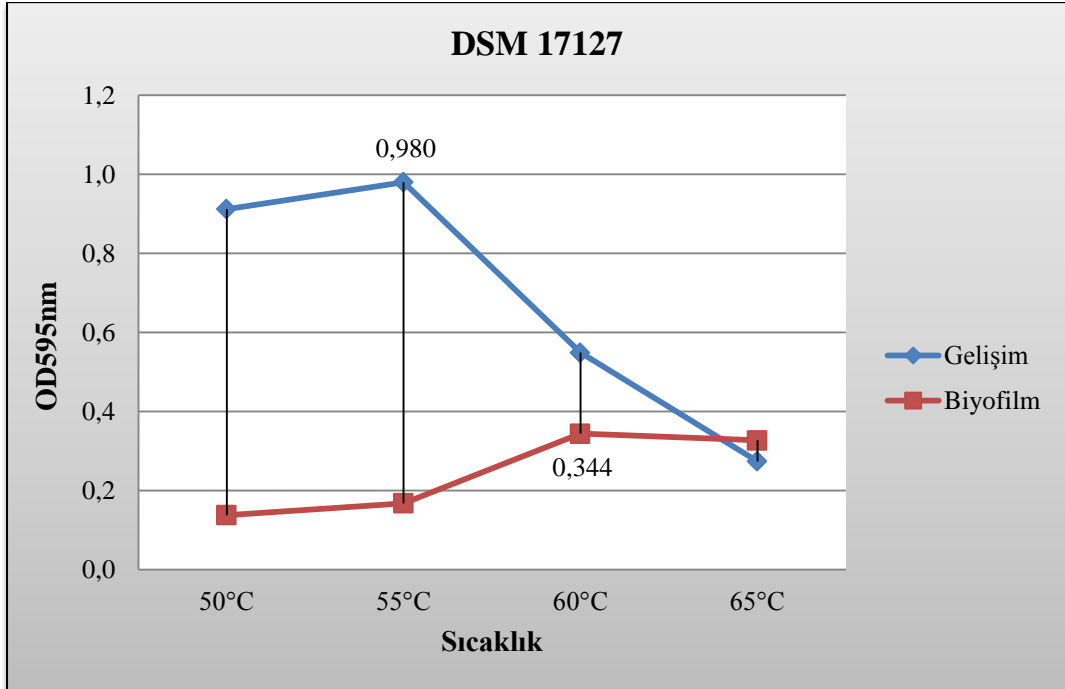
Şekil 4.7 E334 izolatının gelişimi ve biyofilm üretimi için gerekli optimum tuz grafiği



Şekil 4.8 DSM 17127 suşunun gelişimi ve biyofilm üretimi için gerekli optimum tuz grafiği



Şekil 4.9 E334 izolatının gelişimi ve biyofilm üretimi için gerekli optimum sıcaklık grafiği



Şekil 4.10 DSM 17127 suşunun gelişimi ve biyofilm üretimi için gerekli optimum sıcaklık grafiği

4.4 Bakterilerin Optimum pH, Tuz ve Sıcaklık Konsantrasyonlarında Paslanmaz Çelik Kupon Yüzeylerinde Biyofilm Oluşturmaları

Bu çalışmada, bakterilerin belirlenen optimum pH, tuz ve sıcaklık değerlerine göre TSB besiyeri içerisindeki çelik kupon yüzeylerinde oluşturdukları biyofilmler, \log_{CFU/cm^2} cinsinden hesaplanmıştır. Bu bakterilerin optimizasyon öncesi ve sonrası mikrotitrasyon plakalarında ve çelik kupon yüzeylerinde oluşturdukları biyofilm miktarları çizelge 4.6-4.7'de sunulmuştur. Biyofilm üretimleri optimizasyon öncesi ile karşılaştırıldığında, tüm bakterilerde gerek mikrotitrasyon kuyularında gerekse çelik kuponda önemli ölçüde artmıştır.

Çizelge 4.6 Bakterilerin biyofilm üretimlerinin optimizasyon öncesi ve sonrası polistiren mikrotitrasyon plaka yüzeylerinde oluşturdukları biyofilm miktarlarının karşılaştırılması

Bakteriler	Mikrotitrasyon plakadaki biyofilm miktarı (OD_{595nm})		
	Optimizasyon öncesi		Optimizasyon sonrası
	55°C	65°C	60°C
E334	0.308	1.116	3.286
DSM 17127	0.190	0.006	0.688

Çizelge 4.7 Bakterilerin biyofilm üretimlerinin optimizasyon öncesi ve sonrası çelik kupon yüzeylerinde oluşturdukları biyofilm miktarlarının karşılaştırılması

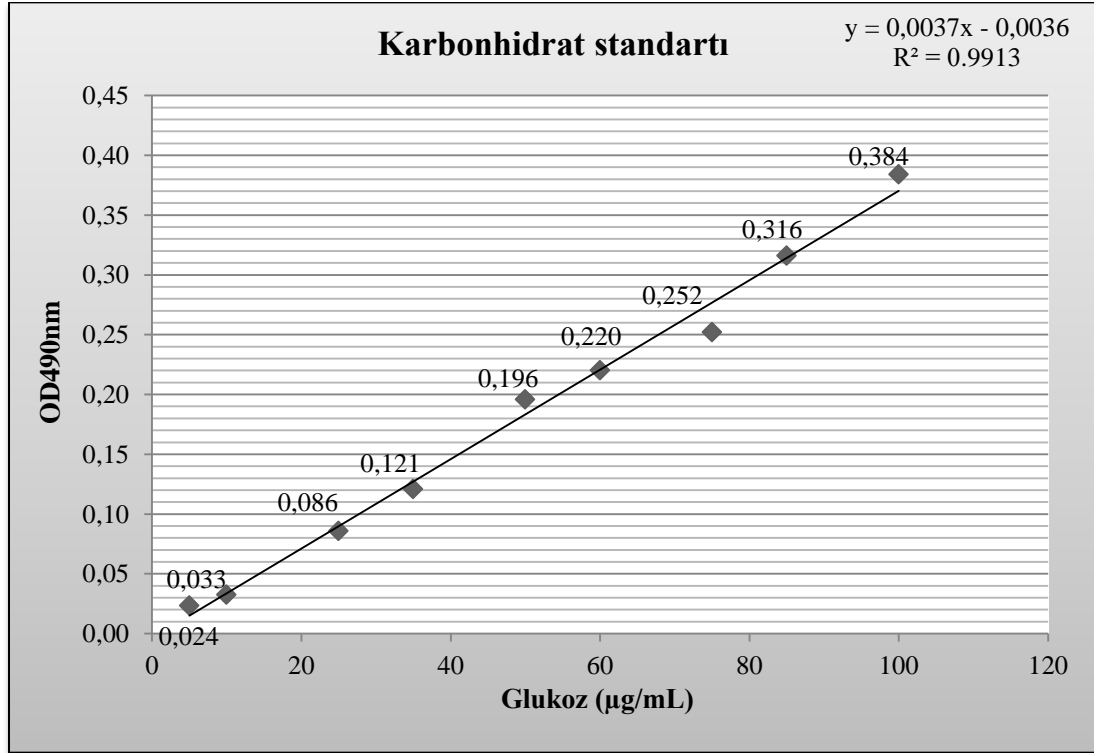
Bakteriler	Çelik kupon yüzeyindeki biyofilm miktarı (\log_{CFU/cm^2})					
	Optimizasyon öncesi			Optimizasyon sonrası		
	Sıcaklık	Kazıma	Cam boncuk	Sıcaklık	Kazıma	Cam boncuk
E334	65°C	4.79	4.33	60°C	5.1	5.7
DSM 17127	55°C	4.30	4.24	60°C	3.6	5.12

4.5 Bakterilerin Biyofilmlerindeki EPS Bileşenlerinin Belirlenmesi

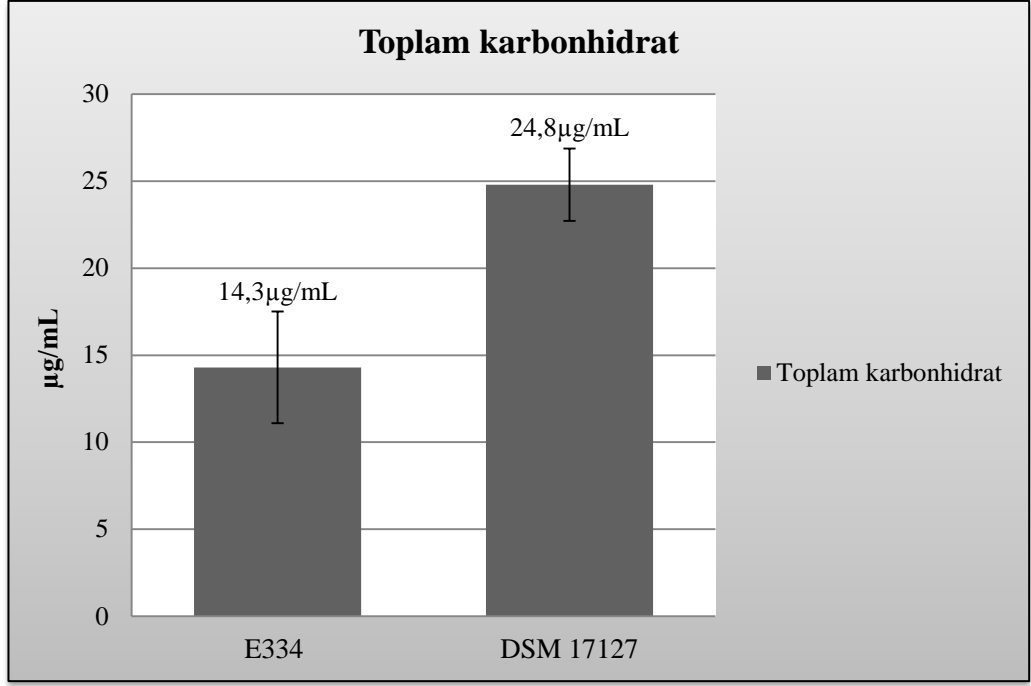
Biyofilmin EPS bileşenleri olan, karbonhidrat, protein ve eDNA içeriklerinin tayini için TSA besiyeri yüzeyinden toplanan biyofilm hücreleri kullanılmıştır.

4.5.1 Karbonhidrat miktarı tayini

EPS bileşenlerinden olan karbonhidrat miktarını hesaplamak için, farklı konsantrasyonlarda kullanılan glukoz çözeltilerine (x-ekseni) karşılık gelen absorbans değerlerine (y-ekseni) göre bir kalibrasyon grafiği çizilerek şekil 4.11’de sunulmuştur. Standart eğri yardımıyla, Eliza’da okunan absorbans değerine karşılık gelen karbonhidrat miktarı hesaplanmıştır. Bakterilerin karbonhidrat miktarları, kalibrasyon grafiği verilerinden elde edilen standart eğri formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar şekil 4.12’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre DSM 17127 suşunun E334 izolatına göre, EPS içeriğinde yaklaşık iki katı kadar daha çok miktarda karbonhidrat içerdiği gözlemlenmiştir.



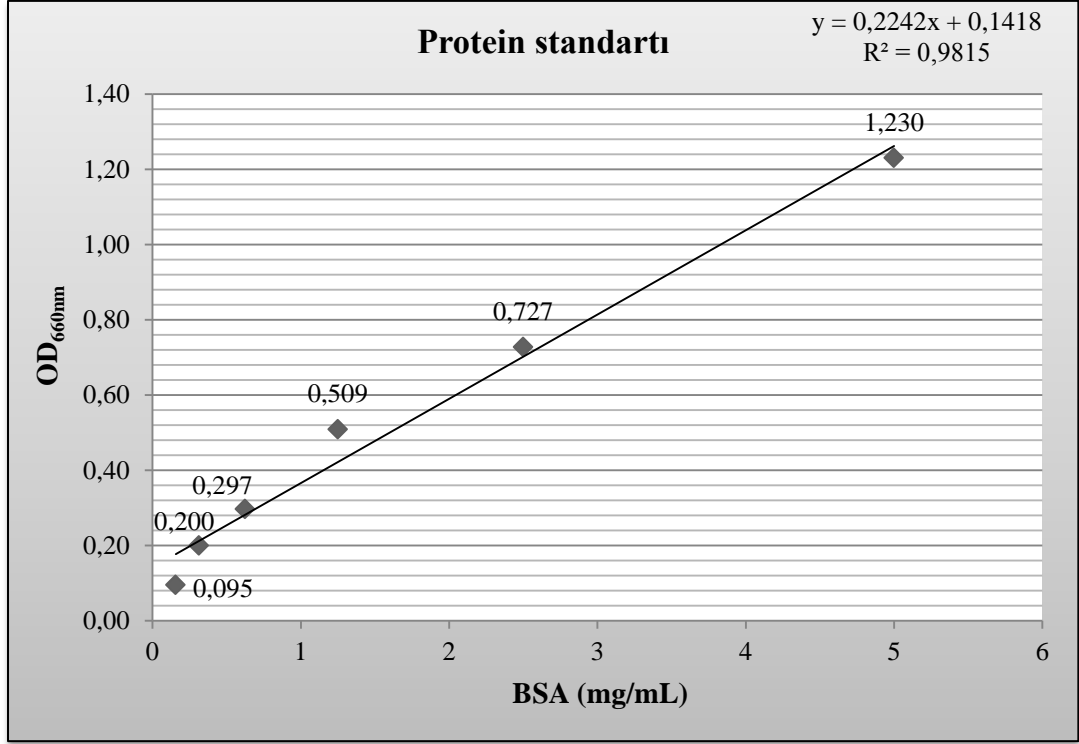
Şekil 4.11 Karbonhidrat miktarı ölçümü için hazırlanan kalibrasyon grafiği



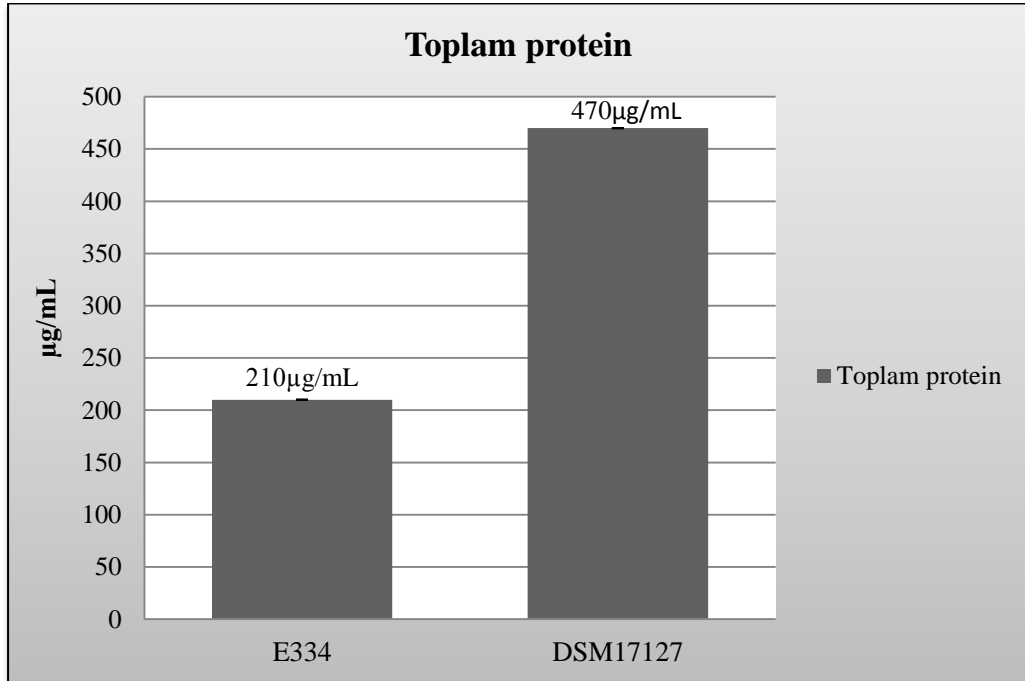
Şekil 4.12 Bakterilerin karbonhidrat miktarlarının karşılaştırmalı grafiği

4.5.2 Protein miktarı tayini

EPS bileşeninde bulunan protein miktarını hesaplamak için farklı konsantrasyonlarda kullanılan BSA çözeltilerine (x-ekseni) karşılık gelen absorbans değerlerine (y-ekseni) göre grafik çizilerek şekil 4.13’de sunulmuştur. Standart eğri yardımıyla Eliza’da okunan absorbans değerine karşılık gelen protein miktarı hesaplanmıştır. Bakterilerin protein miktarları kalibrasyon grafiği verilerinden elde edilen standart eğri formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar şekil 4.14’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, DSM 17127 suşunun EPS matriksinde E334 izolatına kıyasla oldukça fazla protein içerdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.13 Protein miktarı ölçümü için hazırlanan kalibrasyon grafiği



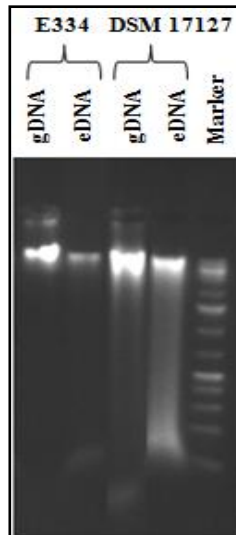
Şekil 4.14 Bakterilerin protein miktarlarının karşılaştırmalı grafiği

4.5.3 Genomik DNA ve ekzopolisakkarit bileşenlerinden eDNA içeriği

Genomik DNA ve eDNA konsantrasyonları (ng/ μ L) ve saflıklarını belirlemek için 260/280 ile 260/230 oranları Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür. Genomik DNA ve eDNA'nın varlığı agaroz jel elektroforezi ile de tespit edilmiştir. Ayrıca genomik DNA ve eDNA'ların molekül ağırlıkları hesaplanarak kb cinsinden büyüklükleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.8'de ve agaroz jel görüntüleri şekil 4.15'de sunulmuştur. Agaroz jel görüntülerinde eDNA'ların, genomik DNA'lardan farklı molekül ağırlıklarına sahip oldukları gözlemlenmiştir. Her iki bakterinin de genomik DNA'larının, eDNA'larından daha büyük olduğu görülmüştür. Ayrıca, EPS bileşeni olan eDNA'nın, E334 izolatında, DSM 17127 suşuna kıyasla matriksde daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.8 Genomik DNA ve eDNA konsantrasyonları ve büyüklükleri

Bakteri kodu	Konsantrasyonu (ng/ μ L)		Büyüklüğü (kb)	
	Genomik DNA	eDNA	Genomik DNA	eDNA
E334	205	247	24.5	21.4
DSM 17127	1101.2	766.8	27.6	20.9



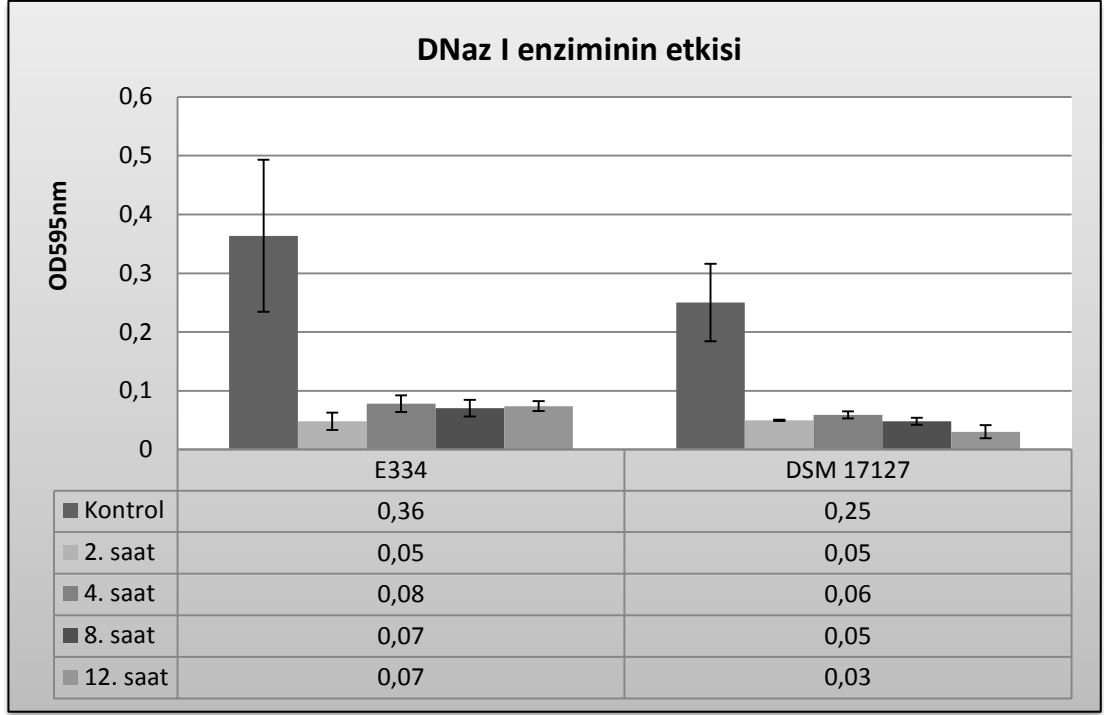
Şekil 4.15 Genomik DNA ve eDNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntülerine göre molekül ağırlıklarının hesaplanması

Marker, Thermo, Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, 75-20000 bp.

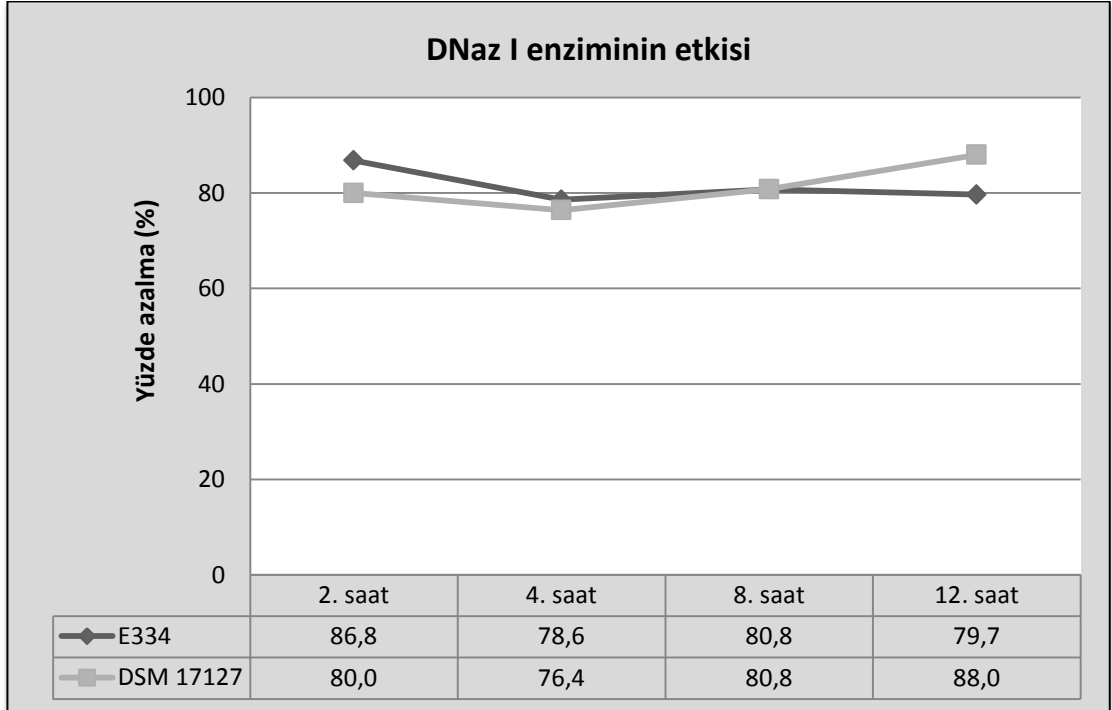
4.6 Bakterilerin Oluşturduğu Olgun Biyofilmlerin DNaz I Enzimi ile Muamelesi Sonucu eDNA'nın Fonksiyonunun Belirlenmesi

Gerek spektrofotometrik olarak gerekse Şekil 4.12'deki agaroz jel elektroforezi ile de görüntülenen eDNA'ların birer DNA molekülü olarak varlıkları kesinleştirilmiştir. Olgun biyofilmlerin, 2 ila 12 saat süresince DNaz I enzimi ile muamelesi sonucu enzimin biyofilm üzerine etkisi şekil 4.16'de, yüzde azalma değerleri ise şekil 4.17'deki grafiklerde verilmiştir. Bu sonuca dayanarak yürüttüğümüz çalışmada, olgun biyofilmlerin DNaz I enzimi ile muamelesi sonucu, her iki bakterinin de EPS'lerindeki eDNA'ların DNaz I enzime duyarlı oldukları ve enzimin biyofilm kütlelerinde bir azalmaya sebep olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda enzimin 2 saat içerisinde etkisini gösterdiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, eDNA'nın biyofilmin stabilitesi üzerinde önemli bir etkiye sebep olduğu ve giderim çalışmalarında DNaz I enziminin kullanılabilceği tespit edilmiştir.

Ayrıca, enzim muamelesinin biyofilm yapılarını zayıflattığı ve hatta %80 oranında giderdiği saptanmıştır. Bu sebeple bu bakterilerin eDNA'sının olgun biyofilm matriksinin bütünlüğü ve sağlamlığı adına önemli bir yapısal rol oynadığı görülmüştür. Bu veri, termofilik basillerde DNaz uygulaması sonucu eDNA'nın duyarlı olduğunun gösterildiği ilk çalışmadır.



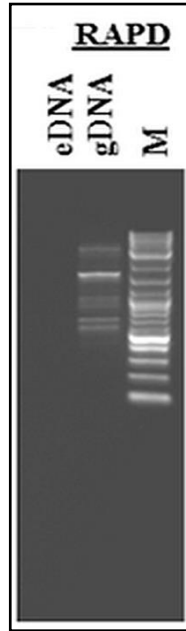
Şekil 4.16 Olgun biyofilmlerin DNaz I enzimi ile 2-12 saat muamele edilmeleri sonrası mikrotitrasyon plakalarında ölçülen biyofilm miktarları



Şekil 4.17 Olgun biyofilmlerin DNaz I enzimi ile 2-12 saat muamele edilmeleri sonrası biyofilm miktarlarındaki yüzde azalma (%) grafiği

4.7 Genomik DNA ile eDNA'nın RAPD-PCR Analizleri ve DNaz I, RNaz A ve Proteinaz K Enzimlerine Duyarlılıkları

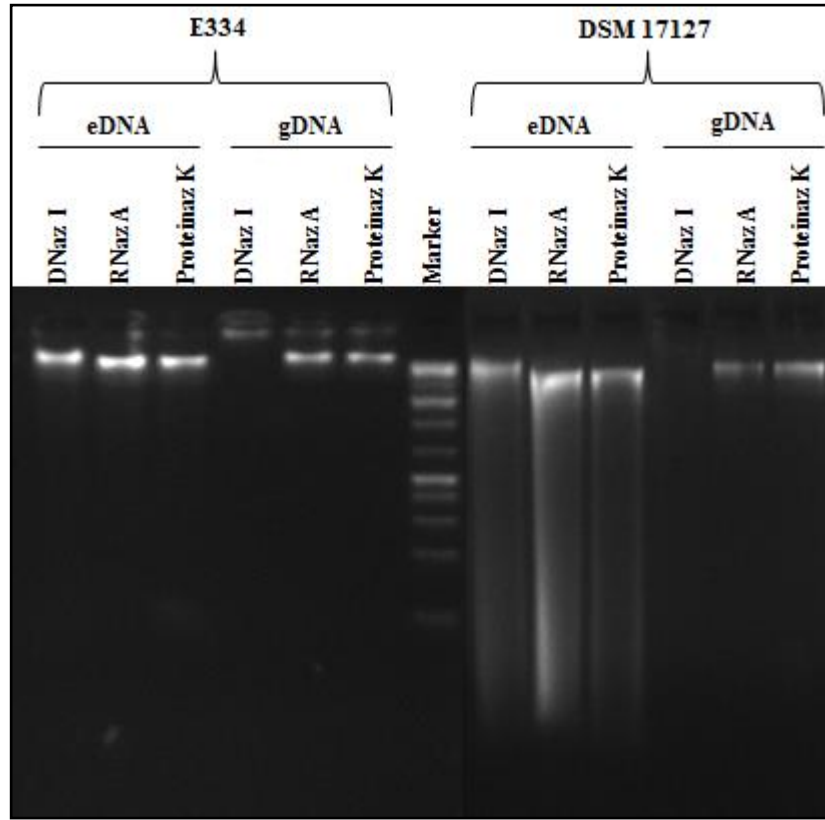
Genomik DNA ve eDNA'lar üzerinde OPR-1, OPR-2, OPR-10, OPR-13, OPR-15, OPR-20, P1254 ve P1283 primeri kullanılarak yürütülen Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-PCR (RAPD-PCR) çalışmalarında, genomik DNA'lar çoğaltılabildiği olmasına rağmen, eDNA örneklerinden sonuç alınamamıştır (Şekil 4.18). Termofilik basillerin eDNA içerikleri hakkında herhangi bir bilgi birikimi mevcut değildir ve bu konu şu ana kadar hiç çalışılmamıştır. Tez kapsamında eDNA'ya uygulanan rastgele primerler ile RAPD-PCR analizlerinde herhangi bir bant profili çıkarılamamıştır. Ancak, agaroz jel elektroforezi ve nanodrop cihazı ölçümleri sonucunda saflaştırılan eDNA'ların birer DNA molekülü oldukları ve yine eDNA'nın DNaz I uygulaması sonrası olgun biyofilm stabilitesi üzerindeki önemleri tez çalışmasında kanıtlanmıştır. eDNA ile yürütülen PCR reaksiyonlarının sonuç vermemesinin sebebi değerlendirilirken, eDNA'ların genomik DNA'ya göre daha az stabil ve kırılabilir olduğu kanısı göz önünde bulundurulmalıdır.



Şekil 4.18 RAPD-PCR sonrası, *A. pallidus* genomik DNA (gDNA) ve eDNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

Marker, Thermo, Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, 75-20000 bp.

PCR direnci olan fakat olgun biyofilm içerisinde DNaz I'e duyarlı olan eDNA'ların, eDNA saflaştırma işleminden sonra DNaz I, RNaz A ve Proteinaz K enzimleri ile muamelesi sonucu kullanılan her üç enzimle de sindirilemedikleri ve dirençli oldukları görülmüştür. Bunun aksine, aynı bakteri biyofilmlerinden izole edilen genomik DNA'ların bu enzimlerden DNaz I ile tamamen hidrolize edildikleri gözlenmiştir. Her üç enzim muamelesi sonrası genomik DNA ve eDNA'ların agaroz jel görüntüleri şekil 4.19'da sunulmuştur.

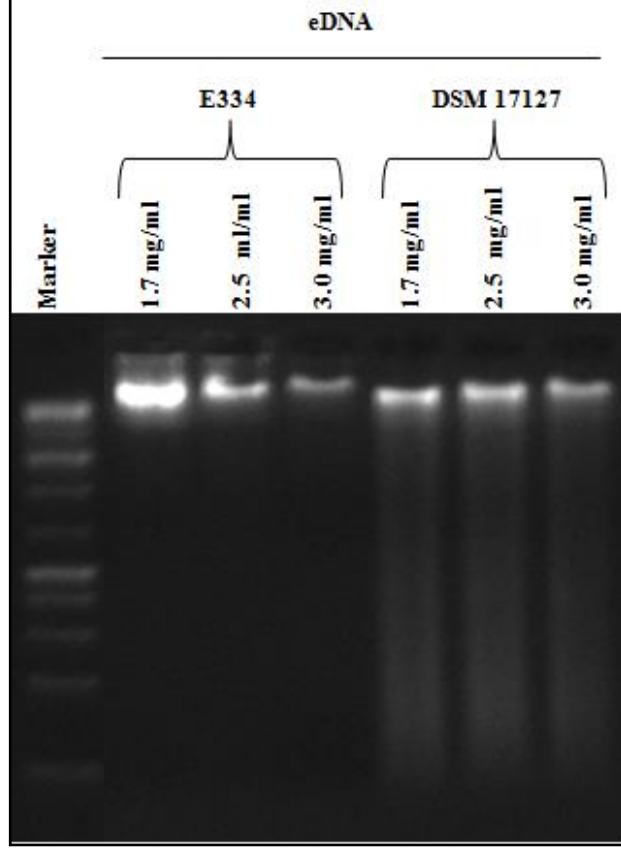


Şekil 4.19 Bakterilerin genomik DNA (gDNA) ve eDNA'larının DNaz I (1.45 mg/mL), RNaz A (0.90 mg/mL), ve Proteinaz K (0.85 mg/mL) muamelesi sonrası elde edilen agaroz jel görüntüleri

Marker, Thermo, Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, 75-20000 bp.

Saf eDNA'ların, DNA, RNA ve proteinlere etki eden bu üç enzimle parçalanamaması üzerine, eDNA'nın DNaz I direncinin daha detaylı incelenebilmesi amacı ile, şekil 4.19'da 1.45 mg/mL olacak şekilde muamele edilen DNaz I konsantrasyonu daha da artırılarak 1.7-3.0 mg/mL aralığına kadar çıkarılmıştır. Şekil 4.20'de verilen

sonuçlardan da saf eDNA’larda görülebileceği üzere, uygulanan DNaz I konsantrasyonu artırılmasına karşın, eDNA’ların DNaz I direnç desenlerinde bir değişim olmamıştır.



Şekil 4.20 Bakteri eDNA’larına daha yoğun DNaz I (1.7, 2.5, ve 3.0 mg/mL) uygulanmasına karşın, enzim dirençlerini gösteren agaroz jel görüntüleri

Marker, Thermo, Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, 75-20000 bp.

4.8 Bakterilerin Mikrotitrasyon Plakalar İçinde Bulunan Çeşitli Abiyotik Yüzeylerde Oluşturdukları Biyofilm Yapılarının İncelenmesi

Her iki bakterinin polikarbonat, polipropilen, polivinil klorür, paslanmaz çelik, polistiren ve cam tabiatında olan 6 farklı abiyotik yüzeyde oluşturdukları biyofilmlerdeki koloni sayımlarının hücre yüzey alanlarına bölünmesiyle elde edilen oranlar (\log_{CFU/cm^2}) ile bu sonuçların istatistiksel analizleri, çizelge 4.9 - 4.10’da sunulmuştur. Bakteriler ile kullanılan yüzeyler üzerinde oluşturdukları biyofilm oranları arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bakterilerin

tamamının farklı abiyotik yüzeylerde oluşturdukları biyofilmlerdeki koloni sayılarının yüzey alanına oranları (\log_{CFU/cm^2}) yine şekil 4.21 - 4.22'de grafik üzerinde, koloni sayımının yapıldığı petri görüntüleri ise şekil 4.23'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre E334 kodlu izolatta en iyi tutunma, polipropilen yüzey üzerinde gözlemlenirken, DSM 17127 suşu için ise tutunmanın en ideal polikarbonat yüzey üzerinde olduğu saptanmıştır. Böylece, kullanılan abiyotik kuponun yüzey karakterine bağlı olarak, bakterilerin oluşturdukları biyofilm miktarları değişiklik göstermiştir.

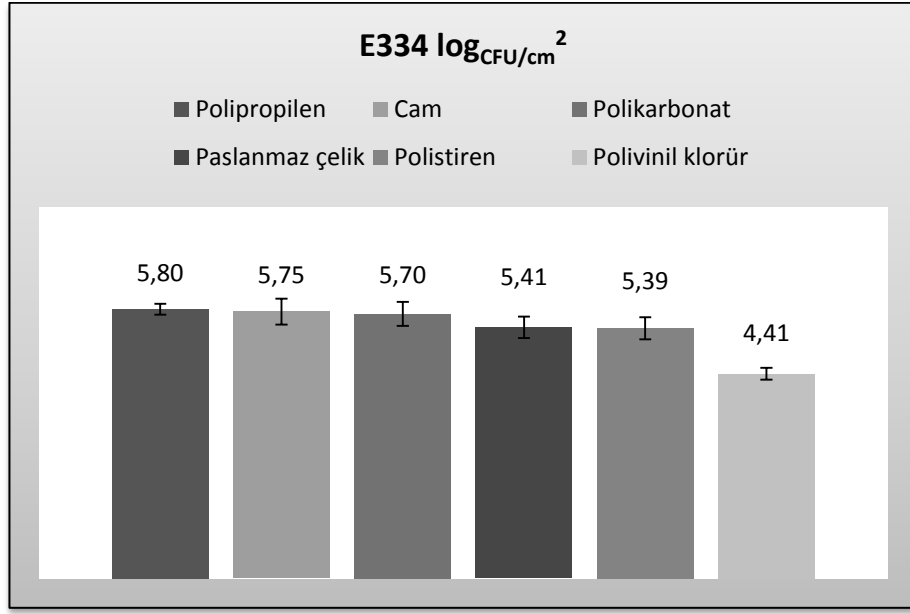
Çizelge 4.9 E334 kodlu bakterinin farklı abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilm miktarı

Kupon yüzeyleri	E334		
	Ortalama CFU	\log_{CFU/cm^2}	Logaritmik standart sapma
Polipropilen	1.95×10^6	5.80	0.52
Cam	1.75×10^6	5.75	0.17
Polikarbonat	1.55×10^6	5.70	0.20
Paslanmaz çelik	7.95×10^5	5.41	0.21
Polistiren	7.59×10^5	5.39	0.24
Polivinil klorür	8.02×10^4	4.41	0.22

Çizelge 4.10 DSM 17127 kodlu bakterinin farklı abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilm miktarı

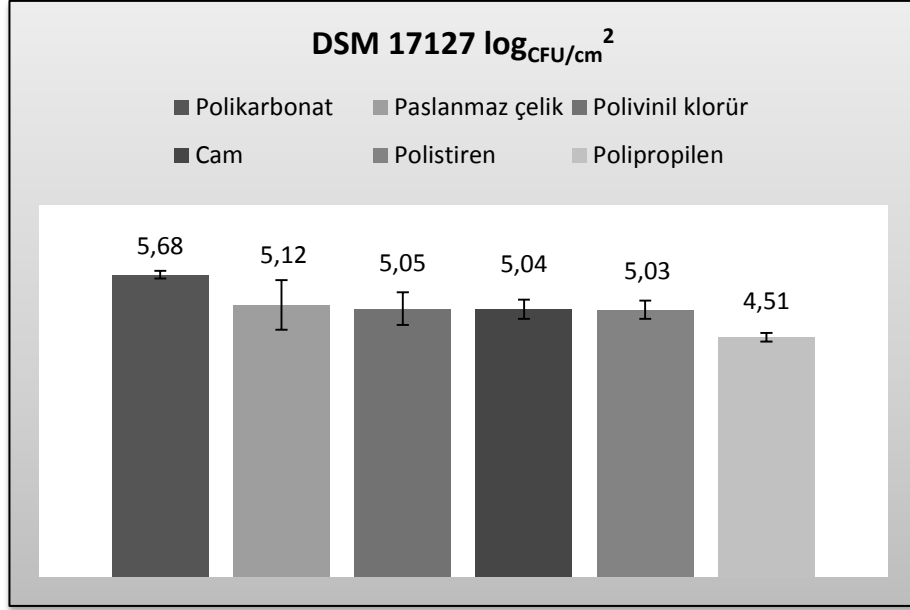
Kupon yüzeyleri	DSM 17127		
	Ortalama CFU	\log_{CFU/cm^2}	Logaritmik standart sapma
Polikarbonat	1.48×10^6	5.68	0.36
Paslanmaz çelik	4.84×10^5	5.12	0.38
Polivinil klorür	3.43×10^5	5.05	0.26
Cam	3.40×10^5	5.04	0.18
Polistiren	3.31×10^5	5.03	0.28
Polipropilen	1.00×10^5	4.51	0.34

A. pallidus E334 için, hidrofobik ve düşük yüzey enerjili bir materyal olan polipropilen yüzey hücre tutunması için en ideal abiyotik substrat olarak belirlenmiştir. Ayrıca, hidrofilik, pürüzsüz ve pozitif yüzey yüküne sahip cam, E334 hücrelerinin tutunması için ikinci en uygun yüzey olarak saptanmıştır.

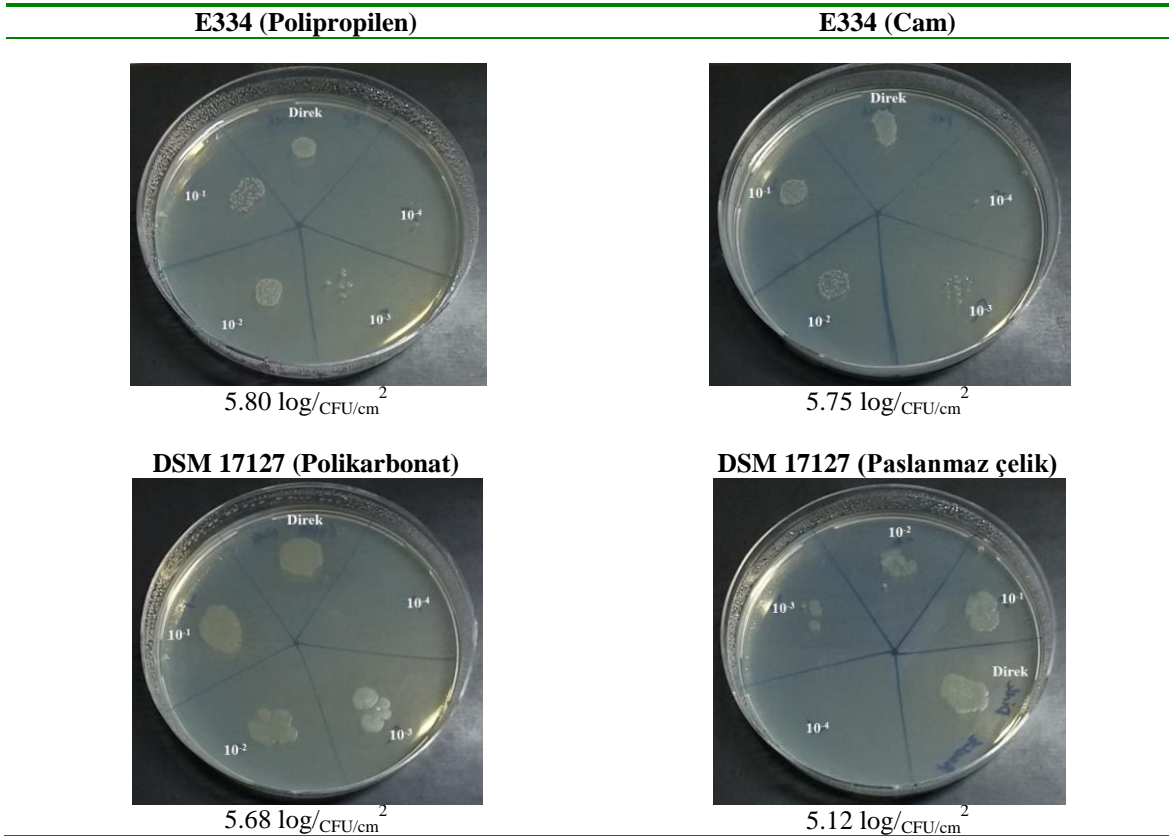


Şekil 4.21 E334 kodlu izolatin farklı abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilmlerdeki koloni sayılarının yüzey alanına oranları

A. rubeus DSM 17127 için, hidrofobik ve düşük yüzey enerjili bir materyal olan polikarbonat yüzey hücre tutunması için en ideal abiyotik substrat olarak belirlenmiştir. Ayrıca, hidrofilik, pürüzsüz ve pozitif yüzey yüküne sahip paslanmaz çelik, DSM 17127 hücrelerinin tutunması için ikinci en uygun yüzey olarak saptanmıştır.



Şekil 4.22 DSM 17127 kodlu suşun farklı abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilmlerdeki koloni sayılarının yüzey alanına oranları

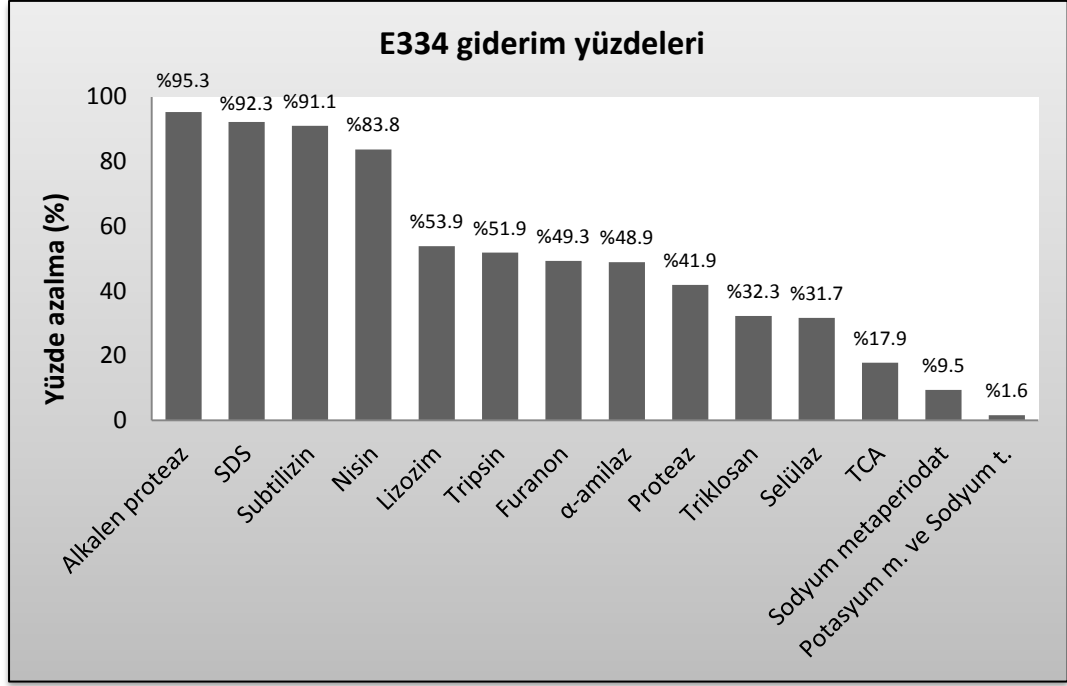


Şekil 4.23 E334 izolatının ve DSM 17127 suşunun en iyi tutundukları iki abiyotik yüzeyde oluşturdukları biyofilm koloni sayılarının yüzey alanına oranı (log/CFU/cm²) ve koloni sayımının yapıldığı petri görüntüleri

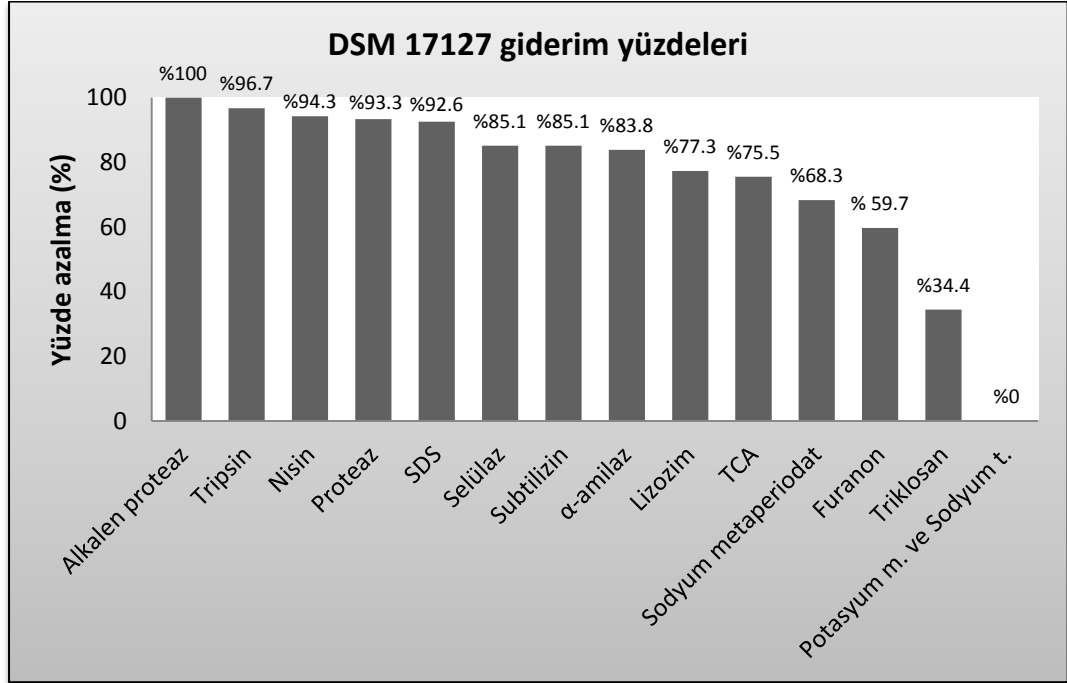
4.9 Bakterilerin Polistiren Mikrotitrasyon Plakalar Yüzeyinde Oluşturduğu Biyofilmlerin Kimyasal Olarak Giderimi

Bir çeşit alkalen proteaz olan ve *Bacillus licheniformis* menşeyli Subtilizin A, alkali pH'da (pH 9.0-11.0) aktivite gösteren bir enzim olup, sanitasyon deneylerinde kullanılmıştır. Ayrıca, enzimatik ajan subtilizin, bakteriyel tip VIII proteaz (optimal pH 7.5-10.0)'dır. Her iki proteazın da optimal pH'ları enzimatik aktivite için birbirlerinden farklı olmalarına rağmen, bu proteazların ikisi de endopeptidazdır ve proteinlerin peptit bağlarını ayırır ve serin proteazların aktif bölgelerindeki nükleofilik aminoasitler olarak görev yaparlar (Hedstrom 2002). Dahası, enzimatik olmayan kimyasal ajan SDS, anyonik bir sürfaktandır ve sahip olduğu negatif yük ile proteinleri denatüre eder ve proteinlerin birincil yapısına döndürerek üç boyutlu konformasyonunu değiştirir. EPS matriks analizlerinde E334'de yüksek protein içeriği gözlemlenmiştir. Bu yüzden, matriks sonuçları ile de paralel şekilde, E334 biyofilmi üzerine en çok proteinlere etki eden temizleme ajanları giderimde başarılı olmuştur. DSM 17127 biyofilmi için ise, en etkili kimyasallar alkalen proteaz, tripsin ve nisin olarak belirlenmiştir.

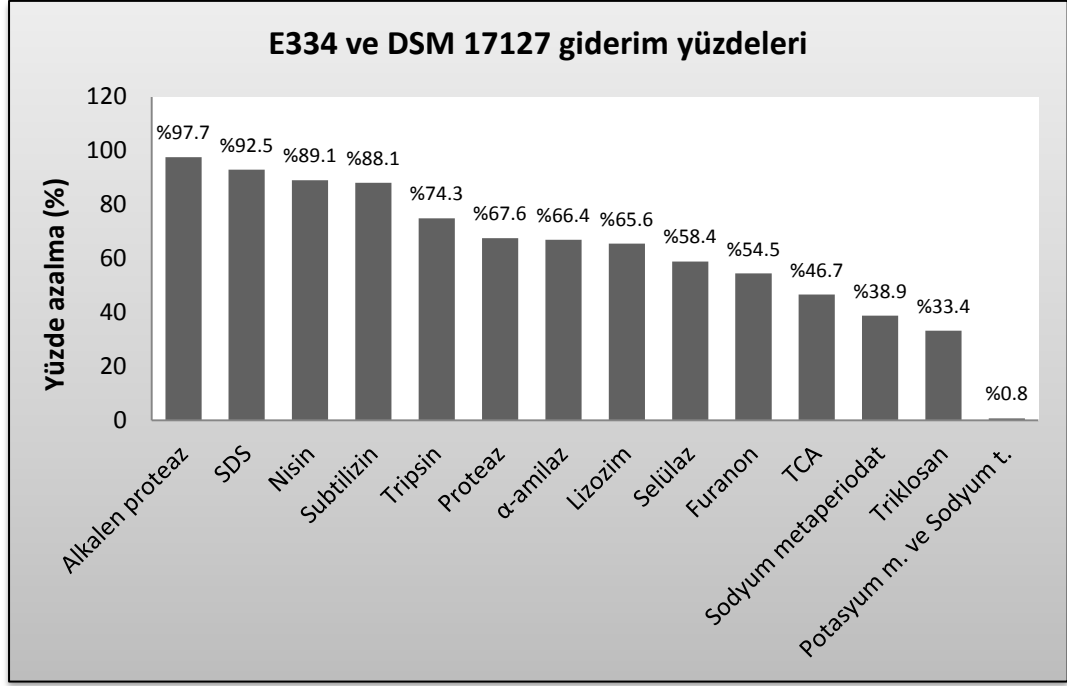
Her iki bakteri biyofilmlerinin, etken maddelerle muamelesi sonucunda, kristal viyole boyaması ile spektrofotometrik olarak ölçülen biyofilm miktarlarındaki % giderim oranları, şekil 4.24 - 4.26'da grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.24 E334 biyofilmlerinin, etken maddelerle muamelesi sonucunda, spektrofotometrik olarak ölçülen biyofilm miktarlarındaki % giderim grafiği



Şekil 4.25 DSM 17127 biyofilmlerinin, etken maddelerle muamelesi sonucunda, spektrofotometrik olarak ölçülen biyofilm miktarlarındaki % giderim grafiği



Şekil 4.26 Kullanılan 15 kimyasalın her iki bakteri üzerindeki genel etkilerini gösteren grafik

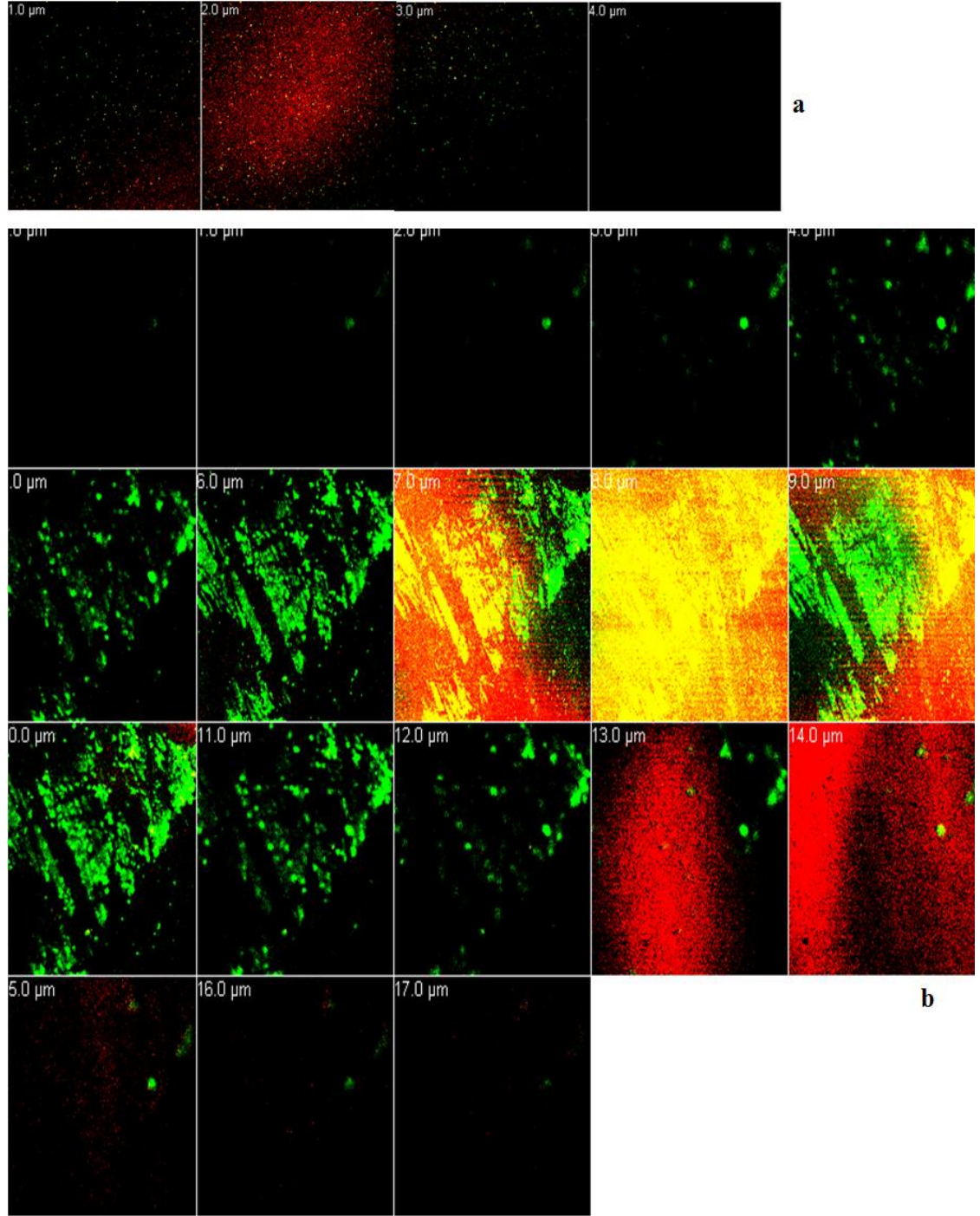
Elde edilen sonuçlara göre, biyofilme etki eden ajan içeriklerinin yüzdesi bakteriye göre değişiklik göstermektedir. Giderim çalışmalarında tercih edilen etken maddelerin her iki bakterinin biyofilmleri üzerindeki toplam etkileri değerlendirildiğinde, en etkin bileşenin *Bacillus licheniformis* kaynaklı alkalen proteaz (%97.7) olduğu görülmektedir. Enzimatik muameleye tabi tutulan biyofilm örneklerindeki matriks proteinlerinin bu sonuçlar doğrultusunda serin proteazlarca etkin bir şekilde yıkıma uğradığı görülmektedir (Alkalen proteaz %97.7, Subtilizin %88.1). Nisinin her iki bakteri biyofilmleri üzerinde yüksek bir etkinlik göstermesinden ötürü, bu bakteriyosinin termofilik basillerin biyofilmlerine kolaylıkla penetre olabilmesi ve biyofilm katmanları içerisindeki basillerin membranları üzerinde etki gösterebilmesi kuvvetle muhtemeldir. Bu bağlamda uzun yıllardır gıda koruyucusu bir etken olarak kullanılan nisinin, termofilik basillerin biyofilmleriyle mücadelede tercih edilebileceği görülmektedir. SDS gibi deterjanlar, süt ve süt ürünlerinin işlendiği gıda çevrelerinde sanitasyon ajanı olarak kullanılmaktadır. SDS'in özellikle gıdaların işlendiği yüzeylerin mekanik temizliklerinde tercih edilen bir ajan olduğu göz önünde bulundurulduğunda, ilgili etkenin yine termofilik basillerin biyofilmlerinin giderimde yüksek etkinlik gösterdiği anlaşılmaktadır (%92.5). Biyofilm gideriminde hiçbir surette etki göstermeyen tek ajan,

çok yönlü bir oksidan ve oksitleyici etken olarak yaygın bir kullanım alanına sahip potasyum monopersülfat (%0.8) olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, mikrotitrasyon plakalarında küçük hacimde yürütülen bu çalışma sonucunda, hangi bakterinin biyofilm kütesinin, kullanılan ajanlarından hangisi uygulandığında en çok giderilebildiğine dair net veriler elde edilmiştir.

4.10 *Aeribacillus pallidus* E334 İzolatının Polipropilen ve Cam Yüzeyler Üzerinde Oluşturduğu Biyofilm Yapısının CLSM ile Görüntülenmesi

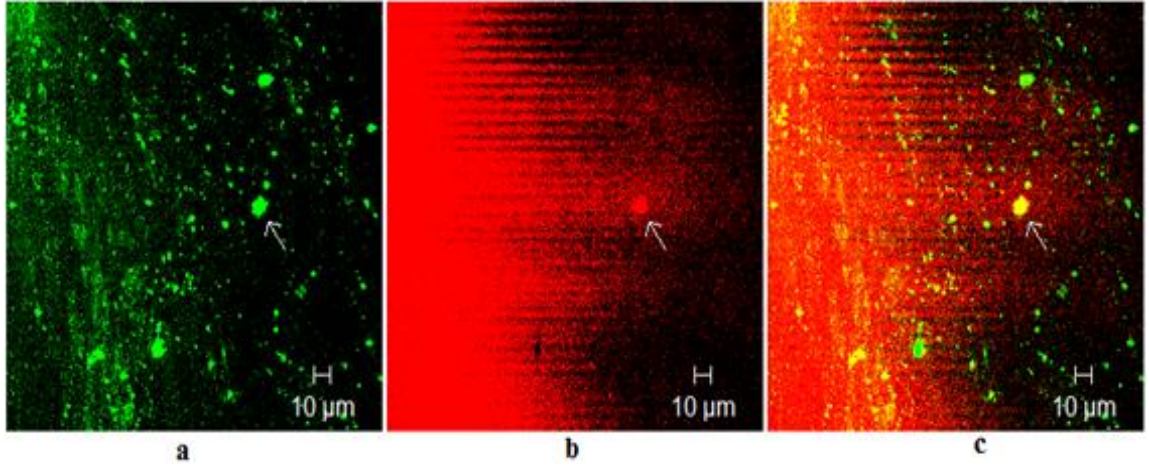
Giderim ve mikroskopi tekniklerine odaklanılan bu basamakta referans suş çalışılmamış olup, sadece E334 izolatu ile çalışılmıştır. Bir önceki çalışma sonuçlarından elde edilen verilere göre, E334 kodlu bakteri için en etkili iki giderim ajanı ve kupon yüzeyi belirlenmiştir. Mikroskobik analizlerden önce canlı hücreleri boyayarak yeşil floresan veren Syto 9 (uyarı/emisyon: 485/498 nm) ve kırmızı spekturumda ışılarak ölü hücreleri boyayan Propidyum iyodür (PI), (uyarı/emisyon: 535/617 nm) boyaarı ile en ideal yüzeyler olan cam ve polipropilendeki biyofilm preparatları boyanmıştır. CLSM analizi sonucunda çeşitli yüzeyler için elde edilen fotoğraflar şekil 4.27 - 4.28'de gösterilmiştir. Şekil 4.27'de cam ve polipropilen yüzeylerdeki biyofilm kütleleri 1'er µm'lik ince kesitlerle taranmıştır. Bu taramada bakterinin polipropilen yüzeyde 20 saatte çok daha geniş alanlarda 17 µm kadar kalın biyofilmler oluşturabildiği, cam yüzeye tutunmanın ise daha zayıf olduğu ve yüzeyin sadece belirli bölgelerinde 4 µm kadar ince biyofilmler oluşturduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu abiyotik yüzeylerden hidrofobik tabiatlı plastik materyal polipropilende $3.45 \log_{CFU/cm^2}$, pozitif yüklü, hidrofilik ve düz bir yüzey olan camda ise $2.66 \log_{CFU/cm^2}$ canlı hücre sayılmıştır. Şekil 4.27.b'deki polipropilen kontrol yüzeyinde 13-17. kesitlere tekabül eden biyofilmin alt kısmı çoğunlukla ölü hücrelerden oluşmuşken, biyofilmin tepe kısmı ise canlı hücrelerden oluşmuştur. Bunun yanında 7-9. kesitler arasında canlı hücrelerin gömülü olduğu, floresan özellik göstererek sarıya boyanan ağ şeklinde bir EPS matriksi göze çarpmaktadır. Yeşil floresanla boyanan canlı hücreler, bir araya gelerek bu network-benzeri EPS yapısının içinde mikrokoloniler oluşturmuşlardır (kesit 6-10). Şekil 4.27. a'daki camın kontrol yüzeyinde ise daha düz ve dağınık, çoğunlukla ölü hücrelerden oluşan bir biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Hücreler polipropilendeki gibi tüm yüzeyi kaplamamıştır. Yine bu yüzeyde kırmızı floresanın alt kesitlerde, canlı hücreleri ifade

eden yeşil floresanın ise orta ve üst kesitlerde yoğunlaştığı gözlenmiştir. Şekil 4.28'de görüldüğü üzere aynı alanın sadece yeşil (Şekil 4.28.a), sadece kırmızı (Şekil 4.28.b) ve hem kırmızı hem de yeşil (Şekil 4.28.c) lazer kaynakları kullanılarak görüntülenen CLSM ince kesiti sıralanmıştır. Bu sıralamada yeşil ile boyalı ilk şekil canlı hücreleri, kırmızı ile boyalı kısımlar ise ölü hücreleri göstermektedir. Her iki görüntü üst üste çakıştırıldığında ise (Şekil 4.28.c) EPS matriksinin floresan özelliğine bağlı olarak ortaya çıkan sarı fibriller görülmektedir. Ayrıca, ilk iki kesitte işaretlenmiş alanların Şekil 4.28-c'de ortası sarı, etrafı yeşil canlı hücrelerle çevrili bir alan oluşturduğu görülmektedir. Şekil 4.28.a, b'de okla gösterilen kısımlar hem Syto 9 hem de PI ile boyanmasına karşın, kesitler çakıştırıldığında bu 4.28.c'deki kısımlar sarı renge boyanmıştır. Bu alanda PI, eDNA'yı da boyadığından sarı alan eDNA, etrafında ise onu çevreleyen yeşil floresan özellikli canlı hücreler görülmektedir.



Şekil 4.27 20 h geliştirilen *A. pallidus* E334 biyofilmlerinin üç boyutlu CLSM projeksiyonları. Biyofilmler canlı hücreleri gösteren (yeşil floresan) Syto 9 ve ölü hücreleri gösteren PI (kırmızı floresan) boya ile boyanmıştır. Tüm konfokal kesitleri biyofilmin dışından içine doğru alınmıştır.

a. Camda, z-ekseninde 4 konfokal kesitine ait imaj elde edilebilmiştir, b. Polipropilen yüzeyde z-ekseninde toplam 17 kesit görüntüsü elde edilebilmiştir. Bu yüzeyde EPS matriksine gömülü halde ve çoğunlukla canlı hücrelerden oluşan mikrokoloniler görülebilmektedir (Kesit 6-10).

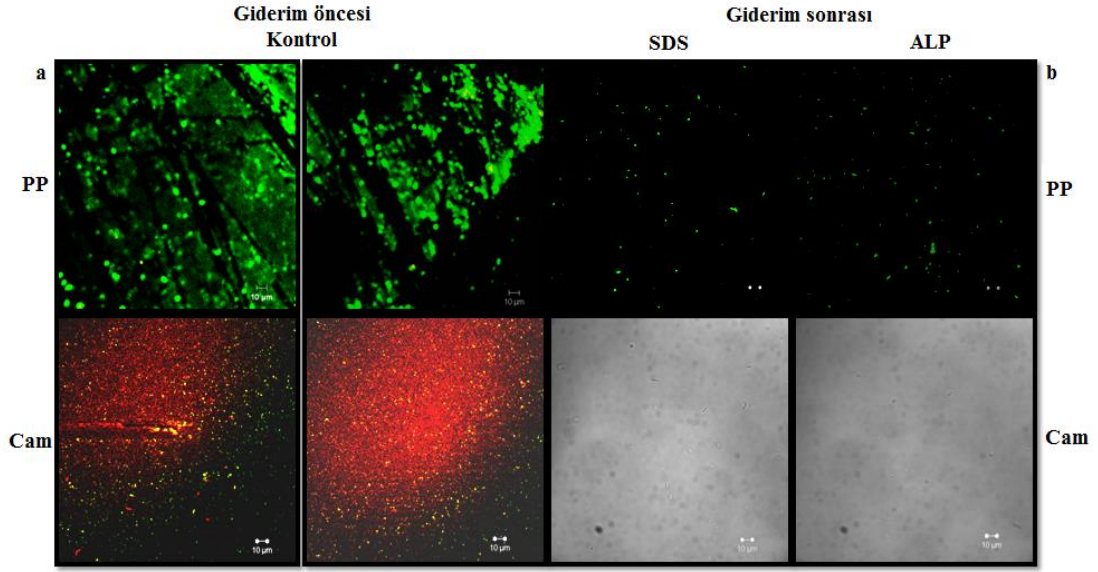


Şekil 4.28 E334 izolatının 20 h geliştirilmesi sonrası polipropilen yüzeyden alınan 3D CLSM kesitinin görüntüsü.

a. Yeşil, b. Kırmızı renkli iki farklı lazer kaynağı ve, c. Her iki görüntünün çakıştırılmasıyla elde edilen mikroskobik biyofilm görüntüsü. Oklar eDNA'yı işaret etmektedir.

4.11 *Aeribacillus pallidus* E334 İzolatının Polipropilen ve Cam Yüzeylerdeki Biyofilmlerinin Giderimi ve Bununla İlişkili CLSM Sonuçları

Bu çalışmada ise, CLSM ile mikroskopi çalışmaları yapılarak, E334 izolatı için en ideal iki yüzey olan polipropilen ve cam kuponlardaki biyofilmlerin, en etkili iki ajan olan SDS ve ALP ile giderim öncesi ve sonrasına ait biyofilm preparatları incelenmiştir.



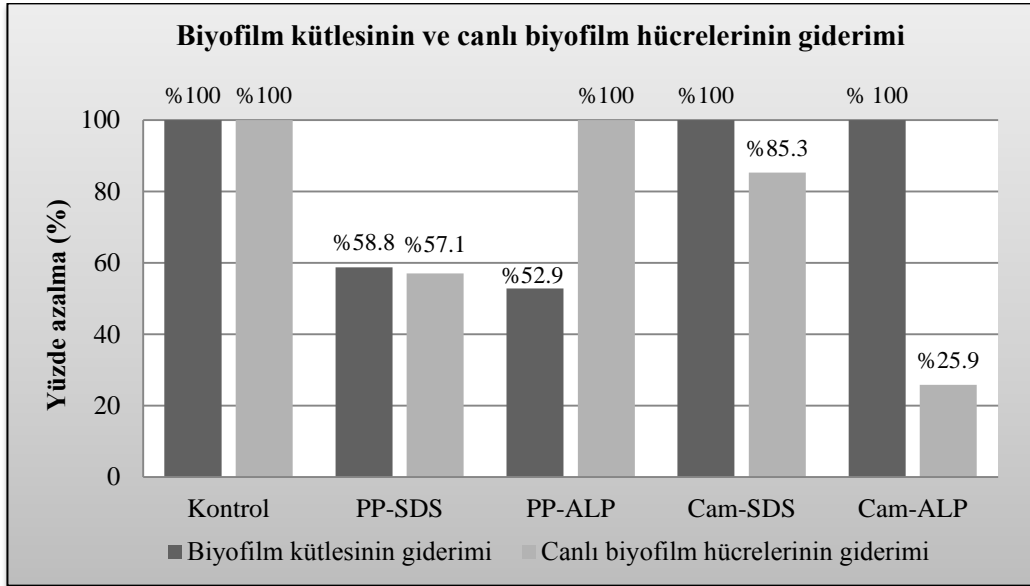
Şekil 4.29 E334 izolatının 20 h geliştirilmesi sonrası, polipropilen (PP) ve cam yüzeylerde oluşturulan biyofilmlerinin giderim öncesi ve sonrası CLSM görüntüleri.

a. Giderim öncesi incelenen kuponların iki boyutlu kesitleri, b. PP ve cam yüzeylerde SDS ve alkalin proteaz (ALP) ile giderim sonrası incelenen kuponların iki boyutlu kesitleri. Giderim sonrası elde edilen son iki cam kesiti, sadece epifloresan mikroskobu ile görüntülenebilmiştir.

CLSM çalışmasında, SDS ve ALP ile giderim çalışması öncesi (Şekil 4.29.a) ve sonrası polipropilen ve cam yüzeylerdeki biyofilmlerin yoğunlukları ile % giderim oranları Çizelge 4.11’de sunulmuştur. Bu verilere göre, E334 izolatının cam yüzeyde 4.0 µm gibi ince bir biyofilm oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.29.a). SDS ve ALP ile muamele sonrası cam yüzeydeki 4.0 µm’lik tüm biyofilm kütesinin tamamının giderilebildiği, ancak canlı hücre sayımlarında ise SDS ile %85.3 ve ALP ile de yaklaşık %25.9 oranlarında canlı hücre giderimi yapılabildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.29.b). Ayrıca, E334 kodlu bakterinin en iyi tutunduğu yüzey olarak saptadığımız polipropilen yüzeyde bakterinin kalın bir biyofilm oluşturarak 17.0 µm kalınlığında yoğun bir biyofilm ürettiği ve bu biyofilmin cam yüzeydekinden çok daha kalın olduğu görülmektedir (Şekil 4.29.a). SDS ve ALP ile giderim sonrası, polipropilen kupondaki biyofilm üzerinde bulunan 3D canlı/ölü hücre biyokütlesi, 40X’lik objektif ile incelendiğinde, 17.0 µm kalınlığındaki muamele edilmemiş kontrol kuponuyla kıyaslandığında, kalınlığı sırasıyla 7.0 µm ve 8.0 µm’ye kadar düştüğü belirlenmiştir. Buna göre, SDS ve ALP ile polipropilen kupon yüzeyinden biyofilm kütesinin giderim oranları %58.8 ile %52.9 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.30). Bu yüzeyde

özellikle alkalin proteaz ile biyofilm kütlesi tamamen giderilememiş (%52.9) olmasına rağmen, biyofilmdeki canlı hücrelerin tamamının giderilmiş olması önemli bir giderim başarısıdır. Polipropilen yüzeyde ALP ile giderim sonrası koloni sayımında hiç üremenin olmaması, seçilen ideal giderim ajanıyla uygulanan koşullar dahilinde, biyofilm kütlesindeki tüm bakteri hücre ve sporlarının öldüğüne işaret etmektedir. Polipropilen yüzeyde SDS ile giderim sonrası ise biyofilm kütlesinin %58.8 giderildiği görülürken, canlı hücre sayımlarında %57.1 giderim sağlandığı tespit edilmiştir.

Yine, şekil 4.29’da gösterildiği gibi polipropilen yüzeyde yeşile boyalı canlı hücrelerin, örümcek ağı yapısına benzer bir matriks içine gömüldükleri ve bu matriksin biyofilm hücrelerini bir arada tuttuğu görülmektedir. EPS bileşenlerinden protein ve eDNA içeriğinin kantitatif analizlerde çok yoğun olduğunun bulunması ve kullanılan giderim ajanları olan SDS ve ALP’nin özellikle proteinlere etki ettiği düşünüldüğünde, giderim stratejisinin doğru olarak kurgulandığı ve bunun da giderimin başarısını arttırdığı saptanmıştır. Alkalin proteaz ile polipropilen yüzeyinden canlı hücrelerin tamamının ve alkalin proteaz ve SDS ile cam yüzeylerden %100 (biyokütlenin) giderimi CLSM ile de başarıyla görüntülenmiştir.



Şekil 4.30 Polipropilen (PP) ve cam yüzeyleri üzerinde geliştirilen E334 biyofilmlerinin, SDS ve alkalin proteaz (ALP) ile muamelesi sonrası biyofilm kütlesi ve canlı hücreler üzerindeki etkilerinin gösterildiği giderim yüzdeleri

Çizelge 4.11 E334 kodlu izolatin giderim öncesi ve sonrası canlı hücre sayımı ve CLSM sonuçları

E334 biyofilmi	Kullanılan ideal abiyotik yüzeyler			
	Polipropilen		Cam	
Giderim öncesi	Ortalama	Standart sapma	Ortalama	Standart sapma
Koloni sayımı/yüzey alan	3.45 log _{CFU/cm²}	0.25	2.66 log _{CFU/cm²}	0.14
Biyofilm kalınlığı (3D)	17.0 µm	0.34	4.0 µm	0.50
SDS ile giderim sonrası	Ortalama		Ortalama	
Koloni sayımı/yüzey alan	1.5 log _{CFU/cm²}	0.10	0.4 log _{CFU/cm²}	0.10
Koloni sayısına göre giderim oranı	%57.1		%85.3	
Biyofilm kalınlığı (3D)	7.0 µm	0.50	-	
Biyofilm kütlesine göre giderim oranı (CLSM)	%58.8		%100	
ALP ile giderim sonrası	Ortalama		Ortalama	
Koloni sayımı/yüzey alan	Üreme yok		2.0 log _{CFU/cm²}	0.74
Koloni sayısına göre giderim oranı	%100		%25.9	
Biyofilm kalınlığı (3D)	8.0 µm	0.50	-	
Biyofilm kütlesine göre giderim oranı (CLSM)	%52.9		%100	

E334 izolatinın EPS matriksinde, yüksek protein içeriğine sahip olduğundan diğer bileşenler ve hücreler arasında bir ağ yapısı oluşmuştur. CLSM'de canlı hücrelerin bulunduğu ve matriks içinde gömülü olarak mikrokolonilerin olduğu görülebilmektedir. Bu yüzden protein içeriği, matriks stabilitesinde ve *A. pallidus* E334 biyofilmlerinin korunmasında çok önemli olabilir. Sonuç olarak, biyofilm kütlesini gidermede başarılı olunan SDS ve canlı biyofilm hücrelerinin gideriminde başarılı olunan ALP ajanları bir arada kullanıldıklarında, giderimde sinerjistik etkilerinin çok daha yüksek olabileceği görülmüştür.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Termofilik basillerin çeşitli yüzeylere tutunarak genel biyofilm karakteristiklerinin anlaşılması, sporlu bakterilerin pek çok endüstriyel süreçte oluşturdukları kontaminasyonu azaltabilmek ve etkili sanitasyon programlarının geliştirilmesi adına önem arz etmektedir. Dolayısıyla, termofilik basillerin biyofilm oluşumları ve bu biyofilmlerin giderimi ile ilgili önemli veriler, literatürde ilk defa bu tez çalışmasıyla ortaya çıkarılmıştır.

Tez çalışması öncesinde tamamlanan proje sonuçlarımıza göre kültür koleksiyonumuzda bulunan 145 endospor oluşturan basilin genel biyofilm üretim kapasiteleri taranmış ve bunun sonucunda bu basiller arasından termofilik üreme göstererek, yüksek miktarda biyofilm oluşturabilen *Aeribacillus pallidus* E334 kodlu termofilik basil izolatu ve pozitif kontrol olarak da *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127 referans aday suşu seçilmiştir. Seçilen bu iki termofilik bakteri, polistiren mikrotitrasyon plakası kuyucuklarının yanısıra, çelik kupon yüzeylerine de iyi tutunduklarından, giderim çalışmalarında daha etkili olacakları ön görüldüğünden, tez çalışmalarına dahil edilmiştir. Tez çalışmalarında, bu iki bakterinin gelişmeleri için ihtiyaç duydukları optimum pH, tuz ve sıcaklık değerleri saptanmıştır. Ardından, biyofilm oluşumu için gerekli optimum pH, tuz ve sıcaklık değerleri polistiren mikrotitrasyon plakalarında ölçülmüştür. Bakterilerin biyofilmlerindeki EPS bileşenlerinden karbonhidrat, protein ve eDNA miktarları saptanmış ve bu bileşenlerden eDNA'nın varlığı moleküler biyolojik çalışmalar ile kanıtlanmış, ayrıca bakterilerin olgun biyofilmlerinin DNaz I enzimi ile muamelesi sonucu eDNA'nın EPS'deki önemi belirlenmiştir. Bakterilerin polikarbonat, paslanmaz çelik, polivinil klorür, polipropilen, polistiren ve cam menşeyli 6 farklı abiyotik yüzeyden hangisinde yüksek miktarda biyofilm ürettikleri saptanmıştır. Bakterilere ait biyofilmlerin, 15 farklı kimyasal giderim ajanı ile belirli sıcaklık ve sürelerde muamelesi sonucunda, hangi bakteride, hangi giderim ajanının biyolojik giderimde daha çok etkili olduğu, mikrotitrasyon plakaları kullanılarak belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra yürütülen giderim ve mikroskopi çalışmaları ise sadece E334 izolatu ile yapılmış olup, E334 için en ideal giderim ajanları oldukları belirlenen ALP ve SDS varlığında polipropilen ve cam

yüzeylerde oluşturulan biyofilmlerde, giderim öncesi ve sonrası biyofilm yapısı hakkında, hem canlı hücre sayımı sonuçları hem de CLSM ile elde edilen biyofilm kütlesi verileri doğrultusunda önemli bulgular elde edilmiştir.

Termofilik *A. pallidus* E334 izolatu, Gram pozitif, amilaz negatif, çubuk şeklinde endospor oluşturabilen, hareketli bir basildir. *A. rupiensis* ise *A. pallidus*'tan farklı olarak amilolitik aktivite göstermemektedir (Cihan vd. 2011). *A. pallidus* E334 izolatu ve *A. rupiensis* DSM 17127 referans suşu pelikül oluşturabilen, ayrıca paslanmaz çelik ve polistiren plakalar üzerinde güçlü biyofilmler oluşturabilen bakterilerdir. E334 izolatının optimum gelişim değerleri 65°C, pH 9.5 ve %1 NaCl konsantrasyonunda olup, optimum biyofilm oluşumu ise 60°C, pH 7.5 ve %1.5 NaCl konsantrasyonundadır. DSM 17127 suşunun ise, optimum gelişim değerleri 55°C, pH 8.0 ve %1 NaCl konsantrasyonunda olup, optimum biyofilm oluşumu ise 60°C, pH 8.0 ve % 0 NaCl konsantrasyonundadır. Bu sonuçlara göre, E334 izolatının biyofilm oluşumunun, üreyebildiği pH değerlerinden daha dar bir aralıkta gerçekleştiği ve çok daha düşük bir pH'da biyofilm ürettiği görülmüştür. DSM 17127 suşu ise, yine E334 gibi dar pH aralığında biyofilm üretebilmiş, ancak biyofilm oluşumu ve gelişimi için optimal pH değeri aynı kalmıştır. Bu da sadece E334 için nötral pH'ın biyofilm oluşumu için sınırlandırıcı bir etkisi olduğunu göstermektedir. Tuz gerksinimine bakıldığında, E334 izolatının gelişmek için halotolerant olduğu (%0.5-4.0), fakat optimal biyofilm oluşumunda daha yüksek bir tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyduğu gözlenmiştir. DSM 17127 suşu ise gelişiminde %1 kadar tuzu tolere edebilse de, biyofilm üretirken hiç tuz istememiş ve tuz onun biyofilm oluşumu için sınırlandırıcı etki göstermiştir. Son olarak, her iki bakteri de 50-65°C arasında hem gelişebilmiş, hem de biyofilm üretebilmiştir. Ancak, optimum gelişimleri için gerekli olan 65°C, biyofilm optimumları için 60°C'ye düşmüştür. Bu da her iki bakteri için yüksek sıcaklıkların biyofilm oluşumunu kısıtladığına işaret etmektedir.

A. pallidus E334'ün EPS bileşenlerindeki toplam protein ve karbonhidrat değerleri sırasıyla 210 µg/mL and 14.3 µg/mL olarak ölçülmüş olup, DSM 17127 için değerler sırasıyla, 470 µg/mL and 24.8 µg/mL olarak ölçülmüştür. E334 izolatının EPS matriksi, yüksek protein içeriğine sahip olduğundan diğer bileşenler ve hücreler arasında bir ağ

yapısı oluşturabilmektedir. CLSM incelemesinde canlı hücrelerin tutunduğu ve matriks içinde gömülü olarak mikrokoloniler oluştuğu görülmüştür. Bu yüzden protein, matriks stabilitesinde ve *A. pallidus* E334 biyofilmlerinin korunmasında çok önemli olabilir. Dahası, saflaştırılmış genomik DNA miktarı E334 için 205 ng/μL iken, DSM 17127 için 1101.2 ng/μL olarak ölçülmüştür. EPS'deki saf eDNA'nın miktarı, E334 için 247 ng/μL, DSM 17127 için ise 766.8 ng/μL olarak ölçülmüştür. Genomik DNA ve eDNA'nın moleküler ağırlıkları birbirlerinden farklılık göstermiş olup, E334 ile DSM 17127'nin genomik DNA ve eDNA'larının moleküler ağırlıkları sırasıyla 24.5 kb - 21.4 kb ve 27.6 kb - 20.9 kb'dır. Genomik ve eDNA arasındaki bant profillerindeki farklılıkları tespit etmek için uygulanan RAPD-PCR analizi sonucu, sadece genomik DNA'da bant profile oluşturabilmişken, kullanılan primerler ile eDNA herhangi bir amplikon vermemiştir. Ancak, yine de EPS matriksinde bulunan eDNA'nın varlığı, agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometrik DNA ölçümleri ile doğrulanmıştır. Biyofilm hücrelerin genomik DNA'sında elde edilen pozitif PCR reaksiyonlarına karşın, eDNA PCR deneylerinde herhangi bir sonuç vermemiştir. Çoğu mezofilik bakterilerden eDNA'lar izole edilmiştir. *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *Salmonella*, *Pseudomonas* ve *Listeria* gibi türlerle yürütülen bu çalışmalarda PCR reaksiyonları pozitif sonuç vermiştir (Vilain vd. 2009, Grande vd. 2010, Harmsen vd. 2010, Shields vd. 2013, Wang vd. 2013, Dengler vd. 2015). Ancak, şimdiye kadar literatürde termofilik basillerin eDNA içeriği hakkında herhangi bir bilgi mevcut değildir. Dolayısıyla, bu çalışmada eDNA ile ilişkili amplifiye edilemeyen PCR reaksiyonlarının ve matriksde eDNA varlığının kanıtlanması sebebiyle, bu iki DNA molekülü arasındaki farklılığın, eDNA'nın ve genomik DNA'nın katlanma tipi ve konformasyonel stabilite farklılıklarından kaynaklanabileceği sonucuna varılabilir. Bu farklılık, PCR reaksiyonlarında DNA polimerazın hedef eDNA'ya ulaşamamasından kaynaklanabilir. Hem genomik DNA hem de eDNA'nın saflaştırılması aşamasında benzer kimyasal ekstraksiyon metodları uygulanmasına rağmen, kimyasal muamelelerden sonra eDNA yeniden düzenlenmiş ve daha çok kompakt hale gelmiş olabilir ve daha çok katlanarak yoğun bir 3D yapı kazanmış olabilir.

E334 ve DSM 17127 olgun biyofilmlerinin 2 ila 12 saat süresince DNaz I enzimi ile muamele edilmesi sonucu, pozitif kontrol ile arasında önemli farklılıklar

gözlemlenmiştir. E334 olgun biyofilmleri, 2 saat enzimle muamele sonrasında biyokütle giderimi %86.8 olurken, inkübasyon süresi arttırılarak 12 saate çıkarıldığında ise, giderim oranı %79.7 olarak bulunmuştur. DSM 17127 için ise, 2 saat enzimle muamele sonrasında biyokütle giderimi %80.0 olurken, 12 saat sonunda giderim oranı %88.0 olarak bulunmuştur. Genomik DNA'ları, DNaz I, RNaz A and Proteinaz K ile muamele edildiğinde, sadece DNaz I enzimi tarafından parçalanmışlardır. Bunun aksine, eDNA'ları bu enzimlerin hiçbirinden etkilenmemiştir. eDNA'nın DNaz I enzime dirençliliğini doğrulamak için, DNaz I enziminin daha yüksek konsantrasyonları uygulanmıştır; ancak herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Saflaştırılan eDNA'nın, DNaz I enzime dirençlilik göstermesi, enzimin EPS bileşenlerinden protein ve karbonhidratdan arınmış çıplak eDNA'nın kendi üzerine daha sıkı bir katlanma yapısı göstermesi yüzünden hedef DNA'ya kolaylıkla erişememesi şeklinde açıklanabilir. Saflaştırma aşamalarında, genomik DNA ve eDNA için benzer kimyasal saflaştırma yöntemleri uygulanmasına rağmen, eDNA muhtemelen kimyasal muamelelerden sonra yeniden düzenlenmiş ve ilave katlanmalar ile sıkı bir yapı kazanmış olabilir.

Yürütülen bu çalışma, PCR reaksiyonlarında eDNA çoğaltılamamış olmasına rağmen, EPS matriksinde eDNA varlığı ve DNaz I duyarlılığı tespit edilmiştir. Dahası, matriks içerisinde gömülü olan eDNA, DNaz I'e duyarlı iken, saflaştırılan eDNA molekülü DNaz I'e dirençli hale gelmiştir. Tüm bu sonuçlar, saflaştırılmış eDNA'nın katlanma motifi değişkenliği ve konformasyon stabilitesi ile açıklanabilir. Dolayısıyla, protein ve karbonhidrat ağından ayrılan saf eDNA molekülü muhtemelen daha sıkı şekilde paketlenmiş olduğundan, PCR reaksiyonunda polimeraz enzimi hedef eDNA'ya ulaşamamış ve PCR amplifikasyonu gerçekleşmemiştir.

eDNA'ların DNaz I enzime duyarlılıkları E334 için %86.8, DSM 17127 için ise %80.0 olduğu belirlendiğinden, olgun eDNA'nın biyofilmlerin birer yapısal bileşeni olarak önemi ortaya koyulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre DNaz I dirençliliği, iki hipotez ile açıklanabilir. Birincisi, eDNA üzerinde oluşan metilasyon desenleriyle ve diğeri ise, eDNA'nın yapısal olarak daha stabil ve daha sıkı bir şekilde paketlenmesi sonucu enzimin hedef eDNA'ya ulaşamaması ile ilişkilendirilebilir. Bu nedenlerden

dolayı, hem PCR reaksiyonlardaki DNA polimeraz hem de DNaz I enzimlerinden hiçbiri eDNA'ya ulaşamamış olabilir (Hewish 1977, Burgoyne vd. 1978, Grande vd. 2010, Jakobovics vd. 2013). Ayrıca, mikrotitrasyon plaka deneylerinde her iki bakterinin olgun biyofilmi üzerine DNaz I enziminin, biyofilm kütlelerini dağıtarak etki etmesi, DNaz I direncini gösterecek mevcut bir metilasyon deseninin olmadığına işaret etmektedir. Bu sonuçlara göre ikinci hipotez olan, saflaştırma aşamasından sonra daha sıkı paketlenmiş eDNA'nın varlığı daha olasıdır. EPS matriksi içerisinde, protein ve karbonhidrat bileşenlerinin varlığı ve onların eDNA ile etkileşimleri sonucu matrikste örümcek ağ şeklinde bir ağ oluşabilmektedir ve böylece oluşan bu üç boyutlu yapı ile eDNA'nın stabilitesi artabilir ve daha sıkı paketlenir. E334 biyofilm bileşeni eDNA'lar muhtemelen protein ve karbonhidratlar ile etkileşimleri yüzünden, örümcek ağına benzer bir ağ görüntüsündeki matriksde daha gevşek ve açılmış bir konformasyona sahip olabilirler. Ancak, böyle bir durumda DNaz veya polimeraz enzimleri etkilerini gösterebilecektir.

Daha önce yapılan çalışmalarda olgun biyofilmler üzerine DNaz I enziminin etki ettiği veya etmediği ile ilgili sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmaların bir çoğu, DNaz enzimlerinin çoğu mezofilik bakteri ve mantarların biyofilm gelişimlerini engelleyebildiğini ve dağıtabildiğini göstermiştir (Whitchurch vd. 2002, Tetz vd. 2009, Nijland vd. 2010, Harmsen vd. 2010, Martins vd. 2010). Diğer taraftan, mezofilik bakterilerin biyofilmlerinin eDNA içeriğinin DNaz enzimlerine dirençli olduğunu gösteren de pek çok çalışma mevcuttur (Grande vd. 2010, Lappann vd. 2010, Shields vd. 2013). Ancak şu ana kadar literatürde eDNA saflaştırdıktan sonra, DNaz I enziminin dirençliliğine veya PCR ile ilgili DNA polimeraz dirençliliğine dair herhangi bir çalışma yoktur. Bu sonuçlar, termofilik bakterilerden izole edilen eDNA'nın termostabilitesiyle de bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

E334 izolatının, 6 farklı yüzey içerisinde (paslanmaz çelik, cam, polivinil klorür, polipropilen, polistiren, polikarbonat) en iyi polipropilen ve cam yüzeyine tutunarak biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Polipropilen ve cam yüzeylerinde canlı hücre sayıları sırasıyla 5.80 ve 5.75 logCFU/cm² olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre, E334 izolatı için, plastik tabiatlı bir polimer olan polipropilenin hidrofobik doğasının ve

hidrofilik, pozitif yüklü ve düz bir yüzey olan camın tutunma için en uygun yüzeyler oldukları sonucuna varılmıştır. DSM 17127 suşu için ise, polikarbonat ve paslanmaz çelik en uygun iki yüzey olarak belirlenmiş olup, bu yüzeyler üzerindeki canlı hücre sayıları sırasıyla 5.68 ve 5.12 logCFU/cm² olarak hesaplanmıştır.

Yüzey yükü, hidrofobisite, ıslanabilirlik ve yüzeyin pürüzlülüğü biyofilm oluşumu için hücrelerin tutunma yeteneğini direk olarak etkiler (Van Houdt ve Michiels 2010). Düşük yüzey enerjili materyallerin genellikle hidrofobik, zayıf pozitif veya zayıf negatif yüklü ve çoğunlukla plastik organik materyaller oldukları söylenebilir (Carpentier ve Cerf 1993, Kumar ve Prasad 2006).

Paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde termofilik basillerin biyofilm oluşumu üzerine bazı çalışmalar mevcut ve bu sonuçlar çelik, cam veya plastik materyaller gibi abiyotik yüzeylerde değişkenlik göstermektedir (Flint vd. 2001, Burgess vd. 2009). Bu çalışmadaki *A. pallidus* E334 izolatu için, hidrofobik ve düşük yüzey enerjili bir materyal olan polipropilen yüzey, hücre tutunması için en ideal abiyotik substrat olarak belirlenmiştir. Ayrıca, hidrofilik, pürüzsüz ve pozitif yüzey yüküne sahip cam, E334 hücrelerinin tutunması için ikinci en uygun yüzey olarak saptanmıştır. *A. rupiensis* DSM 17127 referansı için ise, hidrofobik ve düşük yüzey enerjili bir materyal olan polikarbonat, hücre tutunması için en uygun abiyotik substrat olarak belirlenmiştir. Ayrıca, hidrofilik, pürüzsüz ve pozitif yüzey yüküne sahip paslanmaz çelik, DSM 17127 hücrelerinin tutunması için ikinci en ideal yüzey olarak saptanmıştır. Böylece, kullanılan abiyotik kuponun yüzey karakterine bağlı olarak, bakterilerin oluşturdukları biyofilm miktarları değişiklik göstermiş olup, Marouani-Gadri vd. (2009)'un çalışmasında olduğu gibi, hidrofilik yüzeylere kıyasla hidrofobik yüzeyler üzerinde E334 izolatının biyofilm gelişimi arasında çok az farklılık görülmüştür.

Mikrotitrasyon plakalar üzerinde oluşan E334 biyofilmlerine uygulanan kimyasallar ile biyofilm giderim çalışması sonucunda, ALP ve SDS ile muamele sonrasında sırasıyla %95.3 ve %92.3 giderim başarısı sağlanmıştır. Lizozim, tripsin, α -amilaz, proteaz ve selüloz gibi diğer enzimatik ajanlar biyofilm üzerine yaklaşık %50 oranında giderim etkisi sağlamışlardır. SDS hariç, furanon, triklosan, potasyum monopersülfat/sodyum

tiyosülfat, sodyum metaperiodat ve TCA gibi enzimatik olmayan ajanlar biyokütlenin gideriminde etkili bulunmamıştır (<50%). DSM 17127 suşu için biyofilm giderimi sonucunda ise, ALP ve tripsin ile muamele sonrasında sırasıyla %100 ve %96.7 giderim başarısı sağlanmıştır. Her iki bakteri için de, en az biyofilm giderimi potasyum monosülfat ve sodyum tiyosülfat ajanlarının ardı sıra kullanılması ile sağlanmıştır.

Bir çeşit ALP olan ve *B. licheniformis* menşeyli Subtilizin A, alkali pH'da (pH 9.0-11.0) aktivite gösteren bir enzim olup, sanitasyon deneylerinde kullanılmıştır. Ayrıca, enzimatik ajan subtilizin, bir bakteriyel tip VIII proteaz (optimal pH 7.5-10.0)'dır. Her iki proteazın da optimal pH'ları enzimatik aktivite için birbirlerinden farklılık göstermelerine rağmen, bu proteazların ikisi de endopeptidazdır ve proteinlerin peptit bağlarını ayırır ve serin, bu proteazların aktif bölgelerindeki nükleofilik aminoasit olarak görev yapar (Hedstrom 2002). Dahası, enzimatik olmayan kimyasal ajan SDS, anyonik bir sürfaktandır ve sahip olduğu negatif yük ile proteinleri denatüre eder ve proteinlerin birincil yapısına döndürerek üç boyutlu konformasyonunu değiştirir. EPS matriks analizlerinde E334'de yüksek protein içeriği gözlemlenmiştir. Bu yüzden, matriks sonuçları ile de paralel şekilde, E334 biyofilmi üzerine en çok proteinlere etki eden temizleme ajanları giderimde başarılı olmuştur. DSM 17127 biyofilmi için ise, en etkili kimyasallar alkalen proteaz, tripsin ve nisin olarak belirlenmiştir.

Paslanmaz çelik kuponların yüzeyleri üzerinde termofilik bakterilerin kontrolü ve *A. flavithermus* B12-C^m izolatının biyofilmlerinin giderimi ile ilgili çalışmaların birinde, Paradigm olarak adlandırılan proteolitik bir enzim temizleyici preparatı kullanarak canlı biyofilm hücrelerinin azalmasını sağlamıştır; ancak mikroskop altında hücre materyal kalıntıları (%11) görülebilmektedir. Ayrıca, Purafect olarak adlandırılan bir subtilizin türevi ile biyofilmlerin %100 öldürülmesinde başarı sağlanamamış; ancak canlılığın azaldığı saptanmıştır (Parkar 2004).

Parkar vd. (2003) yaptıkları çalışmaya göre, *A. flavithermus* B12-C^m suşu için en az iki farklı paslanmaz çelik kupon yüzeyi üzerindeki 18 saatlik biyofilmleri, %2'lik SDS ile 10 dk kaynatmışlar ve hücre canlılığının %80 azaldığını ve sadece sporların hayatta kaldığını bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında ise, polistiren mikrotitrasyon plakalar

üzerinde oluşan biyofilmlerin, %3'lük SDS ile 10 dk kaynatılması sonrası, E334 izolatında biyofilm oluşumunun %92.3 oranında azaldığı, DSM 17127 referans suşunda ise, %92.6 azaldığı tespit edilmiştir. Tripsin kullanıldığında ise, E334 izolatında %51.9, DSM 17127 suşunda ise, %96.7 oranında biyofilm giderimi sağlanmıştır. Windholz (1983), lizozim, sodyum metaperiodat veya TCA'nın muamelesi sonucu vejetatif hücrelerin tutunmasının arttığını belirtmiştir. Ayrıca, Chen ve Stewart (2000), *P. aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine uygulanan 500 mg/L lizozim ile canlı hücre sayısında %87, biyofilm proteini gideriminde ise %40 başarı elde etmişlerdir. Ayrıca yine bu çalışmada SDS (1000 mg/L) ile muamele de önemli bir giderime neden olmuş; ancak tüm canlı hücreleri öldürememiştir. Tez çalışmasında ise, E334 kodlu izolat için lizozim ile %53.9, sodyum metaperiodat ile %9.5 ve TCA ile %17.9 giderim sağlanmıştır. DSM 17127 suşu için ise, lizozim ile %77.3, sodyum metaperiodat ile %68.3 ve TCA ile %75.5 giderim sağlanmıştır. Giderim çalışmaları arasındaki bu farklılıklar; bakteri türlerinin farklı oluşu ve abiyotik substratların yüzey karakteristikleri ile açıklanabilir.

Daha ileri giderim ve mikroskopi çalışmalarında sadece E334 izolatı kullanılmış olup, E334 biyofilmleri 6 kuyucuklu mikrotitrasyon plakalarda 20 saat boyunca polipropilen ve cam yüzeyler üzerinde geliştirilmiştir. CLSM'de polipropilen yüzeyde EPS'de canlı ve ölü hücreleri saran ağ benzeri yapılar gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, CLSM analizleri, E334 izolatının cam üzerindeki biyofilmlerinin sadece 4 µm kalınlığında olduğu gözlemlenirken, polipropilen üzerinde ise maksimum kalınlık 17 µm olarak gözlemlenmiştir. Yine mikroskobik analizlerde, polipropilenin hidrofobik karakterinin E334 hücrelerinin floresan bir EPS matriks ile ilişkili kalın ve pürüzlü biyofilmler oluşmasına sebebiyet verdiği görülmüştür. Bunun yanı sıra, bakterinin farklı abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilm kütlelerinin morfolojik olarak da farklılıklar içerdiği gözlenmiştir.

Bütün CLSM sonuçları, *A. pallidus* E334 için, olgun biyofilmlerin oluşumu ile abiyotik yüzeylerin fizikokimyasal karakterleri arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Canlı-ölü hücreler içeren biyofilmlerin yapısı ve kalınlığı ile EPS matriksi, kullanılan abiyotik yüzeylere göre farklılık göstermiştir. Ayrıca, yüksek

protein içeriği ile yoğun bir floresans özelliğe sahip olan EPS matriksi, biyofilm yapısının stabilitesinde ve gelişiminde önemli bir rol oynamış ve örümcek ağı gibi (spider web benzeri) matriks, çoğunlukla gömülü canlı hücreler ile kaynaşmıştır. Bu örümcek ağı EPS matriksleri *P. aeruginosa* PAO1 and WFPA801 biyofilmlerinde de gözlemlenmiş ve Psl proteinlerin varlığı ile açıklanmıştır (Wang vd. 2013). Bu çalışmada WFPA801'in örümcek ağı gibi matriks oluşturan, mikrokolonileri bağlayan, çoklu hücre agregatlarını çevreleyen biyofilmlerinde güçlü floresan sinyaller gözlemlenmiştir. EPS ile ilişkili bu ağ benzeri yapı, saflaştırılarak protein ve karbonhidratlardan yoksun eDNA'nın DNaz I enzimine dirençliliğine karşın, olgun E334 biyofilmlerinde eDNA'nın DNaz I enziminde duyarlılığını açıklayabilir. EPS matriks içeriği olan bu ağ benzeri yapının, hücreler ve eDNA'nın stabilitesini koruduğu düşünülmektedir. Matrikse gömülü eDNA'nın konformasyonu, saflaştırılmış eDNA ile karşılaştırıldığında enzimatik aktivitelere duyarlılığı nedeniyle daha az katlanmış olabilir.

Biyofilmlerin giderim sonrası canlı hücre sayımı ve CLSM sonuçlarına göre, polipropilen ve cam yüzeylerde SDS ve ALP uygulanması ile, cam yüzeylerden biyofilm hücreleri sadece %25.9 giderilebilirken, polipropilen yüzeyinden canlı hücrelerin tamamı (%100) ALP ile giderilebilmiştir. SDS muamelesi sonucu ise, polipropilen ve cam yüzeylerinde sırasıyla %57.1 ve %85.3 canlı hücrelerin giderimi sağlanmıştır. SDS ve ALP'in kullanılması sonucu polipropilen yüzeylerden sırasıyla biyokütlenin %58.8 ve %52.9'unun giderilebildiği görülmüştür. Sonuç olarak, alkalin proteaz ile polipropilen yüzeyinden canlı hücrelerin tamamının ve ALP ve SDS ile cam yüzeylerden biyokütlenin tamamının giderimi CLSM ile mikroskopik olarak da görüntülenmiştir. Yapılan bu biyogiderim çalışmasında, proteinlere etki eden bu iki ajanla muamele sonucu yüzeylerden biyofilm kütlelerinin ve canlı hücrelerin tamamen elimine edilmesi, önemli bir başarı kriteri olarak değerlendirilmiştir.

EPS matriksi, hücreler ve diğer bileşenler arasında bir ağ yapısı oluşturur ve çoğunlukla fazla miktarda protein içerir. CLSM analizlerinde canlı hücrelerin floresan matriks içerisinde gömülü olarak mikrokoloniler oluşturduğu gözlenmiştir. Bu yüzden, protein matriksi, *A. pallidus* E334 biyofilminin korunmasında ve stabilitesinde çok önemli bir

yere sahiptir. Tüm bu bilgiler ışığı altında, E334 kodlu izolatın, polipropilen yüzeyde ALP ile giderim sonrası canlı biyofilm hücrelerin tamamının ve cam yüzeyde ise SDS ve ALP varlığında biyofilm kütesinin tümünün yok edilmesi, tekrar biyofilm oluşumunun önlenmesi açısından oldukça önemli bir bulgudur. Sonuç olarak, E334 izolatına uygulanan SDS ve ALP oranlarının, sürelerinin ve sıcaklıklarının biyogiderim çalışması için uygun olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu iki protein giderici ajan kombine kullanıldıklarında, tüm biyofilm kütesi ve canlı hücreler üzerinde yaratacakları sinerjistik etkilerinden dolayı daha etkili bir giderim stratejisi oluşturulması olasıdır.

Sonuç olarak, elde edilen tüm veriler göz önüne alındığında, tezde hedeflenen amaçlar doğrultusunda, termofilik basillerin biyofilm üretimleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Elde edilen veriler, çeşitli koşullar altında *A. pallidus* E334 biyofilmlerinin fizyolojisinin ve karakterizasyonunun yapıldığı ilk sonuçlardır. Pek çok sanitasyon rejiminin etkisi gözlemlenmiş ve abiyotik yüzeylerden başarıyla termofilik biyofilmlerin yok edilmesi sağlanmıştır. Ayrıca temel mikrobiyolojik, mikroskopik ve moleküler biyolojik çalışmalarla desteklenmiş bu biyofilm giderimi bulguları pek çok endüstriyel süreçte sorun teşkil eden termofilik basil biyofilmlerinin gideriminde kullanılabilecek sorunların çözümüne odaklı yaklaşımlar geliştirme imkanı doğurmuştur.

KAYNAKLAR

- Abee, T., Kovacs, A.T., Kuipers, O.P. and van der Veen, S. 2011. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2); 172-179.
- Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J. and Sturve, J. 2002. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*, 46(9); 1485-1489.
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59(4); 1114-1128.
- Almeida, M. and De Franca, F. 1999. Thermophilic and mesophilic bacteria in biofilms associated with corrosion in a heat exchanger. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(4); 439-442.
- Anonymous. 2003a. Web Sitesi: www.cs.montana.edu, Erişim Tarihi: 13.08.2015.
- Anonymous. 2003b. Web Sitesi: www.savcor.com, Erişim Tarihi: 09.10.2016.
- Angst, E.C. 1923. The fouling of ship bottoms by bacteria. Report, Bureau Construction and repair. United States Navy Department, Washington, DC.
- Anwar, H., Dasgupta, M. and Costerton, J. 1990. Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(11); 2043.
- Anwar, H., Strap, J. and Costerton, J. 1992. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(7); 1347.
- Aparna, M.S. and Yadav, S. 2008. Biofilms: microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(6); 526-530.
- Applegate, D.H. and Bryers, J.D. 1991. Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(1); 17-25.
- Araujo, J.C., Mortara, R., Campos, J.R. and Vazoller, R.F. 2004. Development and analysis of anaerobic biofilms onto hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Environmental Technology*, 25(7); 809-817.
- 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 Science*, 79(12); 1839-1845.

- Bai, A.J. and Rai, V.R. 2011. Bacterial quorum sensing and food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(3); 183-193.
- Banat, I.M., Marchant, R. and Rahman, T.J. 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (Pt 6); 2197-2201.
- Barnes, L.M., Lo, M., Adams, M. and Chamberlain, A. 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10); 4543-4548.
- Beatty, N.F. and Walsh, M.K. 2016. Influence of thermosonication on *Geobacillus stearothermophilus* inactivation in skim milk. *International Dairy Journal*, 61;10-17.
- Beech, I.B. 1996. The potential use of atomic force microscopy for studying corrosion of metals in the presence of bacterial biofilms-an overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 37(3), 141-149.
- Beech, I.B. and Sunner, J. 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3); 181-186.
- Berne, C., Kysela, D.T. and Brun, Y.V. 2010. A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. *Molecular Microbiology*, 77(4), 815-829.
- Beveridge, T.J., Makin, S.A., Kadurugamuwa, J.L. and Li, Z. 1997. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4); 291-303.
- Blackman, I.C. and Frank, J.F. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 59(8); 827-831.
- Block, J. 1992. *Biofilms in drinking water distribution systems*. Springer, 469-485.
- Boles, B.R., Thoendel, M. and Singh, P.K. 2004. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47); 16630-16635.
- Borenstein, S. 1994. *Microbiologically influenced corrosion handbook*. Elsevier.
- Bos, R., Van der Mei, H.C. and Busscher, H.J. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2); 179-230.
- Bott, T. 1992. *Introduction to the problem of biofouling in industrial equipment*. Springer, 3-11.

- Boulane-Petermann, L. 1996. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: A review with special reference to the food industry. *Biofouling*, 10(4); 275-300.
- Bower, C., McGuire, J. and Daeschel, M. 1995. Influences on the antimicrobial activity of surface-adsorbed nisin. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3); 227-233.
- Bower CK, McGuire J. and Daeschel M.A. 1996. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science and Technology*, 7(5); 152-157.
- Boyd, A. and Chakrabarty, A.M. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3); 162-168.
- Boziaris, I. and Adams, M. 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. *International Journal of Food Microbiology*, 53(2); 105-113.
- Böckelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, T.R., Wecke, J., Lawrence, J.R. and Szewzyk, U. 2006. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiology Letters*, 262(1); 31-38.
- Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R. and Kolter, R. 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59(4); 1229-1238.
- Bremer, P.J., Seale, B., Flint, S., Palmer, J., Fratamico, P. and Annous, B. 2009. Biofilms in dairy processing. *Biofilms in the Food and Beverage Industries*, 396-431.
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V. and Briandet, R. 2010. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods*, 82(1); 64-70.
- Bridier, A., Meylheuc, T. and Briandet, R. 2013. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron*, 48;65-69.
- Brock, T.D. and Freeze, H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98, 289-298.
- Brock, T.D. 2001. The origins of research on thermophiles. In: *Thermophiles biodiversity, ecology, and evolution*, Springer US, 1-9.
- Brown, M.R., Allison, D.G. and Gilbert, P. 1988. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22(6); 777-780.

- Burgess, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M. and Flint, S.H. 2009. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107(3); 1012-1018.
- Burgoyne, L.A., Skinner, J.D. and Marshall, A. 1978. Analysis of the penetrable space within the nucleus. *Journal of Cell Science*, 31(1); 1-11.
- Busalmen, J., Vazquez, M. and De Sanchez, S. 2002. New evidences on the catalase mechanism of microbial corrosion. *Electrochimica Acta*, 47(12); 1857-1865.
- Busscher, H.J., Poortinga, A.T. and Bos, R. 1998. Lateral and perpendicular interaction forces involved in mobile and immobile adhesion of microorganisms on model solid surfaces. *Current Microbiology*, 37(5); 319-323.
- Byrd, M.S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A.B., Richardson, S.H., Ma, L., Ralston, B., Parsek, M.R., Anderson, E.M., Lam, J.S. and Wozniak, D.J. 2009. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology*, 73(4); 622-638.
- Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lawrence, J.R. 1992. *Confocal laser microscopy and digital image analysis in microbial ecology*. Springer, 1-67.
- Carpentier, B. and Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6); 499-511.
- Characklis, W.G. 1973. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research*, 7(9); 1249-1258.
- Characklis, W.G. and Marshall, K.C. 1990. *Biofilms*. John Wiley, New York.
- Chatterjee, S. and Das, J. 1967. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, 49(1); 1-11.
- Chen, L., Coolbear, T. and Daniel, R.M. 2004. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal*, 14(6); 495-504.
- Chen, X. and Stewart, P.S. 2000. Biofilm removal caused by chemical treatments. *Water Research*, 34(17); 4229-4233.
- Cheryan, M. 1986. *Ultrafiltration Handbook*. Technomic Publishing Co. Inc., USA.
- Chisti, Y. 1999. Modern systems of plant cleaning. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 3; 1806-1815.
- Christensen, B.E. 1989. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Journal of Biotechnology*, 10(3); 181-202.

- Cihan, A.C., Ozcan, B., Tekin, N. and Cokmus, C. 2011. Phylogenetic diversity of isolates belonging to genera *Geobacillus* and *Aeribacillus* isolated from different geothermal regions of Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(11); 2683-2696.
- Cihan, A.C., Koc, M., Ozcan, B., Tekin, N. and Cokmus, C. 2014. *Thermolongibacillus altinsuensis* gen. nov., sp. nov. and *Thermolongibacillus kozakliensis* sp. nov., aerobic, thermophilic, long bacilli isolated from hot springs. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 1); 187-197.
- Claus, D. and Berkeley, C.W. 1986. The genus *Bacillus* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. 34, 1105-1139.
- Cloete, T.E. and Jacobs, L. 2001. Surfactants and the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to 3CR12 stainless steel and glass. *Water SA*, 27(1); 21-26.
- Cloete, T. 2003. Biofouling control in industrial water systems: What we know and what we need to know. *Materials and Corrosion*, 54(7); 520-526.
- Cohn, F. 1872. Untersuchungen über bakterien. *Beitr Biol Pflanz* 1; 127–244.
- Conover, M.S., Mishra, M. and Deora, R. 2011. Extracellular DNA is essential for maintaining *Bordetella* biofilm integrity on abiotic surfaces and in the upper respiratory tract of mice. *PLoS One*, 6(2); e16861.
- Conrad, A., Kontro, M., Keinänen, M.M., Cadoret, A., Faure, P., Mansuy-Huault, L. and Block, J.C. 2003. Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids*, 38(10); 1093-1105.
- Cooksey, K. and Wigglesworth-Cooksey, B. 1992. The design of antifouling surfaces: background and some approaches. *Springer*, 529-549.
- Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A. and Logan, N.A. 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearotherophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 7); 1470-1485.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, K.J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, 238; 86–95.
- Costerton, J.W., Cheng, K., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. and Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1); 435-464.

- Costerton, J.W. and Lappin-Scott, H.M. 1989. Behavior of bacteria in biofilms. American Society for Microbiology, News 55; 650–654.
- Costerton, J., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. and James, G. 1994. Biofilms, the customized microniche. Journal of Bacteriology, 176 (8); 2137.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284 (5418); 1318-1322.
- Coughlan, L., Cotter, P., Hill, C. and Alvarez-Ordóñez, A. 2016. New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. Frontiers in Microbiology, 7(1641); 1-21.
- Czechowski, M.H. and Banner, M. 1992. Control of biofilms in breweries through cleaning and sanitizing. Master Brewers Association of the Americas, O. 29; 86-88.
- Çöleri, A. 2007. Bazı termofilik *Bacillus* türlerinin termostabil α -glukozidaz üretim kapasiteleri ve enzim/lerin kısmi karakterizasyonu. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Daeschel, M.A., McGuire, J. and Al-Makhlafi, H. 1992. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. Journal of Food Protection, 55(9); 731-735.
- Dagang, W.R.Z., Bowen, J., O’Keeffe, J., Robbins, P.T. and Zhang, Z. 2016. Biotechnology Letters, DOI 10.1007/s10529-016-2047-x.
- Dan, N. 2003. The effect of charge regulation on cell adhesion to substrates: salt-induced repulsion. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 27(1); 41-47.
- Danese, P.N., Pratt, L.A. and Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. Journal of Bacteriology, 182(12); 3593-3596.
- Das, J., Bhakoo, M., Jones, M. and Gilbert, P. 1998. Changes in the biocide susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* cells associated with rapid attachment to plastic surfaces. Journal of Applied Microbiology, 84(5); 852-858.
- Davey, M.E. and O’Toole, G. A. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(4); 847-867.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C. and O’Toole, G.A. 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Journal of Bacteriology, 185(3); 1027-1036.
- Davies, D.G. 2000. Physiological events in biofilm formation. In: Symposia-Society for general microbiology. Cambridge; Cambridge University Press, p. 37-52.

- Davies, D.G. and Marques, C. N. 2009. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 191(5); 1393-1403.
- De Beer, D., Stoodley, P. and Lewandowski, Z. 1997. Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 53(2); 151-158.
- Decho, A.W. 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology An Annual Review*, 28; 73–153.
- De Goederen, G., Pritchard, N.J. and Hasting, A.P.M. 1989. Improved cleaning for the food industry. *Fouling and Cleaning in Food Processing*. Vol. 3, 115–130.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P. and Heyndrickx, M. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3); 318-325.
- Dell'Anno, A. and Danovaro, R. 2005. Extracellular DNA plays a key role in deep-sea ecosystem functioning. *Science*, 309(5744); 2179-2179.
- Dellagnezze, B.M., Vasconcellos, S.P., Melo, I. S., Santos Neto, E.V. and Oliveira, V.M. 2016. Evaluation of bacterial diversity recovered from petroleum samples using different physical matrices. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3); 712-723.
- Demirci, A. and Pometto III, A.L. 1995. Repeated-batch fermentation in biofilm reactors with plastic-composite supports for lactic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4); 585-589.
- Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A.S. and Losick, R. 2015. An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 197(24); 3779-3787.
- Derekova, A., Mandeva, R. and Kambourova, M. 2008. Phylogenetic diversity of thermophilic carbohydrate degrading bacilli from Bulgarian hot springs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9); 1697-1702.
- Dickson, J.S. and Koohmaraie, M. 1989. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(4); 832-836.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M. and McLandsborough, L.A. 2002. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6); 2950-2958.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2); 167-193.

- Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9); 881-890.
- Dunne, W.M. 2002. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2); 155-166.
- Dorward, D.W., Garon, C.F. and Judd, R.C. 1989. Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, 171(5); 2499-2505.
- Doyle, R.J., Rosenberg, M. and Drake, D. 1990. Hydrophobicity of oral bacteria. American Society of Microbiology, Washington DC, pp 387-419.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dunsmore, D., Twomey, A., Whittlestone, W. and Morgan, H. 1981. Design and performance of systems for cleaning product-contact surfaces of food equipment: a review. *Journal of Food Protection*, 44(3); 220-240.
- Dunsmore, D., 1981. Bacteriological control of food equipment surfaces by cleaning systems. II. Sanitizer effects. *Journal of Food Protection*, 44(1); 21-27.
- Elder, M.J., Stapleton, F., Evans, E. and Dart, J.K. 1995. Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye*, 9(1); 102-109.
- Erişen, B. 1996. Türkiye jeotermal envanteri. Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Escalada, M.G., Russell, A.D., Maillard, J.Y. and Ochs, D. 2005. Triclosan-bacteria interactions: single or multiple target sites? *Letters in Applied Microbiology*, 41(6); 476-481.
- Etoa, F.X. and Michiels, L. 1988. Heat-induced resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Letters in Applied Microbiology*, 6(3); 43-45.
- Evans, D., Allison, D., Brown, M. and Gilbert, P. 1991. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms towards ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(2); 177-184.
- Farber, B.F., Kaplan, M.H. and Clogston, A.G. 1990. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *Journal of Infectious Diseases*, 161(1); 37-40.
- Ferencz, A., Qrskov, I., Qrskov, F. and Klemm, P. 1980. Deoxyribonucleic acid is a significant component of the small-intestinal mucus. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology*, 88(1-6); 347-348.

- Finore, I., Di Donato, P., Mastascusa, V., Nicolaus, B. and Poli, A. 2014. Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production. *Marine Drugs*, 12(5); 3005-3024.
- Firstenberg-Eden, R., Notermans, S., Thiel, F., Henstra, S. and Kampelmacher, E. 1979. Scanning electron microscopic investigations into attachment of bacteria to teats of cows. *Journal of Food Protection*, 42(4); 305-309.
- Flemming, H.C., Schaule, G. and McDonough, R., 1992. Biofouling on membranes. A short review. *Biofilms-Science and Technology*. Springer Netherlands, pp. 487–497.
- Flemming, H.C. 2002. Biofouling in water systems-cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59(6); 629-640.
- Flemming, H.C. and Leis, A. 2002. In: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley and Sons, New York, 2958–2967.
- Flemming, H.C., Neu, T. R. and Wozniak, D. J. 2007. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of Bacteriology*, 189(22); 7945-7947.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9); 623-633.
- Fletcher, M. 1976. The effects of proteins on bacterial attachment to polystyrene. *Microbiology*, 94(2); 400-404.
- Fletcher, M. 1985. Effect of solid surfaces on the activity of attached bacteria. Springer, 339-362.
- Flint, S.H., Brooks, J. and Bremer, P. 1997. The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainlesssteel. *Journal of Applied Microbiology*, 83(4); 508-517.
- Flint, S.H. 1998. Formation and control of biofilms of thermo-resistant streptococci on stainless steel: a thesis presented in partial fulfilment of the degree of Doctor of Philosophy in Food Technology at Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Flint, S.H, Ward, L. J. and Brooks, J. 1999. *Streptococcus waius* sp. nov., a thermophilic streptococcus from a biofilm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2); 759-767.
- Flint, S.H., Brooks, J. and Bremer, P. 2000. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering*, 43(4); 235-242.
- Flint, S.H, Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J. and Crawford, R. 2001a. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2); 151-157.

- Flint, S.H., Ward, L.J. and Walker, K.M. 2001b. Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S-23S internal spacer region. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4); 539-548.
- Flint, S.H., Walker, K., Waters, B. and Crawford, R. 2007. Description and validation of a rapid (1 h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4); 909-915.
- Floyd, K.A., Moore, J.L., Eberly, A.R., Good, J.A., Shaffer, C.L., Zaver, H., Almqvist, F., Skaar, E.P., Caprioli, R.M. and Hadjifrangiskou, M. 2015. Adhesive fiber stratification in uropathogenic *Escherichia coli* biofilms unveils oxygen-mediated control of type 1 pili. *PLoS Pathogens*, 11(3); 1-26.
- Food and Drug Administration. 1988. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Federation Register*, 53, 11247–11251.
- Ford, T.E., Walch, M. and Mitchell, R. 1987. Corrosion of metals by thermophilic microorganisms. *Materials Performance* 26; 35-39.
- Fortina, M.G., Pukall, R., Schumann, P., Mora, D., Parini, C., Manachini, P.L. and Stackebrandt, E. 2001. *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson *et al.* 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2); 447-455.
- Fournier, B. and Hooper, D.C. 2000. A New Two-Component Regulatory System Involved in Adhesion, Autolysis, and Extracellular Proteolytic Activity of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 182(14); 3955-3964.
- Francolini, I., Donelli, G. and Stoodley, P. 2003. Polymer designs to control biofilm growth on medical devices. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2(2-4); 307-319.
- Frank, J.F. and Koffi, R.A. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 53(7); 550-554.
- Franklin, M.J. and Ohman, D.E. 1993. Identification of algF in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* which is required for alginate acetylation. *Journal of Bacteriology*, 175(16); 5057-5065.
- Fritze, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, 94(11); 1245-1248.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K. and Nielsen, P.H. 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, 30(8); 1749-1758.
- Fuchs, S., Haritopoulou, T. and Wilhelmi, M., 1996. Biofilms in freshwater ecosystems and their use as a pollutant monitor. *Water Science and Technology*, 37; 137–140.

- Fukuzaki, S., Urano, H. and Nagata, K. 1995. Adsorption of pectin onto stainless steel surfaces: role of electrostatic interactions. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-Shi*, 42(9); 700–708.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2); 269.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N. and Nychas, G.J. 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*, 68(10); 2149-2154.
- Giaouris, E. and Nychas, G.J. 2006. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*, 23(8); 747-752.
- Gilbert, P., Collier, P.J. and Brown, M. 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(10); 1865.
- Gilbert, P., Evans, D., Evans, E., Duguid, I. and Brown, M. 1991. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(1); 72-77.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology*, 7(6); 894-906.
- Glover, F.A. 1985. Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry. National Institute for Research in Dairy, Reading, England, UK.207p.
- Golovacheva, R.S. and Karavaiko, G. 1978. *Sulfobacillus*, a new genus of thermophilic spore-forming bacteria. *Microbiologia* 47; 815–822.
- González-García, Y., Heredia, A., Meza-Contreras, J.C., Escalante, F.M.E., Camacho-Ruiz, R.M. and Córdova, J. 2015. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances by the Marine Bacterium *Saccharophagus degradans* under Different Nutritional Conditions. *International Journal of Polymer Science*, 2015;1-7.
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P.R., Beresford, T.P., Fenelon, M.A. and Cotter, P.D. 2015. The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry. *Frontiers in Microbiology*, 6;1418.
- Götz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43(6); 1367-1378.
- Grande, R., Di Giulio, M., Bessa, L.J., Di Campli, E., Baffoni, M., Guarnieri, S. and Cellini, L. 2010. Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: a backstairs rumour. *Journal of Applied Microbiology*, 110(2); 490-498.

- Halek, G. and Garg, A. 1988. Fungal inhibition by a fungicide coupled to an ionomeric film. *Journal of Food Safety*, 9(3); 215-222.
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3); 228-233.
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiology*, 11(7); 1034-1043.
- Hancock, I.C. 1991. Microbial cell surface architecture. *Microbial Cell Surface Analysis*, 23-59.
- Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E. and Al-Ahmad, A. 2010. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology*, 59(Pt 1); 1-7.
- Harmsen, M., Lappann, M., Knochel, S. and Molin, S. 2010. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7); 2271-2279.
- Hedstrom, L. 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12); 4501-4524.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. and Götz, F. 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Molecular Microbiology*, 24(5); 1013-1024.
- Heimbrook, M.E., Wang, W. and Campbell, G. 1989. Staining bacterial flagella easily. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(11); 2612-2615.
- Herald, P.J. and Zottola, E. A. 1988. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science*, 53(5); 1549-1562.
- Herigstad, B., Hamilton, M. and Heersink, J. 2001. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44(2); 121-129.
- Hermansson, M. 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14(1); 105-119.
- Hewish, D. 1977. Features of the structure of replicating and non-replicating chromatin in chicken erythroblasts. *Nucleic Acids Research*, 4(6); 1881-1890.
- Hibiya, K., Nagai, J., Tsuneda, S. and Hirata, A. 2004. Simple prediction of oxygen penetration depth in biofilms for wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 19(1); 61-68.

- Hodgson, A., Nelson, S., Brown, M. and Gilbert, P. 1995. A simple *in vitro* model for growth control of bacterial biofilms. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(1);87-93.
- Hoiby, N. 2014. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathogens and Disease*, 70(3); 205-211.
- Holah, J., Betts, R. and Thorpe, R. 1989. The use of epifluorescence microscopy to determine surface hygiene. *International Biodeterioration*, 25(1); 147-153.
- Hood, S. and Zottola, E. 1995. Biofilms in Food Processing. *Food control*, 6(1); 9-18.
- Hood, S.K. and Zottola, E.A. 1997. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2); 145-153.
- Horan, N. and Eccles, C. 1986. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Water Research*, 20(11); 1427-1432.
- Hoyle, B.D., Jass, J. and Costerton, J.W. 1990. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 26(1); 1-5.
- Hoyle, B.D., Alcantara, J. and Costerton, J.W. 1992. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(9); 2054-2056.
- Huebner, J. and Goldmann, D. 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annual Review of Medicine*, 50(1); 223-236.
- Hughes, K.A., Sutherland, I.W. and Jones, M.V. 1998. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*, 144(11); 3039-3047.
- Hughes-van Kregten, M.C. 1988. Slime flora of New Zealand paper mills. *Appita*, 41(6); 470-474.
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, 27;85-123.
- Husmark, U. and Rönner, U. 1990. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(4); 557-562.
- Husmark, U. and Rönner, U. 1992. The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. *Biofouling*, 5(4); 335-344.
- Husmark, U. 1993. Adhesion mechanisms of bacterial spores to solid surfaces. Ph.D. Thesis. Department of Food Science, Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden. 85 pp.

- Iwabuchi, N., Sunairi, M., Anzai, H., Morisaki, H. and Nakajima, M. 2003. Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30(1-2); 51-60.
- Jakubovics, N.S., Shields, R.C., Rajarajan, N. and Burgess, J.G. 2013. Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, 57(6); 467-475.
- Jass, J. and Walker, J.T. 2000. *Industrial Biofouling: Detection, Prevention and Control*. Wiley, 1–12.
- Jefferson, K.K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiology Letters*, 236(2); 163-173.
- Jeong, D.K. and Frank, J.F. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 21 C in biofilms with micro-organisms isolated from meat and dairy processing environments. *LWT-Food Science and Technology*, 27(5); 415-424.
- Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y. and Yu, W. 2011. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS One*, 6(4); 1-11.
- Johansen, C., Falholt, P. and Gram, L. 1997. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9); 3724-3728.
- Jones, G. W. and Isaacson, R.E. 1982. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 10(3);229-260.
- Joseph, B., Ota, S., 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*, 64(3); 367-372.
- Jucker, B.A., Harms, H. and Zehnder, A. 1996. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Journal of Bacteriology*, 178(18); 5472-5479.
- Jurcisek, J.A. and Bakaletz, L.O. 2007. Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *Journal of Bacteriology*, 189(10); 3868-3875.
- Kambourova, M., Radchenkova, N., Tomova, I. and Bojadjieva, I. 2016. Thermophiles as a promising source of exopolysaccharides with interesting properties. *Biotechnology of Extremophiles*, 1;117-139.
- Kaplan, J.B., Velliyagounder, K., Rangunath, C., Rohde, H., Mack, D., Knobloch, J.K. and Ramasubbu, N. 2004. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 186(24); 8213-8220.

- Kaplan, J.B. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89(3); 205-218.
- Karatan, E. and Watnick, P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2); 310-347.
- Keller, L. and Surette, M.G. 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology*, 4(4); 249-258.
- Kim, K.Y. and Frank, J.F. 1995. Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. *Journal of Food Protection*, 58(1); 24-28.
- Kim, Y., Oh, S. and Kim, S.H. 2009. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2); 324-329.
- Kim, B., Bae, Y., Hwang, J. and Lee, S. 2016. Biofilm formation and cell surface properties of *Staphylococcus aureus* isolates from various sources. *Food Science and Biotechnology*, 25(2): 643-648.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A. and Molin, S., Tolker-Nielsen, T. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6); 1511-1524.
- Knight, G.C., Nicol, R.S. and McMeekin, T.A. 2004. Temperature step changes: a novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurisation plant. *International Journal of Food Microbiology*, 93(3); 305-318.
- Koc, M., Cokmus, C. and Cihan, A.C. 2015. The genotypic diversity and lipase production of some thermophilic bacilli from different genera. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4); 1065-1076.
- Kolari, M., Mattila, K., Mikkola, R. and Salkinoja-Salonen, M. 1998. Communitystructure of biofilms on ennobled stainless steel in Baltic Sea water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(6); 261-274.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R. and Losick, R. 2010. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, 328(5978); 627-629.
- Kondo, K., Takade, A. and Amako, K. 1993. Release of the outer membrane vesicles from *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and Immunology*, 37(2); 149-152.
- Korber, D.R., Lawrence, J.R., Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W. 1995. Growth of microorganisms on surfaces. *Microbial Biofilms*, 5, 15-45.

- Kordel, M. and Sahl, H.G. 1986. Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep 5 and nisin. *FEMS Microbiology Letters*, 34(2); 139-144.
- Körstgens, V., Flemming, H.C., Wingender, J. and Borchard, W. 2001. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Science and Technology* 43; 49–57.
- Kuchma, S.L. and O'Toole, G.A. 2000. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5); 429-433.
- Kumar, C.G. 1997. Studies on microbial alkaline proteases for use in dairy detergents. Ph.D. Thesis, Deemed University, National Dairy Research Institute, Karnal, India.
- Kumar, C.G. and Anand, S. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1); 9-27.
- Kumar, A. and Prasad, R. 2006. Biofilms. *JK Science Journal of Medical Education and Research*, 8(1); 14-17.
- Lad, P.G. 1992. Endoglycosidases: New enzymes for cleaning. Marrs, SJ, Thomason, JC, Cowling, MJ, Hodgkiess.
- Ladd, T.I. and Costerton, J.W. 1990. Methods for studying biofilm bacteria. *Methods in Microbiology*, 22;285-307.
- Langeveld, L.P.M., van Montfort-Quasig, R.M.G.E., Weerkamp, A.H., Waalewijn, R. and Wever, J.S. 1995. Adherence, growth and release of bacteria in a tube heat exchanger for milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49; 207–220.
- Lappann, M., Claus, H., van Alen, T., Harmsen, M., Elias, J., Molin, S. and Vogel, U. 2010. A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology*, 75(6); 1355-1371.
- Lasa, I. and Penades, J.R. 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, 157(2); 99-107.
- Laue, H., Schenk, A., Li, H., Lambertsen, L., Neu, T.R., Molin, S. and Ullrich, M.S. 2006. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*, 152(Pt 10); 2909-2918.
- Lawrence, J., Korber, D., Hoyle, B., Costerton, J. and Caldwell, D. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 173(20); 6558-6567.
- Lawrence, J., Neu, T. and Swerhone, G. 1998. Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 32(3); 253-261.

- Lawrence, J., Swerhone, G.D., Kuhlicke, U. and Neu, T.R. 2007. In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(3); 450-458.
- LeChevallier, M.W., Babcock, T.M. and Lee, R.G. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12); 2714-2724.
- Leck, C. and Bigg, E.K. 2005. Biogenic particles in the surface microlayer and overlying atmosphere in the central Arctic Ocean during summer. *Tellus B*, 57(4); 305-316.
- Leclercq-Perlat, M.N. and Lalande, M. 1994. Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. *Journal of Food Engineering*, 23(4); 501-517.
- Lee, S. and Frank, J.F. 1991. Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. *Journal of Food Protection*, 54(1); 4-11.
- Lehmann, F., Russell, P., Solomon, L. and Murphy, K. 1992. Bacterial growth during continuous milk pasteurisation. *Australian Journal of Dairy Technology*, 47(1); 28-32.
- Lerebour, G., Cupferman, S. and Bellon-Fontaine, M.N. 2004. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *Journal of Applied Microbiology*, 97(1); 7-16.
- Leung, J.W., Liu, Y.L., Desta, T., Libby, E., Inciardi, J.F. and Lam, K. 1998. Is there a synergistic effect between mixed bacterial infection in biofilm formation on biliary stents?. *Gastrointestinal Endoscopy*, 48(3); 250-257.
- Lewin, R. 1984. Microbial adhesion is a sticky problem. *Science*, 224(4647); 375-377.
- Li, Y.H., Tang, N., Aspiras, M.B., Lau, P.C.Y., Lee, J.H., Ellen, R.P. and Cvitkovitch, D.G. 2002. A Quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 184(10); 2699-2708.
- Li, X.Z., Hauer, B. and Rosche, B. 2007. Single-species microbial biofilm screening for industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(6); 1255-1262.
- Little, B., Wagner, P., Ray, R., Pope, R. and Scheetz, R. 1991. Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *Journal of Industrial Microbiology*, 8(4); 213-221.
- Liu, Y. and Tay, J.H. 2001. Detachment forces and their influence on the structure and metabolic behaviour of biofilms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2); 111-117.

- Liu, Y., Yang, S.F., Li, Y., Xu, H., Qin, L. and Tay, J.H. 2004. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *Journal of Biotechnology*, 110(3); 251-256.
- Loo, C., Corliss, D. and Ganeshkumar, N. 2000. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. *Journal of Bacteriology*, 182(5); 1374-1382.
- Lopez, D., Vlamakis, H. and Kolter, R. 2010. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7); a000398.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1); 265-275.
- Lu, W., Ki  n  , L. and L  vi, Y. 1999. Chlorine demand of biofilms in water distribution systems. *Water Research*, 33(3); 827-835.
- Lux, R., Li, Y., Lu, A. and Shi, W. 2004. Detailed three-dimensional analysis of structural features of *Myxococcus xanthus* fruiting bodies using confocal laser scanning microscopy. *Biofilms*, 1(4); 293-303.
- Lynch, D.J., Fountain, T.L., Mazurkiewicz, J.E. and Banas, J.A. 2007. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiology Letters*, 268(2); 158-165.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E. and Williams, P. 2002. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology*, 4(1); 18-28.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K. and Wozniak, D.J. 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, 5(3); e1000354.
- Mack, W., Mack, J. and Ackerson, A. 1975. Microbial film development in a trickling filter. *Microbial Ecology*, 2(3); 215-226.
- Madigan, M.T. and Martinko, J.M. 2010. *Brock biology of microorganisms* (11th ed.). Pearson Prentice Hall, USA.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J. and Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53(9); 742-746.
- Mah, T.F.C. and O'Toole, G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1); 34-39.
- Malek, F. 2016. Evaluation of a non-submerged cultivation assay combined to ESEM imaging for analysis of biofilms formed by dairy-associated sporeforming bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 10(32); 1263-1273.

- Malhotra, V., Chandra, P. and Maurya, P.K. 2015. Control of bacterial biofilms in industrial and medical settings. *GERF Bulletin of Biosciences*, 6(1);1-4.
- Mann, E.E., Rice, K.C., Boles, B.R., Endres, J.L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L.H., Smeltzer, M.S., Horswill, A.R. and Bayles, K.W. 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, 4(6); e5822.
- Marouani-Gadri, N., Chassaing, D. and Carpentier, B. 2009. Comparative evaluation of biofilm formation and tolerance to a chemical shock of pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* O157: H7 strains. *Journal of Food Protection*, 72(1); 157-164.
- Marsh, P.D. 1995. Dental plaque. In H.M. Lappin-Scott and J.W. Costerton (ed.), *Microbial biofilms*. Cambridge University Press, New York, N.Y., p. 282–300.
- Marshall, K.C., Stout, R. and Mitchell, R. 1971. Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiology*, 68;337–348.
- Marshall, K.C., 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion activity and control at surfaces. *American Society for Microbiology News*, 58; 202–207.
- Martins, M., Uppuluri, P., Thomas, D.P., Cleary, I.A., Henriques, M., Lopez-Ribot, J. L. and Oliveira, R. 2010. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia*, 169(5); 323-331.
- Matsuyama, T. and Nakagawa, Y. 1996. Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *Journal of Microbiological Methods*, 25(2); 165-175.
- Mattila, T., Manninen, M. and Kyläsiurola, A.L. 1990. Effect of cleaning-in-place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. *Journal of Dairy Research*, 57(01); 33-39.
- Mattila, K. 2002. Biofilms on stainless steels exposed to process waters. Ph.D. thesis. University of Helsinki, Helsinki, Finland. Mattila-Sandholm, T. and Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in the industry: A review. *Food Reviews International*, 8(4); 573-603.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D. and Stackebrandt, E. 2001. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4); 572-587.
- Maxcy, R.B. 1964. Potential microbial contaminants from dairy equipment with automated circulation cleaning. *Journal of Milk and Food Technology*, 27; 135–139.
- McEldowney, S. and Fletcher, M. 1987. Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. *Archives of Microbiology*, 148(1), 57-62.

- McFeters, G., Yu, F., Pyle, B. and Stewart, P. 1995. Physiological methods to study biofilm disinfection. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(4); 333-338.
- Meinders, J., Van der Mei, H. and Busscher, H. 1995. Deposition efficiency and reversibility of bacterial adhesion under flow. *Journal of Colloid and Interface Science*, 176(2); 329-341.
- Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M. and Capdeville, B. 1992. *Biofilms-Science and Technology*. Springer-Science+Business Media, BV, Vol. 223.
- Melo, L. and Bott, T. 1997. Biofouling in water systems. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14(4); 375-381.
- Merlini, G. and Bellotti, V. 2003. Molecular mechanisms of amyloidosis. *New England Journal of Medicine*, 349(6); 583-596.
- Miller, R.A., Kent, D.J., Watterson, M.J., Boor, K.J., Martin, N.H. and Wiedmann, M. 2015. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *Journal of Dairy Science*, 98(12); 8492-8504.
- Millsap, K.W., Reid, G., Mei, H.C. and Busscher, H.J. 1997. Cluster analysis of genotypically characterized *Lactobacillus* species based on physicochemical cell surface properties and their relationship with adhesion to hexadecane. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(3); 284-291.
- Minana-Galbis, D., Pinzon, D. L., Loren, J.G., Manresa, A. and Oliart-Ros, R.M. 2010. Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz *et al.* 1988) Banat *et al.* 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 7); 1600-1604.
- Ming, X., Weber, G.H., Ayres, J.W. and Sandine, W.E. 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *Journal of Food Science*, 62(2); 413-415.
- Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3); 255-261.
- Momba, M.N., Cloete, T.E., Venter, S.N. and Kfir, R. 1999. Examination of the behaviour of *Escherichia coli* in biofilms established in laboratory-scale units receiving chlorinated and chloraminated water. *Water Research*, 33(13); 2937-2940.
- Monroe, D. 2007. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biology*, 5(11), e307.
- Morisaki, H., Nagai, S., Ohshima, H., Ikemoto, E. and Kogure, K. 1999. The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment. *Microbiology*, 145(10); 2797-2802.

- Moscoso, M., Garcia, E. and Lopez, R. 2006. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *Journal of Bacteriology*, 188(22); 7785-7795.
- Muhammad, S.A. and Ahmed, S. 2015. Production and characterization of a new antibacterial peptide obtained from *Aeribacillus pallidus* SAT4. *Biotechnology Reports*, 8; 72-80.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. and Lewenza, S. 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 4(11); e1000213.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L. and Lewenza, S. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environmental Microbiology*, 12(6); 1621-1629.
- Murphy, P.M., Lynch, D. and Kelly, P.M. 1999. Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology*, 52(2); 45-50.
- Mustapha, A. and Liewen, M.B. 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers. *Journal of Food Protection*, 52; 306-311.
- Nakamura, K., Haruta, S., Ueno, S., Ishii, M., Yokota, A. and Igarashi, Y. 2004. *Cerasibacillus quisquiliarum* gen. nov., sp. nov., isolated from a semi-continuous decomposing system of kitchen refuse. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 4); 1063-1069.
- Nazina, T., Tourova, T., Poltarau, A., Novikova, E., Grigoryan, A., Ivanova, A., Lysenko, A., Petrunyaka, V., Osipov, G. and Belyaev, S. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, G. th. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2); 433-446.
- Neu, T.R. and Poralla, K. 1988. An amphiphilic polysaccharide from an adhesive *Rhodococcus* strain. *FEMS Microbiology Letters*, 49(3); 389-392.
- Neu, T.R., Dengler, T., Jann, B. and Poralla, K. 1992. Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. *Microbiology*, 138(12); 2531-2537.
- Neu, T.R. and Lawrence, J.R. 1999. Lectin-binding analysis in biofilm systems. *Methods in Enzymology*, 310;145-152.

- Neu, T.R., Swerhone, G.D. and Lawrence, J.R. 2001. Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology*, 147(2); 299-313.
- Nijland, R., Hall, M.J. and Burgess, J.G. 2010. Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase. *PLoS One*, 5(12); 1-7.
- Notermans, S., Dormans, J.A.M.A. and Mead, G.C. 1991. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: A review. *Biofouling*, 5(1-2); 21-36.
- Oakley, J.D., Taylor, K.G. and Doyle, R.J. 1985. Trypsin-susceptible cell surface characteristics of *Streptococcus sanguis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 31(12); 1103-1107.
- Or, D., Phutane, S. and Dechesne, A. 2007. Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils. *Vadose Zone Journal*, 6; 298-305.
- Ortega-Morales, B.O., Santiago-García, J., Chan-Bacab, M., Moppert, X., Miranda-Tello, E., Fardeau, M.L., Carrero, J., Bartolo-Pérez, P., Valadéz-González, A. and Guezennec, J. 2007. Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1); 254-264.
- O'Toole, G. and Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3); 449-461.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1); 49-79.
- Otzen, D. and Nielsen, P.H. 2008. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(6); 910-927.
- Palmer, J., Flint, S. and Brooks, J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9); 577-588.
- Palop, A., Manas, P. and Condon, S. 1999. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *Journal of Food Safety*, 19(1); 57-72.
- Pamp, S.J., Gjermansen, M. and Tolker-Nielsen, T. 2007. In the biofilm mode of life. mechanisms and adaptations. *Horizon Bioscience*, 37-69, Norfolk, UK.
- Parkar, S., Flint, S., Palmer, J. and Brooks, J. 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90(6); 901-908.
- Parkar, S., Flint, S. and Brooks, J. 2003. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli-potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology and*

- Biotechnology, 30(9); 553-560.
- Parkar, S., Flint, S. and Brooks, J.D. 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1); 110-116.
- Parment, P., Svanborg-Ede'n, C., Chaknis, M., Sawant, A., Hagberg, L., Wilson, L. and Ahearn, D. 1992. Hemagglutination (fimbriae) and hydrophobicity in adherence of *Serratia marcescens* to urinary tract epithelium and contact lenses. *Current Microbiology*, 25(2); 113-118.
- Pasmore, M., Todd, P., Pfiefer, B., Rhodes, M. and Bowman, C.N. 2002. Effect of polymer surface properties on the reversibility of attachment of *Pseudomonas aeruginosa* in the early stages of biofilm development. *Biofouling*, 18(1); 65-71.
- Paul, J.H. and Jeffrey, W.H. 1985. Evidence for separate adhesion mechanisms for hydrophilic and hydrophobic surfaces in *Vibrio proteolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(2); 431-437.
- Paul, J.H., Jeffrey, W.H. and DeFlaun, M.F. 1987. Dynamics of extracellular DNA in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(1); 170-179.
- Pedersen, K. 1990. Biofilm development on stainless steel and PVC surfaces in drinking water. *Water Research*, 24(2); 239-243.
- Peng, J.S., Tsai, W.C. and Chou, C.C. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1); 105-111.
- Percival, S., Knapp, J., Wales, D. and Edyvean, R. 1999. The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(3); 152-159.
- Persat, A., Nadell, C.D., Kim, M.K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., Wingreen, N.S., Bassler, B.L., Gitai, Z. and Stone, H. A. 2015. The mechanical world of bacteria. *Cell*, 161(5); 988-997.
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. and Laurinavichius, K. 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6); 2109-2117.
- Pirttijärvi, T., Graeffe, T. and Salkinoja-Salonen, M. 1996. Bacterial contaminants in liquid packaging boards: assessment of potential for food spoilage. *Journal of Applied Bacteriology*, 81(4); 445-458.

- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zilver, N. and Stewart, P.S. 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, 54(2); 269-276.
- Pompermayer, D.M. and Gaylarde, C.C. 2000. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiology*, 17(4); 361-365.
- Ponnusamy, K., Paul, D., Kim, Y.S. and Kweon, J.H. 2010. 2 (5H)-Furanone: a prospective strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1); 227-234.
- Pontefract, R.D. 1991. Bacterial adherence: Its consequences in food processing. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24(3-4); 113-117.
- Poortinga, A.T., Bos, R. and Busscher, H.J. 2001. Charge transfer during staphylococcal adhesion to tinco coatings with different specific resistivity. *Biophysical Chemistry*, 91(3), 273-279.
- Poortinga, A.T., Bos, R., Norde, W. and Busscher, H.J. 2002. Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces. *Surface Science Reports*, 47(1); 1-32.
- Popham, D.L., Sengupta, S. and Setlow, P. 1995. Heat, hydrogen peroxide, and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10); 3633-3638.
- Pratt, L.A. and Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30(2); 285-293.
- Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S. and Qu, D. 2007. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 153(Pt 7); 2083-2092.
- Raaska, L., Sillanpää, J., Sjöberg, A. and Suihko, M. 2002. Potential microbiological hazards in the production of refined paper products for food applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(4); 225-231.
- Radchenkova, N., Vassilev, S., Panchev, I., Anzelmo, G., Tomova, I., Nicolaus, B., Kuncheva, M., Petrov, K. and Kambourova, M. 2013. Production and properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(1); 31-43.
- Radchenkova, N., Panchev, I., Vassilev, S., Kuncheva, M., Dobreva, S. and Kambourova, M. 2015. Continuous cultivation of a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418 for production of an exopolysaccharide applicable in cosmetic creams. *Journal of Applied Microbiology*, 119(5); 1301-1309.

- Ray, B. 1992. Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as a food biopreservative. Food Biopreservatives of Microbial Origin, pp. 207–264.
- Reddy, P.C., Atwal, J.S. and Srinivasan, R.A. 1975. Studies on the survival of thermophilic bacteria during manufacture and storage in dried milks. Indian Journal of Dairy Science, 28; 289–295.
- Rendueles, O., Kaplan, J.B. and Ghigo, J.M. 2012. Antibiofilm polysaccharides. Environmental Microbiology, 15(2); 334–346.
- Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y. and Beveridge, T.J. 2004. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. Microbiology, 150; 2161–2169.
- Rice, S.A., Koh, K.S., Queck, S. Y., Labbate, M., Lam, K.W. and Kjelleberg, S. 2005. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. Journal of Bacteriology, 187(10); 3477–3485.
- Ridgway, H. and Olson, B. 1981. Scanning electron microscope evidence for bacterial colonization of a drinking-water distribution system. Applied and Environmental Microbiology, 41(1); 274–287.
- Ridgway, H., Kelly, A., Justice, C. and Olson, B. 1983. Microbial fouling of reverse-osmosis membranes used in advanced wastewater treatment technology: chemical, bacteriological, and ultrastructural analyses. Applied and Environmental Microbiology, 45(3); 1066–1084.
- Riesenman, P.J. and Nicholson, W.L. 2000. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. Applied and Environmental Microbiology, 66(2); 620–626.
- Rijnaarts, H.H., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J. and Zehnder, A.J. 1995. Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 4(1); 5–22.
- Rijnaarts, H.H., Norde, W., Lyklema, J. and Zehnder, A. . 1999. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 14(1); 179–195.
- Rinker, K.D. and Kelly, R.M. 1996. Growth physiology of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: Development of a sulfur-free defined medium, characterization of an exopolysaccharide, and evidence of biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology, 62(12); 4478–4485.
- Rittmann, B.E. 1989. Detachment from biofilms. John Wiley, pp. 49–58, New York, USA.
- Roberson, E.B. and Firestone, M.K. 1992. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. Applied and Environmental Microbiology, 58(4); 1284–1291.

- Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3(4); 229-236.
- Ronimus, R.S., Parker, L.E. and Morgan, H.W. 1997. The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 147(1); 75-79.
- Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A. and Morgan, H.W. 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2); 45-61.
- Römling, U. and Rohde, M. 1999. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiology Letters*, 180(1); 91-102.
- Römling, U., Rohde, M., Olsen, 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*, 36(1); 10-23.
- Rönner, U., Husmark, U. and Henriksson, A. 1990. Adhesion of *Bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(4); 550-556.
- Rueckert, A., Ronimus, R.S. and Morgan, H.W. 2005. Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. *Journal of Microbiology Methods*, 60(2); 155-167.
- Rupp, C.J., Fux, C.A. and Stoodley, P. 2005. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Applied Environmental Microbiology*, 71(4); 2175-2178.
- Russell, A.D. 2004. Whither triclosan?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5); 693-695.
- Ryder, C., Byrd, M. and Wozniak, D.J. 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6); 644-648.
- Sadiq, F.A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G. and He, G. 2016. A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China. *International Journal of Food Microbiology*, 217;200-208.
- Sand, W. and Gehrke, T. 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology*, 157(1); 49-56.

- Saravia, S.G.G. and Mele, M.F.L. 2003. Non-invasive methods for monitoring biofilm growth in industrial water systems. *Latin American Applied Research*, 33; 353-359.
- Sarnaik, S. and Kanekar, P. 1995. Bioremediation of colour of methyl violet and phenol from a dye-industry waste effluent using *Pseudomonas* spp. isolated from factory soil. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(4); 459-469.
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A. H., Zeef, L. A., Davies, D.G. and Gilbert, P. 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of Bacteriology*, 186(21); 7312-7326.
- Saxena, S., Banerjee, G., Garg, R. and Singh, M. 2014. Comparative study of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients of lower respiratory tract infection. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(5); 1-7.
- Sayem, S.M., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., De Felice, M. and Varcamonti, M. 2011. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, 10;74.
- Schild, S., Nelson, E.J. and Camilli, A. 2008. Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. *Infection and Immunity*, 76(10); 4554-4563.
- Schlafer, S. and Meyer, R.L. 2016. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *Journal of Microbiological Methods*, doi: 10.1016/j.mimet.2016.03.002.
- Schmitt, J., Nivens, D., White, D.C. and Flemming, H.-C. 1995. Changes of biofilm properties in response to sorbed substances-an FTIR-ATR study. *Water Science and Technology*, 32; 149-155.
- Scholz, T., Demharter, W., Hensel, R. and Kandler, O. 1987. *Bacillus pallidus* sp. nov., a new thermophilic species from sewage. *Systematic and Applied Microbiology*, 9(1-2); 91-96.
- Scott, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M. and Flint, S.H. 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2); 109-117.
- Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J. and Bremer, P.J. 2008. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3); 731-737.
- Seale, B., Burgess, S., Flint, S., Brooks, J., Bremer, P. and Parkar, S. 2015. Thermophilic spore-forming bacilli in the dairy industry. John Wiley and Sons, Ltd., 124.

- Semwogerere, D. and Weeks, E.R. 2008. Confocal microscopy. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, doi:10.3109/E-EBBE-120024153.
- Seper, A., Fengler, V.H., Roier, S., Wolinski, H., Kohlwein, S.D., Bishop, A.L., Camilli, A., Reidl, J. and Schild, S. 2011. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. Molecular Microbiology, 82(4), 1015-1037.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. and Komagata, K. 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 46(4); 939-946.
- Shields, R.C., Mokhtar, N., Ford, M., Hall, M.J., Burgess, J.G., ElBadawey, M.R. and Jakubovics, N. S. 2013. Efficacy of a marine bacterial nuclease against biofilm forming microorganisms isolated from chronic rhinosinusitis. PLoS One, 8(2); e55339.
- Skillman, L., Sutherland, I. and Jones, M. 1999. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. Journal of Applied Microbiology, 85;13S-18S.
- Skjevrak, I., Lund, V., Due, A. and Herikstad, H. 2004. Biofilm in water pipelines; a potential source for off-flavours in the drinking water. Water Science and Technology, 49; 211-217.
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C. and Lasa, I. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. Molecular Microbiology, 43(3); 793-808.
- Somerton, B., Lindsay, D., Palmer, J., Brooks, J. and Flint, S. 2015. Changes in sodium, calcium, and magnesium ion concentrations that inhibit *Geobacillus* biofilms have no effect on *Anoxybacillus flavithermus* biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 81(15); 5115-5122.
- Sorongon, M.L., Bloodgood, R.A. and Burchard, R.P. 1991. Hydrophobicity, adhesion, and surface-exposed proteins of gliding bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 57(11); 3193-3199.
- Speers, J. and Gilmour, A. 1985. The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. Journal of Applied Bacteriology, 59(4); 325-332.
- Stadhouders, J., Hup, G. and Hassing, F. 1982. The conceptions index and indicator organisms discussed on the basis of the bacteriology of spray-dried milk powder. Netherlands Milk and Dairy Journal, 36; 231-260.
- Stanley, P. M. 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. Canadian Journal of Microbiology, 29(11); 1493-1499.

- Steinberger, R.E. and Holden, P.A. 2005. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9); 5404-5410.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. and Švabić-Vlahović, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2); 175-179.
- Stevens, K., Sheldon, B., Klapes, N. and Klaenhammer, T. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12); 3613-3615.
- Stewart, P.S. 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11); 2517-2522.
- Stewart, P.S., McFeters, G. A. and Huang, C. T. 2000. Biofilm control by antimicrobial agents, Chapter 11 in *Biofilms II: Process Analysis and Applications*.
- Stickler, D. 1999. Biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 2(3); 270-275.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M. and Costerton, J.W. 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12); 5608-5613.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56;187-209.
- Suller, M. and Russell, A. 1999. Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *Journal of Hospital Infection*, 43(4); 281-291.
- Suominen, I., Suihko, M. and Salkinoja-Salonen, M. 1997. Microscopic study of migration of microbes in food-packaging paper and board. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(2); 104-113.
- Sutherland, I. 1982. Microbial exopolysaccharides-their role in microbial adhesion in aqueous systems. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 10(2); 173-201.
- Sutherland, I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1); 3-9.
- Sutherland, I.W. 2007. The best and most comprehensive overview of the polysaccharide moiety of EPS. *Comprehensive Glycoscience*. Elsevier, Doordrecht, Vol. 2, 521–558, The Netherland.
- Suzuki, Y., Kishigami, T. and Abe, S. 1976a. Production of extracellular alpha-glucosidase by a thermophilic *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(6); 807-812.

- Suzuki, Y., Yuki, T., Kishigami, T. and Abe, S. 1976b. Purification and properties of extracellular α -glucosidase of a thermophile, *Bacillus thermoglucosidius* KP 1006. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 445(2); 386-397.
- Szewzyk, U., Szewzyk, R., Schmidt, B. and Braun, B. 2011. Neutrophilic iron-depositing microorganisms. In *Biofilm Highlights*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 63-79.
- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K.R., Chikindas, M.L. and Yaron, S. 2007. Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 267(2); 200-206.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(3); 722.
- Takehara, A. and Fukuzaki, S. 2002. Effect of the surface charge of stainless steel on adsorption behavior of pectin. *Biocontrol Science*, 7(1); 9-15.
- Tan, S.Y., Chew, S. C., Tan, S.Y., Givskov, M. and Yang, L. 2014. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 26; 1-6.
- Telgmann, U., Horn, H. and Morgenroth, E. 2004. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water Research*, 38(17); 3671-3684.
- Tetz, G.V., Artemenko, N.K. and Tetz, V.V. 2009. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3); 1204-1209.
- Thomas, V.C., Thurlow, L.R., Boyle, D. and Hancock, L.E. 2008. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 190(16); 5690-5698.
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S. and Molin, S. 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *Journal of Bacteriology*, 182(22); 6482-6489.
- Torres-Sanchez, R. and Magana-Vazquez, A. 1997. High temperature microbial corrosion in the condenser of a geothermal electric power unit. *Materials Performance*, 36; 43-46.
- Touzel, J.P., O'Donohue, M., Debeire, P., Samain, E. and Breton, C. 2000. *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan-degrading bacterium isolated from farm soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1); 315-320.
- Trevors, J. 1996. DNA in soil: adsorption, genetic transformation, molecular evolution and genetic microchip. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(1); 1-10.

- Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A., Hirata, A. 2003. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2); 287-292.
- Ude, S., Arnold, D.L., Moon, C.D., Timms-Wilson, T. and Spiers, A. J. 2006. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environmental Microbiology*, 8(11); 1997-2011.
- Uzoigwe, C., Burgess, J.G., Ennis, C.J. and Rahman, P.K. 2015. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6;245.
- Vaara, M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56(3); 395-411.
- Vadillo-Rodriguez, V., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., de Vries, J. and Norde, W. 2005. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 41(1); 33-41.
- Väisänen, O.M., Weber, A., Bennasar, A., Rainey, F.A., Busse, H.J. and Salkinoja-Salonen, M.S. 1998. Microbial communities of printing paper machines. *Journal of Applied Microbiology*, 84; 1069-1084.
- Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P. and Ghigo, J.M. 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33); 12558-12563.
- Van der Wal, A., Norde, W., Zehnder, A. J. and Lyklema, J. 1997. Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 9(1); 81-100.
- Vanhaecke, E., Remon, J., Moors, M., Raes, F., De Rudder, D. and Van Peteghem, A. 1990. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3); 788-795.
- Van Houdt, R. and Michiels, C.W. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4); 1117-1131.
- Van Hullebusch, E.D., Zandvoort, M.H. and Lens, P.N. 2003. Metal immobilisation by biofilms: mechanisms and analytical tools. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2(1); 9-33.
- Vanangelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J. and De Vuyst, L. 2004. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their

- molecular and functional characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2); 900-912.
- Van Loosdrecht, M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. and Zehnder, A. 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(8); 1898-1901.
- Van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W. and Zehnder, A. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*, 54(1); 75-87.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Norde, W. and Zehnder, A.J.B. 1990. Physical chemical description of bacterial adhesion. *Journal of Biomaterials Applications*, 5(2); 91-106.
- Van Schaik, E.J., Giltner, C.L., Audette, G.F., Keizer, D.W., Bautista, D.L., Slupsky, C.M., Sykes, B.D. and Irvin, R.T. 2005. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *Journal of Bacteriology*, 187(4); 1455-1464.
- Van Speybroeck, M.M.P., Bruggeman, G., van Poele, J., van Peel, K.L.I., van Damme, E. J. 1996. Exopolysaccharide-degrading enzyme and use of the same PCT Patent Appl. WO 9631610.
- Veenendaal, H.R., and van der Kooij, D. 1999. Biofilm formation potential of pipe materials in plumbing systems. Kiwa NV Research and Consultancy. The Netherlands, Commissioned by the Ministry of Public Housing, Urban Planning and Environment. VROM order No. 30.2461.016.
- Vestby, L.K., Moretro, 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*, 5; 20.
- Vieille, C. and Zeikus, G.J. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1); 1-43.
- Vilain, S., Pretorius, J.M., Theron, J. and Brozel, V.S. 2009. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9); 2861-2868.
- Vlassov, V.V., Laktionov, P.P. and Rykova, E.Y. 2007. Extracellular nucleic acids. *Bioessays*, 29(7); 654-667.
- Walker, S.L., Hill, J.E., Redman, J.A. and Elimelech, M. 2005. Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6); 3093-3099.
- Wang, S., Parsek, M.R., Wozniak, D.J. and Ma, L.Z. 2013. A spider web strategy of type IV pili-mediated migration to build a fibre-like Psl polysaccharide matrix in

- Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, 15(8); 2238-2253.
- Wang, H., Wilksch, J., Chen, L., Tan, J., Strugnell, R. and Gee, M. 2016. Influence of Fimbriae on Bacterial Adhesion and Viscoelasticity, and Correlations of the Two Properties with Biofilm Formation. *ACS Paragon Plus Environment*, 1-26.
- Warnecke, F. 2001. The ecology of thermophilic bacilli of milk powder processing plants. Mphil. Thesis, University of Waikato, Hamilton, New Zealand.
- Watnick, P.I. and Kolter, R. 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology*, 34(3); 586-595.
- Watnick, P. and Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10); 2675-2679.
- Watterson, M.J., Kent, D.J., Boor, K.J., Wiedmann, M. and Martin, N.H. 2014. Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of Dairy Sciences*, 97(4); 2487-2497.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. and Mattick, J.S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559); 1487-1487.
- Whitehead, K.A. and Verran, J. 2006. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food and Bioproducts Processing*, 84(4); 253-259.
- Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M. and Lory, S., Greenberg, E. 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(6858); 860-864.
- Wiatr, C.L. 1991. Enzyme blend containing cellulase to control industrial slime. United States Patent No. US 4994390A.
- Wiencek, K.M., Klapes, N.A. and Foegeding, P. 1990. Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9); 2600-2605.
- Wilson, K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, Unit 2.4; 2.4.1-2.4.5.
- Wilson, S., Hamilton, M.A., Hamilton, G.C., Schumann, M.R. and Stoodley, P. 2004. Statistical quantification of detachment rates and size distributions of cell clumps from wild-type (PAO1) and cell signaling mutant (JP1) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10); 5847-5852.
- Wimpenny, J.W. and Colasanti, R. 1997. A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(1); 1-16.

- Wimpenny, J. 2000. An overview of biofilms as functional communities. In: Symposia-Society for general microbiology. Cambridge; Cambridge University Press, p. 1-24.
- Wingender, J., Neu, T.R., and Flemming, H.C. 1999. Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure, and function. Springer Science and Business Media.
- Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A. and Flemming, H.C. 2001. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Enzymology*, 336; 302-314.
- Wingender, J. and Jaeger, K.E. 2002. in *Encyclopedia of Environmental Microbiology* (ed. Bitton, G.), 1207–1223, Wiley, New York.
- Wirtanen, G., Husmark, U. and Mattila-Sandholm, T. 1996. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food Protection*, 59(7); 727-733.
- Wirtanen, G. and Mattila-Sandholm, T. 1992. Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. Part II. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 25(1); 50-54.
- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk JR, P., Fox, G.E., Deinhard, G. and Poralla, K. 1992. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(2); 263-269.
- Wittschier, N., Lengsfeld, C., Vorthems, S., Stratmann, U., Ernst, J., Verspohl, E. and Hensel, A. 2007. Large molecules as anti-adhesive compounds against pathogens. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(6); 777-786.
- Wolfaardt, G., Lawrence, J., Robarts, R., Caldwell, S. and Caldwell, D. 1994. Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2); 434-446.
- Wong, A.C. L. and Cerf, O. 1995. Biofilms: Implications for hygiene monitoring of dairy plant surfaces. *IDF Bulletin*, 302; 40–44.
- Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A. and Parsek, M.R. 2003. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, 100(13); 7907-7912.
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J.B., Molin, S., Givskov, M. and Hoiby, N. 2004. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance

- in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6); 1054-1061.
- Wuertz, S., Spaeth, A., Hinderberger, A., Griebe, T., Flemming, H.C. and Wilderer, P.A. 2001. A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Science and Technology*, 43 (6); 25–31.
- Xue, Y., Zhang, X., Zhou, C., Zhao, Y., Cowan, D.A., Heaphy, S., Grant, W.D., Jones, B. E., Ventosa, A. and Ma, Y. 2006. *Caldalkalibacillus thermarum* gen. nov., sp. nov., a novel alkalithermophilic bacterium from a hot spring in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(Pt 6); 1217-1221.
- Yang, J., Bos, R., Belder, G.F., Engel, J. and Busscher, H.J. 1999. Deposition of oral bacteria and polystyrene particles to quartz and dental enamel in a parallel plate and stagnation point flow chamber. *Journal of Colloid and Interface Science*, 220(2); 410-418.
- Yang, L., Barken, K.B., Skindersoe, M.E., Christensen, A.B., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153(Pt 5); 1318-1328.
- Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L. and Matthews, K.R. 2000. Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157: H7 to other Enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10); 4414-4420.
- Yasawong, M., Areekit, S., Pakpitchareon, A., Santiwatanakul, S. and Chansiri, K. 2011. Characterization of thermophilic halotolerant *Aeribacillus pallidus* TD1 from Tao Dam Hot Spring, Thailand. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8); 5294-5303.
- Yazdankhah, S.P., Scheie, A.A., Høiby, E.A., Lunestad, B.T., Heir, E., Fotland, T.Ø., Naterstad, K. and Kruse, H. 2006. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. *Microbial Drug Resistance*, 12(2); 83-90.
- Yoshida, A. and Kuramitsu, H.K. 2002. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12); 6283-6291.
- Zhang, T.C. and Bishop, P.L. 1994. Experimental determination of the dissolved oxygen boundary layer and mass transfer resistance near the fluid-biofilm interface. *Water Science and Technology*, 30(11); 47-58.
- Zhang, X., Bishop, P.L. and Kinkle, B.K. 1999. Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Science and Technology*, 39 (7); 211-218.
- Zhang, X. and Bishop, P.L. 2003. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere*, 50(1); 63-69.

- Zhao, W., Weber, C., Zhang, C.L., Romanek, C.S., King, G.M., Mills, G., Sokolova, T. and Wiegel, J. 2006. *Thermalkalibacillus uzonensis* gen. nov. sp. nov, a novel aerobic alkali-tolerant thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Uzon Caldera, Kamchatka. *Extremophiles*, 10; 337–345.
- Zhao, Y., Caspers, M.P., Abee, T., Siezen, R.J. and Kort, R. 2012. Complete genome sequence of *Geobacillus thermoglucosidans* TNO-09.020, a thermophilic sporeformer associated with a dairy-processing environment. *Journal of Bacteriology*, 194(15); 4118-4118.
- Zheng, C., Li, Z., Su, J., Zhang, R., Liu, C. and Zhao, M. 2012. Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus* YM-1. *Journal of Applied Microbiology*, 113(1); 44-51.
- Zinger-Yosovich, K.D. and Gilboa-Garber, N. 2009. Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* and *Ralstonia solanacearum* lectins by plant and microbial branched polysaccharides used as food additives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15); 6908-6913.
- Zobell, C.E. and Allen, E.C. 1935. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of Bacteriology*, 29(3); 239.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. and Römling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39(6); 1452-1463.
- Zottola, E.A. 1991. Characterization of the attachment matrix of *Pseudomonas fragi* attached to non-porous surfaces. *Biofouling*, 5(1-2); 37-55.
- Zottola, E.A. 1994. Microbial attachment and biofilm formation: A new problem for the food industry?. *Food Technology*, 48; 107–114.
- Zottola, E.A. and Sasahara, K.C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry-Should they be a concern?. *International Journal of Food Microbiology*, 23(2); 125-148.
- Zubay, G. 1988. *Biochemistry*. Machmillan Publishing Company, 866 Third Avenue, New York 10022, 2nd. edition; 131-414, ISBN-0-22-432080-3.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tuğba KILIÇ
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 03.08.1984
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Anıttepe Anadolu Lisesi (2002)
Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2003-2007)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji A.B.D (Eylül 2009–Şubat 2011)

Hakemli Dergiler

Ozdemir, C. S., Cihan, A. C., **Kilic, T.** and Cokmus, C., “Optimization of thermostable alpha-amylase production from *Geobacillus* sp. D413” Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2016.

Uluslararası Kongreler

Kilic T., Özel P.B., Karaca B., Ozcan B., and Cihan, A.C. “Determination of biofilm characteristics and evaluation of the sanitation procedures on biofilms of thermophilic *Aeribacillus pallidus*” Biofilms 7, Porto, 26th-28th June 2016 (poster presentation).

Özel P.B., **Kilic T.**, Karaca B., Cokmus C, and Cihan, A.C. “*Brevibacillus thermoruber* B93: a remarkable biofilm producing strain for further industrial applications” Biofilms 7, Porto, 26th-28th June 2016 (poster presentation).

Ulusal Kongreler

Gökdemir, Ş., **Kılıç, T.** “Filogenetik Akrabalıkların Belirlenmesinde MLSA” 1. Uluslararası Adli Biyoloji ve Genetik Kongresi, Poster Sunumu, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ANKARA, 27-28 Kasım 2014 (poster sunumu)