

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRKİYE'DEN İZOLE EDİLEN *Salmonella* SUŞLARININ BİYOFİLM
OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN TANIMLANMASI**

Başar KARACA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2011**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE'DEN İZOLE EDİLEN *Salmonella* SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN TANIMLANMASI

Başar KARACA

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

Bu çalışmada; serotiplendirmesi yapılmış 99 ve cins düzeyinde tanımlanmış 41 adet Türkiye kökenli *Salmonella* suşunun biyofilm oluşturma karakteristikleri araştırıldı. 140 adet suşun biyofilm oluşturma özellikleri incelendiğinde % 56.4'nün "rdar", %40.7'sinin "bdar" ve %2.1'nin ise "pdar" morfotipinde biyofilm ürettiği belirlendi. 1 adet *S. Agona* suşu daha önce belirtilen hiçbir morfotipe dahil edilemedi. 79 adet "rdar" morfotipi içeren suşun 72'sinde; 57 adet "bdar" morfotipi içeren suşun ise 41'inde sıvı-hava arafazında pelikül yapısına rastlandı. Suşlar, oluşturdukları pelikül yapılarına, pelikülün fiziksel farklılıklarına ve pelikül oluşumuyla birlikte besi ortamlarında meydana gelen değişimlere göre değerlendirildi. "Rdar" morfotipi içeren suşların rijit yapıda; "bdar" morfotipi içeren suşların ise kırılgen yapıda pelikül oluşturduğu saptandı. Biyofilm matriks yapılarındaki selüloz varlığının araştırılmasında, 79 adet "rdar" ve 3 adet "pdar" morfotipi içeren suşun kalkofloru bağlayıp UV ışık altında floresan özellik gösterdiği; 57 adet "bdar" ve 1 adet tanımlanamayan morfotip içeren suşun ise kalkofloru bağlamadığı dolayısıyla UV ışık altında floresan özellik göstermediği belirlendi. Kongo kırmızısı içeren ortamda yoğun "rdar" morfotipi içerdiği saptanan 38 adet suşun ve her morfotipi temsilen seçilen birer suşun polistiren ve paslanmaz çelik gibi abiyotik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma kabiliyetleri araştırıldı. Polistiren plaklarda seçilen suşların biyofilm üretme miktarlarının ölçülmesi sonucunda en yoğun biyofilm üretimi *Salmonella* Typhimurium suşunda belirlendi (OD: 3,418). İdeal biyofilm üretimi koşullarının belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklık, su aktivitesi ve pH değerlerinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, biyofilm oluşumu için en uygun sıcaklığın 20 °C, NaCl konsantrasyonunun % 0.0 olduğu belirlenirken; pH'nın farklı morfotip içeren suşların biyofilm oluşturma özellikleri üzerindeki etkisinin değişkenlik gösterdiği saptandı. Matriks yapısında bulunması muhtemel hücre dışı DNA'nın varlığı "bdar" morfotipi içeren *S. Infantis* suşunda tespit edildi.

2011, 119 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Salmonella*, biyofilm, paslanmaz çelik, polistiren, biyofilm morfotipi, rdar

ABSTRACT

Master Thesis

IDENTIFICATION OF BIOFILM FORMING ABILITIES OF *Salmonella* STRAINS ISOLATED FROM TURKEY

Başar KARACA

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

Supervisor: Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

In this study; the biofilm forming characteristics of the 99 serotyped and 41 genus level identified *Salmonella* strains originated from Turkey was investigated. When screening biofilm forming abilities of 140 *Salmonella* strains, 56.4 % were able to express “rdar”, 40.7 % were able to express “bdar” and 2.1 % were able to express “pdar” morphotype. 1 *S. Agona* strain could not be classified in any morphotype previously identified. Pellicle formation at the air-liquid interface was investigated at 91.1 % of strains containing “rdar” morphotype and 72 % of strains containing “bdar” morphotype. Strains were evaluated according to their pellicle structure forming, physical differences of pellicle, and the alterations in the media along with the pellicle forming. It was detected that the strains containing “rdar” morphotype had rigid, the strains containing “bdar” morphotype had fragile pellicle structure forming. In the analysis of cellulose existence in biofilm matrix structures, 79 of “rdar” and 3 of “pdar” morphotyped strains showed fluorescence features under UV light by binding calcoflour; whereas 57 of “bdar” and 1 unidentified morphotyped strains showed no fluorescence feature under UV light since could not binding calcoflour. Biofilm forming abilities on abiotic surfaces like polystyrene and stainless steel of the strains which had highly “rdar” morphotype in media that contained Kongo red and one strain representing each morphotype were investigated. As a result of measuring biofilm producing amounts of strains, selected on polystyrene microtiter plates, *S. Typhimurium* was determined as the best biofilm producer (OD: 3,418). As a result of experiments conducted in different temperatures, water activities and pH values in order to determine optimum biofilm producing conditions, the optimum temperature for biofilm producing was determined as 20 °C and the optimum NaCl concentration was 0.0 %; whereas pH values showed variable effects on biofilm forming feature. Extracellular DNA that may exist in biofilm matrix structure was detected in *S. Infantis* strain with “bdar” morphotype.

2011, 119 pages

Key Words: *Salmonella*, biofilm, stainless steel, polystyrene, biofilm morphotype, rdar

TEŞEKKÜR

Bilimsel tecrübe ve engin bilgisiyle bulunduğu akademik katkılarının yanı sıra onurlu duruşu ve yaşam felsefesiyle, bana her daim ilham veren, minnet duyduğum hocam sayın Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e;

Zorlu geçen dönemlerimde bana her türlü manevi desteği veren, güleryüzü ve bilimsel bilgisiyle bilime olan bağlılığımı ve inancımı güçlendiren danışman hocam sayın Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ'e;

Çalışmalarına olan katkılarının yanı sıra gösterdikleri dostluktan ötürü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı çalışanlarına;

Hakkını asla ödeyemeyeceğim, yaşama olan sevgimi ve bağlılığımı borçlu olduğum sevgili annem ve ablama;

Rahmet ve sevgiyle andığım merhum babama;

Teşekkürlerimi sunarım.

Başar KARACA
Ankara, Haziran 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi.....	4
2.2 Biyofilm Oluşum Aşamaları.....	6
2.2.1 İlk tutunma ve mikrokoloni oluşumu.....	10
2.2.2 Biyofilm oluşturmak üzere tutunmuş bakterilerin olgunlaşması.....	11
2.2.3 Planktonik hücrelerin biyofilmlerden ayrılması ve dağılması.....	11
2.3 Biyofilm Matriksinin Kompozisyonu.....	12
2.4. Bakteriyel Biyofilmlerin Sebep Olduğu Enfeksiyon Hastalıkları ve Antibiyotiklerle Etkileşimleri.....	15
2.5 <i>Salmonella</i> 'da Biyofilm Oluşumu.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1 Materyal.....	32
3.1.1 Bakteriler.....	32
3.1.2 Besiyerleri.....	38
3.1.3 Çözeltiler.....	40
3.1.4 Primerler.....	42
3.2 Yöntem.....	42
3.2.1 Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde <i>Salmonella</i> suşlarının biyofilm morfortiplerinin belirlenmesi.....	42
3.2.2 Sıvı besiyerlerinde pelikül oluşumu.....	44
3.2.3 Kalkoflor bağlanma uygulaması.....	44
3.2.4 Polistiren üzerinde biyofilm oluşumunun incelenmesi.....	45
3.2.5 Farklı NaCl konsantrasyonlarında, sıcaklık ve pH değerlerinde polistiren üzerinde biyofilm oluşumlarının ölçülmesi.....	46
3.2.6 Çelik kuponlar üzerinde farklı NaCl konsantrasyonlarının, sıcaklık ve pH değerlerinin <i>Salmonella</i> 'nın biyofilm oluşumu üzerine etkileri.....	46
3.2.7 Genomik DNA izolasyonu.....	48
3.2.8 Hücre dışı DNA varlığının aranması.....	49
3.2.9 Mikrotitre plaklardaki biyofilmlere DNAaz I uygulanması.....	49
3.2.10 Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PZR) analizleri.....	50
3.2.11 İstatistik analizleri.....	51
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	52
4.1 Kongo Kırmızılı NaCl'siz LB Agar Ortamında <i>Salmonella</i> Suşlarının Biyofilm Morfortiplerinin Belirlenmesi.....	52
4.2 <i>Salmonella</i> Suşlarının Pelikül Yapılarının İncelenmesi.....	64

4.3 Kalkoflor Bağlanma Uygulaması.....	78
4.4 Polistiren Mikrotitre Plakları Üzerinde Biyofilm Miktarının Ölçülmesi.....	79
4.5 Farklı Sıcaklık, pH, NaCl Konsantrasyon Değerlerinin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin Mikrotitre Plak Yöntemiyle Araştırılması.....	84
4.6 Çelik Kuponlar Üzerinde Farklı Sıcaklık, Su ve pH Uygulamalarının Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkileri.....	95
4.7 Hücre Dışı DNA'nın Biyofilm Oluşumuna Katkısı.....	102
5. SONUÇ.....	105
KAYNAKLAR.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	120

SİMGELER DİZİNİ

ATM	Adezyon test besiyeri
A_w	Su aktivitesi
bdar	Kahverengi, kuru ve pürüzlü
°C	Celcius
CEN	Avrupa Stantardizasyon Komitesi
cm	Santimetre
CTAB	Setil trimetilamonyum bromit
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eDNA	Hücre dışı DNA
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzim ilintili immün test
EPS	Ekzopolisakkarit
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
KCl	Potasyum klorür
LB	Luria Bertani
μ l	Mikro litre
μ g	Mikro gram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mRNA	Mesajcı RNA
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Soydu hidroksit
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pdar	Pembe, kuru ve pürüzlü
PVC	Poli-vinil-klorür
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD-PZR	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu
rdar	Kırmızı, kuru ve pürüzlü
RNA	Ribonükleik asit
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
saw	Düz ve beyaz
SBAM	Düz, kahverengi ve mukoid
SDS	Sodyum dodezil sülfat
SPI-I	<i>Salmonella</i> Patojenite Adası I

TC 216	Teknik Komite 216
TE	Tris EDTA
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu
UV	Ultra viyole
<i>V. cholera</i>	<i>Vibrio cholera</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Stafilokokal bir biyofilmin medikal bir alet üzerinde geliştirdiği biyofilmin TEM mikrografı.....	5
Şekil 2.2	Endüstriyel bir su sistemi içindeki 8 haftalık biyofilmin TEM mikrografı.....	5
Şekil 2.3	Biyofilm oluşumunun beş basamaklı aşamaları ve bu aşamaları gösteren mikrograflar.....	8
Şekil 2.4	<i>P. aeruginosa</i> biyofilminin olgunlaşma basamakları ve bakterilerin biyofilmlerden ayrılma yolları	12
Şekil 2.5	Serbest ve matriksle çevrili mikrokoloni elektron mikrografları.....	14
Şekil 2.6	Biyofilmlerin antibiyotiklerle ve antikorlarla olan etkileşimleri.....	16
Şekil 2.7	Tobramisin'in biyofilm oluşumu üzerine etkileri.....	18
Şekil 2.8	c-di-GMP'nin biyofilm oluşumunda aminoglikozitlere karşı geliştirdiği yanıt.....	18
Şekil 2.9	Doğal tip ve isogenik mutant <i>Salmonella</i> Typhimurium suşlarında biyofilm oluşumu.....	25
Şekil 2.10	Selüloz biyosentezi, CsgD regülasyonu.....	26
Şekil 2.11	Doğal <i>S. Enteritidis</i> suşlarında biyofilm oluşum fenotipleri.....	28
Şekil 2.12	LuxI/LuxR sistemi.....	30
Şekil 3.1	<i>Salmonella</i> 'da rdar ve bdar morfortipleri.....	43
Şekil 3.2	<i>Salmonella</i> 'da pdar morfortipi.....	43
Şekil 3.3	Sıvı besiyerinde sıvı-hava ara fazında gözlemlenen pelikül formasyonu.....	44
Şekil 4.1	DMC kodlu suşlarda biyofilm morfortipleri dağılımları.....	59
Şekil 4.2	IS kodlu suşlarda biyofilm morfortipleri dağılımı.....	60
Şekil 4.3	Tüm <i>Salmonella</i> suşlarında biyofilm morfortipleri dağılımı.....	60
Şekil 4.4	<i>Salmonella</i> serovaryetlerinde biyofilm morfortipi dağılımı.....	61
Şekil 4.5	<i>Salmonella</i> suşları arasında tanımlanan üç farklı morfortip.....	62
Şekil 4.6	DMC 61 kodlu <i>S. Agona</i> suşunun Kongo kırmızılı agar ortamındaki koloni morfolojisi.....	62
Şekil 4.7	Rdar ve bdar morfortipine özgü sıvı-hava arafazında gözlemlenen pelikül yapısı.....	74
Şekil 4.8	Rdar morfortipi ifadesi yüksek <i>Salmonella</i> serovaryetelerinin pelikül oluşumlarının zamana bağlı değişimi.....	76
Şekil 4.9	Rdar morfortipi ifadesi yüksek <i>Salmonella</i> serovaryetelerinin pelikül oluşumlarının zamana bağlı değişimi.....	76
Şekil 4.10	Farklı biyofilm morfortipleri içeren suşların 322 nm UV ışık altındaki floresan özellikleri.....	79
Şekil 4.11	Rdar morfortipi içeren DMC kodlu suşların biyofilm miktarı (OD ₅₉₅).....	83
Şekil 4.12	Rdar morfortipi içeren IS kodlu suşların biyofilm miktarı (OD ₅₉₅).....	83
Şekil 4.13	İnkübasyon sıcaklığının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün).....	86

Şekil 4.14	pH'nın biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün).....	87
Şekil 4.15	Farklı NaCl konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün).....	89
Şekil 4.16	İnkübasyon sıcaklığının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün).....	90
Şekil 4.17	pH'nın biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün).....	92
Şekil 4.18	Farklı NaCl konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün).....	93
Şekil 4.19	Seçilen morfotiplerin farklı sıcaklıklarda çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşturma özellikleri.....	97
Şekil 4.20	Seçilen morfotiplerin farklı pH değerlerinde çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşturma özellikleri.....	98
Şekil 4.21	Seçilen morfotiplerin farklı NaCl konsantrasyon (A_w) değerlerinde çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşturma özellikleri.....	100
Şekil 4.22	Hücre dışı ve genomik DNA'ların RAPD-PZR profilleri.....	102
Şekil 4.23	DNAaz I uygulaması sonucunda DMC 12 suşunun biyofilm miktarındaki değişim.....	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan DMC kodlu serotiplendirmesi yapılmış <i>Salmonella</i> suşları.....	32
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan IS kodlu, serotiplendirmesi yapılmamış <i>Salmonella</i> suşları.....	36
Çizelge 4.1	<i>Salmonella</i> suşları arasında gözlemlenen morfotiplerin sayıca dağılımı...	53
Çizelge 4.2	Serotiplendirmesi yapılmış <i>Salmonella</i> suşlarının içerdiği morfotipler....	54
Çizelge 4.3	Cins düzeyinde tanımlanmış <i>Salmonella</i> suşlarının içerdiği morfotipler..	57
Çizelge 4.4	DMC kodlu <i>Salmonella</i> suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi.....	65
Çizelge 4.5	IS kodlu <i>Salmonella</i> suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi.....	70
Çizelge 4.6	Farklı biyofilm morfotipi içeren suşların sıvı besiyerinde pelikül oluşumuna göre değerlendirilmesi.....	72
Çizelge 4.7	Farklı biyofilm morfotipi içeren suşların peliküllerinin fiziksel özelliklerine göre değerlendirilmesi.....	73
Çizelge 4.8	Farklı biyofilm morfotipi içeren suşların besiyerlerindeki bulanıklık değişimine göre değerlendirilmesi.....	74
Çizelge 4.9	DMC ve IS kodlu “rdar” morfotipi içeren suşların mikrotitre plak ölçümlerinin sonuçları.....	80
Çizelge 4.10	İnkübasyon sıcaklığının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün).....	85
Çizelge 4.11	pH'nın biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin ölçümü (1. gün).....	86
Çizelge 4.12	Farklı NaCl konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün).....	88
Çizelge 4.13	İnkübasyon sıcaklığının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün).....	89
Çizelge 4.14	pH'nın biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün).....	91
Çizelge 4.15	Farklı NaCl konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün).....	92
Çizelge 4.16	Seçilen morfotiplerin farklı sıcaklık değerlerinde çelik kupon yüzeylerine tutunma özellikleri.....	96
Çizelge 4.17	Seçilen morfotiplerin farklı pH değerlerinde çelik kupon yüzeylerine tutunma sonuçları.....	97
Çizelge 4.18	Seçilen morfotiplerin farklı NaCl konsantrasyon (A_w) değerlerinde çelik kupon yüzeylerine tutunma özellikleri.....	99

1. GİRİŞ

Salmonella cinsi *Enterobacteriaceae* familyasına dahil olup, *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür içerir. *Salmonella enterica* subspecies *enterica*'nın altı alt türü vardır ve memeli hayvanlarda en çok hastalığa neden olan serovaryeteleri kapsamaktadır. Diğer *Salmonella enterica* alt türleri *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* ve *indica*'dır. Bu alt türün üyelerinin birçoğu insanlar için sıklıkla patojenik niteliktedir ve genellikle sıcak kanlı (poikilotermik) hayvanların bağırsak sisteminde bulunmaktadır (Popoff vd. 2005, Threlfall vd. 2005).

Salmonella Gram negatif bir bakteridir, genellikle hareketsizdir ve çubuk şeklinde bir hücre morfolojisi gösterir. Bazı nadir durumların haricinde *Salmonella*, 7-48 °C sıcaklık aralığında gelişme gösterir. *Salmonella* cinsine dahil bakteriler fakültatif anaerobtur. Bu bakteriler asidik stres, düşük su aktivitesi ve yüksek sıcaklık gibi koşullara adapte olarak çeşitli yüzeylerde aylarca canlı kalabilmektedirler (Kaufman 1998, White vd. 2006).

S. enterica serovaryete Typhi (*S. Typhi*) insanlarda tifo etkeni, *S. Typhimurium* ise insan gastroenteritine neden olan en yaygın serovaryetelerden biridir. Hayvan konakçılarda *S. Typhimurium* bağırsak epitelinde yer alan Peyer plaklarını istila etmektedir. Bakteriler, epitel dokuyu makrofajların içerisinde geçer. Bu bakteriler serovaryete ve konakçı tipine bağlı bir şekilde; makrofajlar içerisinde hayatta kalarak replike olur ve mezenterik lenf nodüllerine, dalağa ve karaciğere yayılabilir (Zhang vd. 2003).

Tifo etkeni *S. Typhi* insan konakçılarda safra taşlarının üzerinde biyofilm oluşturmak suretiyle asemptomatik olarak hayatta kalmaya devam eder. Bu nedenle asemptomatik konakçılarda patojenin yok edilmesi için antibiyotik uygulaması, çoğu kez yetersiz bir uygulama olmaktadır. Tifo etkeni olmayan *Salmonella* serovaryeteleri de aynı zamanda laboratuvar koşullarında safra taşları üzerinde kolonize olabilmektedir ve Hep-2 hücreleri üzerinde biyofilm oluşturabilmektedirler (Prouty vd. 2002).

Salmonella enfeksiyonları çapraz kontaminasyonlar nedeniyle hızlı bir yayılma özelliği göstermektedir. Özellikle endüstriyel sanitasyon uygulamalarında, biyofilm oluşturma yeteneklerinden kaynaklanan dirençlilik sayesinde, canlılıklarını sürdürebilmektedirler. Bu da *Salmonella* kontaminasyonlarının hızlı bir şekilde yayılmasına neden olmaktadır.

Gıdalarda ve gıda katkı maddelerinde *Salmonella* kontaminasyonu dünya genelinde büyük bir sorun teşkil etmekte ve bu durum hayvanlarda ve hayvansal gıdaları tüketen bireylerde *Salmonella* enfeksiyonu riskini artırmaktadır (Crump vd. 2002). Salmonelloz vakalarının bir kısmının, kanatlı hayvan etlerinin yanı sıra marul, kişniş, kavun, pastörize edilmemiş portakal suyu, domates gibi çeşitli meyve ve sebzelerin tüketilmesi sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir (Cook vd. 1998, Burnett ve Beuchat 2000). Gıda üretiminin gerçekleştirildiği fabrikalarda, *Salmonella* kontaminasyonunu için büyük yatırımlar yapılmasına karşın, bazı klonların fabrika koşullarında yıllarca varlığını sürdürebildiği belirlenmiştir. Ayrıca bu klonların biyofilm oluşturma yeteneklerinden dolayı dezenfektanlar aracılığı ile de üretim yapılan yüzeylerden uzaklaştırılmadığı saptanmıştır (Ronner vd. 1993, Møretro vd. 2003).

Bakteriyel biyofilmler; bir nesneye, ara yüzeye ya da birbirine yapışık halde duran bakteri toplulukları olarak tanımlanmaktadır (Costerton vd. 1995). Biyofilm içerisinde bulunan hücreler, kendi ürettikleri ve dış çevreye karşı kimyasal ve mekanik koruma sağlayan bir matriks içerisine gömülü olarak bulunmakta ve üzerlerinde çok çeşitli bileşiklerin birikmesine neden oldukları için hem endüstriyel hem de tıp alanında büyük sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Møretro vd. 2009). Biyofilm içerisindeki bakterilerin dezenfektanlara ve kurumaya karşı oldukça dirençli oldukları bilinmektedir (Matthysse vd. 1981, Zogaj vd. 2001). Yapılan son çalışmalar; *Salmonella*'nın polimer, çelik ve cam gibi yüzeylerin yanı sıra maydanoz gibi organik yüzeylerde de biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğu belirlenmiştir (Møretro vd. 2009).

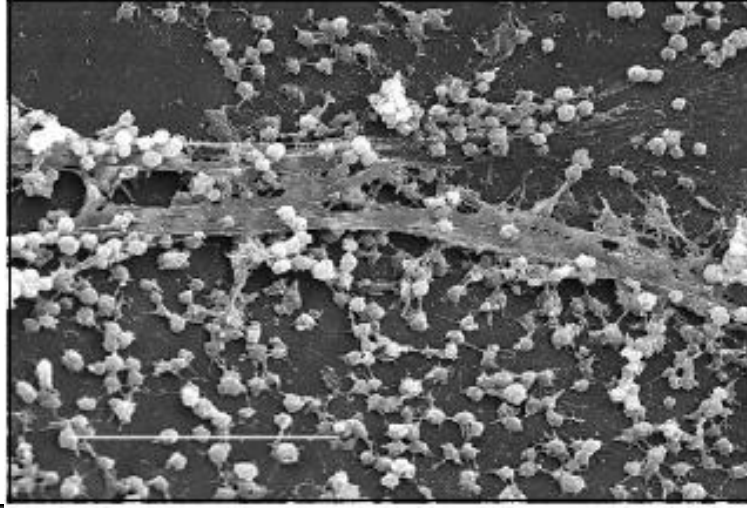
Bitki yüzeyleri gibi biyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneklerinin yanısıra *Salmonella*, plastik ve metal gibi abiyotik yüzeylerde de biyofilm oluşturmaktadır

(Hood ve Zottola 1997, Momba ve Kaleni 2002, Brand 2006). *Salmonella* türlerinin doğal mikroflora ile birlikte içme suyu borularında ölçülebilir düzeyde biyofilm oluşturduğu saptanmıştır (Schmeisser vd. 2003). *Salmonella*'nın hayvan konakçılarının dışındaki biyofilmler içerisinde hayatta kalabilmesi ve çoğalabilmesi, *Salmonella* ile ilgili gıda ve su kaynaklı gastroenteritin sürekliliğini açıklamaktadır (Brandl 2006, Teplitski 2006). Bu araştırmada, yukarıda belirtilen tıbbi ve endüstriyel önemi nedeniyle, Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarında biyofilm oluşturma karakteristiklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

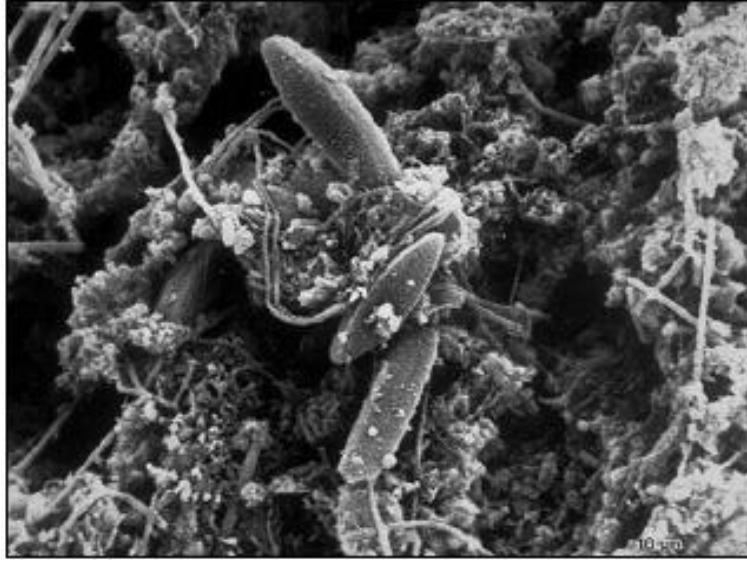
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi

Bakteriyel biyofilm kavramı ilk olarak 1683 yılında Antonie van Leeuwenhoek tarafından ifade edilmiştir. Araştırmacı, insan dışından kazıdığı plakları kendi ilkel mikroskopunda incelemiş ve bu gözlemlerindeki yapılara “animalkuli” adını vermiştir. Heukelekian ve Heler deniz mikroorganizmaları için “şişe etkisi” kavramını bulmuşlardır. Bu etkide mikroorganizmaların cam yüzeyler üzerine tutunup kolonize oldukları keşfedilmiştir. Bundan 250 yıl sonra, Claude E. ZoBell ışık mikroskopunda bazı deniz bakterilerinin cam slaytların yüzeylerine tutunup mikrokoloniler oluşturduğunu tespit etmiştir (Zobell ve Eshter 1935). Bu araştırmacı aynı zamanda cam yüzeylerdeki bu yapıların yıkama ya da çalkalamayla dağılmadığını da belirlemiştir. Characklis, endüstriyel su sistemlerindeki mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin klor gibi dezenfektanlara dahi dirençli olabileceklerini keşfetmiştir (Characklis 1973). Sonrasında bakterilerin biyofilmler içerisinde çok çeşitli yollarla organize olabilecekleri saptanmıştır. Örneğin; farklı bakteriyel türler ağızda farklı mikroflora üyeleri ile birlikte tutunma özelliği göstermektedir. Mikroelektrot teknolojisiyle birlikte ışık mikroskopisinde sağlanan gelişmeler sonucunda, bakteriyel biyofilmlerin bir yüzeye tutunmuş mikrokolonilerden oluştuğunu ve bu mikrokolonilerle birlikte biyofilmlerin organize ve gelişkin bir şekilde fonksiyonel heterojenite gösterdiklerinin anlaşılması mümkün olmuştur. Biyofilm üzerinde yürütülen çalışmalar, ekolojik ve endüstriyel sistemlerin dışında biyofilmlerin, halk sağlığı açısından da ciddi bir önem taşıdığını açık bir şekilde ortaya koymuştur (Şekil 2.1) (Donlan 2001). Bakterilerin biyofilmler içerisindeyken tıbbi malzemelerin üzerlerinde uzun süre hayatta kalabilmelerinden ötürü klinik sistemlerde de göz önünde bulundurulması gereken bir olgu olduğu anlaşılmıştır (Şekil 2.2) (www.microbelibrary.org 2002)



Şekil 2.1 Stafilokokal bir biyofilmin medikal bir alet üzerinde geliştirdiği biyofilmin TEM mikrografi (Donlan 2001)



Şekil 2.2 Endüstriyel bir su sistemi içindeki 8 haftalık biyofilmin TEM mikrografi (www.microbelibrary.org, 2002)

1980'lerde ve 1990'larda bakteriyel biyofilmlerin yapısal, karmaşık sistemler olduğu gerçeği anlaşılmaya başlanmıştır. Biyofilm, Costerton ve ortak çalışma gruplarının elde ettiği veriler doğrultusunda; birbirlerine, yüzeylere ya da arayüzelere bir matriks aracılığıyla tutunan bakteriyel popülasyonlar olarak tanımlanmıştır. Daha sonra,

Costerton ve Donlan (2002) tarafından yeni bir biyofilm tanımı yapılmıştır: Buna göre; arayüzlere, birbirlerine ya da bir substrata geri dönüşümlü olarak tutunmuş ve ürettikleri hücre dışı polimerik matriksin içine gömülmüş, farklı mikrobiyel gelişme fizyolojileri ve farklı genetik ifade ile ilişkili biçimde değişen bir fenotip sergileyen yapılar, biyofilm olarak adlandırılmıştır.

2.2 Biyofilm Oluşum Aşamaları

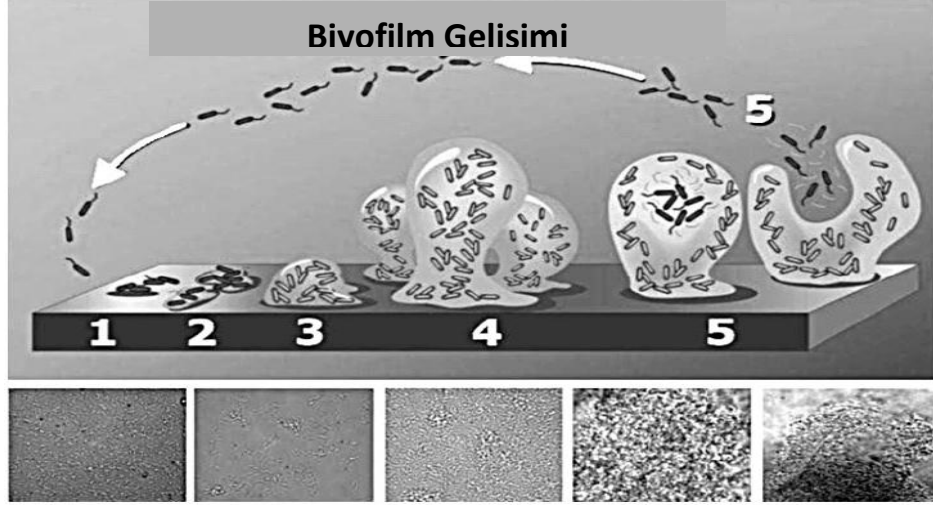
Biyofilm oluşumunun ilk aşaması; bakterilerin uygun bir yüzeye tutunmalarınıdır. Doğal sular, çevresel koşullarda hayatta kalabilmeleri ve kendilerini koruyabilmeleri için biyofilm oluştururlar. Herhangi bir yüzeye etkileşime girecek olan bakteriyel hücreler tutunmadan önce yüzey boyunca hareket ederler. Yüzeye etkileşimden sonra aynı türe dahil bakteriler bir araya gelip mikrokoloniler oluşturabilmek için tek tabakalı hücre hatları oluştururlar. Biyofilmler, aynı türden bakterilerin bir araya gelmeleriyle oluşabileceği gibi, farklı türden bakterilerin bir araya gelmesi halinde daha karmaşık bir yapıda olabilirler. Tutunma aktif bir süreç olup, bakterinin yüzeye ve diğer bakterilere geri dönüşümlü bir biçimde bağlanabilmesi için gerekli olan hücre dışı polimerlerin sentezini gerektirir (Costerton 1999). Bakterilerin geri dönüşümlü bir biçimde bağlanmalarının ardından bakteriyel hücreler çoğalır ve ekzopolisakkarit (EPS) üretirler (Kumar ve Anand 1998). Biyofilmler, elastiki davranış sergileyen yüksek derecede esnek yapılardır (Stoodley vd. 1998). Bakteriyel türlere bağlı olarak biyofilmler; % 10-25 bakteri hücrelerinden ve % 75-90 ekzopolisakkarit matriksten oluşur. Biyofilm içerisindeki bakterilerin Brown hareketinden yoksun olmaları karakteristik bir özelliktir. Biyofilmler sıklıkla mantar benzeri yapılar sergilerler. Bu yapının baş kısmında hücresel yoğunluk sap kısmına oranla daha fazladır (Costerton 1999). Olgun biyofilmlerin üç boyutlu yapılarında bakteriyel kümeler arasında su dolu kanallar bulunmaktadır, bu su dolu kanallar primitif bir dolaşım sistemine analog olacak şekilde metabolik süreçlerde üretilen toksik maddelerin atılmasında ve besinsel öğelerin alınmasında görev yapar. Biyofilmlerin ilerleyen safhalarında biyofilmden kopmalar görülebilir. Biyofilm hücre topluluğundan köken alan yavru hücreler, hayatta kalabilmek ve yeniden kolonize olabilmek için biyofilmden ayrılabilirler (Aparna ve Yadav 2008).

Biyofilmler, doğal çevrelerde yaygın bir şekilde bulunurlar ve cam, paslanmaz çelik, su boruları, implant, ve dişleri de içeren sayısız farklı ortamda gelişme gösterebilirler (Carpentier ve Cerf 1993, Costerton vd. 1999, Woodward vd. 2000, Joseph vd. 2001). Biyofilmler bazı durumlarda antibiyotiklere ve dezenfektanlara toleranslı olmalarından ötürü hastalık etkeni bakterilere koruyucu bir yapı teşkil ederler (Costerton vd. 1987, Costerton vd. 1999, Ueda ve Kuwabara 2007, Janssens vd. 2008). Su endüstrisinde biyofilmler hem sorun olarak algılanan ve hem de istenilen yapılardır. Atık su arıtım uygulamalarında biyofilmler, bakteriler için substrat olabilecek su kirleticilerinin ortadan kaldırılmasında basit ve ucuz bir yoldur. İçme suyu endüstrisinde istenmeyen biyofilmler halk sağlığı açısından önemli sorunlara neden olmaktadır (Rittmann 2004).

Uzun süreli yapısal ve fonksiyonel araştırmalar sonucunda, mikroorganizmaların zorlu çevre koşullarında neden biyofilm oluşturdukları daha iyi anlaşılmıştır. Bu koşullar doğal, endüstriyel ve medikal çevrelerdeki koşullar olup, mikroorganizmalar bazı durumlarda bu çevrelerdeki biyotik ya da abiyotik yüzeylerde kolonize olarak komünite davranışı sergilemeye yönelebilirler. Biyofilm yapılarında en dikkat çekici özelliklerden biri polimerik matriks içerisinde gömülü vaziyette bulunan bakterilerin planktonik yaşam tarzlarından farklı olarak fenotipik ve morfolojik farklılıklar sergilemeleridir (David 1999). Biyofilm yapısındaki bakteriler ve planktonik bakteriler arasında yaklaşık olarak % 1-10 arasında bakteriyel transkript farkı saptanmıştır. Gen ifade düzeyleri ve metabolizma aynı şekilde biyofilm oluşumunun farklı safhalarında çeşitlilik gösterir (Schembri vd. 2003, Webb vd. 2003, Beloin ve Ghigo 2005). Gram negatif bakterilerde çeşitli çevresel koşullar (örneğin; besin arzı, konakçı metabolitleri, kolonize olunan yüzeylerin fiziksel ve kimyasal nitelikleri, sıcaklık, oksijen gerilimi, tuz konsantrasyonu ve ozmolarite) ve bakterinin kendi ürettiği sinyaller (örneğin; indol, siklik-diguanilat, asetil fosfat ve N-asilhomoserin laktonlar) biyofilm oluşumunda, olgunlaşmasında ve dağılmasında rol oynar (Prouty vd. 2002, Shirtliff vd. 2002, Hammer ve Bassler 2003, Martino vd. 2003, Wolfe vd. 2003, Tischler ve Camilli 2004).

Biyofilmler beş temel aşamada oluşurlar: Bunlar; bakterilerin yüzeye temasa geçmeleri, bakterilerin yüzeye sıkıca tutunabilmeleri için ekzopolisakkarit üretmeleri,

biyofilm yapısının erken gelişimi, biyofilmin olgunlaşması, olgun biyofilm üzerinden hücrelerin koparak ayrılmasıdır (Şekil 2.3) (Stoodley vd. 2002).



Şekil 2.3 Biyofilm oluşumunun beş basamaklı aşamaları ve bu aşamaları gösteren mikrograflar (Stoodley vd. 2002)

Biyofilm oluşumu en az üç mekanizmayla açıklanabilen bir süreçtir. Bunlardan birincisi; yüzey hareketi sonucunda tutunmuş hücrelerin yeniden dağılmasıdır. *Pseudomonas aeruginosa*'nın mutantlarından elde edilen sonuçlarda tip IV piluslarıyla gerçekleştirilen hareketliliğin yüzey üzerindeki agregasyonda önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır. İkinci bir oluşum mekanizması; tutunmuş bakteri hücrelerinin ikiye bölünerek çoğalmasıyla ilgilidir (Heydon vd. 2000). Hücre bölünmesiyle birlikte yavru hücreler tutundukları yüzeyden yukarı istikamette biyofilme yayılırlar ve kolonizasyonla yeni hücre kümeleri oluştururlar. Üçüncü mekanizma, sıvı fazda planktonik halde bulunan bakterilerin gelişmekte olan biyofilmin üzerine birikmesiyle ilgilidir. Bu mekanizmaların biyofilm oluşumuna görece katkıları, mevcut bakterilerin türüne, kolonize olunan yüzeyin doğasına ve çevrenin fizikokimyasal koşullarına bağlıdır. Biyofilmlerin fiziksel boyutlarının ölçülmesi ve görsel karşılaştırmalarının mikroskopik yöntemlerle yapılması sonucunda, ortalama 10 gün gibi uzun bir süreçte oluştukları anlaşılmıştır. Bu nedenle biyofilm oluşumunun başlangıcında rol alan tek tek genlerin susturulmasıyla elde edilecek fenotiplerin biyofilm oluşumunun anlaşılmasına sağlayacağı veriler, süreci açıklamakta yetersiz kalmaktadır.

Pseudomonas putida ve *Escherichia coli*'de yapılan bazı çalışmalarda biyofilmlerin merkezindeki hücre kümelerinde biyofilmin hızla gelişmesine bağlı olarak bir süre sonra azalma görülmüştür; ancak merkezdeki bu hücrelerin aktivitesi kullanılabilir karbon kaynaklarının takviyesiyle yeniden kontrol edilebilir bir hale getirilebilir (Sternberg vd. 1999). Biyofilmi oluşturan hücre kümelerine oksijen ve besinsel destek sağlanarak, bu kümeleri çevreleyen kanallarda artış olduğu saptanmıştır (De Beer vd. 1994).

İyi karakterize edilmiş ve biyofilm oluşumu bakımından mutant suş kütüphaneleri biyofilm oluşumunun başlangıç safhalarının anlaşılmasına güçlü bir alternatif sunmaktadır. *E. coli*'nin biyofilm oluşumu bakımından defektif mutant suşlarının polivinil-klorür (PVC) materyaller üzerinde transpozon mutasyonu uygulamasıyla tip I pilus üretemeyen ya da hareketsiz suşların tutunamaması, hareketin ve pilusların biyofilm başlangıç safhasında önemli olduğunu göstermiştir. Tip I pilusları, mannoz-duyarlı piluslara dahil edilir. Doğal tip suşların geliştirildiği besiyerlerine mannoz analoglarının ilavesi sonucu tip I pilusunun ifadesinin inhibe edilmesiyle biyofilm başlangıcı sekteye uğramaktadır. *E. coli*'deki hareketliliğe ilişkin yapılan ileri analizlerle flagella üretemeyen ya da paralize flagella bulunduran suşların biyofilm oluşturma kapasitelerinin azaldığı gözlenmiştir. Bu mikroorganizmanın biyofilm oluşumunun başlangıcında hücre-yüzey etkileşiminin gerçekleşebilmesi için tip I piluslara gereksinim duyulmakta, sonrasında biyofilmin yüzey boyunca yayılabilmesi için mikroorganizmanın flagellar hareket kabiliyeti sergilemesi gerekmektedir. Bu sonuçlar biyofilm oluşumunun yalnızca bu niteliklere bağlı olduğunu göstermemektedir. Transpozon insersiyonu yöntemiyle elde edilmiş yüzeye tutunma yetersizliği gösteren *Pseudomonas fluorescens* suşlarında “*sad*” (yüzeye tutunma defekti) mutantları hareketsiz ve sitoplazmik bir proteazla ilişkili Clp yüzey proteinini üretemediği halde biyofilm oluşturma başarısını göstermektedir. Bu durum çevresel sinyallerin değişmesine göre mikroorganizmaların biyofilm oluşumuna yönelebilmek için çok çeşitli stratejiler geliştirebileceklerinin bir göstergesidir (Costerton vd. 1999).

Biyofilm araştırmalarında model olarak en çok tercih edilen mikroorganizmalardan biri olan *Pseudomonas aeruginosa*'nın flagellar hareket yetersizliği sergileyen ve tip IV

pilusunu sentezleyemeyen mutant suşlarında yüzeye etkileşim gerçekleşse dahi, bu aşamadan sonra biyofilm tabakasının temelini teşkil eden mikrokolonizasyon aşamasının gerçekleşmediği bilinmektedir. Gıda kaynaklı enterik patojen olan *Salmonella* Enteritidis aynı şekilde, biyofilm oluşumu için gereksinim duyulan pilusları bulundurmaktadır. Bu pilus, önceleri ince agregatif fimbriya olarak adlandırılmaktaydı (güncel ifadeyle kıvrımlı fimbriya) ve bu fimbriyanın ifade edilmediği mutant suşlarda, doğal suşlarda görüldüğü gibi yoğun biyofilm sentezi görülmemektedir. *P. aeruginosa* biyofilm modeline göre; biyofilm oluşum aşamalarını ilk tutunma ve mikrokoloni oluşumu, biyofilm gelişimi ve hücrelerin biyofilmden ayrılması olarak özetlemek mümkündür (Costerton vd. 1999).

2.2.1 İlk tutunma ve mikrokoloni oluşumu

P. aeruginosa biyofilmleri üzerine yürütülen bir çalışmada, biyofilm oluşturma yeteneğini etkileyen 2 tip mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan ilki “*sad*” (surface attachment defective; yüzeye tutunma bakımından yetersiz) olarak adlandırılmıştır. Bu grup, flagella ilgili mutantları içermekte olup, plastik yüzeylere iyi bir şekilde tutunamama özelliği ile karakterize edilmiştir. Diğer sınıf mutantlarsa tip IV pilusları gibi saç-benzeri bileşenlerin biyogenezinde etkin genlerin mutasyonlarını içermektedir. Sonuçta, doğal tip hücreler plastik materyaller üzerinde mikrokoloniler (küçük bakteri grupları) halinde kümelenirken, pilus biyogenezi bakımından mutant suşlar, yüzeyde mikrokoloniler oluşturamayıp, yalnızca tek tabakalı ince bir yapı gösterirler. *P. aeruginosa*'da tip IV pilusları hücrelerin mikrokoloniler halinde bir araya gelebilmelerinde etken seğirme (twitching motility) adı verilen yüzeye ilişkili hareketi gerçekleştirmektedir (Costerton vd. 1999).

Biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan yüzeye tutunma sırasında bazı genlerin ifade düzeylerinde artış olduğuna yönelik kanıtlar mevcuttur. *P. aeruginosa*'da yürütülen çalışmalarda polisakkarit sentezinde gerekli olan *algC*, *algD* ve *algU* genlerinin transkripsiyonunda, yüzeye tutunma sırasında artış olduğu saptanmıştır. Bu durum bakterinin yüzeye teması algılayabildiğini ve spesifik genlerin ifadesini yönlendirdiğini göstermektedir (Costerton vd. 1999).

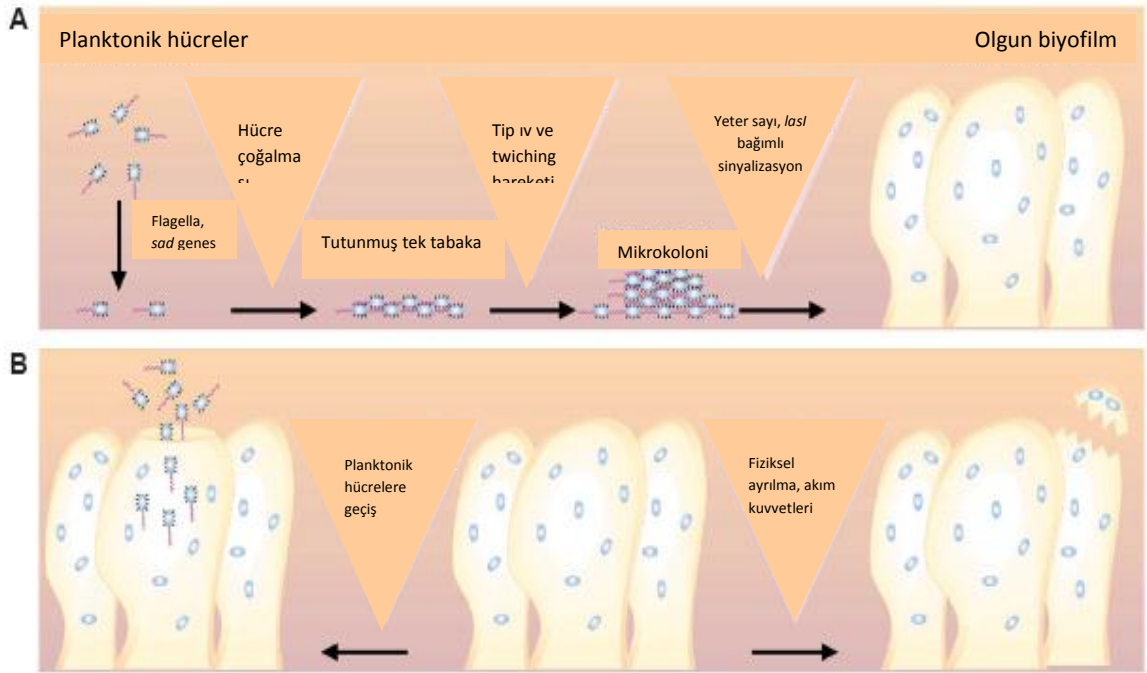
2.2.2 Biyofilm oluşturmak üzere tutunmuş bakterilerin olgunlaşması

Tutunmadan sonra mikrokoloniler, biyositlere dirençli ekzopolisakkarit kaplı komüniteler halinde farklılaşırlar. Gram negatif bakterilerde yeter sayı algılama (quorum sensing) çalışmaları bakterilerce salınan asilhomoserin lakton sinyallerinin kritik hücresele yoğunlukta, spesifik bazı genlerin ifadesini teşvik ettiğini göstermiştir. *P. aeruginosa*'da iki tip yeter sayı algılama mekanizması tanımlanmıştır. Bunların bir tanesi LasR-LasI sistemi olup, bu mekanizma hücre dışı virülens faktörlerinin ifadesini düzenler. Bu sistem aynı zamanda sekonder metabolitlerin üretimini düzenleyen RhIR-RhII sistemini de kontrol eder. RhII butirilhomoserin laktonunun üretimini katalizler ve LasI, 3-oksododekanoil homoserin laktonun sentezini yönlendirir. Doğal tip, *lasI* ve *rhII* mutantları cam bir yüzeyde kolonize olup mikrokoloni oluşturabilir; fakat doğal tip ve *rhII* mutant tip, kalın-biyosit dirençli biyofilmler oluştururken, *lasI* mutantlarının oluşturduğu biyofilmler ince ve farklılaşmamış bir şekilde kalarak zayıf deterjanlarla (% 0.2 sodyum dodezil sülfat) uzaklaştırılabilirler. *lasI* mutantlarına 3-oksododekanoil homoserin laktonun ilavesiyle bu mutantlarda biyofilm oluşumu yeniden görülmüştür. Bu durumun en iyi örneği; *P. aeruginosa*'nın silikon ureter kateterleri üzerindeki biyofilmlerinde asilhomoserin laktonun saptanmasıdır. *P. aeruginosa* biyofilmlerinde, yüzeye tutunma ve yüzeydeki agregasyon için spesifik hücre bileşenlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu biyofilmlerin olgunlaşması için de hormon benzeri bir bileşene ihtiyaç duyulduğu saptanmıştır (Costerton vd. 1999).

2.2.3 Planktonik hücrelerin biyofilmlerden ayrılması ve dağılması

Bağlı (sesil) bir komünite içindeki bir bakterinin farklı bölgelerde kolonize olabilmesi için birtakım dağılma mekanizmalarına gereksinimi vardır. Bunun yanında, biyofilm içerisindeki bakteriler planktonik faza da geçebilmektedir. *P. aeruginosa*'da bu durum aljinatı sindiren bir enzimle gerçekleştirilmektedir. Başka bir örnekte, *Rhodobacter sphaeroides*'te olduğu gibi biyofilmdeki bağlı hücrelerin serbest hale gelebilmesi için bir yeter sayı algılama sinyal molekülü olan asilhomoserin laktona gereksinim duyulmasıdır (Bu bakteride yeter sayı algılama genlerine “*cer*” ; komünite kaçış yanıtı denilmektedir) (Şekil 2.4) (Costerton vd. 1999).

Biyofilm organizasyonunun anlaşılmasında en ideal model olarak kabul edilen *P. aeruginosa* biyofilmi, bir substrata tutunmuş vaziyettir ve biyofilmin üzerinde besinlerin sürekli akış halinde olduğu bir sulu faz vardır. Tutunmuş hücreler mikrokolonilerin oluşumu için ekzopolisakkarit üretir ve biyofilmin yayılabilmesi için mikroorganizmalar yüzey boyunca yavaşça göç ederek mantar şeklini andıran yapılar oluştururlar. Primitif dolaşım sistemine paralellik gösteren su dolu kanallar, mikrokoloniler arasında oluşturularak besinsel gereksinimlerin giderilmesine ve toksik atıkların uzaklaştırılmasına olanak sağlar. Bu kompleks ve organize yaşamsal yapının nasıl düzenlendiğine ilişkin sorular hala güncelliğini korumakta ve yeni çalışmalara kaynak teşkil etmektedir (Costerton vd. 1999).



Şekil 2.4.a *P. aeruginosa* biyofilminin olgunlaşma basamakları, b. bakterilerin biyofilmlerden ayrılma yolları (Costerton vd. 1999)

2.3 Biyofilm Matriksinin Kompozisyonu

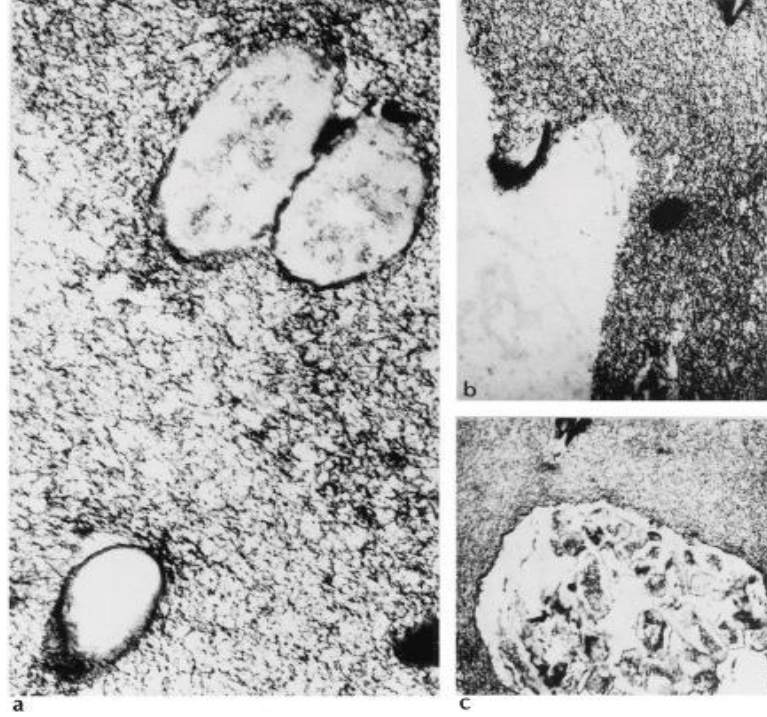
Bakteriler, çevresel yüzeyler ve arayüzeyler üzerinde, biyofilmler içerisinde organize olurlar. Biyofilmler, çoğunlukla kendisini oluşturan bakterilere iç ve dış çevresel tehditlere karşı koruma sağlar. Doğal olarak meydana gelmiş biyofilmler, çoğunlukla

farklı bakteriyel türleri içermektedir. Ancak biyofilmlerin fizyolojik, kimyasal ve genetik karakteristiklerinin anlaşılmasında, laboratuvarlarda tek tip türlerin oluşturduğu biyofilmlerin analizi daha kolay bir yoldur. Çok hücreli bir komünite oluşturmak üzere bir araya gelen hücrelerin yapısallığı, hücre dışı bileşenler tarafından belirlenir. Bu bileşenlerin çeşitliliğine göre de biyofilmlerin çeşitliliklerinden söz edilebilir (Branda vd. 2005).

Planktonik ve sesil (bağlı) bakteriler arasındaki en çarpıcı farklılıklardan bir tanesi biyofilmin yapısallığı için gereken biyofilm matriksidir. Matriks bileşenleri; biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların türüne, biyolojik ve biyolojik olmayan birçok parametreye bağlıdır. Bu farklı bileşenler, salgılanan ekzopolisakkaritler, proteinler ve ekstraselüler DNA'lardır. Ekzopolisakkaritler % 50-70 oranında organik karbon içerirler. Bakteriyel türlerin farklılığına bağlı olarak ekzopolisakkaritlerin tipi ve miktarı çeşitlilik göstermektedir (Starkey vd. 2004). Bakteriyel virülense etkilerinden ötürü ekstraselüler polisakkaritler uzun yıllardır çalışılmakta olan bir konudur. Hücre dışı polisakkaritler, kapsüler polisakkaritler ya da ekzopolisakkaritler şeklinde sınıflandırılmışlardır. Geliştirilen bakteri kültürleri santrifüj edildikten sonra, hücreyle bağlantılı şekilde kalan ekstraselüler polisakkaritler kapsül olarak adlandırılırken, üst sıvı içerisinde kalan hücre dışı polisakkaritler, ekzopolisakkaritler olarak adlandırılmaktadır. Biyofilm çalışmalarında bazı polisakkaritlerin izolasyonun zor olması, biyofilmin kimyasal kompozisyonunun anlaşılmasına engel teşkil etmektedir (Branda vd. 2005).

Monosakkarit monomerlerinin (1→4) β glikozit bağlarıyla bir araya gelmesiyle oluşan selüloz, birçok bakteriyel matriks kompozisyonunda bulunan önemli bir bileşendir (Zogaj vd. 2001, Romling vd. 2002, Aparna ve Yadav 2008, Ma vd. 2009). Bakteriyel ekzopolisakaritler biyofilm matriksinin en temel ögesidir. Matriks sulu bir tabiata sahip olup birçok türün biyofilminde anyonik bir karakter sergileyerek temel besinlerin ve minerallerin yakalanarak konsantre hale getirilmesine olanak sağlayan bir sistem oluşturur. Biyofilmler içerisinde yer alan bakteriler için çevresel tehditlere, biyositlere, antikorlara, surfaktanlara, serbest yaşayan amip gibi predatörlere ve beyaz kan hücrelerine karşı koruyucu bir avantaj sağlar. Matriks üç boyutlu bir kuvvet alanı

yaratarak bakterileri çevreler ve bakterilerin yüzeylere sıkıca tutunmalarını sağlayarak bakterilere stabilite kazandırır (Şekil 2.5) (Dunne 2000).



Şekil 2.5.a.b.c. Serbest ve matriksle çevrili mikrokolonilerin elektron mikrografları (Dunne 2000)

Proteinler de biyofilm matrikslerde selüloz gibi önemli bileşenlerdir. Proteinlerin miktarları ve tipleri biyofilm içerisindeki mevcut bakterinin türüne göre değişim gösterir. Biyofilm matriksin kompozisyonuna dahil edilen lektinler bu duruma tipik bir örnek teşkil etmektedir. Lektinler, piluslar ve Gram negatif bakteri dış membranı gibi hücre yüzey yapılarıyla ilişkilidir ve bakterilerin hem birbirlerine hem de konakçılara spesifik bir şekilde tutunmalarına olanak sağlar (Starkey vd. 2004). Fimbriyalar temelde fimbrin adı verilen monomerlerin bir araya gelmesiyle oluşan yapısal elemanlar olup, bakterilerin inert yüzeylerle olan etkileşiminde önemli bir rol oynarlar (Collinson vd. 1991, Muller vd. 1991, Woodward vd. 2000). Diğer yandan hücre dışı DNA (eDNA), matriksin yapısallığında önem teşkil eder. Bazı bakterilerin matriks yapısındaki DNA, rasgele bir şekilde kromozomal DNA'dan köken almakta ve bu DNA matriks içerisinde hücre-hücre etkileşimine katkı sağlamaktadır. Hücre dışı DNA'nın biyofilmin erken

oluşum safhalarında yapısallığa katkıda bulunan bir fonksiyon sergilediği de bilinmektedir (Starkey vd. 2004).

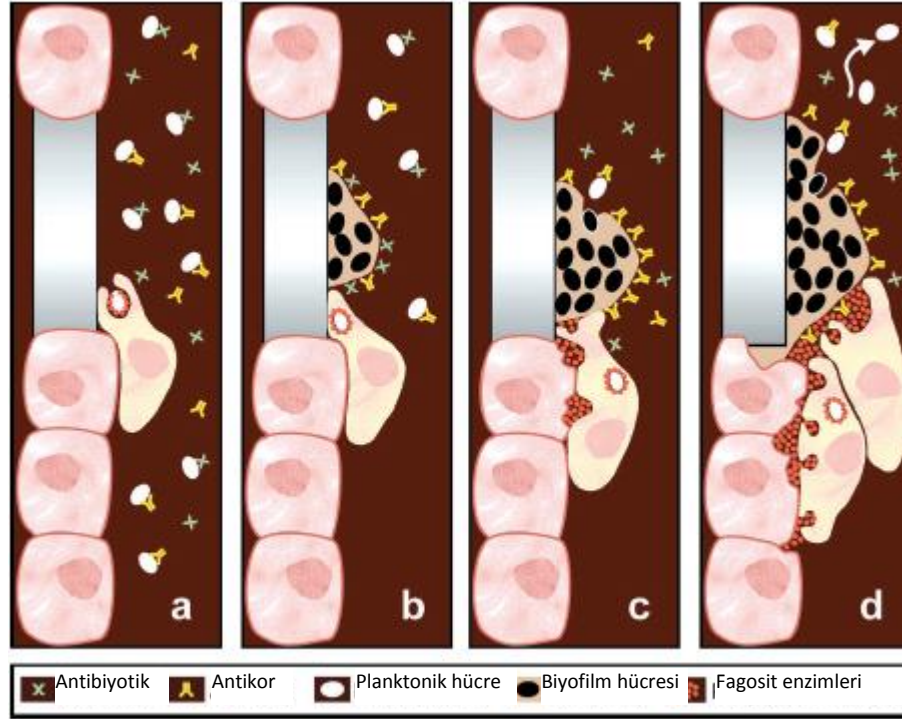
P. aeruginosa suşlarının, mukoid olmayan biyofilm üreticisi suşlardan farklı olarak daha kompleks ve farklı bir matriks oluşturdukları saptanmıştır. Bu farklılıklardan biri, mukoid suşlardaki matriks yapısında bulunan ekzopolisakkaritlerin temel bileşeni olan O-asetilli aljinattır (Nivens vd. 2000). *E. coli* K12 ve *Vibrio cholerae* O139 suşlarında kolonik asit ve EPS karmaşık yapısallığın tesisinde gereklidir (Danese vd. 2000, Watnick vd. 2001). EPS'nin biyofilmin yapısallığına ve biyofilmi oluşturan bakterilerin hayatta kalabilme kabiliyetlerine önemli katkılar sağladığı, deneysel koşullarda biyofilmden EPS'nin uzaklaştırılması halinde bakterilerin antimikrobiyel ajanlara karşı daha duyarlı hale gelmeleriyle anlaşılmıştır.

2.4. Bakteriyel Biyofilmlerin Sebep Olduğu Enfeksiyon Hastalıkları ve Antibiyotiklerle Etkileşimleri

Günümüzde enfeksiyon hastalıkları, etkin antibiyotik terapileriyle tedavi edilmektedir. Ancak bu yaklaşım çoğunlukla bakteriyel biyofilmlerin söz konusu olduğu durumlarda etkin bir çözüm sağlayamamaktadır.

Medikal aletlerin yüzeylerinde ve bu yüzeylerdeki ölü dokularda biyofilm gelişebilir. Aynı zamanda endokardit tablosunda görüldüğü gibi canlı dokular üzerinde de biyofilm oluşabilir. Biyofilmler yavaş gelişirler ve enfekte bireylerde ileri semptomlar üretirler. Biyofilm içerisindeki bakteriler, birtakım antijenler sentezleyerek antikor üretimini tetikleyebilirler; ancak antikorlar çoğu kez biyofilm içerisindeki bakterileri öldürmek için yeterli etkinliği gösterememektedirler. Bunun sonucunda, biyofilm çevresindeki dokuda immün kompleks hasarı meydana gelmektedir. Yeterli hücresel ve humoral bağışıklığı olan bireylerde dahi biyofilmler, immün sistemce alt edilemeyebilirler. Antibiyotik terapiler, biyofilmlerden açığa çıkan planktonik hücrelerin semptomlarını tersine çevirebilirken, biyofilmlerin yok edilmesinde etkin olamamaktadır (Şekil 2.6) Sürekli antibiyotik terapisine rağmen tekrarlayan semptomların görülmesi sonucunda

cerrahi müdahaleyle biyofilmin vücuttan uzaklaştırılması gerekmektedir. (Costerton vd. 1999).



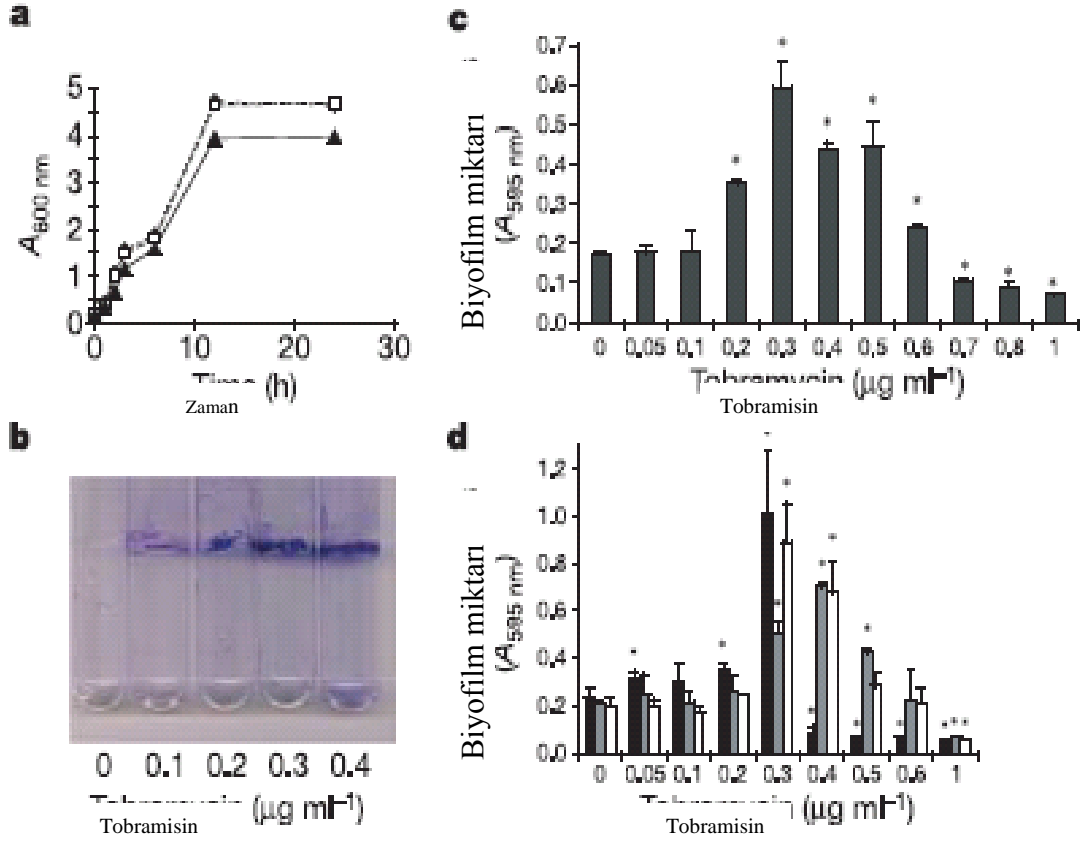
Şekil 2.6 Biyofilmlerin antibiyotiklerle ve antikorlarla olan etkileşimleri (Costerton vd. 1999)

Biyofilm içerisindeki bakteriler, konakçı immün yanıtına daha güçlü bir şekilde karşı koyabilmekte, planktonik bakterilere oranla antibiyotiklere daha yüksek düzeyde direnç gösterebilmektedirler. Biyofilmler ayrıca kronik enfeksiyonların sürekliliğinde de rol oynamaktadır. Antibiyotik dirençliliğinde biyofilm mekanizmaları farklılık göstermektedir. Bir mekanizma; antimikrobiyel ajanların biyofilmin derinliklerine dek nüfuz edememesiyle ilgilidir. Biyofilmlerde olduğu gibi polimerik matriksler, antibiyotiklerin difüzyonunu engellerler ve genelde antibiyotikler sudaki hallerinden daha yavaş oranlarda biyofilmler içerisinde difüze olurlar. Biyofilmin ve ajanın doğasına göre antibiyotikler biyofilmlerin içine girebilir ya da biyofilmlere zayıf bir şekilde nüfuz eder. Bir bariyerin varlığında antibiyotik ajan, diffüze olabildiği serbest alanda olduğundan çok daha hızlı bir şekilde aktivitesinin kaybedebilmektedir. Bu durum hidrojen peroksit ve hipoklorit gibi reaktif oksidantlar için de geçerlidir. Bu

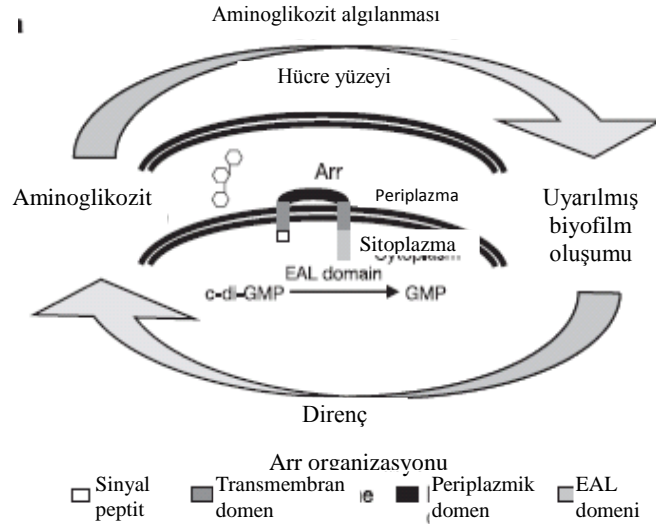
antimikrobiyel oksidantlar fagositik hücrelerin ürünleri olup, biyofilmdeki bakterileri öldürmede yetersizdirler. İkinci mekanizma; biyofilm içerisinde yavaş gelişme gösteren bakterilerin antimikrobiyel ajanlara karşı daha az duyarlı olmalarıyla ilgilidir. Biyofilmlerdeki bakterilerin farklı gelişme stratejileri göstermeleri bu bakterilerin herhangi bir metabolik saldırıda hayatta kalmaları için zorunludur. Üçüncü mekanizma; öncekilerden daha tartışmalıdır. Bu hipotez, biyofilmlere özgü fenotiplerin, açlık durumunun sınırlamasına bağlı olmaksızın, bakterinin yalnızca biyofilm içerisinde bulunmasına bağlı olarak dirençliliğe karşı farklı bir genetik programlama içerebileceğini öngörmektedir (Costerton vd. 1999).

Biyofilmlerin antibiyotiklere dirençlilik göstermelerinin yanı sıra, biyofilmlere karşı minimal inhibisyon konsantrasyon düzeylerinin altında uygulanan antibiyotik terapilerinin biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğu saptanmıştır. İnhibisyon konsantrasyonlarının altında kullanılan aminoglikozit türü antibiyotikler, *P. aeruginosa*'da ve *E. coli*'de biyofilm oluşumunu teşvik etmiştir (Şekil 2.7). *P. aeruginosa*'da aminoglikozit direnç yanıtını düzenleyen “*arr*” adı verilen bir genin fonksiyonu saptanmıştır. “*arr*” geni tahminen substratı bakteriyel bir sekonder mesaj olan c-di-GMP'yi üreten bir iç zar fosfodiesterazını kodlamaktadır (Şekil 2.8) (Hoffman vd. 2005).

Klinik anlamda fırsatçı enfeksiyon durumlarına sebep olmasıyla bilinen *P. aeruginosa*, bir aminoglikozit antibiyotik türü olan tobramisine karşı artan bir biyofilm yanıtıyla karşılık vermektedir (Hoffman vd. 2005).



Şekil 2.7 Tobramisin'in biyofilm oluşumu üzerine etkileri (Hoffman vd. 2005)



Şekil 2.8 c-di-GMP'nin biyofilm oluşumunda aminoglikozitlere karşı geliştirdiği yanıt (Hoffman vd. 2005)

2.5 *Salmonella*'da Biyofilm Oluşumu

S. Typhimurium'da ve yakın ilişkili bakterilerde, flagellar hareket, pilus ve kolanik asit, lipopolisakkarit, ortak enterobakteriyel antijen lipid II ve selüloz sentezi ile ilgili yapısal genler, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda katkı sağlamaktadır (Pratt ve Silhavy 1995, Mireles vd. 2001, Zogaj vd. 2001, Solano vd. 2002, Boddicker vd. 2003). Ozmolarite ve zar stresini algılayan sensörler tarafından sağlanan hareketlilikle, karbon depolama regülatörleriyle ve polimer matriks senteziyle ilgili düzenleyici proteinler, biyofilmin oluşumu ve dağılımında etkilidir (Mireles vd. 2001, Romling 2001, Zogaj vd. 2001, Jackson vd. 2002, Solano vd. 2002, Boddicker vd. 2003, Gerstel vd. 2003).

S. Typhimurium'un BarA/SirA ortologlarının *E. coli* ve *Pseudomonas*'daki etkinliği bilinmekle birlikte *Salmonella*'daki biyofilm oluşumuna katkıları henüz tanımlanamamıştır (Parkins vd. 2001, Jackson vd. 2002, Suzuki vd. 2002, Teplitski ve Ahmer 2004). BarA /SirA önemli bir virülens, hareketlilik ve biyofilm oluşumu regülatörüdür. *S. Typhimurium* ortologları olan BarA/SirA komponentleri, γ -Proteobacteria grubu bakterilerde biyofilm oluşumu ve virülens özelliğinin gelişimi için önem taşımaktadır. *S. Typhimurium*'da SirA, karbon depolama regülasyonundan sorumlu RNA'lar olan *crsB* ve *csrC*'yi ve virülens genlerin regülatörleri olan *hilA* ve *hilC*'yi aktive eder. Regülatör RNA'lar virülens genlerinin translasyonuna izin vererek ve flagellar genlerin translasyonunu inhibe ederek etki göstermektedir. Bu anlamda SirA ve Csr sistemi aynı zamanda tip I fimbriyayı kodlayan *fim* operonunu da kontrol etmektedir. Diğer bakteriyel türlerdeki SirA ortologlarının ve *S. Typhimurium*'daki *fim* operonunun biyofilm oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. *S. Typhimurium*'un tüm üyelerinde SirA regülasyonunun biyofilm oluşumu üzerine etkisi *in vitro* koşullarda belirlenmiştir. SirA mutanı, *crsB* ve *csrC* ikili mutantları ve *fimI* mutantlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini kaybettiği saptanmıştır. SirA, biyofilm oluşumunu başlatmak için *crsB*, *csrC* ve *fim* operonlarını aktive etmektedir. *crsB* ve *csrC*, *fim* operonunu translasyonunu yönetirken, aynı zamanda biyofilm oluşumunu inhibe eden flagella translasyonunu engellemektedir (Teplitski vd. 2006).

SirA (*E. coli*'de UyrY ve *Pseudomonas*'ta GacA olarak bilinir) üç parçalı histidin sensör kinaz BarA tarafından fosforile edilen FixJ ailesinin yanıt regülatörüdür (Heeb ve Haas 2001, Pernestig vd. 2003, Teplitski vd. 2003, Teplitski ve Ahmer 2004, Tomenius vd. 2005). SirA'nın BarA tarafından fosforile edilmediği durumda, SirA hücrel asetil fosfat havuzundan aktive edilir (Lawhon vd 2002, Tomenius vd 2005). BarA/SirA sisteminin ortologları *E. coli*'de, *Salmonella*'da, *Pseudomonas*'ta ve *Vibrio* spp.'de, flagellar gen ifadesinin (*flhDC*) regülasyonuna ve bakteriyel hareketliliğe katkı sağlar (Whistler vd 1998, Goodier ve Ahmer 2001, Teplitski vd. 2003). *flhDC* promotorunun transkripsiyonu, Crp, OmpR, H-NS, HdfR, OseBC, FliA ve LrhA sistemleri ve DNA süpersarmallaşması, sıcaklık, gelişme fazı, hücre döngüsü kriterlerine bağlı olarak regüle edilir (Kutsukake 1997, Soutourina vd. 1999, Chilcott ve Hughes 2000, Clarke ve Sperandio 2005). Bu genin ürününün post transkripsiyonel regülasyonu flhDC-Csr sistemi ve ClpXP proteazı tarafından denetlenir (Wei vd. 2001, Tomoyasu vd. 2002). Csr sistemi, RNA-bağlanma proteini olan CsrA ve küçük regülatör RNA'lar olan CsrB ve CsrC'den oluşur. CsrA dışında CsrB ve CsrC'nin transkripsiyonu, *E. coli* ve *Salmonella*'da BarA/SirA ortologlarının kontrolü altındadır (Suzuki vd. 2002, Teplitski vd. 2003, Weilbacher vd. 2003, Fortune vd. 2006). CsrA, 61 amino asitlik bir protein olup hedef genlerin mRNA'larına bağlanır. Bu bağlanmayla mesaj ortadan kaldırılabılır, translasyon sürecine dahil olabilir ya da ifadesi engellenir (Romeo 1998). *E. coli*'de CsrA, biyofilm oluşumunu ve ekzopolisakkarit sentezini uyarırken, glikojen metabolizmasını ve glukoneogenezisi inhibe eder (Romeo 1998, Suzuki vd. 2002). CsrA proteinin aktivitesi, küçük düzenleyici CsrB ve CsrC RNA'ları tarafından engellenmektedir. CsrB molekülü, 18 adet CsrA proteinine bağlanırken; CsrC 9 adet CsrA proteinine bağlanır (Romeo 1998, Weilbacher vd. 2003). CsrA'nın Csr RNA'ları ile olan etkileşimi *S. Typhimurium*'da tanımlanmamıştır. Ancak *E. coli*'de *csrA*, *csrB* ve *csrC* genleri harekette, karbon depolanmasında, virülensin ve sekonder metabolizmanın denetlenmesinde önemli rollere sahiptir (Altier vd. 2000, Lawhon vd. 2003, Fortune vd. 2006). Diğer yandan evrimsel olarak korunmuş *csr* genlerinin kontrolünde *Salmonella* SirA regülasyon sistemi, aynı zamanda yatay gen transferiyle kazanılmış virülens genleri de regüle eder. Virülens genlerinin ifadesinin etkilenmesi için fosforile edilmiş SirA doğrudan virülens regülatörleri olan hilA ve hilC'nin kodlandığı *Salmonella* patojenite adasını uyarır (Teplitski vd. 2003). HilA,

SPI-1'in büyük bir regülatörü olup *prgH* ve *invF* operonlarınca kodlanan tip III salgı sistemini doğrudan aktive eder (Bajaj vd. 1996, Darwin ve Miller 1999, 2001, Lostroh vd. 2000). InvF kontrollü *sic/sip* operonlarıyla birlikte sipBCD, salgılanan efektörleri kodlar ve bu proteinler hedef hücre membranı üzerinde translokaz kompleksi oluşturur (Darwin ve Miller 1999, 2001). BarA ve SirA'nın tip I fimbriyayı kodlayan *fim* operonunu regüle ettiği saptanmıştır. Tip I fimbriyanın *Salmonella* biyofilm oluşumunda önemli olduğu bilinmektedir (Boddicker vd. 2002). Bundan dolayı SirA/BarA regülasyonunun tüm bileşenlerinin *Salmonella*'da biyofilm oluşumundaki etkileri incelenmiştir. SirA, BarA, CsrB, CsrC ve tip I fimbriya plastik yüzeylerde biyofilm oluşumu için gereklidir. Flagellayı elimine eden tersine mutasyonlar biyofilm oluşumunu artırır. SirA-P doğrudan *fimA* promotörü ile etkileşim içerisinde olduğu saptanmıştır (Teplitski vd. 2006).

SirA regülasyonunun genlerindeki mutasyonlar biyofilm oluşumunu etkiler. γ -proteobakteriler için BarA/SirA ortologları hareket, virülens ve bazı durumlarda biyofilm oluşumu için gerekli genleri kontrol etmektedir (Heeb ve Haas 2001, Parkins vd. 2001, Teplitski ve Ahmer 2004). Ancak BarA ve SirA'nın *S. Typhimurium*'daki biyofilm oluşumundaki rolleri henüz belirlenmemiştir. Yürütülen çalışmalarda, mutant *S. Typhimurium* suşlarının polisitiren mikrotitre plaklarında oluşturdukları biyofilm fenotipleri, kristal viyole boyamasıyla ölçülmüş ve biyofilmlerin mikrotitre plaklardaki lokasyonları ve içerikleri tespit edilmiştir. Doğal tip *S. Typhimurium* biyofilmlerinin, kuyuların tabanında ve plağın çeper kısımlarında olduğu saptanmıştır. Doğal tip suş, aynı zamanda plastik yüzeylerin üst kısımlarda kolonize olmakta ve biyofilm oluşturmakta; ancak *sirA* mutantlarında biyofilm oluşumununun 3-5 kat azaldığı saptanmıştır. *sirA* mutantları, kuyuların çeper kısımlarında bakteriyel hücrelerden oluşan ince bir halka meydana getirmekte ve kuyunun tabanında saptanabilir bir biyofilm oluşturamamaktadır. SirA'nın plazmid kodlu düşük kopya sayılarıyla, biyofilm defekti giderilebilmektedir. *sirA*'nın ifadesinin regülasyonundan sorumlu *barA* geninin delesyonu aynı şekilde biyofilm oluşumunu azaltmaktadır. *sirA* mutantına benzer şekilde, *barA* mutantlarındaki biyofilm oluşumunda da kuyuların menisküs kısmında ince bir hücresel halka oluşumu karakteristiktir. *S. Typhimurium*'da BarA/SirA, SPI-1, SPI-4 ve SPI-5 üzerinde lokalize olan yatay olarak kazanılmış

virülens genlerini, SPI-1 üzerinde lokalize olmuş *hilA* geni aracılığıyla kontrol eder. SPI-4 ya da SPI-5 içindeki herhangi bir mutasyon, biyofilm oluşumunu değiştirmez. Ancak SPI-1 regülatörü olan *hilA* içindeki bir MudJ insersiyonu, biyofilm oluşumunu 1,5-2 kat artırır. Benzer şekilde SPI-1 içerisindeki tip III salgı sistemi genlerinin delesyonu ya da *sipB*'nin ifadesinin ortadan kalkması (tip III translokaz kompleksinin bir parçası) aynı şekilde biyofilm oluşumunu artırır. Bu sonuçlar SPI-1 tarafından kodlanan TTSS'nin, biyofilm oluşumuyla ya da test edilen koşullarda biyofilm oluşumunun azaltılarak regüle edilmesiyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Küçük düzenleyici RNA'lar olan CsrB ya da CsrC'nin ifade edilmemesi biyofilm oluşumunu azaltır. Bunun yanında ikili *csrB/csrC* mutanti biyofilm oluşum kabiliyetini önemli ölçüde düşürmektedir. Benzer şekilde *sirA*'nın plazmid üzerinde düşük kopya sayılı üretimi, *csrB/csrC* ikili mutantlarında biyofilm oluşumunu yenileyememektedir. Bu sonuçlar, hem *sirA* hem de *csrB* ve *csrC*'nin biyofilm oluşumu için gerekli olduğunu gösterir. SirA protein aktivasyon için, düzenleyici RNA'lar ise translasyon için gereklidir (Teplitski vd. 2006).

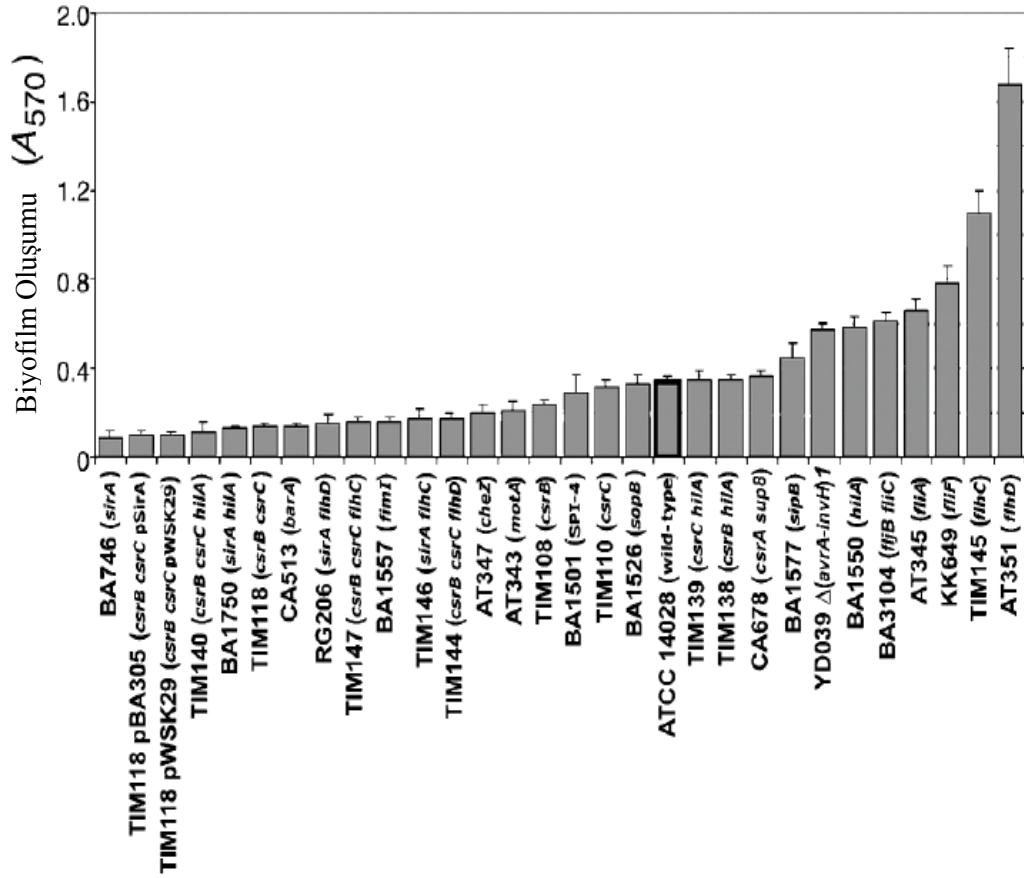
CsrA proteini, biyofilm oluşumu için gereken proteinlerin translasyonunu önler ya da proteinlerin parçalanmasına yol açar. CsrB ve CsrC RNA'larıysa, CsrA'ya antagonistik etki göstererek bu durumu tersine çevirir. Bununla birlikte SirA'nın bir geni aktive edebilmesi için, CsrB ve CsrC'nin translasyona izin vermesi gerekmektedir. Bu modelin teşkil ettiği temele göre *csrA* mutantlarında, *sirA* ya da *csrB/csrC* mutantlarına nazaran daha fazla biyofilm oluşumu gözlenir (*flhDC* mutantlarında olduğu gibi). *E. coli*'de *csrA* mutantları iyi bir şekilde gelişirken *S. Typhimurium*'un *csrA* mutantları zayıf bir şekilde gelişme göstermektedir. Ayrıca bu mutantların baskın mutasyonları hızlı bir şekilde biriktirdiği saptanmıştır (Altier vd. 2000). CsrB ve CsrC'nin yüksek ifadesi, CsrA proteininin miktarını dengeleyip bu proteinin fonksiyonunu azalmaktadır. Ancak *csrB* ya da *csrC* genlerinin fazla sayıda kopyasını bulunduran *S. Typhimurium* suşları *csrA* mutantlarında olduğu gibi çok yavaş çoğalmaktadır. Bu gözlemler ciddi gelişme yetersizliği gösteren *csrA* mutantlarıyla yapılan önceki çalışmalarla da teyit edilmiştir (Altier vd. 2000, Lawhon vd. 2003).

Flagellar regülatörlerin *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Flagellar regülon, BarA/SirA ve Csr sistemleriyle düzenlenmektedir. flhDC regülatörü, flagellar regülasyon çağlayanının en üst noktasındadır. *flhD* ve *flhC* genlerinde meydana gelen mutasyonlarda biyofilm oluşumunda yaklaşık olarak 5 katlık bir artış meydana gelmektedir. Bu fenotip *E. coli*'de görülen *flhDC* mutasyonlarında farklı bir sonuç doğurur. *E. coli*'de *flhD::Tn10* mutantlarıyla yapılan plazmid tamamlama çalışmalarında *flhDC* ifadesi ayarlanarak biyofilm miktarının doğal tipteki biyofilm düzeyine düşürüldüğü saptanmıştır (Pratt ve Kolter 1998). Ayrıca, *sirA* ve *flhD* ya da *sirA/flhC* ikili mutantlarında biyofilm üretimi azalmaktadır. *Salmonella* flhD ve flhC mutantlarının tutunma karakteristikleri doğal tiplerdekinden farklıdır. Doğal tipin aksine *flhD* ve *flhC* mutantları kuyuların çeper kısmında sıkı şekilde tutunan bakterilerin oluşturduğu halka yapısını ve kuyunun üst kısmında görülebilen bakteri kolonisi oluşturmaz. *flhD* ve *flhC* mutantları kuyuların taban kısmına çok sıkı bir şekilde bağlanırlar. Uzun süreli inkübasyonda (beş günlük) doğal tip bakteriler kuyunun tabanında kalın, gevşek bir biyofilm oluştururken, *flhD* ve *flhC* mutant hücrelerinin çoğu kuyunun duvarlarına bağlanacak şekilde taban kısmında ince bir biyofilm oluştururlar. flhDC fenotipinin ileri analizi için flagellanın varlığında hareket, kemotaksi ya da flhD'nin hareketten bağımsız düzenleyici fonksiyonları, biyofilm kontrolü açısından test edilmiştir. Çalışmada kullanılan bütün hareketsiz suşlar (*csrA*, *flhD*, *flhC*, *fliF*, *fliA*, *cheZ*, *motA* ve flagellasız *fliB/fliC* ikili mutantları) doğal tiplerden farklı olarak biyofilm oluşumunda farklı kabiliyetler göstermişlerdir. Bunlardan CsrA, *E. coli*'deki *flhDC* mRNA'sına doğrudan bağlanmakta ve mRNA'yı regüle etmektedir (Romeo 1998, Wei vd. 2001). Diğer mutasyonlar (*flhD*, *flhC*, *fliA*, *cheZ* ve *motA*) flhDC regülonuyla ilgilidir (Chilcott ve Hughes 2000). Alternatif bir sigma faktörü kodlayan *fliA*'da meydana gelen bir mutasyon *flhD* mutasyonunda olduğu gibi biyofilm miktarında artışa sebep olur. *fliF*'yi kısıtlayan mutasyon (*fliF* mutantları motor aparata sahip olup, yüzeyde flagella bulundurmaz) aynı şekilde doğal tiptekinden daha fazla biyofilm üretimine yol açmaktadır. Flagellin üretimi kısıtlanmış; fakat flagellar salgı makinesine sahip ikili *fliB/fliC* mutantında biyofilm artışı gözlenir. *fliF* ve *fliB/fliC* mutantlarının her ikisi de, *flhD* ile *fliA* mutantlarına benzer şekilde, kuyuların çeper kısmında sıkı bir halka yapısı oluşturmadan ya da çeperin yukarı kısımlarında kolonize olmadan tutunur. Paralize flagella bulunduran *motA* mutantının ve flagellalı; fakat

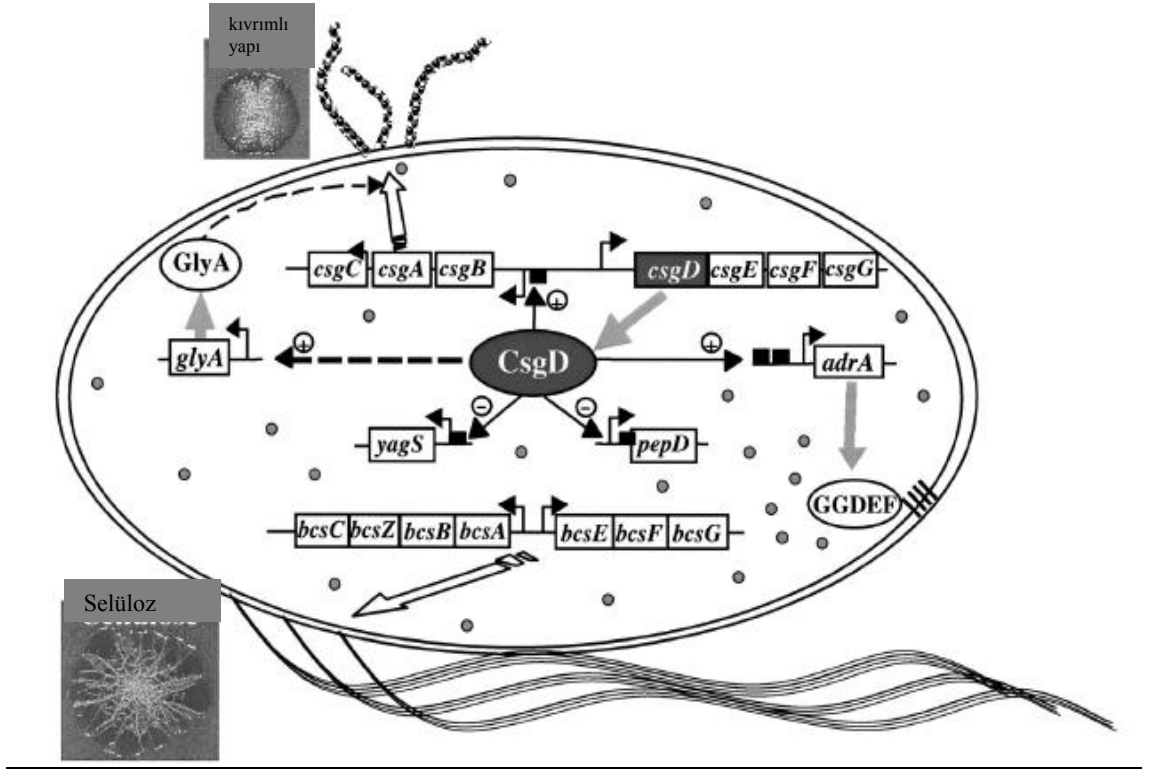
kemotaktik olmayan *cheZ* mutantının doğal tiptekinden daha az biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. Bu mutantlar, sadece çeper kısmında ince bir halka oluştururken çeperin aşağı ve yukarı kısımlarında kolonize olamazlar. Bu bulgular flagellanın bakterinin yüzeyinde fonksiyonel olsun ya da olmasın biyofilm oluşumunu inhibe ettiğine işaret etmektedir. Flagellanın kaybı, biyofilm oluşumunu artırır. Fonksiyonel olmayan flagellalı mutantların (*motA*) ya da kemotaktik hareket yapamayan mutantların (*cheZ*) fonksiyonel flagellalı doğal tiplere kıyasla daha az biyofilm oluşturduğu bilinmektedir. Küçük düzenleyici bir RNA olan CsrC, *Salmonella*'nın hareketlilik ile ilgili genlerini düzenler. CsrC post-translasyonel regülasyon sisteminin bir parçası olup SPI-1 üzerindeki virülens genlerinin regülasyonu ile ilgilidir (Fortune vd. 2006, Teplitski vd. 2006). *S. Typhimurium*'da SirA'nın flagellar genler üzerinde dolaylı bir etkisi vardır ve bu etki CsrA'nın antagonistiği olan CsrB'nin aktivasyonu ile ilişkilidir (Lawhon vd. 2003, Teplitski vd. 2003). CsrC'nin fonksiyonu, CsrB'ye benzer ve CsrC, *flhDC*'nin ifadesini baskılayarak biyofilm oluşumuna katkıda bulunur. *csrB/csrC* ikili mutantları, flhDC fenotipinin ifadesini artırarak biyofilm miktarını artırır. Bu sonuçlar *sirA/flhD* ya da *flhC/sirA* ikili mutantlarında *flhDC* fenotipinden ziyade, sirA fenotipinin görülmesi sonucunu tutarlı kılmaktadır. CsrC'nin SirA-bağımlı flagellar genlerin regülasyonuna ve biyofilm oluşumuna nasıl katkı sağladığını belirleyebilmek için flagellar *fliA-luxCDABE* füzyonu içeren doğal tip suşlar ve *sirA*, *csrB*, *csrC* ve *csrB/csrC* ikili mutantları kullanılmıştır. Füzyonun ifadesinin ölçümü, bakterilerin LB agar yüzeyleri üzerinde gelişimleri süresince yapılmış ve sıvı besiyerinde SirA'nın flagellar genler üzerindeki marjinal etkileri tespit edilmiştir (Goodier ve Ahmer 2001), (Şekil 2.9 Teplitski vd. 2006).

Birçok *Salmonella* serovaryetesi hücre dışı matris bileşenleri olan; selüloz ve kıvrımlı fimbriyalarla karakterize edilmiş çok hücreli bir davranış durumu sergilemektedir (Romling, 2005). Çok hücreli davranış biçimi, CsgD (ince agregatif alt ünite geni) tarafından pozitif şekilde regüle edilir. *Salmonella*'da biyofilm bileşeni olarak önemli bir rol sergileyen selüloz, bakteriyel selüloz sentez operonu olan *bcsABZC* ve selüloz biyosentezinin aktivatörü olan *adrA* operonunun ifadeleriyle düzenlenir. CsgD, selüloz biyosentezini dolaylı bir şekilde *adrA* aracılığıyla yapar. c-di-GMP'nin üretiminin uyarılması *adrA* tarafından gerçekleştirilir ve c-di-GMP *bcsB* alt ünitesine bağlanıp,

selüloz üretimini başlatır. Selüloz kompleksi *bcsA* ve *bcsB* tarafından oluşturulurken *bcsZ* selülaz vazifesi görür. CsgD kıvrımlı fimbriyanın sentezine de katılır ve promotora bağlanarak *csgBAC* operonunun transkripsiyonunu başlatır (Şekil 2.10) (Solano vd. 2002, Romling 2005).



Şekil 2.9 Doğal tip ve isogenik mutant *Salmonella* Typhimurium suşlarında biyofilm oluşumu (Teplitski vd. 2006)

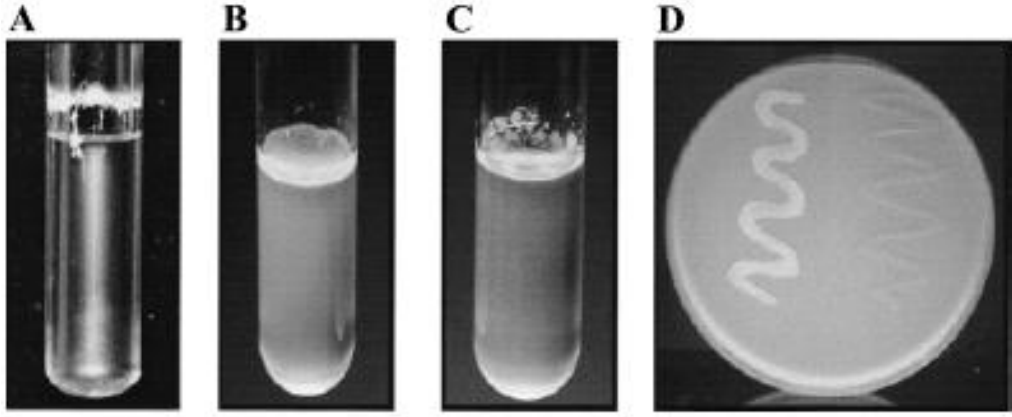


Şekil 2.10 Selüloz biyosentezi, CsgD regülasyonu (Romling 2005)

Salmonella'da selüloz biyosentezi ve ince agregatif fimbriya (Tafi) sentezi sıklıkla birlikte olur. Bu ince agregatif fimriyalar selülozun oluşturduğu elastik ve stabil bağların aksine hücreler arasında katı ve kırılğan bağlar kurar. Biyofilm yapılarında ince agregatif fimbriya ve selüloz bulunduran bakteriler, sıvı kültürlerde sıvı-hava arafazının hemen altında, çözülmesi son derece güç biyofilmler oluştururlar. Ekzopolisakkarit olarak yalnızca selüloz sentezleyen bakterilerin sıvı-hava arafazındaki biyofilmleri gevşek bir yapı gösterir. Bu iki bileşenle birlikte bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerde inert hidrofobik bir matriks meydana gelir. Bu durum *Salmonella*'nın tek hücreli yaşam formundan farklı olarak çok hücreli bir yaşam formu sergilemesine olanak sağlar (Romling 2002).

S. Enteritidis'te selülozün biyofilm oluşumundaki kritik rolünün anlaşılması için önemli çalışmalar yapılmıştır. *S. Enteritidis* farklı koşullar altında ve farklı yapıya sahip materyaller üzerinde biyofilm oluşturabilen gıda kaynaklı önemli bir enterik patojendir

(Korber vd. 1997, Austin vd. 1998, Solano vd. 1998, Bradshaw ve Marsh 1999). *S. Enteritidis* izolatları, *S. Typhimurium*'da da gösterildiği gibi çok hücreli ve agregatif bir davranış sergileyebilirler. Bu davranış biçimini karakterize eden koloni morfoloji "rdar"dır (kırmızı, kuru ve pürüzlü). Bu morfoloji ilk olarak *Salmonella Typhimurium*'da tanımlanmıştır. Söz konusu morfoloji içeren suşlar, sıvı besiyerlerinde inkübe edildiklerinde sıvı-hava arafazında son derece sıkı bir "pelikül" yapısı oluştururlar. İnce agregatif fimbriyanın alt ünitesini (AgfA) kodlayan genin baskılanmasıyla bu suşlarda elde edilen koloni morfoloji "pdar" olmaktadır (pembe, kuru ve pürüzlü) (Romling vd. 1998, Romling ve Rohde 1999). pdar kolonileri içerisindeki bakteriler elastik bir yapı oluşturarak bir araya gelirler. Ancak sıvı kültürlerde pelikül yapısı oluşturmazlar. Bu sonuçlar ince agregatif fimbriyanın *Salmonella* suşlarının oluşturdukları biyofilmlerde ne kadar önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Diğer yandan insersiyonel mutasyonla inaktif hale getirilen ve muhtemelen bir transmembran proteini kodlayan *adrA* geninde oluşan bir defekt taşıyan suşların oluşturduğu koloniler "rdar" morfoloji yerine "bdar" (kahverengi, kuru ve pürüzlü) morfoloji göstermektedir. Bu durumda görevi tam olarak anlaşılamayan ekstraselüler bileşenin yokluğu sıvı kültürlerde görülen pelikül oluşumlarının çok daha kırılabilir olmasına yol açmaktadır (Romling vd. 2000). Çok hücreli davranış durumuyla ilişkili olan ve durağan gelişme fazında ifade olunan ince agregatif fimbriya, *agfD* tarafından pozitif şekilde regüle edilmektedir. *agfD*'nin delesyonu kırmızı, buruşuk, kuru ve yayılan bir koloni morfoloji olan "rdar"ı beyaz ve düz bir koloni morfoloji olan "saw" morfolojisine çevirir. İlave olarak sigma faktör *rpoS* ve OmpR'nin, *agf* operonlarının transkripsiyonu için gerekli olduğu anlaşılmıştır (Romling vd. 1998). *rpoS* aynı zamanda fonksiyonu tam olarak anlaşılamayan bir ekstraselüler maddenin üretimiyle de ilişkilidir (Şekil 2.11) (Romling vd.2000).



Şekil 2.11 Doğal *S. Enteritidis* suşlarında biyofilm oluşum fenotipleri (Solano vd. 2002)

a. 37 °C’de 4 saatlik çalkalamalı inkübasyon sonunda ATM besiyerinde cam tüp duvarında oluşan biyofilm **b.** 96 saatlik oda sıcaklığındaki inkübasyon sonunda sıvı-hava ara fazında oluşan yüzen haldeki pelikül oluşumu **c.** Doğal tip suşların oluşturduğu kırılğan pelikül oluşumu **d.** Solda kalkoflorlu besiyerinde biyofilm oluşumu, sağda aynı koşullarda biyofilm oluşturmayan suşun görünümü

S. Typhimurium ile ilgili biyofilm çalışmalarının çoğu geleneksel bir metot olan rasgele transpozon insersiyon kütüphaneleri oluşturularak elde edilen mutantların susturulmuş genlerinden yola çıkılarak mikrotitre plak deneylerinde mutantların biyofilm oluşturma ve tutunma kapasitelerinin incelenmesine dayanır. Bu yaklaşım *Salmonella*’da olduğu gibi birçok Gram negatif bakterinin biyofilm çalışmalarında da başarıyla sonuç vermiştir. Gram negatif bakterilerde yürütülen mutasyonel çalışmalarla elde edilen bu veriler, biyofilm oluşumunun flagellar hareketle, seğirme hareketiyle, ekzopolisakkaritlerin senteziyle, sayı algılama sistemiyle, dış membran adhezinleriyle ve gen ifadelerinin global regülatörleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir (O’Toole vd. 2000).

Solano vd. (2002) kanamisin dirençli-MudJ transpozonunu kullanarak yaptıkları transpozon insersiyon mutasyonu çalışmalarıyla elde ettikleri *S. Enteritidis* mutantlarını biyofilm oluşturma kapasiteleri bakımından gruplara ayırmışlardır. Grup I mutantlar, LB ve ATM sıvı besiyerlerinde biyofilm oluşturma yeteneğinden tam anlamıyla yoksundur (“saw” morfotipi). Grup II mutantlar, LB besiyerinde hem biyofilm hem de ince pelikül yapısı oluşturmaktan yoksundur; ancak ATM besiyerinde biyofilm

oluşturabilirler (Bu mutantlar Kongo kırmızısı agar üzerinde çeşitli morfotipler sergilerler: rdar, saw; yeni karakterize edilmiş düz renkli koloni morfotipi). Grup III mutantlar LB sıvı besiyerinde kırılğan bir pelikül oluşturabilirken (bdar morfotipi), ATM besiyerinde biyofilm oluşturamazlar. Bu çalışmaya ek olarak yapılan mikrotitre plak çalışmalarında *rpoS*, *rffG* ve *barA* mutantları dışında grup I ve II mutantlar mikrotitre kuyuları içerisinde biyofilm oluşturamamışlardır. Grup III mutantlarsa, doğal tipe kıyasla çok daha zayıf bir tutunma kapasitesi sergilemişlerdir.

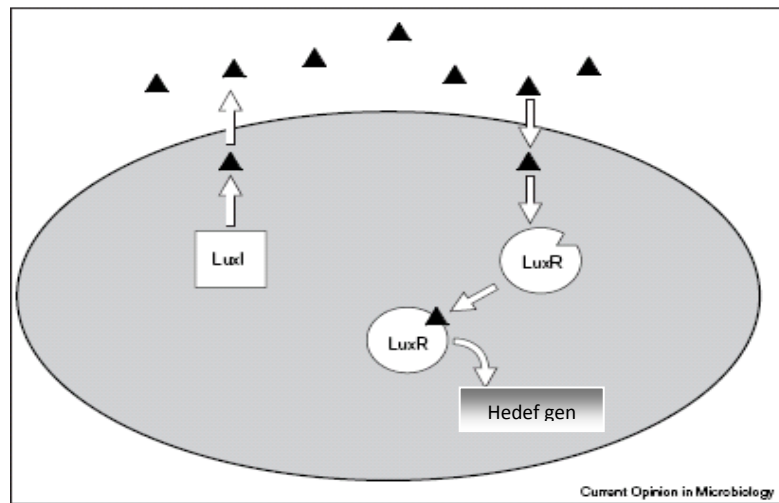
S. Enteritidis'te polisakkarit, lipopolisakkarit, enterobakteriyel yaygın antijen, adhezinler, amino asit ve pirimidin biyosentezi, enerji metabolizması, regülasyon fonksiyonları ve hareketlilikle ilgili çeşitli yollarda meydana gelebilecek bir mutasyon biyofilm ya da pelikül oluşturma kapasitesini etkilemektedir (Solano vd. 2002).

Biyofilmlerde hücresel yoğunluk artışına bağlı olarak hücrelerin sinyalizasyonunda görev alan ve hormon benzeri bileşenleri düzenleyen yeter sayı algılama mekanizması, biyofilm süreci için son derece önemlidir. Bakteriler, bu sinyal moleküllerini komünitenin gen ifadelerini düzenlemek için üretir (Miller vd. 2001). Yeter sayı algılama sistemi ilk kez *Vibrio fischeri*'de keşfedilmiştir. Bu bakteri bir lüsiferaz enzim kompleksi üretmektedir ve yüksek hücresel yoğunlukta bu kompleks yeter sayı algılama mekanizmasıyla düzenlenerek, bakteri komünitesinin biyoluminesans özellik göstermesine neden olmaktadır (Schauder vd. 2001). Yeter sayı algılama mekanizmasının birçok bakteriyel türde biyofilm gelişimiyle ilgili olduğu bilinmektedir. *Salmonella*'da üç tür sayı algılama mekanizması tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar: N-asilhomoserin laktonlar (AHL), otoindükleyici-2 (AI-2) ve otoindükleyici-3 (AI-3) sistemleridir (Surette vd. 1998, Michael vd. 2001, Walters vd. 2006). *Salmonella*'da en iyi tanımlanmış sayı algılama mekanizmaları, AI-2 ve AHL sistemleridir.

Otoindükleyici-2 (AI-2) yeter sayı algılama sistemi, *luxS* genini içeren bir sistemdir. Bu gen, *Salmonella*'yı da kapsayacak şekilde birçok bakteride tanımlanmıştır (Surette vd.

1998). *luxS* geni AI-2 üretimi için sorumlu olan proteini kodlar (Surette vd. 1999). Bu sistemin tanımlandığı tüm bakteriler AI-2 üretiminden sorumlu *luxS* genini ve AI-2'nin üretimini elimine eden genleri bulundurmaktadır (Xavier vd. 2003). Bu sayı algılama sisteminde S-ribozil-homosistein, homosisteine ve 4,5-dihidroksi-2,3-pentandiona (DPD) çevrilir ve reaksiyon LuxS proteini tarafından katalize edilir. Stabil olmayan DPD molekülü su ile reaksiyona girerek kendiliğinden şekil değişikliği geçirir ve böylelikle farklı AI-2 sinyal molekülleri oluşturulur (Schauder vd. 2001). LuxS/AI-2 sistemi çeşitli süreçlerle ilgili genlerin düzenlenmesinde sorumludur (örneğin; virülens, hareket ve biyofilm oluşumu). *Salmonella*'da AI-2 sistemi tarafından regüle edilen genler yalnızca *lsr* operonunu (ABC taşıyıcı sistemi) düzenleyen genlerdir. Bu sistem AI-2'nin alınmasında bir rol oynar (Taga vd. 2003, De Keersmaecker vd. 2006). Daha güncel bir çalışma AI-2'nin *Salmonella Typhimurium*'da daha çok rol üstlendiğini göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen *luxS* mutantlarıyla AI-2'nin *Salmonella Typhimurium*'da birçok hücresel sürece dahil olduğu gösterilmiştir (Soni vd. 2008).

İyi tanımlanan diğer bir yeter sayı algılama sistemi N-asilhomoserin lakton sistemidir (AHL). Bu sayı algılama sistemi LuxI/LuxR sistemi tarafından regüle edilir. N-asilhomoserin laktonlar LuxI-tip proteini tarafından sentezlenir ve LuxR-tip proteini tarafından saptanır (Fuqua vd. 1994, Beeston ve Fuqua 2001, Taga vd. 2003) (Şekil 2.12) (Bassler 1999).



Şekil 2.12 LuxI/LuxR sistemi (Bassler 1999)

AHL'ler bakteriyel membranlardan serbestçe geçerler ve bakterilerin yüksek hücre sel yoğunluklarda bir araya gelmelerini sağlarlar. *Salmonella*'nın SdiA adı verilen bir LuxR homologuna sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle SdiA, diğer türlerden salınan AHL'leri saptamak için kullanır. *Salmonella*, LuxI sistemine homolog bir sistem bulundurmadığından AHL üretmez (Ahmer vd. 1998, Michael vd. 2001, Smith vd. 2003, Ahmer 2004).

Yeter sayı algılama mekanizması ve hücre dışı matriks bileşenlerinin üretimi arasında da bir ilişki söz konusudur. Biyofilm oluşumunda, *P. aeruginosa*'daki yeter sayı algılama mekanizmalarıyla ilgili yürütülen çalışmalar, hücre dışı matriks yapısının tesisi ve hücreler arası sinyalizasyon arasında ilişki olduğuyla ilgili kanıtlar sağlar. Biyofilm oluşumunun kalınlığının ve şeklinin tesisinde N-(3-oksododekanoil)-L-homoserinin etkileri matrikste önemli değişikliklere sebep olmaktadır. Yeter sayı algılama etkisiyle sentezlenen rhamnolipid, biyofilm olgunlaşması boyunca su kanallarını açık tutarak biyofilm şeklinin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Branda 2005).

V. cholerae'da biyofilm ve sayı algılama arasındaki ilişki daha iyi anlaşılmıştır. Bu bakteride önemli hücre dışı polisakkarit üretimiyle ilişkili sistem VPS'dir (*vps* adı verilen genlerce bu polisakkaritin üretimi kontrol edildiği için). VPS'nin negatif regülasyonu *hapR* geni tarafından düzenlenir. *hapR* mutantları rugoz koloniler ve dar su kanallı hareketli, kalın biyofilmler oluşturur. *hapR*, *aphA* (bir virülens negatif regülatörü) ifadesini inhibe eden bir transkripsiyon faktörü kodlar ve bu faktör *hapA*'nın (HapA hemaglutininin aktivitesi gösteren bir metalloproteazdır) transkripsiyonunu başlatır. *hapA* ifadesi düşük hücre sel yoğunlukta aktif olan LuxA ile baskılanır. LuxA aktivitesi en az iki tane yeter sayı algılama sinyali tarafından kontrol edilir; fakat yalnızca asil homoserin lakton CAI-1 (kolera otoindükleyici -1) biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Branda vd. 2005).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriler

Çalışmada kullanılan Türkiye gıda kaynaklı *Salmonella* suşları, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan temin edildi. Çalışılan toplam suş sayısı serotiplendirmesi yapılmış DMC kodlu (99 adet) ve IS kodlu (41 adet) olmak üzere toplam 140 adettir (Çizelge 3.1-3.2). *Salmonella* suşları LB broth ortamında 37 °C’de 18 saat süreyle geliştirildi ve % 60 gliserol içeren LB broth besiyeri ile 1:1 (hacim/hacim) oranında karıştırılarak 1,5 mL’lik steril mikrofuj tüplerinde -20 °C’de saklandı.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan DMC kodlu serotiplendirmesi yapılmış *Salmonella* suşları

Suş Kodu	Suş Serovaryeteleri
DMC 1	<i>S. Group C1</i>
DMC 2	<i>S. Group C1</i>
DMC 3	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 4	<i>S. Typhimurium</i>
DMC 5	<i>S. Virchow</i>
DMC 6	<i>S. Virchow</i>
DMC 7	<i>S. Infantis</i>
DMC 8	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 9	<i>S. Virchow</i>
DMC 10	<i>S. Virchow</i>
DMC 11	<i>S. Virchow</i>
DMC 12	<i>S. Infantis</i>

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan DMC kodlu serotiplendirmesi yapılmış *Salmonella* suşları (devam)

Suş Kodu	Suş Serovaryeteleri
DMC 13	<i>S. subsp. Roughform</i>
DMC 14	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 15	<i>S. Nchanga</i>
DMC 16	<i>S. Virchow</i>
DMC 17	<i>S. Virchow</i>
DMC 18	<i>S. Virchow</i>
DMC 19	<i>S. Virchow</i>
DMC 20	<i>S. Infantis</i>
DMC 22	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 23	<i>S. Infantis</i>
DMC 24	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 25	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 26	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 27	<i>S. Group C1</i>
DMC 28	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 29	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 30	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 31	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 32	<i>S. Virchow</i>
DMC 33	<i>S. Virchow</i>
DMC 34	<i>S. Kentucky</i>
DMC 35	<i>S. Kentucky</i>
DMC 36	<i>S. Corvallis</i>
DMC 37	<i>S. Group C1</i>
DMC 38	<i>S. Group C1</i>
DMC 39	<i>S. Thompson</i>
DMC 40	<i>S. Infantis</i>

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan DMC kodlu serotiplendirmesi yapılmış *Salmonella* suşları (devam)

Suş Kodu	Suş Serovaryeteleri
DMC 41	<i>S. Infantis</i>
DMC 42	<i>S. Virchow</i>
DMC 43	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 44	<i>S. Thompson</i>
DMC 45	<i>S. Thompson</i>
DMC 46	<i>S. Group C1</i>
DMC 47	<i>S. Thompson</i>
DMC 48	<i>S. Thompson</i>
DMC 49	<i>S. Group C1</i>
DMC 50	<i>S. Group C1</i>
DMC 51	<i>S. Thompson</i>
DMC 52	<i>S. Kentucky</i>
DMC 53	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 54	<i>S. subsp. Rauform</i>
DMC 55	<i>S. Senftenberg</i>
DMC 56	<i>S. Kentucky</i>
DMC 57	<i>S. Infantis</i>
DMC 58	<i>S. Infantis</i>
DMC 59	<i>S. Agona</i>
DMC 60	<i>S. Agona</i>
DMC 61	<i>S. Agona</i>
DMC 62	<i>S. Agona</i>
DMC 63	<i>S. Rauform</i>
DMC 64	<i>S. Agona</i>
DMC 65	<i>S. Kentucky</i>
DMC 66	<i>S. Telaviv</i>
DMC 67	<i>S. Telaviv</i>
DMC 68	<i>S. Virchow</i>

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan DMC kodlu serotiplendirmesi yapılmış *Salmonella* suşları (devam)

Suş Kodu	Suş Serovaryeteleri
DMC 69	<i>S. Virchow</i>
DMC 70	<i>S. Infantis</i>
DMC 71	<i>S. Infantis</i>
DMC 72	<i>S. Kentucky</i>
DMC 73	<i>S. Kentucky</i>
DMC 74	<i>S. Kentucky</i>
DMC 75	<i>S. Infantis</i>
DMC 76	<i>S. Infantis</i>
DMC 77	<i>S. Infantis</i>
DMC 78	<i>S. Bispebjerg</i>
DMC 79	<i>S. Kentucky</i>
DMC 80	<i>S. Kentucky</i>
DMC 81	<i>S. Montevideo</i>
DMC 82	<i>S. Montevideo</i>
DMC 83	<i>S. Virchow</i>
DMC 84	<i>S. Virchow</i>
DMC 85	<i>S. Kentucky</i>
DMC 86	<i>S. Corvallis</i>
DMC 87	<i>S. Corvallis</i>
DMC 88	<i>S. Montevideo</i>
DMC 89	<i>S. Montevideo</i>
DMC 90	<i>S. Anatum</i>
DMC 91	<i>S. Anatum</i>
DMC 92	<i>S. Anatum</i>
DMC 93	<i>S. Salford</i>
DMC 94	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 95	<i>S. Typhimurium</i>
DMC 96	<i>S. Enteritidis</i>

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan DMC kodlu serotiplendirmesi yapılmış *Salmonella* suşları (devam)

Suş Kodu	Suş Serovaryeteleri
DMC 97	<i>S. subsp. Rauform</i>
DMC 98	<i>S. Enteritidis</i>
DMC 99	<i>S. Nchanga</i>
DMC 100	<i>S. Corvallis</i>

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan IS kodlu, serotiplendirmesi yapılmamış *Salmonella* suşları

Suş Kodu	Suş Cinsi
IS-2	<i>Salmonella</i> spp.
IS-4	<i>Salmonella</i> spp.
IS-6	<i>Salmonella</i> spp.
IS-20	<i>Salmonella</i> spp.
IS-23	<i>Salmonella</i> spp.
IS-46	<i>Salmonella</i> spp.
IS-52	<i>Salmonella</i> spp.
IS-53	<i>Salmonella</i> spp.
IS-58	<i>Salmonella</i> spp.
IS-63	<i>Salmonella</i> spp.
IS-64	<i>Salmonella</i> spp.
IS-69	<i>Salmonella</i> spp.
IS-72	<i>Salmonella</i> spp.
IS-73	<i>Salmonella</i> spp.
IS-80	<i>Salmonella</i> spp.
IS-81	<i>Salmonella</i> spp.
IS-83	<i>Salmonella</i> spp.
IS-84	<i>Salmonella</i> spp.
IS-89	<i>Salmonella</i> spp.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan IS kodlu, serotiplendirmesi yapılmamış *Salmonella* suşları (devam)

Suş Kodu	Suş Cinsi
IS-91	<i>Salmonella</i> spp.
IS-96	<i>Salmonella</i> spp.
IS-97	<i>Salmonella</i> spp.
IS-98	<i>Salmonella</i> spp.
IS-100	<i>Salmonella</i> spp.
IS-101	<i>Salmonella</i> spp.
IS-104	<i>Salmonella</i> spp.
IS-107	<i>Salmonella</i> spp.
IS-112	<i>Salmonella</i> spp.
IS-117	<i>Salmonella</i> spp.
IS-124	<i>Salmonella</i> spp.
IS-128	<i>Salmonella</i> spp.
IS-134	<i>Salmonella</i> spp.
IS-135	<i>Salmonella</i> spp.
IS-137	<i>Salmonella</i> spp.
IS-140	<i>Salmonella</i> spp.
IS-141	<i>Salmonella</i> spp.
IS-148	<i>Salmonella</i> spp.
IS-162	<i>Salmonella</i> spp.
IS-163	<i>Salmonella</i> spp.
IS-174	<i>Salmonella</i> spp.
IS-177	<i>Salmonella</i> spp.

3.1.2 Besiyerleri

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

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

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

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

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

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

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

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

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlanır. Çözülen içeriğe 0,04 gram Kongo kırmızısı ilave edilir. pH ayarı yapıp 15 gram agar ilavesinden sonra besiyeri 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Katı besiyerleri 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra petrilere dökülür.

Kalkoflor İçeren (50 µg/mL) Luria Bertani (LB) Agar ^{wo} NaCl (NaCl'siz)

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

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2 'ye ayarlanır. Çözülen içeriğe 0,04 gram kalkoflor (fluorescent brightner) ilave edilir. pH ayarı yapıp 15 gram agar ilavesinden sonra besiyeri 121 °C'de 15 dakika steril edilir. Katı besiyerleri 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra petrilere dökülür. Petriler karanlık bir ortamda 4 °C'de muhafaza edilir.

3.1.3 Çözeltiler

PBS (Fosfat Salin Tamponu)	g/L
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Sterilizasyon işlemi 121 °C'de 15 dk süre ile yapılır.

SF (Serum Fizyolojik)	g/L
NaCl	8,5 g
dH ₂ O	1000 mL

Alkol/Aseton Çözeltisi	100 mL
Saf etanol	70 mL
Aseton	30 mL

Glasiyel asetik asit çözeltisi	100 mL
% 33'lük Glasiyel asetik asit	100 mL

CTAB/NaCl	g/100mL
NaCl	4,1 g
CTAB	10 g
dH ₂ O	100 mL

NaCl 80 mL destile su içerisinde çözülür. 10 g CTAB yavaş yavaş eklenir. CTAB'ın çözünmesi için çözelti aralıklarla 65 °C'ye kadar ısıtılır. Son aşamada toplam hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Tris/HCl (0.5 M EDTA pH:8)	g/L
Tris	1,21 g
EDTA	0,37 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. pH 7.0±0.02 (Sterilizasyondan önce) ayarlanır. Sterilizasyon işlemi 121 °C'de 15 dk süre ile yapılır.

% 10'luk SDS Çözeltisi	g/100mL
SDS	10 g
dH ₂ O	100 mL

DNA Jel Yükleme Tampon Çözeltisi	g/100mL
Bromfenol mavisi	0.25 mL
Sakkaroz	40 g
dH ₂ O	100 mL

Fenol/Kloroform/İzoamil Alkol Çözeltisi

Fenol	25 mL
Kloroform	24 mL
İzoamil alkol	1 mL

Kloroform/ İzoamil Alkol Çözeltisi

Kloroform	24 mL
İzoamil Alkol	1 mL

3.1.4 Primerler

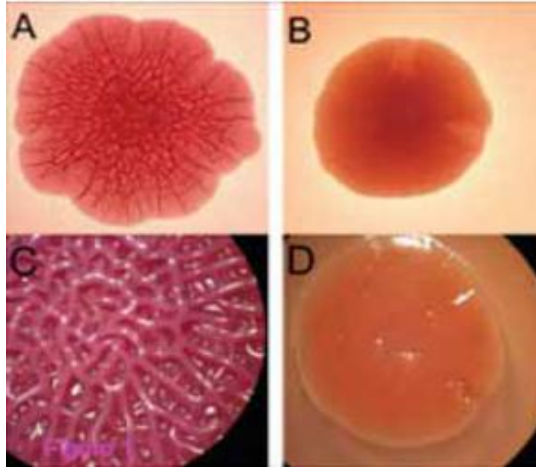
Çalışmada RAPD-PZR reaksiyonları için P1254 (5'-CCG CAG CCA A-3', T_a/t_e: 35 °C/60 sn) primeri kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

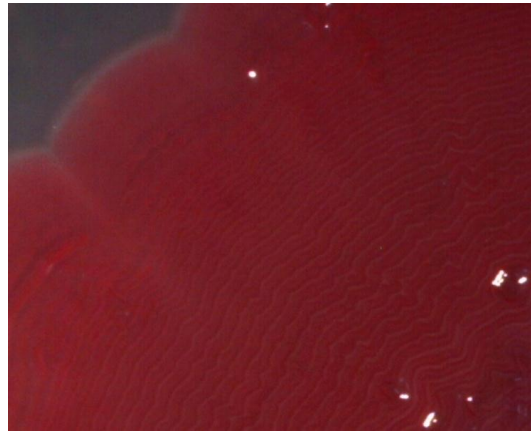
3.2.1 Kongo kırmızısı içeren LB agar besiyerlerinde *Salmonella* suşlarının biyofilm morfoloğlarının belirlenmesi

DMC (n=99) ve IS (n=41) kodlu 140 adet suş -20 °C stoğundan alınarak 5'er mL'lik LB broth besiyerlerine % 1 inokülasyon oranıyla aktarıldı ve bir gece (18 saat) çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dakika) 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra aktif kültürlerden % 1 oranında alınan inokülumlar 5'er mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarına (LB^{wo}/NaCl; baktotripton 10 g/L, maya özütü 5 g/L) aktarıldı ve suşlar 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (Römling vd. 1998). İnkübasyondan sonra daha önceden hazırlanmış, biyofilm matriksinin bileşenleri için indikatör özellik gösteren Kongo kırmızısını (40 µg/mL) içeren NaCl'siz LB agar besiyerlerine aktif kültürlerden damlatıldı (5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50

μL). Petriler daha sonra 20 °C’de en az 8 gün süreyle inkübasyona bırakıldı (Römling ve Rohde 1999). Tüm petriler stereo mikroskobunda (Leica, Germany) ve görsel olarak incelendi. Çalışma 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Suşların içerdiği morfotipler: biyofilmin matriksinde kıvrımlı fimbriya ve selüloz bulunduran rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü), yalnızca kıvrımlı fimbriya bulunduran bdar (kahverengi, kuru ve pürüzlü), yalnızca selüloz bulunduran pdar (pembe, kuru ve pürüzlü) ve her ikisini de bulundurmeyen saw (düz ve ıslak) olmak üzere kategorize edildi (Şekil 3.1) (Vestby vd. 2009), (Şekil 3.2).



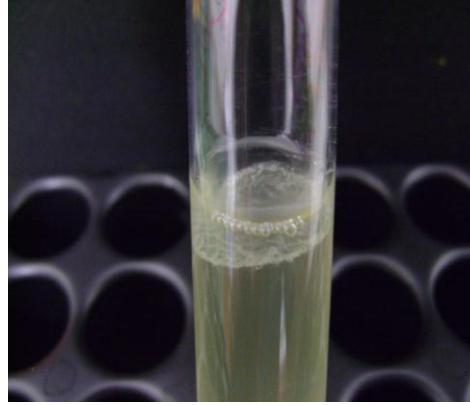
Şekil 3.1 *Salmonella*'da rdar (A ve C) ve bdar (B ve D) morfotipleri (Vestby vd. 2009)



Şekil 3.2 *Salmonella*'da pdar morfotipi

3.2.2 Sıvı besiyerlerinde pelikül oluşumu

Çalışılan tüm suşlar sıvı besiyerlerinde sıvı-hava ara fazında pelikül oluşturmalarına göre incelendi. Suşlar 5 mL'lik NaCl 'siz LB broth (LB broth^{wo}/NaCl) besiyerlerinde bir gece boyunca 37 °C'de çalkalamalı koşullarda geliştirildi. Sıvı-hava ara fazında pelikül oluşumlarının varlığını gösterebilmek için 4,5 mL NaCl'siz LB broth (LB^{wo}/NaCl broth) besiyerlerine bir gecelik aktif kültürlerden 0,5 mL inoküle edildi ve test tüpleri 20 °C'de statik koşullarda 8 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Suşlar her gün pelikül oluşturup oluşturmamalarına göre incelendi (Solano vd. 2002) (Şekil 3.3) Gözlemler aynı zamanda besiyerindeki turbidite değişimine, sıvı-hava ara fazında halka yapısının oluşumuna ve tüpün tabanındaki peletin durumuna göre de yapıldı (Römling vd. 2000).



Şekil 3.3 Sıvı besiyerinde sıvı-hava ara fazında gözlemlenen pelikül formasyonu

3.2.3 Kalkoflor bağlanma uygulaması

Çalışılan suşlar selüloz indikatörü olan kalkofloru içeren (fluorescent brightner 28, Sigma-Aldrich, China, 200 µg/L) NaCl'siz LB agar besiyerlerinde geliştirildi. Petriler 20 °C'de 8 gün süresince inkübasyona bırakıldı ve suşlar bir hücre dışı matriks bileşeni olan selülozu üreten üretenlerine göre 366 nm UV ışık altında değerlendirmeye tabi tutulup fotoğraflandı (Kodak Gel Logic 200 Imaging System). Çalışma 2 paralel ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. 366 nm UV ışık altında floresan özellik gösteren

örnekler selüloz üretimi bakımından pozitif; göstermeyenlerse selüloz üretimi bakımından negatif olarak belirlendi (Vestby vd. 2009).

3.2.4 Polistiren üzerinde biyofilm oluşumunun incelenmesi

Salmonella izolatlarının polistiren üzerinde biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Woodward vd. (2000) tarafından önerilen yöntem modifiye edildi. Bu amaçla, NaCl içermeyen 5 mL'lik LB broth (LB^{wo}/NaCl) ortamlarında 37 °C'de çalkalamalı koşullarda bir gece boyunca geliştirilen aktif kültürler LB^{wo}/NaCl ile 0.2 OD düzeyine kadar seyreltildi (Shimadzu spektrophotometer, Japan) ve bu süspansiyonlardan, 100 µL LB^{wo}/NaCl içeren 96 kuyuluk mikrotitrasyon plaklarına 30 µL aktarıldı. Bakteri süspansiyonlarını içeren mikrotitrasyon plakları maksimum biyofilm üretiminin görüldüğü 2 gün süresince 20 °C'de statik olarak inkübe edildi (Vestby vd. 2009). İnkübasyon süresi bitiminde, kuyular 2 defa steril distile su ile yıkandıktan ve plaklar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 130 µL % 1'lik kristal viyole kuyulara aktarıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Daha sonra plaklar steril distile su ile 2 kez yıkandı. Kuyulara 130 µL etanol:aseton (70:30 w/w) aktarıldı. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi ve biyofilm tabakasına bağlanan boyanın çözünmesi sağlandı. Biyofilm tabakasına bağlanan boyanın çözünmesi aşamasında etanol:aseton karışımının kullanılması yanında boyayı daha iyi çözdüğü bilinen % 33'lük glasiyel asetik asit de kullanıldı (Stepanovic vd. 2000). İnkübasyon bitiminde OD₅₉₅'te çözünen kristal viyole boyası Elisa okuyucusunda (Biorad, USA) ölçüldü. Bu deneme kongo kırmızılı LB agar besiyerinde yoğun "rdar" morfoloji içerdiği saptanan suşlar için 3 paralel ve 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Biyofilm ölçümlenmesinin sonucu her üç paralelden alınan OD değerlerinin ortalamasından, kontrol (yalnızca NaCl'siz LB broth içeren kuyular) kuyularının OD değerlerinin ortalamasının çıkarılmasıyla hesaplandı.

3.2.5 Farklı NaCl konsantrasyonlarında, sıcaklık ve pH değerlerinde polistiren üzerinde biyofilm oluşumlarının ölçülmesi

Çalışılan 140 adet suş içersinden üç farklı morfotipi temsilen ve biyofilm üretme kapasiteleri yüksek suşlar seçildi. Bu suşlar, DMC 4 kodlu suş olan; *S. Typhimurium* (rdar morfotipi), DMC 12 kodlu suş olan; *S. Infantis* (bdar morfotipi), DMC 13 kodlu suş olan; *S. subsp. Rougform* (pdar morfotipi) ve standart suş olarak kullanılan; *S. Typhimurium* LT2 suşlarıdır. Biyofilm oluşturma özellikleri üzerine endüstriyel süreçlerde en yaygın kullanılan üç sıcaklık derecesi (5, 20 ve 37 °C), 4 pH değeri (4.5, 5.5, 6.5, ve 7.4) dört NaCl konsantrasyonunun (% 0.5, 1.5, 5.5, ve 10.5 NaCl) etkisi araştırıldı. Su aktivitesi değerleri belirtilen yüzde konsantrasyonlarda NaCl'nin LB broth besiyerine ilave edilmesiyle azaltıldı. pH değerleri de 1N NaOH ve 1N HCl ile besiyerlerinin sterilizasyonundan önce ayarlandı. Sıcaklığın biyofilm oluşumu üzerine etkisinin inceleneceği denemenin dışındaki denemelerde inkübasyon 20 °C'de gerçekleştirildi. Çalışılan suşlar 5 mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarımda % 1 oranında inokülasyonla bir gece geliştirildi. İnkübasyondan önceki aşamalarda, daha önce polistiren üzerinde biyofilm oluşumunun incelenmesinde belirtildiği gibi, bir gecelik aktif kültürler spektrofotometrede 0,2 OD değerine ayarlandıktan sonra bu kültürlerden 30'ar µL alınarak 100 µL uygun besiyerlerini içeren mikrotitre plak kuyularına aktarıldı. İnkübasyondan sonra ölçüm için gereken aşamalar da daha önce polistiren üzerinde biyofilm oluşumunda belirtildiği gibi tekrarlandı. 2 günlük inkübasyon süresince ölçümler 1. ve 2. günlerin sonlarında Elisa okuyucusunda OD₅₉₅'te yapıldı. Denemeler biyofilm üzerine etkisi araştırılan her değer için 2 tekrar ve 16 paralel olacak şekilde yapıldı.

3.2.6 Çelik kuponlar üzerinde farklı NaCl konsantrasyonlarının, sıcaklık ve pH değerlerinin *Salmonella*'nın biyofilm oluşumu üzerine etkileri

Çalışmada gıda işleme süreçlerinde geniş ölçüde tercih edildiği için çelik kuponlar kullanıldı. 2,5 cm-0,8 cm-0,1 cm ebatlarındaki paslanmaz çelik kuponlar (Ostim, Ankara) başlangıçta bir gece aseton içerisinde bekletildi. Asetonda bir gece bekletilen kuponlar daha sonra 30 dakika süresince deterjanlı suya daldırıldı ve bu süreç içerisinde

kupon yüzeyleri ajite edilerek yıkandı. Kuponlar, bu aşamadan sonra musluk suyunda yıkandı ve bu işlemi takiben üç kez distile suyla yıkanıp, kurumaya bırakıldı. En son olarak kuponlar 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Besiyeri olarak yine NaCl'siz LB broth kullanıldı ve bu besiyerleri 3,5 mL olacak şekilde tüplere dağıtıldı. Steril olan çelik kuponlar bu tüplere konuldu ve çelik kupon içeren tüpler 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. Farklı NaCl konsantrasyonları için (A_w) belirtilen yüzdelerde NaCl besiyerlerine ilave edildi, farklı pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.4) değerleri için ise besiyerleri 1N NaOH ve 1N HCl ile sterilizasyondan önce ayarlandı. Kuponlar üzerinde oluşan biyofilmleri parçalamak için kullanılacak cam boncuklar, 4,5 mL serum fizyolojik içeren tüplere konmadan önce ve tüplere konduktan sonra tüplerle birlikte 2 kez 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

Çalışmada daha önceki gibi, farklı morfortip içeren DMC 4, DMC 12, DMC 13 suşları ve standart suş olarak LT2 suşu kullanıldı. Suşlar, 5 mL'lik NaCl'siz LB broth ortamlarında çalkalamalı koşullarda 37 °C'de bir gece geliştirildi (yaklaşık 10^9 hücre/mL). Aktif kültürler başlangıç konsantrasyonları 10^8 hücre/mL olacak şekilde ayarlandı ve 1 mL alınan kültürler paslanmaz çelik kupon bulunduran besiyerlerine inoküle edildi. Çelik kupon içeren test tüpleri 7 gün boyunca farklı sıcaklıklarda (5, 20 ve 37 °C) statik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Farklı pH ve su aktivitesi değerlerinin biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerinin araştırılması için test tüpleri 7 gün boyunca 20 °C'de statik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol olarak yalnızca çelik kupon bulunduran test tüpleri inkübasyona bırakıldı.

7. günün sonunda paslanmaz çelik kuponlar aseptik koşullarda test tüplerinden alındı ve boş steril tüplerine aktarılıp, 5 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan kuponlar iki kez 10 mL'lik steril serum fizyolojik bulunduran tüplere gevşek tutunan bakterileri uzaklaştırmak için daldırıldı. Her daldırmadan sonra kuponlar 5 dakika kurumaya bırakıldı. Son daldırmadan sonra kuponlar 4,5 mL steril serum fizyolojik ve 5 adet cam boncuk (r:3mm) bulunduran tüplere aktarıldı. Tüpler en yüksek devirde 1 dakika boyunca karıştırıldı (IKA Genius Vortex 3, Germany).

Bakteri hücrelerini saymak için cam boncukla karıştırma aşamasından sonra test tüplerinden bir seri dilüsyon yapıldı (10 kat). Dilüsyonlardan 100'er µL alınarak LB agar bulunduran petrilere yayma ekim yapıldı. Petriler 18 saat boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra uygun sayıda koloni bulunduran petriler seçilip sayım yapıldı (Giaouris vd. 2005).

3.2.7 Genomik DNA izolasyonu

Çalışılan bakteri 5 mL LB broth ortamına % 1 oranında inoküle edildi ve 37 °C'de 200 rpm çalkalama hızında 12 saat süre ile geliştirildi. Bu süre bitiminde 1.5 mL kültür mikrofüj tüplerine alındı ve 12000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek bakteri hücreleri çöktürüldü. Üst sıvı ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra hücre çökeltisi 567 µL Tris-EDTA tampon içerisinde çözüldü. Üzerine 30 µL % 10 SDS ve 3 µL proteinaz K (20 mg/mL, Sigma Chem Co., USA) aktarılıp karıştırıldı ve 37 °C'de 1 saat tutuldu. Ortama 100 µL 5M NaCl ilave edilerek karıştırıldı. 80 µL CTAB/NaCl çözeltisinin ilavesinin ardından kesik mikropipet uçları kullanılarak beyaz partikül yapısı oluşuncaya kadar iyice karıştırılan tüpler, 65 °C'de 10 dk tutuldu. Bu ortam üzerine 0.75 mL kloroform/izoamil alkol (24/1 hacim/hacim) aktarılıp karıştırıldı. 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edilen ortamın üst fazı yeni mikrofüj tüplerine alındı. Alınan faz üzerine 0.75 mL fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1 hacim/hacim) ilave edildi ve 12000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj işleminin sonunda tüplerdeki üst sıvı yeni mikrofüj tüplerine aktarıldı ve bu sıvının üzerine hacmin 0.6'sı (~350 µL) oranında izopropanol ilave edildi. Tüpler beyaz çökelti oluşuncaya kadar öne arkaya hareket ettirilerek karıştırıldı. Daha sonra 12000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulandı. Üst sıvı döküldükten sonra çökelti üzerine 350 µL % 70 etanol eklenerek tekrar 12000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Üst sıvı dikkatli bir şekilde ortamdaki uzaklaştırıldı ve kromozomal DNA örneği oda sıcaklığında kurutuldu. Son aşamada DNA çökeltisi 100 µL TE tampon içerisinde yaklaşık 1 saat muamele edilerek çözüldü (Wilson 2001).

3.2.8 Hücre dışı DNA varlığının aranması

Biyofilm matrisi içerisinde bulunma olasılığı olan hücre dışı DNA'nın izolasyonu için genomik DNA izolasyonunda kullanılan prosedürün bazı aşamalarından yararlanıldı. NaCl'siz LB agar ortamlarında 8 gün boyunca geliştirilen biyofilmler inkübasyon sonunda steril kürdanlarla agar yüzeyinden kazınarak serum fizyolojik içeren (% 0,85) mikrofüj tüplerine aktarıldı. Daha sonra mikrofüj tüpleri en yüksek devirde karıştırıldı (IKA Genius Vortex 3, Germany). Karıştırma aşamasından sonra mikrofüj tüpleri 12000 rpm'de 2 dakika boyunca 2 kez santrifüj işlemine tabi tutuldu. Alınan üst fazlarda DNA izolasyonunda belirtildiği üzere kloroform/izoamil alkol ve fenol/kloroform/izoamil alkol çöktürmeleri yapıldı, izopropanol ilave edilen tüpler beyaz çökelti oluşuncaya kadar karıştırıldı ve 12000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi yapıldı. Üst sıvı döküldükten sonra çökelti üzerine 350 µL % 70 etanol eklenerek tekrar 12000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Üst sıvı dikkatli bir şekilde ortamdan uzaklaştırıldı ve hücre dışı DNA olması muhtemel örnekler oda sıcaklığında kurutuldu. Son aşamada DNA çökeltisi 100 µL TE tampon içerisinde yaklaşık 1 saat muamele edilerek çözüldü (Wilson 2001).

3.2.9 Mikrotitre plaklardaki biyofilmlere DNAaz I uygulanması

Bu uygulama Grande vd. (2010) tarafından önerilen yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Daha önce mikrotitre plak ölçüm yönteminde belirtildiği gibi, geliştirilen 2 günlük biyofilmlere DNAaz I enzimi uygulandı (Norgen, Canada). 2 günlük inkübasyondan sonra kuyular steril distile suyla yıkandı ve kuyulara 200 µL DNAaz I çözeltisi aktarıldı (175 µL, 20 µL enzim tamponu, 5 µL DNAaz I enzimi). Kontrol kuyularına da enzim içermeyen tampon ve distile su karışımından aktarıldı. Plaklar 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra plak kuyuları distile suyla yıkandı ve biyofilm miktarı ölçümü için daha önce belirtilen prosedür aynen uygulandı.

3.2.10 Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PZR) analizleri

RAPD-PZR analizleri için Lin vd. (1996) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Çalışmada rastgele dizayn edilmiş 10 bazlık P1254 primerinden yararlanıldı (5'-CCG CAG CCA A-3'). RAPD-PZR işlemi GeneAmp9700 Thermocycler cihazı (Applied BioSystems, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

PZR reaksiyon karışımı (tek reaksiyon için) :

Steril dH ₂ O.....	23,6 µL
10X PZR tampon -MgCl ₂ +KCl (Fermentas).....	5 µL
primer (Prizma).....	10 µL
dNTP (10mM Fermentas).....	2 µL
MgCl ₂ (25 mM Fermentas).....	7 µL
Taq DNA polimeraz (5u/ml Fermentas).....	0,4 µL
DNA.....	2 µL

PZR amplifikasyon koşulları:

94 °C4 dakika	}	4 döngü
35 °C4 dakika		
72 °C4 dakika		
94 °C30 saniye	}	30 döngü
35 °C60 saniye		
72 °C 2 dakika		
72 °C5 dakika		
4 °C ∞		

Bu işlem sonrasında; 10 µL PZR ürünü, 2 µL 6 x yükleme boyası karıştırıldı ve % 2 oranında agaroz içeren jel sistemlerinde 100 volt elektrik akımı uygulanarak 1.5 saat koşturuldu.

Elektroforez işlemi sonrasında agaroz jeller, 0.2 µg/mL etidyum bromit (Sigma Chem. Co., USA) çözeltisinde 20 dakika süre ile boyandıktan sonra 366 nm dalga boyunda UV ışık altında görüntülenerek fotoğrafları çekildi (Kodak Gel Logic 200 Imaging System).

3.2.11 İstatistik analizleri

Deney sonuçlarından elde edilen veriler, SPSS 13.0 istatistik programında değerlendirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Kongo Kırmızılı NaCl'siz LB Agar Ortamında *Salmonella* Suşlarının Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi

Bu yöntem ile *Enterobacteriaceae* ailesine dahil olan genellikle *Salmonella* ve *E. coli* gibi enterik mikroorganizmaların içerdikleri biyofilm morfotiplerinin taranması mümkündür. Yöntemde biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi için çalışılan 140 adet *Salmonella* suşu, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prokaryot Genetiği Laboratuvarı'ndan temin edilmiş olup, Avşaroğlu vd. (2007) tarafından izole edilen bu suşlardan 99 adedinin serotiplendirmesi daha önceki çalışmalarda yapılmıştır. Taskale vd. (2010) tarafından izole edilen 41 adet suş ise cins düzeyinde tanımlanmıştır. Suşların hepsi Türkiye'de satışa sunulan gıdalardan izole edilmiştir.

Tüm biyofilm çalışmalarında besiyeri olarak NaCl içermeyen LB broth ortamı kullanılmıştır. Suşların bu ortamda geliştirilmesinin nedeni, artan ozmolariteyle *Salmonella*'nın biyofilmin matriksinde önemli bir yapısal ve fonksiyonel görevi olan kıvrımlı fimbriya (curli) genlerinin transkripsiyonel düzeyde ifadelerinin engellenmesidir (Olsén vd. 1993). Çalışmada morfotip analizi için tercih edilen NaCl'siz LB agar (LB agar ^{wo}NaCl) besiyerinde aynı zamanda Coomassie brilliant blue (20 µg/mL) ve kıvrımlı fimbriyanın bağlanabildiği ve biyofilm morfotipi için indikatör bir boya özelliği gösteren Kongo kırmızısı (40 µg/mL) bulunmaktadır. NaCl'siz LB broth ortamlarında 37 °C'de çalkalamalı koşullarda bir gece boyunca geliştirilen suşlar, Kongo kırmızısı içeren NaCl'siz LB agar ortamlarına inoküle edilmiştir. İnokülasyondan sonra suşlar biyofilm oluşturmaları için 20 °C'de 8 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Römling 2005, Vestby vd. 2009). 8 günlük inkübasyon sonunda suşlar içerdikleri morfotiplere göre değerlendirilmiştir. Kongo kırmızılı agar ortamlarında *Salmonella*'nın farklı biyofilm morfotipleri oluşturabildiği saptanmıştır. Bunlar: rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü) morfotipi; hücre dışı matriks bileşenleri olarak selüloz ve kıvrımlı fimbriya üreten, bdar (kahverengi, kuru ve pürüzlü) morfotipi, hücre dışı matriks bileşenleri olarak kıvrımlı fimbriya üreten, pdar (pembe, kuru ve pürüzlü) morfotipi, hücre dışı matriks bileşeni olarak selüloz üreten morfotiplerdir

(Römling vd. 1998). Bu morfotiplere ilave olarak biyofilm üreticisi olamayan ve hücre dışı matriksinde selüloz ve kıvrımlı fimbriya bileşenlerini bulundurmayan saw (düz ve beyaz) morfotipi de tanımlanmıştır (Solano vd. 2002). Ayrıca bu morfotiplerden farklı olarak yakın zamanda hücre dışı matriksinde selüloz ve kıvrımlı fimbriya içermeyen ancak yüksek düzeyde kapsüler polisakkarit ürettiği bilinen ve biyofilm üreten yeni bir morfotip daha tanımlanmıştır. Bu morfotip SBAM (düz, kahverengi ve mukoid) morfotipi olarak adlandırılmıştır (Malcova vd. 2008). Bu çalışmada biyofilm morfotiplerine göre değerlendirilen suşların morfotip dağılımları çizelge 4.1-4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.1 *Salmonella* suşları arasında gözlemlenen morfotiplerin sayıca dağılımı

Morfotip	DMC Kodlu	IS Kodlu	Toplam
rdar	65	14	79
bdar	31	26	57
pdar	2	1	3
sbam	-	-	-
saw	-	-	-
tanımlanamayan	1	-	1
Toplam	99	41	140

Çizelge 4.2 Serotiplendirmesi yapılmış *Salmonella* suşlarının içerdiği morfortipler

Suş Kodu	Suş Serotipleri	İçerdiği Biyofilm Morfortipi
DMC 1	<i>S. Group C1</i>	rdar
DMC 2	<i>S. Group C1</i>	rdar
DMC 3	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC4	<i>S. Typhimurium</i>	rdar
DMC 5	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 6	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 7	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC 8	<i>S. Enteritidis</i>	bdar
DMC 9	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 10	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 11	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC12	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC13	<i>S. subsp.Roughform</i>	pdar
DMC 14	<i>S. Enteritidis</i>	bdar
DMC 15	<i>S.Nchanga</i>	rdar
DMC 16	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 17	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 18	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 19	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 20	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC 22	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC 23	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC 24	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC 25	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC 26	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC 27	<i>S. Group C1</i>	rdar
DMC 28	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC 29	<i>S. Enteritidis</i>	rdar

Çizelge 4.2 Serotiplendirmesi yapılmış *Salmonella* suşlarının içerdiği morfotipler (devam)

Suş Kodu	Suş Serotipleri	İçerdiği Biyofilm Morfotipi
DMC 30	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC 31	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC 32	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 33	<i>S. Virchow</i>	bdar
DMC 34	<i>S. Kentucky</i>	pdar
DMC 35	<i>S. Kentucky</i>	rdar
DMC 36	<i>S. Corvallis</i>	rdar
DMC 37	<i>S. Group C1</i>	rdar
DMC 38	<i>S. Group C1</i>	rdar
DMC 39	<i>S. Thompson</i>	rdar
DMC40	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC41	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC42	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC43	<i>S. Enteritidis</i>	bdar
DMC44	<i>S. Thompson</i>	rdar
DMC45	<i>S. Thompson</i>	rdar
DMC46	<i>S. Group C1</i>	rdar
DMC47	<i>S. Thompson</i>	rdar
DMC48	<i>S. Thompson</i>	rdar
DMC49	<i>S. Group C1</i>	rdar
DMC 50	<i>S. Group C1</i>	rdar
DMC 51	<i>S. Thompson</i>	rdar
DMC 52	<i>S. Kentucky</i>	rdar
DMC 53	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC 54	<i>S. subsp. Rauform</i>	bdar
DMC 55	<i>S. Senftenberg</i>	rdar
DMC 56	<i>S. Kentucky</i>	bdar

Çizelge 4.2 Serotiplendirmesi yapılmış *Salmonella* suşlarının içerdiği morfotipler (devam)

Suş Kodu	Suş Serotipleri	İçerdiği Biyofilm Morfotipi
DMC 57	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC 58	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC 59	<i>S. Agona</i>	bdar
DMC 60	<i>S. Agona</i>	tanımlanamayan
DMC 61	<i>S. Agona</i>	bdar
DMC 62	<i>S. Agona</i>	bdar
DMC 63	<i>S. Rauform</i>	rdar
DMC 64	<i>S. Agona</i>	bdar
DMC 65	<i>S. Kentucky</i>	rdar
DMC 66	<i>S. Telaviv</i>	bdar
DMC 67	<i>S. Telaviv</i>	bdar
DMC 68	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 69	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 70	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC 71	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC 72	<i>S. Kentucky</i>	bdar
DMC 73	<i>S. Kentucky</i>	bdar
DMC 74	<i>S. Kentucky</i>	bdar
DMC 75	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC 76	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC 77	<i>S. Infantis</i>	bdar
DMC 78	<i>S. Bispebjerg</i>	rdar
DMC 79	<i>S. Kentucky</i>	rdar
DMC 80	<i>S. Kentucky</i>	rdar
DMC 81	<i>S. Montevideo</i>	rdar
DMC 82	<i>S. Montevideo</i>	rdar
DMC 83	<i>S. Virchow</i>	rdar

Çizelge 4.2 Serotiplendirmesi yapılmış *Salmonella* suşlarının içerdiği morfotipler (devam)

Suş Kodu	Suş Serotipleri	İçerdiği Biyofilm Morfotipi
DMC 84	<i>S. Virchow</i>	rdar
DMC 85	<i>S. Kentucky</i>	rdar
DMC 86	<i>S. Corvallis</i>	rdar
DMC 87	<i>S. Corvallis</i>	rdar
DMC 88	<i>S. Montevideo</i>	bdar
DMC 89	<i>S. Montevideo</i>	rdar
DMC 90	<i>S. Anatum</i>	rdar
DMC 91	<i>S. Anatum</i>	rdar
DMC 92	<i>S. Anatum</i>	rdar
DMC 93	<i>S. Salford</i>	rdar
DMC 94	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC 95	<i>S. Typhimurium</i>	rdar
DMC 96	<i>S. Enteritidis</i>	bdar
DMC 97	<i>S. subsp. Rauform</i>	bdar
DMC 98	<i>S. Enteritidis</i>	rdar
DMC 99	<i>S. Nchanga</i>	rdar
DMC 100	<i>S. Corvallis</i>	rdar

Çizelge 4.3 Cins düzeyinde tanımlanmış *Salmonella* suşlarının içerdiği morfotipler

Suş Kodu	Suş Cinsi	İçerdiği Biyofilm Morfotipi
IS-2	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-4	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-6	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-20	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-23	<i>Salmonella</i> spp.	rdar

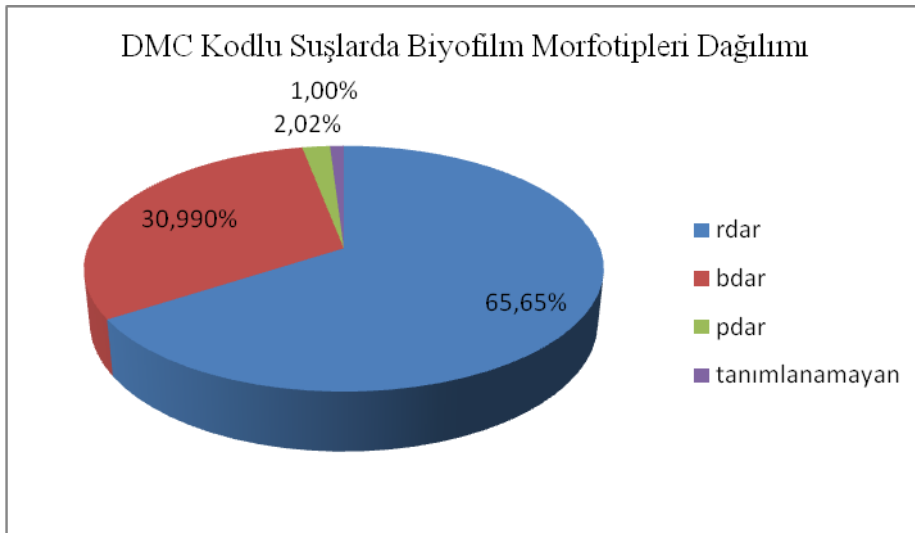
Çizelge 4.3 Cins düzeyinde tanımlanmış *Salmonella* suşlarının içerdiği morfotipler (devam)

Suş Kodu	Suş Cinsi	İçerdiği Biyofilm Morfotipi
IS-46	<i>Salmonella</i> spp.	pdar
IS-52	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-53	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-58	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-63	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-64	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-69	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-72	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-73	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-80	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-81	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-83	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-84	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-89	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-91	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-96	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-97	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-98	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-100	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-101	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-104	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-107	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-112	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-117	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-124	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-128	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-134	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-135	<i>Salmonella</i> spp.	bdar

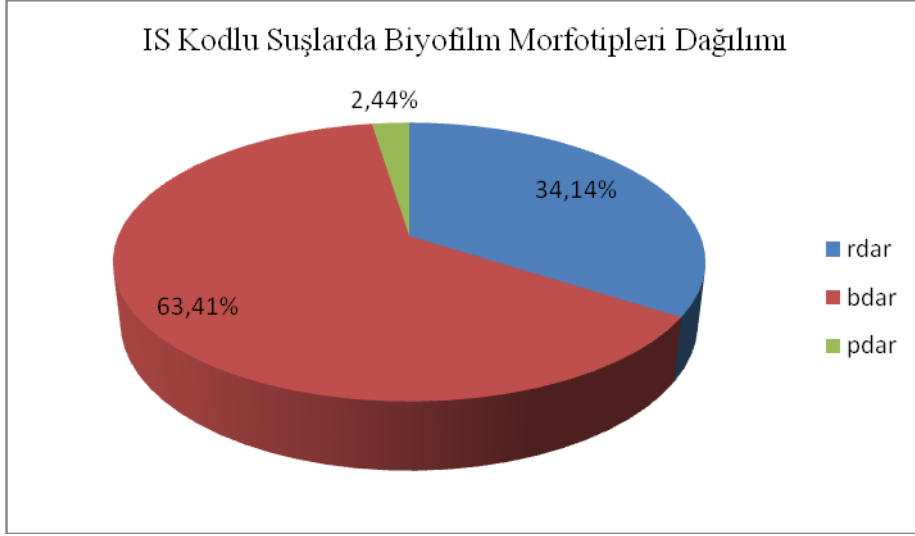
Çizelge 4.3 Cins düzeyinde tanımlanmış *Salmonella* suşlarının içerdiği morfotipler (devam)

Suş Kodu	Suş Cinsi	İçerdiği Biyofilm Morfotipi
IS-137	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-140	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-141	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-148	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-162	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-163	<i>Salmonella</i> spp.	bdar
IS-174	<i>Salmonella</i> spp.	rdar
IS-177	<i>Salmonella</i> spp.	rdar

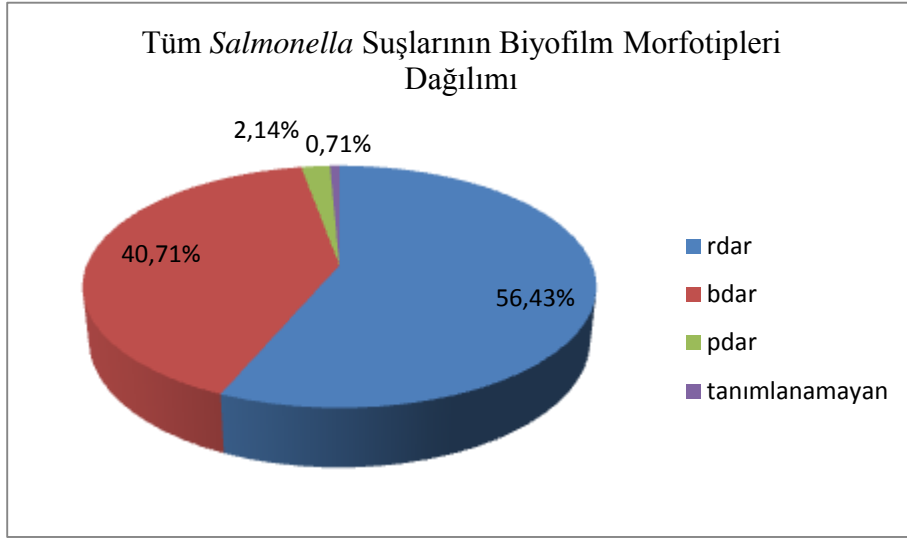
DMC kodlu suşlar arasında baskın biyofilm morfotipinin “rdar” morfotipi olduğu tespit edilmiştir (% 65,65) (Şekil 4.1). IS kodlu suşlar arasında ise baskın biyofilm morfotipinin “bdar” morfotipi olduğu saptanmıştır (% 63,41) (Şekil 4.2). Çalışmada kullanılan tüm *Salmonella* suşlarındaki morfotip dağılımının geneline bakıldığında “rdar” morfotipinin baskın morfotip olduğu görülmektedir (% 56,43) (Şekil 4.3).



Şekil 4.1 DMC kodlu suşlarda biyofilm morfotipleri dağılımları

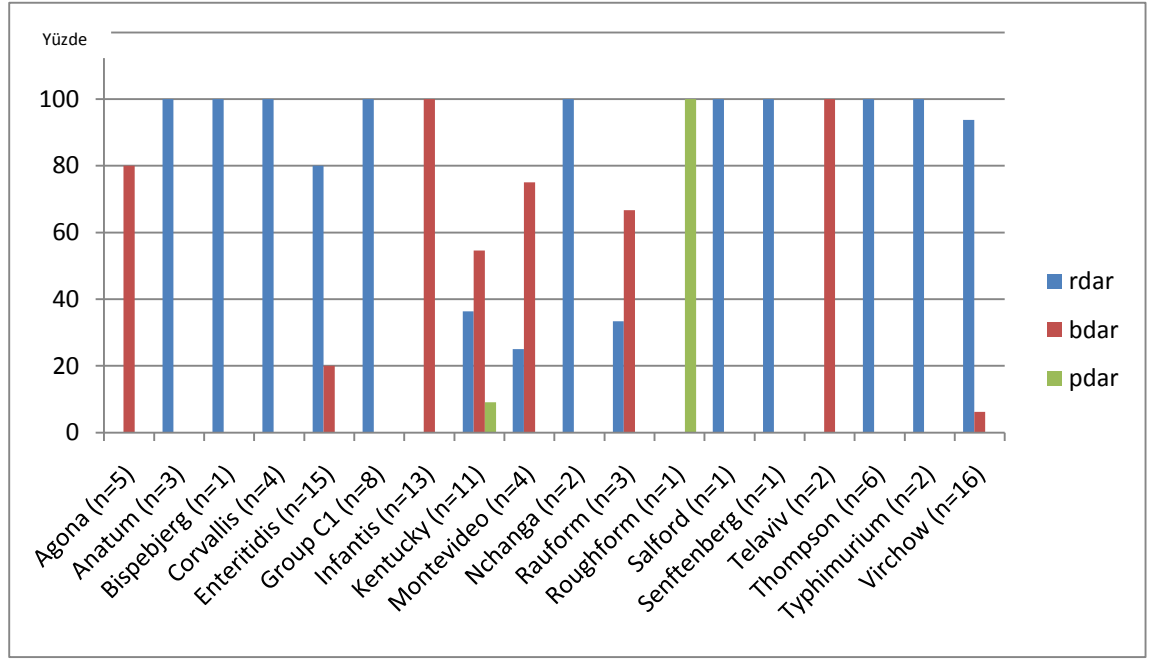


Şekil 4.2 IS kodlu suşlarda biyofilm morfotipleri dağılımı



Şekil 4.3 Tüm *Salmonella* suşlarında biyofilm morfotipleri dağılımı

Serotipleri bilinen DMC kodlu suşlarda serovaryeteler arasındaki morfolojik çeşitliliği göstermektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *Salmonella* serovaryetlerinde biyofilm morfolotipi dağılımı

Serovaryeteler arasında morfolotip çeşitliliğine bakıldığında; “rdar” morfolotipi, *S. Anatum* (% 100), *S. Bispebjerg* (% 100), *S. Corvallis* (% 100), *S. Enteritidis* (% 80), *S. Group C1* (% 100), *S. Salford* (% 100), *S. Senftenberg* (% 100), *S. Thompson* (% 100), *S. Typhimurium* (% 100), *S. Virchow* (% 93,75) serovaryetelerinin suşlarında, “Bdar” morfolotipi, *S. Agona* (% 80), *S. Infantis* (% 100), *S. Kentucky* (% 54,5), *S. Montevideo* (% 75), *S. Rauform* (% 66,6), *S. Telaviv* (% 100) serovaryetelerinin suşlarında yaygın morfolotip olarak gözlenmiştir. “Pdar” morfolotipi ise ender görülen bir morfolotip olarak tanımlanmıştır. 3 adet “pdar” morfolotipi, *S. Kentucky*, *S. Roughform* ve IS-46 kodlu *Salmonella* spp. suşlarında saptanmıştır (Şekil 4.4). Özetle çalışılan tüm suşlarda saptanan morfolotipler; “rdar”, “bdar” ve “pdar” morfolotipleridir (Şekil 4.5). “saw” ve “SBAM” morfolotipleri Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarında tespit edilmemiştir. DMC 61 kodlu *S. Agona* suşunun ise Kongo kırmızılı LB agarda gösterdiği morfolojik özellikleri bilinen hiçbir morfolotipe dahil edilememiştir (Şekil 4.6).



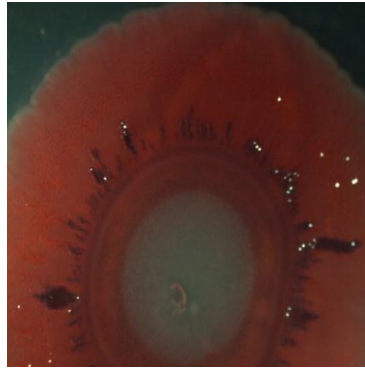
a

b

c

Şekil 4.5 *Salmonella* suşları arasında tanımlanan üç farklı biyofilm morfotipi

- a.** Rdar moroftipi (DMC4 kodlu suş, *S. Typimurium*) **b.** Pdar morfotipi (DMC13 kodlu suş, *S. Roughness*) **c.** Bdar morfotipi (DMC12 kodlu suş, *S. Infantis*)



Şekil 4.6 DMC 61 kodlu *S. Agona* suşunun Kongo kırmızılı agar ortamındaki koloni morfolojisi

Tüm *Salmonella* suşlarının biyofilm morfotiplerinin analizi yapıldıktan sonra yüksek “rdar” morfotipi içerdiği saptanan 31 adet DMC kodlu suş (DMC 1, 2, 4, 9, 10, 15, 16, 17, 25, 26, 30, 36, 37, 50, 51, 55, 65, 78, 79, 80, 84, 85, 86, 87, 89, 91, 92, 93, 95, 99, 100) ve 7 adet IS kodlu suş (IS-2, 6, 63, 64, 91, 107, 140) mikrotitre plak uygulaması ve sıvı-hava arafazında pelikül yapılarının zamana bağlı olarak oluşumlarının değerlendirilmesi için ayrıca seçilmiştir. “rdar” morfotipinin diğer morfotiplerden farklı olarak bu çalışmada seçilmesinin nedeni, bu morfotipin *Salmonella*’nın biyofilm

oluşum mekanizmasının moleküler düzeyde aydınlatılmasında model morfortip olarak tercih ediliyor olmasıdır.

“Bdar” ve “rdar” morfortiplerinin matriksinde bulunan kıvrımlı fimbriya (curli), *Enterobacteria* familyasına dahil bakterilerin dış yüzeylerinde bulunmaktadır (Olsén vd. 1989, Barnhart ve Chapman 2006). Kıvrımlı fimbriya, *Escherichia* ve *Salmonella* türlerinde yüksek agregasyon özelliği gösteren esnek fiber yapılar oluşturmaktadır. Kıvrımlı fimbriya proinflatör yanıt oluşturma potansiyeline sahip olup, fibrinojen ve kontakt-faz proteinleri tarafından tutularak sepsis ve septik şok durumlarında düşük tansiyon ve kanamalı rahatsızlıklara neden olabilmektedir (Herwald vd. 1998). Kıvrımlı fimbriya hücre adezyonunu ve invazyonunu uyararak bakteriyel patojenitede önemli bir rol almaktadır. Fare model sistemleri ile yürütülen çalışmalarda kıvrımlı fimbriyanın konakçıda amiloidoza neden olduğu saptanmıştır (Gophna vd. 2001, Lundmark vd. 2005). Kıvrımlı fimbriya, hücre-hücre ve hücre yüzey etkileşimini sağlayarak memeli ve bitki hücrelerindeki yanı sıra cam, plastik ve paslanmaz çelik gibi inert yüzeylerde bakteriyel adezyonu gerçekleştirir (Barnhart ve Chapman 2006, Cegelski vd. 2009). Selüloz üretimi olmayan mutantlarla yapılan çalışmalarda, selüloz üretiminin *Salmonella*'nın patojenitesiyle ilişkisi olmadığı saptanmıştır. Ancak selüloz üretimi bakımından mutant suşların klorun etkilerine karşı çok daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Selülozun biyofilm içerisindeki varlığı, *Salmonella*'nın çevresel yüzeylerde hayatta kalabilmesi için önemli bir faktördür (Solano vd. 2002). “Bdar ve “rdar” morfortiplerinin uzun süre hayatta kalabilme kabiliyetleri farklıdır. “Rdar” morfortipindeki bakterilerin “bdar” morfortipine kıyasla olumsuz çevresel koşullarda daha uzun süre hayatta kalabildiği ve birçok kimyasal ajana karşı daha dirençli olduğu bilinmektedir (Vestby vd. 2009). Çalışmada kullanılan Türkiye kaynaklı *Salmonella* suşlarında yaygın morfortipin “rdar” olarak belirlenmesi (% 56,43, Şekil 4.3) özellikle gıda üretiminde dezenfeksiyon ve sterilizasyon aşamalarının etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi gerekliliğine işaret etmektedir. Bu durum ayrıca Türkiye'deki Salmonelloz vakalarının yaygınlığını da açıklamaktadır.

Biyofilm, gıda işleme süreçlerinde normal temizlik prosedürleriyle ortadan kaldırılamamakta ve bu nedenle gıdaların işlendiği yüzeylerdeki biyofilm bu

yüzeylerle temas eden gıdalar için kontaminasyon kaynağını oluşturmaktadır (Joseph vd. 2001). Çevresel koşullarda, biyofilmler patojen mikroorganizmalar için rezervuar özelliği göstererek yüzeylerin ve suyun kontaminasyonuna da neden olmaktadır (Larsen vd. 2007). Bu durum, gıdaların raf ömürlerinin kısılmasında ve gıda kaynaklı hastalıkların yayılmasında büyük risk oluşturmaktadır. Biyofilm oluşumu gıda işleme ünitelerinde aynı zamanda ısı transfer sistemlerinin bozulmasına ve metal yüzeylerde korozyona neden olmaktadır. *Salmonella* kümes hayvanlarının işlendiği nemli ortamlarda ideal bir biyofilm üreticisidir. *Salmonella*'nın gıda işlenen ortamlardaki çimento, plastik ve paslanmaz çelik yüzeylerde biyofilm üretebildiği saptanmıştır (Helke ve Wong 1994, Joseph vd. 2001).

Gıda endüstrisi ve gıda kaynaklı hastalıklar için son derece önemli bir bakteri olan *Salmonella*'nın Türkiye kaynaklı açıkta satışı sunulan tavuk ve gıda örneklerinden izole edilenlerinin tümünün biyofilm üreticisi suşlar olması, dikkat edilmesi gereken bir diğer durumdur. Gelişmekte olan ülkemizde gıda işleme süreçlerindeki sanitasyon işlemlerinin biyofilm formasyonu dikkate alınarak yapılması önem arz etmektedir.

4.2 *Salmonella* Suşlarının Pelikül Yapılarının İncelenmesi

Bu çalışmada, daha önce Kongo kırmızılı NaCl'siz LB agar besiyerlerinde içerdikleri morfolojiye göre analiz edilmiş *Salmonella* suşları, sıvı-hava arafazında pelikül oluşturmalarına göre test edilmiştir. 4,5 mL'lik NaCl'siz LB broth besiyerlerine yine NaCl'siz LB broth ortamlarında, çalkalamalı koşullarda 18 saat geliştirilmiş kültürlerden 0,5 mL inoküle edilmiştir. Test tüpleri 20 °C'de 8 gün boyunca statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Suşlar, 8 günlük inkübasyon süresi boyunca her gün pelikül varlıklarına göre incelenmiştir. (Solano vd. 2002). Test tüpleri, pelikül oluşumlarının yanı sıra, pelikülün elastik, kırılabilir ve rijit özellik göstermesine, sıvı-hava arafazında oluşan halka yapılarına, besiyerinin bulanıklığı ve tüp tabanında çökelti birikimi gibi bazı değişimlere göre de değerlendirilmiştir (Römling vd 2000). Belirtilen bu niteliklere göre değerlendirilen suşların pelikül karakteristikleri ve pelikül oluşumu esnasında besiyerinde tanımlanan değişimler çizelge 4.4 -4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 DMC kodlu *Salmonella* suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi

Suş Kodu	Sıvı-hava arafazında halka yapısı oluşumu	Sıvı-hava arafazında pelikül oluşumu	Besiyerindeki bulanıklık	Tüpün tabanındaki çökelti	Morfotip
DMC 1	Var	Var (rijit)	Az	Var (+)	rdar
DMC 2	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 3	Var	Var (rijit)	Az	Var (+)	rdar
DMC4	Var	Var(rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 5	Var	Var (rijit)	Yoğun	Var (+)	rdar
DMC 6	Var	Var (rijit)	Yoğun	Var (+)	rdar
DMC 7	Var	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 8	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 9	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 10	Var	Var (rijit)	Yoğun	Var (+ +)	rdar
DMC 11	Var	Var (rijit)	Az	Var (+)	rdar
DMC12	Var	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC13	Var	Var (elastik)	Yoğun	Var (+ +)	pdar
DMC 14	Var	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 15	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 16	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 17	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 18	Var	Var (rijit)	Yoğun	Var (+)	rdar
DMC 19	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar

Çizelge 4.4 DMC kodlu *Salmonella* suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi (devam)

Suş Kodu	Sıvı-hava arafazında halka yapısı oluşumu	Sıvı-hava arafazında pelikül oluşumu	Besiyerindeki bulanıklık	Tüpün tabanındaki çökelti	Morfotip
DMC 20	Var	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 22	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 23	Var	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 24	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 25	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 26	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 27	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 28	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 29	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 30	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 31	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 32	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 33	Var	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 34	Var	Var (elastik)	Az	Var (+ +)	pdar
DMC 35	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 36	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 37	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 38	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 39	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar

Çizelge 4.4 DMC kodlu *Salmonella* suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi (devam)

Suş Kodu	Sıvı-hava arafazında halka yapısı oluşumu	Sıvı-hava arafazında pelikül oluşumu	Besiyerindeki bulanıklık	Tüpün tabanındaki çökelti	Morfotip
DMC40	Var	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC41	Var	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC42	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC43	Yok	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC44	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC45	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC46	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC47	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC48	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC49	Var	Var (rijit)	Az	Var (++)	rdar
DMC 50	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 51	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 52	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 53	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 54	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	rdar
DMC 55	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 56	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 57	Var	Yok	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 58	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar

Çizelge 4.4 DMC kodlu *Salmonella* suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi (devam)

Suş Kodu	Sıvı-hava arafazında halka yapısı oluşumu	Sıvı-hava arafazında pelikül oluşumu	Besiyerindeki bulanıklık	Tüpün tabanındaki çökelti	Morfotip
DMC 59	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 60	Var	Var (rijit)	Yoğun	Var (+ +)	Tanımsız
DMC 61	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 62	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 63	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 64	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 65	Var	Var (rijit)	Yoğun	Var (+ +)	rdar
DMC 66	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 67	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 68	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 69	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 70	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 71	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 72	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 73	Var	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 74	Var	Var (kırılgan)	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 75	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 76	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 77	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar

Çizelge 4.4 DMC kodlu *Salmonella* suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi (devam)

Suş Kodu	Sıvı-hava arafazında halka yapısı oluşumu	Sıvı-hava arafazında pelikül oluşumu	Besiyerindeki bulanıklık	Tüpün tabanındaki çökelti	Morfotip
DMC 78	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 79	Var	Var (rijit)	Yoğun	Var (+ +)	rdar
DMC 80	Var	Var (rijit)	Yoğun	Var (+ +)	rdar
DMC 81	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 82	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 83	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 84	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	rdar
DMC 85	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 86	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 87	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 88	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
DMC 89	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 90	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 91	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 92	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 93	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 94	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 95	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 96	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar

Çizelge 4.4 DMC kodlu *Salmonella* suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi (devam)

Suş Kodu	Sıvı-hava arafazında halka yapısı oluşumu	Sıvı-hava arafazında pelikül oluşumu	Besiyerindeki bulanıklık	Tüpün tabanındaki çökelti	Morfotip
DMC 97	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
DMC 98	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 99	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
DMC 100	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar

Çizelge 4.5 IS kodlu *Salmonella* suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi

Suş Kodu	Sıvı-hava arafazında halka yapısı oluşumu	Sıvı-hava arafazında pelikül oluşumu	Besiyerindeki bulanıklık	Tüpün tabanındaki çökelti	Morfotip
IS-2	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
IS-4	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-6	Var	Var (rijit)	Yoğun	Var (+ +)	rdar
IS-20	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-23	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-46	Var	Var (elastik)	Az	Var (+ +)	pdar
IS-52	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
IS-53	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-58	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-63	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
IS-64	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar

Çizelge 4.5 IS kodlu *Salmonella* suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi (devam)

Suş Kodu	Sıvı-hava arafazında halka yapısı oluşumu	Sıvı-hava arafazında pelikül oluşumu	Besiyerindeki bulanıklık	Tüpün tabanındaki çökelti	Morfotip
IS-69	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-72	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-73	Var	Var (kırılğan)	Yoğun	Var (+ +)	rdar
IS-80	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-81	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-83	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-84	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-89	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	rdar
IS-91	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	rdar
IS-96	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-97	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
IS-98	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
IS-100	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-101	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-104	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-107	Var	Var (rijit)	Yoğun	Var (+ +)	rdar
IS-112	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	rdar
IS-117	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
IS-124	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
IS-128	Var	Var (kırılğan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-134	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
IS-135	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar

Çizelge 4.5 IS kodlu *Salmonella* suşlarının pelikül oluşumlarına göre değerlendirilmesi (devam)

Suş Kodu	Sıvı-hava arafazında halka yapısı oluşumu	Sıvı-hava arafazında pelikül oluşumu	Besiyerindeki bulanıklık	Tüpün tabanındaki çökelti	Morfotip
IS-137	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	bdar
IS-140	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	rdar
IS-141	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
IS-148	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	rdar
IS-162	Var	Var (kırılgan)	Az	Var (+ +)	rdar
IS-163	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	bdar
IS-174	Var	Var (rijit)	Az	Var (+ +)	rdar
IS-177	Var	Yok	Yoğun	Var (+ +)	rdar

Test tüplerinde gözlemlenen niteliksel değişimlerin morfotipler arasında farklılık gösterip göstermediği istatistiksel analizlerle de araştırılmıştır. Suşlar, içerdikleri biyofilm morfotiplerindeki farklılıkları esas alınarak pelikül formasyonunun varlığına ya da yokluğuna göre değerlendirildiğinde, suşlar arasında en sık saptanan “bdar” ve “rdar” morfotiplerinin, bu özellik bakımından farklı olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Farklı biyofilm morfotipi içeren suşların sıvı besiyerinde pelikül oluşumuna göre değerlendirilmesi

Morfotip	Pelikül Var	Pelikül Yok	Toplam
bdar	41	16	57
rdar	72	7	79
Toplam	111	25	136

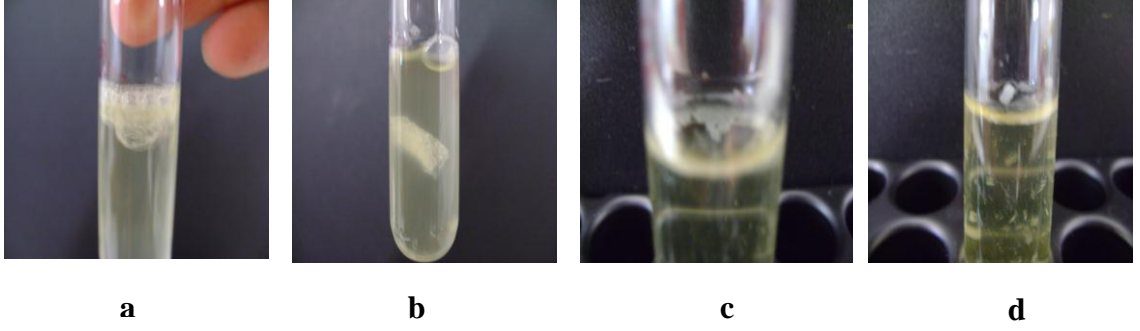
“bdar” ve “rdar” morfotipleri pelikül yapısının varlığına göre farklı frekanslara sahip olup (bdar morfotipi içeren suşların % 71,9’unda, rdar morfotipi içeren suşların % 91,1’inde) bu farklılık istatistiksel analizle de önemli bulunmuştur ($p < 0,01$).

Farklı morfotip içeren suşların pelikül yapılarındaki fiziksel farklılıklar değerlendirildiğinde, yine morfotipler arasında, farklılık olduğu saptanmıştır. Morfotiplerin pelikül yapılarındaki fiziksel farklılık (bdar morfotipi içeren suşların % 2,4’ünde rijit; % 97,6’sında kırılgen, rdar morfotipi içeren suşların % 94,4 ‘ünde rijit; % 5,6’sında kırılgen pelikül yapısı) istatistiksel analizle de önemli bulunmuştur ($p < 0,0001$) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Farklı biyofilm morfotipi içeren suşların peliküllerinin fiziksel özelliklerine göre değerlendirilmesi

Morfotip	Rijit	Kırılgen	Toplam
bdar	1	40	41
rdar	68	4	72
Toplam	69	44	113

Bu farklılık *Salmonella* biyofilminin matriksini teşkil eden selüloz ve kıvrımlı fimbriya gibi temel bazı bileşenlere dayanmaktadır. Rdar morfotipi, yani matriksinde hem selüloz hem de kıvrımlı fimbriya içeren suşların pelikül yapıları daha sağlam fiziksel özelliklere sahip olup, çalkalama ve karıştırma gibi etkiler sonucunda dahi dağılmadan kalabilmektedir (rijit pelikül yapısı). Bdar morfotipi, yani matriksinde kıvrımlı fimbriya içeren suşların pelikül yapıları ise çalkalama ve karıştırma gibi etkiler sonucunda dağılmaktadır (kırılgen pelikül yapısı) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7.a. Rdar morfotipine özgü sıvı-hava arafazında gözlemlenen pelikül yapısı, b. Aynı pelikülün karıştırıldıktan sonra dağılmadan kalan yapısı, c. Bdar morfotipine özgü sıvı-hava arafazında gözlemlenen pelikül yapısı, d. Aynı pelikülün karıştırıldıktan sonra dağılan yapısı

Test tüplerinde farklı morfotiplere göre tanımlanan bir diğer fiziksel ayırım ise besiyerindeki bulanıklıktır (bdar morfotipi içeren suşların % 50,9’unda besiyerlerinde bulanıklık yoğun; rdar morfotipi içeren suşların % 21,6’sında bulanıklık yoğun). Bulanıklığın yoğun ya da az oluşu morfotip farklılığından kaynaklanmıştır ($p < 0,01$) (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Farklı biyofilm morfotipi içeren suşların besiyerlerindeki bulanıklık değişimine göre değerlendirilmesi

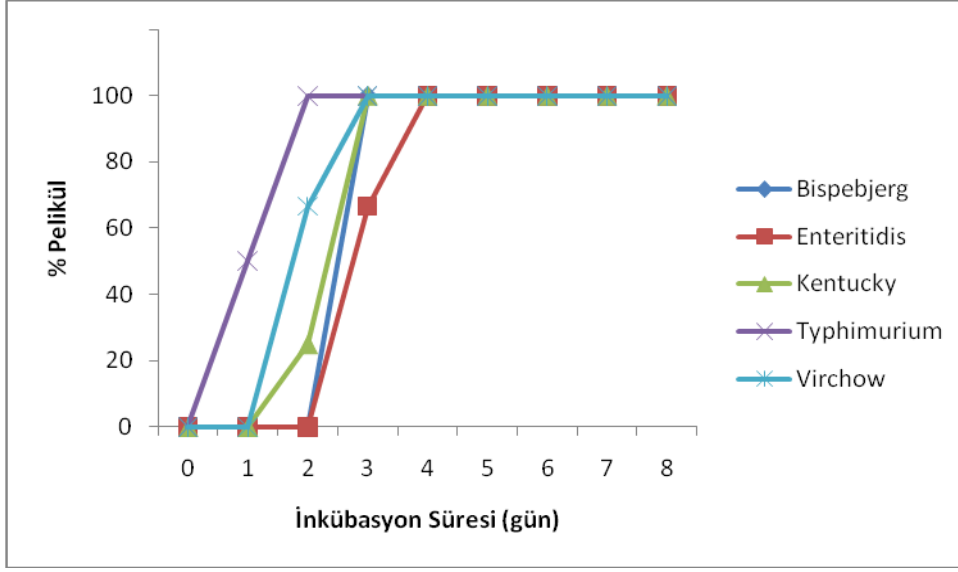
Morfotip	Bulanıklık (yoğun)	Bulanıklık (az)	Toplam
bdar	29	28	57
rdar	17	62	79
Toplam	46	90	136

8 günlük inkübasyon sonunda pelikül oluşturmalarına göre değerlendirilen suşların test tüplerinde sıvı-hava arafazındaki, pelikülün yanı sıra, halka formasyonları da gözlenmiştir (% 98,2 bdar, % 100 rdar). Çökelti birikimi her test tüpünün tabanında

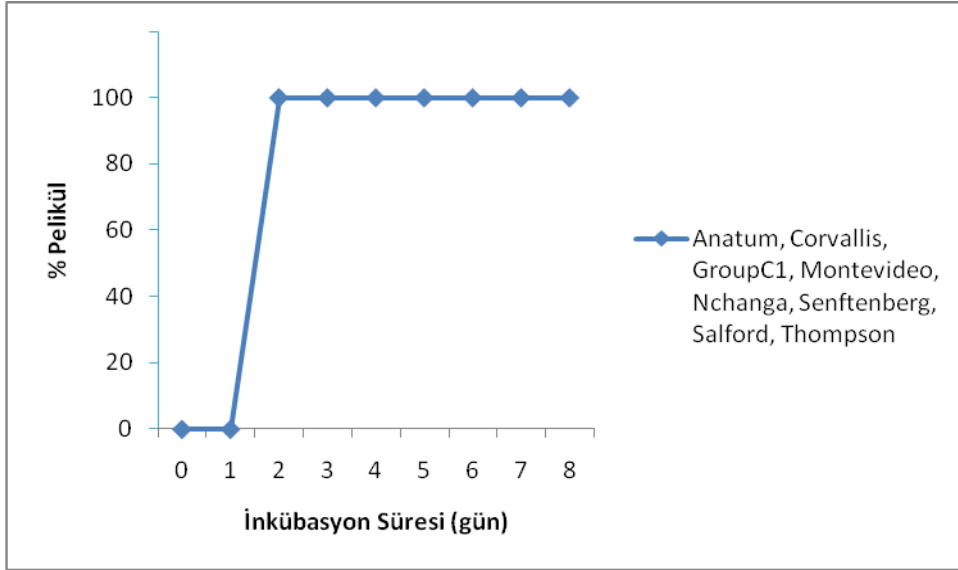
gözlenmiş olup, halka yapılarının varlığı ve çökelti birikimi, morfotiplerin ayrımını bu deneyle mümkün kılmamaktadır. Bu niteliksel özellikler dışında değerlendirilen diğer özellikler, morfotiplerin ayrımı için önemli ipuçları vermektedir.

Pelikül oluşumlarına göre serotiplendirmesi yapılmış suşlar değerlendirildiğinde; *S. Enteritidis* (% 86,7), *S. Rauform* (% 33,3), *S. Kentucky* (% 90,9), *S. Infantis* (% 84,6), *S. Agona* (% 80), *S. Virchow* (% 93,8) serovaryeteleri dışındaki serovaryetelerin tümü sıvı-hava arafazında pelikül oluşturmuşlardır (% 100). Gıda ve su kaynaklı *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* serovaryeteleri, insan gastroenteritinin en önemli nedenlerinden biridir. Bu serovaryetelerin çok çeşitli çevresel koşullarda biyofilm yapıları içerisinde hayatta kalabildiği bilinmektedir (Costerton vd. 1995, Davey ve O'Toole 2000). Gıda kaynaklı önemli enteropatojenler olan *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* serovaryetelerinin literatürde tanımlanan pelikül oluşturma kabiliyetleri değerlendirildiğinde, bu çalışmada kullanılan Türkiye'deki gıda kaynaklı *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* suşlarının farklı bir durum sergilediği görülmektedir. Diğer *Salmonella* serovaryetelerine kıyasla *S. Typhimurium* kuvvetli bir biyofilm üreticisi olmayan ve pelikül üretimi yönünden zayıf bir serovaryetedir (Vestby vd. 2009). Oysa çalışmada kullanılan Türkiye kaynaklı *S. Typhimurium* suşlarının hem pelikül hem de yüksek biyofilm üreticisi suşlar olduğu saptanmıştır. Türkiye kaynaklı *S. Enteritidis* suşlarına bakıldığında bu suşların diğer *S. Enteritidis* suşlarına kıyasla daha yüksek bir pelikül oluşturma yüzdesine sahip olduğu ortaya çıkmaktadır (% 86,6) (Solano vd. 2002).

Kongo kırmızısı içeren NaCl'siz LB agar ortamlarında biyofilm morfotipleri analizine göre yoğun "rdar" morfotipi içerdiği düşünülerek seçilen suşların sıvı-hava arafazında oluşturdukları pelikül yapıları, inkübasyon süresine bağlı olarak farklılık göstermiştir (Anatum; n=2, Bispebjerg; n=1, Corvallis; n=4, Enteritidis; n=3, Group C1; n=4, Kentucky; n= 4, Montevideo; n=1, Nchanga; n=2, Salford; n=1, Senftenberg; n=1, Thompson; n=1, Typhimurium; n=2, Virchow; n=6, toplam: 32) (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8 Rdar morfoloji ifadesi yüksek *Salmonella* serovaryetelerinin pelikül oluşumlarının zamana bağlı değişimi



Şekil 4.9 Rdar morfoloji ifadesi yüksek *Salmonella* serovaryetelerinin pelikül oluşumlarının zamana bağlı değişimi

Pelikül oluşumunun serovaryeteler arasında zamana bağlı değişimi farklı bulunmuştur. Anatum, Corvallis, Group C1, Montevideo, Nchanga, Senftenberg, Salford, Thompson, Typhimurium serovaryetelerinin tümü 2. günde sıvı-hava arafazında pelikül oluşturmuştur (Şekil 4.9). Bispebjerg, Kentucky, Virchow serovaryeteleri 3. günde,

Enteritidis serovaryetesinin tamamı ise ancak 4. günde sıvı-hava arafazında pelikül oluşturabilmiştir (Şekil 4.8).

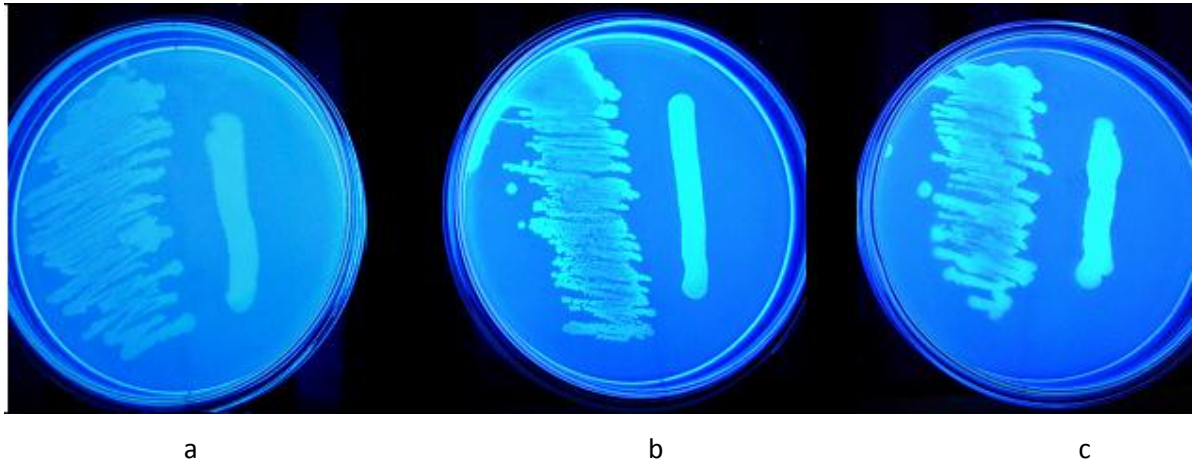
Pelikül formasyonu bir biyofilm yapısıdır. *Salmonella* suşlarının oluşturdukları pelikül yapısının matriksinde kıvrımlı fimbriya ve selülozu bileşenlerinin her ikisi, ya da selüloz ve kıvrımlı fimbriya bileşenlerinden yalnızca biri bulunabilmektedir. Selülozun biyosentezinde görev yapan *bcsABZC* ve *bcsEFG* operonlarının ve kıvrımlı fimbriyanın sentezinde görev yapan *csgBAC* operonlarının ifadelerinin durdurulması, pelikül oluşumunun durmasına ve bakterilerin dezenfektanlara karşı çok daha duyarlı hale gelmelerine neden olmaktadır (Solano vd. 2002). Biyofilm üreticisi bir mikroorganizmanın biyofilm hücreleri aynı mikroorganizmanın planktonik fazdaki hücrelerine kıyasla antibakteriyel ajanlara karşı 1000 kattan daha fazla dirençli olabilmektedir (Costerton vd. 1999, Gilbert vd. 2002). Sıvı besiyerlerinde gelişen birçok bakteri ortamın taban kısmında agregat oluşturmakta ya da yüzeylere tutunmaktadır; ancak, *Salmonella enterica* serovaryeteleri, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Vibrio cholerae* gibi bazı bakteriler sıvı kültürlerde sıvı-hava arafazında sıvı yüzeyini kapatacak şekilde kırılğan ya da rijit pelikül yapıları oluşturmaktadır (Rainey ve Travisano 1998, Römling ve Rohde 1999, Yıldız ve Schoolnik 1999, Anriany vd. 2001, Zogaj vd. 2001, Solano vd. 2002, Spiers vd. 2002). Bakterilerin sıvı-hava arafazında kolonize olup biyofilm yapıları geliştirmeleri aynı zamanda bakterinin hem havadaki gazlardan hem de sıvı ortamdaki su ve besinlerden yararlanması için bir avantaj sağlar (Spiers vd. 2003). Sıvı-hava ve katı-hava fazları arasındaki bakteriyel biyofilmler endüstriyel su sistemleri için de ciddi sorunlara sebep olmaktadır. Pelikül oluşturmayan, selüloz ve fimbriya üretimi bakımından mutant *Salmonella* Typhimurium suşlarıyla, doğal tip suşların farklı stres koşullarına duyarlılıklarıyla ilgili bir çalışmada pelikül içerisindeki hücrelerin klor ve reaktif sodyum hipoklorit streslerine karşı planktonik fazdaki hücrelerden çok daha dirençli olduğu saptanmıştır (Scher vd. 2005).

Türkiye kaynaklı *Salmonella* suşlarının, yüksek bir yüzdeyle (çalışılan tüm suşların % 85'i) bir biyofilm yapısı olan pelikülü oluşturmaları dikkate değer bir bulgudur. Bu durum özellikle gıda işlemlerindeki sanitasyon süreçlerinde, çevresel koşullara ve

birçok antibakteriyel ajana karşı direnç gösteren, biyofilmlerle mücadelenin son derece önemli olduğunu göstermektedir.

4.3 Kalkoflor Bağlanma Uygulaması

Morfotiplerine ve pelikül formasyonlarına göre tanımlanmış *Salmonella* suşları, matrikslerinde önemli bir bileşen olan selülozu içerip içermediklerine göre değerlendirilmiştir. Bir gece boyunca NaCl'siz LB broth besiyerlerinde 37 °C'de çalkalamalı koşullarda geliştirilen suşlar, iki paralelli olarak kalkoflor (fluorescent brightner 28, Sigma-Aldrich, China) içeren NaCl'siz LB agar ortamlarına inoküle edilmiş ve petriler 8 gün süresince inkübasyona bırakılmıştır. 8 gün süresince petrilerdeki biyofilm yapıları hergün 322 nm UV ışık altında (Kodak Gel Logic 200 Imaging System) floresan özellik gösterip göstermemelerine göre değerlendirilmiştir. 322 nm UV ışık altında kuvvetli floresan özellik gösteren suşlar selüloz üretimi bakımından pozitif, göstermeyenlerse selüloz üretimi bakımından negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Farklı biyofilm morfotipleri içeren suşların 322 nm UV ışık altındaki floresan özellikleri

- a.** Selüloz negatif morfotip (*S. Infantis*, bdar morfotipi) **b.** Selüloz pozitif morfotip (*S. Typhimurium*, rdar morfotipi) **c.** Selüloz pozitif morfotip (*S. Roughness*, pdar morfotipi)

Kalkoflor, (1→3)-β-D ve (1→4)-β-D-glukopiranozil bağlarını bulunduran polisakkaritlerin saptanmasında kullanılan çok kuvetli bir indikatördür (Zogaj vd. 2001).

Kalkoflor bağlama özelliklerine göre değerlendirilen suşlardan “rdar” ve “pdar” morfotipi içerdiği saptanan suşların tamamı (79 adet rdar ve 3 adet pdar) biyofilm yapılarına kalkofloru bağlamıştır. “bdar” morfotipi içerdiği saptanan 57 adet *Salmonella* suşunun ve bilinen herhangi bir biyofilm morfotipine dahil edilemeyen DMC 61 kodlu *S. Agona* suşunun kalkofloru bağlamadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar biyofilm bileşen tanımı yapılamamış 1 suşun ve 57 adet “bdar” morfotipinin biyofilm yapısında selüloz içermediğine, 79 “rdar” ve 3 “pdar” adet morfotipinde ise selülozun biyofilm bileşeni olduğuna işaret etmektedir.

4.4 Polistiren Mikrotitre Plakları Üzerinde Biyofilm Miktarının Ölçülmesi

Mikrotitre plak sistemlerinde farklı boyalar kullanılarak birçok mikroorganizmanın biyofilm miktarları ölçülebilir (Christensen vd. 1985, Deighton ve Balkau 1990, Stepanovic vd. 2000, Ramage vd. 2001). Biyofilmin miktarsal tayinlerinde indikatör boya olarak kristal viyole yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yöntem, mikrotitre plak kuyularının çeperlerine tutunmuş biyofilmlerin kristal viyole ile işaretlenmesi, biyofilm matriksine tutunan boyanın ise alkol/aseton çözeltisiyle çözdürülüp, ELISA okuyucusunda ölçülmesini esas almaktadır.

Bu çalışmada, Kongo kırmızılı LB agar ortamlarında yoğun rdar morfotipi içerdiği saptanan 31 adet DMC kodlu ve 7 adet IS kodlu suşun mikrotitre plaklarda biyofilmlerinin miktarı Woodward vd. tarafından (2000) kullanılan yöntemle ölçülmüştür. Yöntemin bazı basamaklarında daha kaliteli ölçümlerin gerçekleştirilebilmesi için modifikasyonlar yapılmıştır. İnkübasyondan sonra kurumaya bırakılan kuyular % 99'luk metanolle fikse edilmiş ve boyanın çözünmesi ise % 33'lük glasiyel asetik asitle gerçekleştirilmiştir (Stepanovic vd. 2000). Bu modifikasyonlarla daha istikrarlı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.9) (Şekil 4.11-Şekil 4.12).

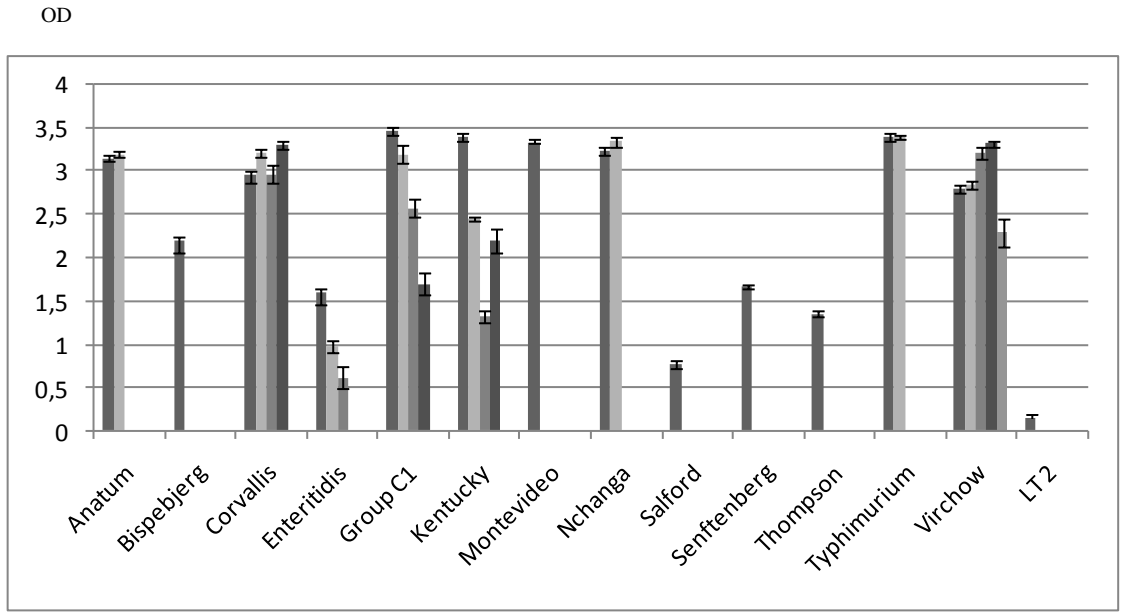
Çizelge 4.9 DMC ve IS kodlu “rdar” morfotipi içeren suşların mikrotitre plak ölçümlerinin sonuçları

Suş Kodu ve Adı	OD _(ortalama)	OD _{ortalama} - Kontrol _(ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
DMC 1 (<i>S. Group C1</i>)	3.498	3.462	0.095	0.055
DMC 2 (<i>S. Group C1</i>)	3.232	3.196	0.170	0.098
DMC4 (<i>S. Typhimurium</i>)	3.434	3.398	0.1014	0.0414
DMC 9(<i>S. Virchow</i>)	2.833	2.797	0.114	0.066
DMC 10 (<i>S. Virchow</i>)	2.875	2.839	0.0816	0.0471
DMC 15 (<i>S. Nchanga</i>)	3.271	3.235	0.0872	0.05
DMC 16 (<i>S. Virchow</i>)	3.248	3.212	0.138	0.0617
DMC 17 (<i>S. Virchow</i>)	3.358	3.322	0.0794	0.0324
DMC 25 (<i>S. Enteritidis</i>)	1.64	1.604	0.217	0.153
DMC 26 (<i>S. Enteritidis</i>)	1.003	0.967	0.106	0.075
DMC 30 (<i>S. Enteritidis</i>)	0.648	0.612	0.182	0.129
DMC 36 (<i>S. Corvallis</i>)	2.995	2.959	0.169	0.098
DMC 37 (<i>S. Group C1</i>)	2.6115	2.575	0.140	0.099
DMC 50 (<i>S. Group C1</i>)	1.7345	1.6985	0.186	0.131
DMC 51 (<i>S. Thompson</i>)	1.383	1.347	0.050	0.036
DMC 55 (<i>S. Senftenberg</i>)	1.691	1.655	0.025	0.0144
DMC 65 (<i>S. Kentucky</i>)	3.433	3.397	0.0936	0.054
DMC 78 (<i>S. Bispebjerg</i>)	2.234	2.198	0.235	0.136
DMC 79 (<i>S. Kentucky</i>)	2.482	2.446	0.0537	0.031
DMC 80 (<i>S. Kentucky</i>)	1.347	1.311	0.121	0.068

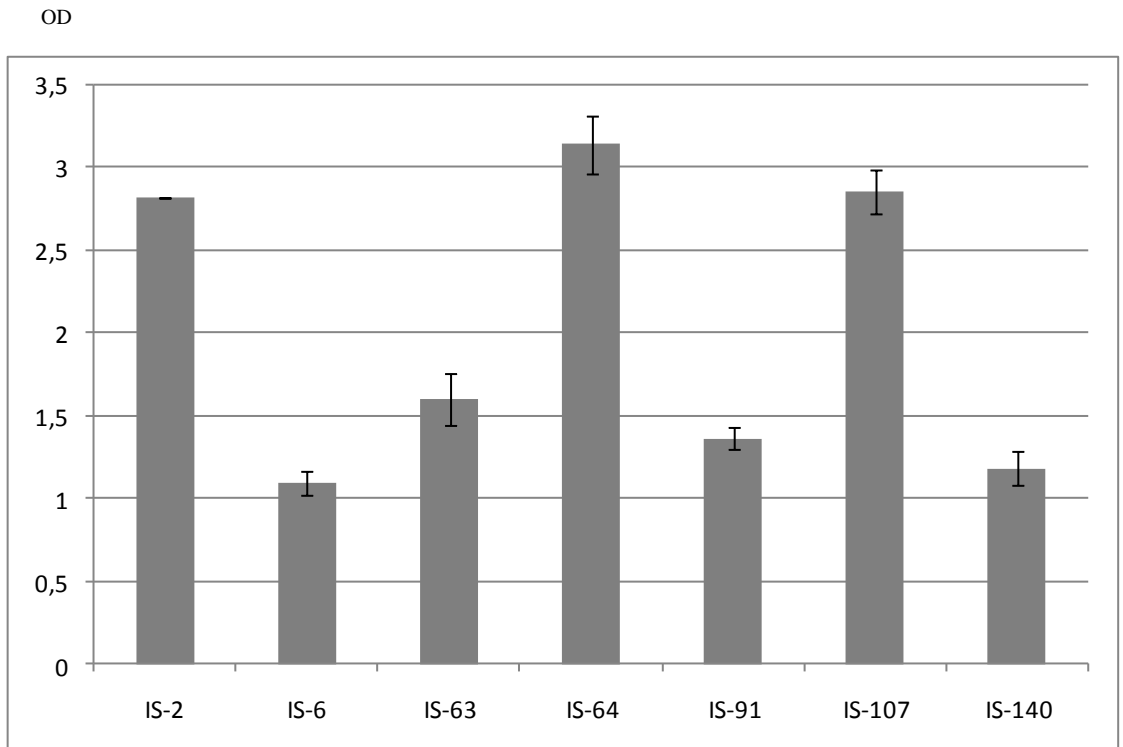
Çizelge 4.9 DMC ve IS kodlu “rdar” morfotipi içeren suşların mikrotitre plak ölçümlerinin sonuçları (devam)

Suş Kodu ve Adı	OD _(ortalama)	OD _{ortalama} - Kontrol _(ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
DMC 84 (<i>S. Virchow</i>)	2.321	2.285	0.221	0.156
DMC 85 (<i>S. Kentucky</i>)	2.234	2.198	0.235	0.135
DMC 86 (<i>S. Corvallis</i>)	3.242	3.206	0.109	0.044
DMC 87 (<i>S. Corvallis</i>)	3.0055	2.967	0.144	0.101
DMC 89 (<i>S. Montevideo</i>)	3.360	3.324	0.0614	0.0035
DMC 91 (<i>S. Anatum</i>)	3.188	3.152	0.0667	0.0385
DMC 92 (<i>S. Anatum</i>)	3.234	3.198	0.071	0.04
DMC 93 (<i>S. Salford</i>)	0.807	0.771	0.105	0.06
DMC 95 (<i>S. Typhimurium</i>)	3.436	3.4	0.0456	0.0228
DMC 99 (<i>S. Nchanga</i>)	3.379	3.343	0.105	0.06
DMC 100 (<i>S. Corvallis</i>)	3.338	3.302	0.092	0.0411
IS-2	2.855	2.819	0.00212	0.0015
IS-6	1.131	1.095	0.128	0.073
IS-63	1.638	1.602	0.273	0.158
IS-64	3.183	3.147	0.304	0.175
IS-91	1.404	1.368	0.126	0.07
IS-107	2.894	2.858	0.240	0.138
IS-140	1.22	1.184	0.175	0.101
LT2	0.186	0.15	0.061	0.021

* OD değerleri örneklerin aldığı değerlerin ortalamasından kontrol değerlerinin aldığı ortalama çıkarılarak hesaplanmaktadır (OD_{Kontrol} : 0.036)



Şekil 4.11 Rdar morfotipi içeren DMC kodlu suşların biyofilm miktarı (OD₅₉₅)



Şekil 4.12 Rdar morfotipi içeren IS kodlu suşların biyofilm miktarı (OD₅₉₅)

Yoğun “rdar” morfotipi içerdığı saptanan *Salmonella* serovaryetelerinin mikrotitre plaklarda ölçülen biyofilm miktarları arasında istatistiksel anlamda çok önemli bir farklılık olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). OD_{595} 'te ölçülen biyofilm miktarları, serovaryetelerin ortalama ölçüm değerleri olan 0,8077 (*S. Salford*) ila 3,435 (*S. Typhimurium*) değerleri arasında dağılım göstermiştir. Çalışmada en yüksek biyofilm miktarı, literatür verilerinde zayıf bir biyofilm üreticisi olduğu bildirilen, *S. Typhimurium*'da tespit edilmiştir (Vestby vd. 2009). Çalışmada kullanılan Türkiye kaynaklı iki adet *S. Typhimurium* suşunun biyofilm miktarlarının, standart suş olarak kullanılan *S. Typhimurium* LT2 suşunun ürettiği biyofilm miktarından çok daha yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla 3.398, 3.4 ve 0.15) (Şekil 4.11).

Pelikül çalışmalarında 8 günlük inkübasyon süresince pelikül oluşturma hızlarına göre değerlendirilen *Salmonella* serovaryelerinin mikrotitre plaklardaki biyofilm ölçümlerine bakıldığında, pelikül oluşum hızıyla biyofilm miktarı arasında negatif bir korelasyon olduğu anlaşılmıştır ($p < 0,05$). Bu değerlendirmeye göre kısa sürede pelikül oluşturan serovaryetelerin mikrotitre plaklarda daha çok biyofilm ürettiği söylenebilir. Örneğin *S. Typhimurium* suşlarının tümü ikinci günde pelikül oluştururken (biyofilm miktarı ortalaması; 3,432) *S. Enteritidis* suşlarının tümü ancak 4. gün pelikül oluşturabilmiştir (biyofilm miktarı ortalaması; 1,098). Farklı *Salmonella* serovaryetelerinin pelikül oluşturma hızları ve mikrotitre plaklardaki biyofilm miktarları arasındaki ilişki dikkate alındığında, serovaryetelerin abiyotik yüzeylerde biyofilm yapıları içerisinde ne kadar süre varlıklarını devam ettirebilecekleriyle ilgili tahmin yürütülebilir.

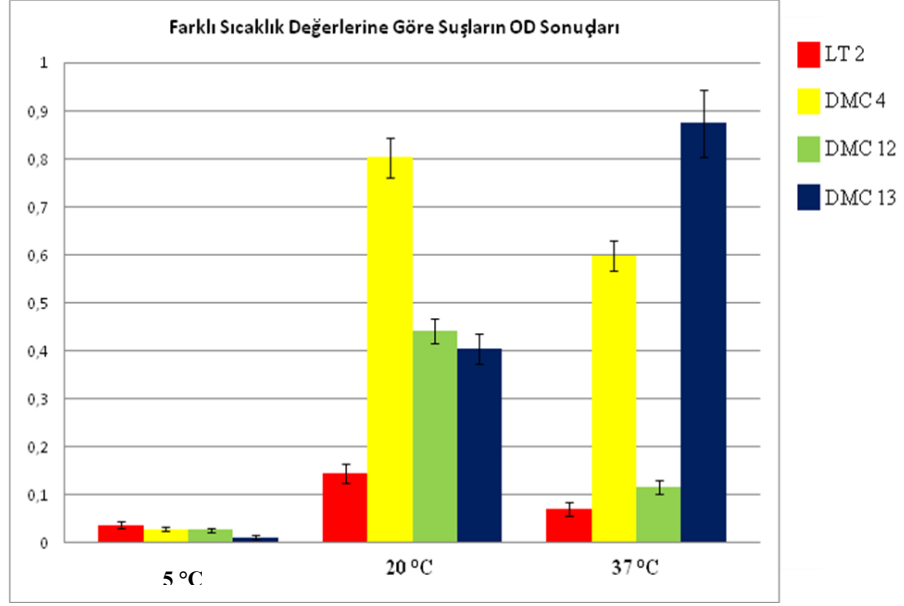
4.5 Farklı Sıcaklık, pH, NaCl Konsantrasyon Değerlerinin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkilerinin Mikrotitre Plak Yöntemiyle Araştırılması

Bu çalışmada farklı *Salmonella* biyofilm morfotiplerini temsilen 3 suş ve standart olarak da *S. Typhimurium* LT2 suşu kullanılmıştır [(LT2: *S. Typhimurium* (rdar morfotipi), DMC4: *S. Typhimurium* (rdar morfotipi), DMC12: *S. Infantis* (bdar morfotipi), DMC13: *S. subsp. Roughform* (pdar morfotipi)].

Suşların biyofilm oluşturma özellikleri üzerine endüstriyel süreçlerde en yaygın kullanılan üç sıcaklık derecesi (5, 20 ve 37 °C), 4 pH değeri (4.5, 5.5, 6.5, ve 7.4) ve dört NaCl konsantrasyon değerinin (% 0.5, 1.5, 5.5, ve 10.5 NaCl) etkileri araştırılmıştır. Farklı stres koşullarının biyofilm üzerine etkileri araştırılırken biyofilm miktarı ölçümleri 1. gün sonunda ve 2. gün sonunda yapılmıştır. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.10-4.14'te ve Şekil 4.13-4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.10 İnkübasyon sıcaklığının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün)

5 °C	OD_(ortalama)	OD_(ortalama)- Kontrol_(ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,0567	0,0307	0,0250	0,0079
DMC4	0,0540	0,0280	0,0130	0,0040
DMC12	0,0525	0,0265	0,0182	0,0047
DMC13	0,0369	0,0011	0,0140	0,0042
Kontrol OD: 0,0260				
20 °C	OD_{ortalama)}	OD_(ortalama)- Kontrol_(ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,1705	0,1440	0,0572	0,0203
DMC4	0,8300	0,8035	0,1650	0,0412
DMC12	0,4680	0,4415	0,0975	0,0260
DMC13	0,4312	0,4047	0,0903	0,0320
Kontrol OD: 0,0265				
37 °C	OD_(ortalama)	OD_(ortalama)- Kontrol_(ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,1117	0,0691	0,0405	0,0143
DMC4	0,6420	0,5994	0,0694	0,0310
DMC12	0,1590	0,1164	0,0467	0,0140
DMC13	0,9172	0,8746	0,1400	0,0700
Kontrol OD: 0,0426				



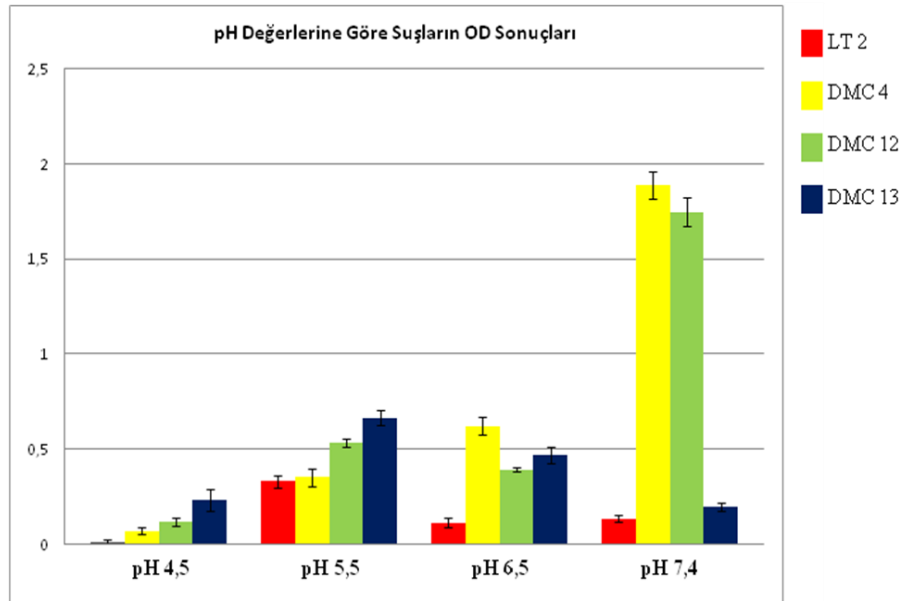
Şekil 4.13 İnkübasyon sıcaklığının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün)

Çizelge 4.11 pH'nın biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin ölçümü (1. gün)

pH:4,5	OD_(ortalama)	OD_(ortalama)- Kontrol_(ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,0667	0,0129	0,0378	0,0098
DMC4	0,1254	0,0716	0,0461	0,0163
DMC12	0,1723	0,1185	0,0638	0,0192
DMC13	0,2870	0,2332	0,1490	0,0560
Kontrol OD: 0,0538				
pH:5,5	OD_(ortalama)	OD_(ortalama)- Kontrol_(ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,3597	0,3304	0,1001	0,0350
DMC4	0,3819	0,3526	0,1200	0,0450
DMC12	0,5603	0,5310	0,0532	0,0217
DMC13	0,6958	0,6665	0,0938	0,0383
Kontrol OD: 0,0293				

Çizelge 4.11 pH'nın biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün) (devam)

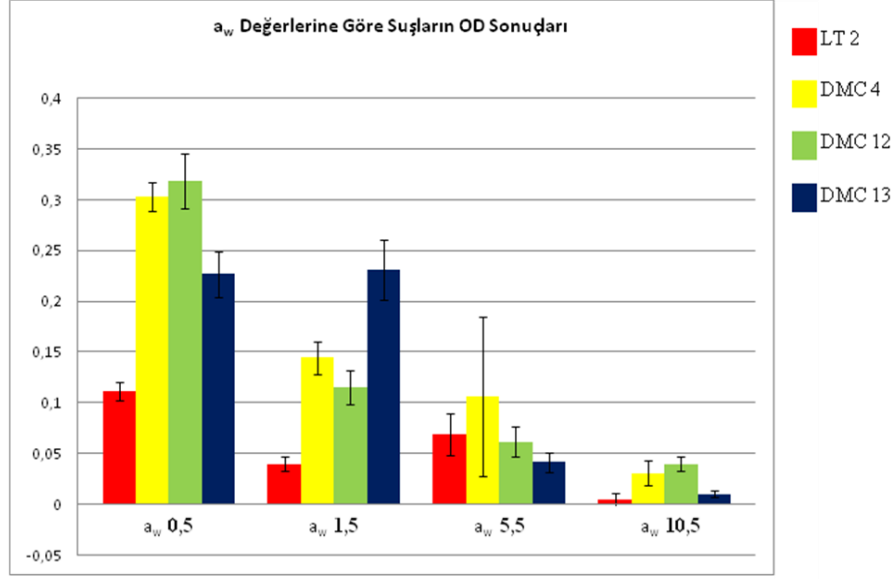
pH: 6,5	OD_(ortalama)	OD_(ortalama)- Kontrol_(ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,1705	0,1136	0,0717	0,0254
DMC4	0,6582	0,6236	0,0917	0,0458
DMC12	0,4280	0,3934	0,0343	0,0121
DMC13	0,5045	0,4699	0,1280	0,045
Kontrol OD: 0,0346				
pH:7,4	OD_(ortalama)	OD_(ortalama)- Kontrol_(ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,1597	0,1351	0,0483	0,0171
DMC4	1,9113	1,8867	0,1742	0,0711
DMC12	1,7722	1,7476	0,2060	0,0730
DMC13	0,2203	0,1957	0,0850	0,0212
Kontrol OD: 0,0246				



Şekil 4.14 pH'nın biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün)

Çizelge 4.12 Farklı NaCl konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün)

% 0,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,1460	0,1113	0,0238	0,0089
DMC4	0,3379	0,3032	0,0390	0,0138
DMC12	0,3531	0,3184	0,0774	0,0274
DMC13	0,2613	0,2266	0,0592	0,0223
Kontrol OD: 0,0347				
% 1,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,0660	0,0397	0,0207	0,0073
DMC4	0,1706	0,1444	0,0464	0,0164
DMC12	0,1411	0,1149	0,0443	0,0167
DMC13	0,2569	0,2306	0,0839	0,0297
Kontrol OD: 0,0262				
% 5,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,1082	0,0695	0,0505	0,0206
DMC4	0,1447	0,1060	0,2209	0,0783
DMC12	0,1005	0,0618	0,0415	0,0147
DMC13	0,0802	0,0415	0,0274	0,0097
Kontrol OD: 0,0387				
% 10,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,0245	0,0050	0,0191	0,0067
DMC4	0,0505	0,0310	0,0342	0,0121
DMC12	0,0591	0,0396	0,0203	0,0072
DMC13	0,0299	0,0104	0,0074	0,0026
Kontrol OD: 0,0195				



Şekil 4.15 Farklı NaCl konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (1. gün)

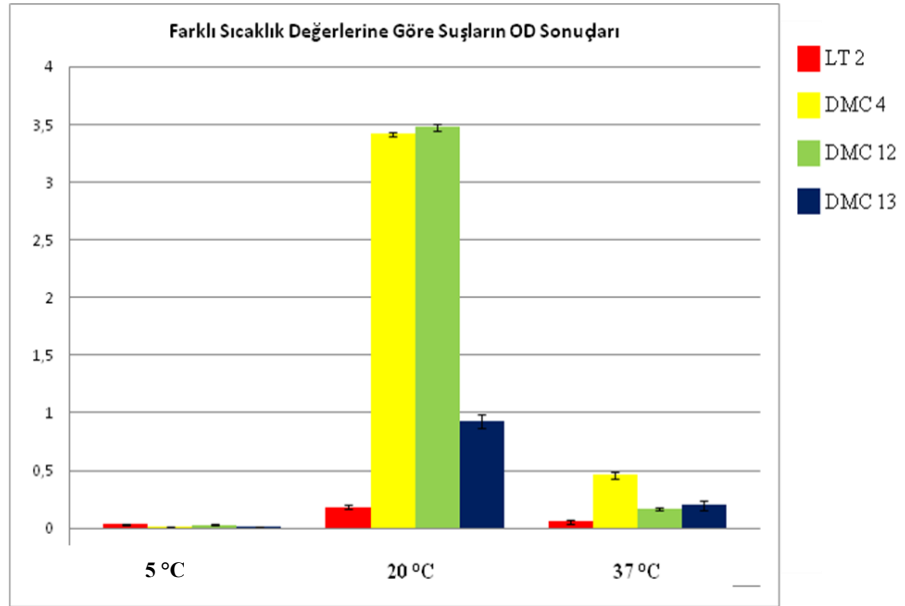
Çizelge 4.13 İnkübasyon sıcaklığının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün)

5 °C	OD _(Ortalama)	OD _(Ortalama) - Kontrol _(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,0634	0,0312	0,0235	0,0083
DMC4	0,0396	0,0074	0,0178	0,0046
DMC12	0,0616	0,0294	0,0206	0,0051
DMC13	0,0373	0,0051	0,0201	0,0052
Kontrol OD: 0,0322				
20 °C	OD _(Ortalama)	OD _(Ortalama) - Kontrol _(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,2133	0,1823	0,0686	0,0207
DMC4	3,449	3,418	0,0712	0,0197
DMC12	3,5095	3,4785	0,0867	0,0274
DMC13	0,9576	0,9266	0,1491	0,0564
Kontrol OD: 0,0310				

Çizelge 4.13 İnkübasyon sıcaklığının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün)(devam)

37 °C	OD _(Ortalama)	OD _(Ortalama) - Kontrol _(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,0828	0,0565	0,0485	0,0172
DMC4	0,4899	0,4636	0,0860	0,0305
DMC12	0,1934	0,1671	0,0497	0,0124
DMC13	0,2255	0,1992	0,1081	0,0383

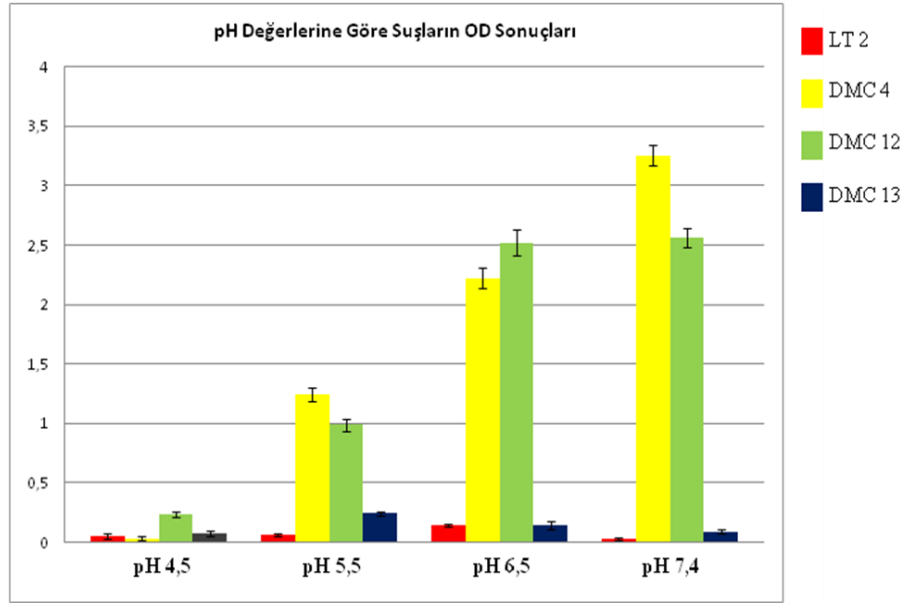
Kontrol OD: 0,0263



Şekil 4.16 İnkübasyon sıcaklığının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün)

Çizelge 4.14 pH'nın biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün)

pH:4,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,0943	0,0503	0,0513	0,0194
DMC4	0,0781	0,0341	0,0359	0,0136
DMC12	0,2780	0,234	0,0762	0,0270
DMC13	0,1162	0,0722	0,0581	0,0206
Kontrol OD: 0,044				
pH:5,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,1130	0,0657	0,0395	0,0109
DMC4	1,2928	1,2455	0,1586	0,0529
DMC12	1,0357	0,9884	0,5600	0,0553
DMC13	0,2902	0,2429	0,0586	0,0177
Kontrol OD: 0,0473				
pH: 6,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,2031	0,1446	0,3041	0,0109
DMC4	2,2827	2,2242	0,3120	0,0900
DMC12	2,5801	2,5216	0,3390	0,113
DMC13	0,203	0,1445	0,0515	0,0297
Kontrol OD: 0,0585				
pH:7,4	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,076	0,0280	0,0360	0,0136
DMC4	3,3037	3,2557	0,2345	0,0886
DMC12	2,6114	2,5634	0,2940	0,0849
DMC13	0,1385	0,0905	0,0219	0,0155
Kontrol OD: 0,0480				



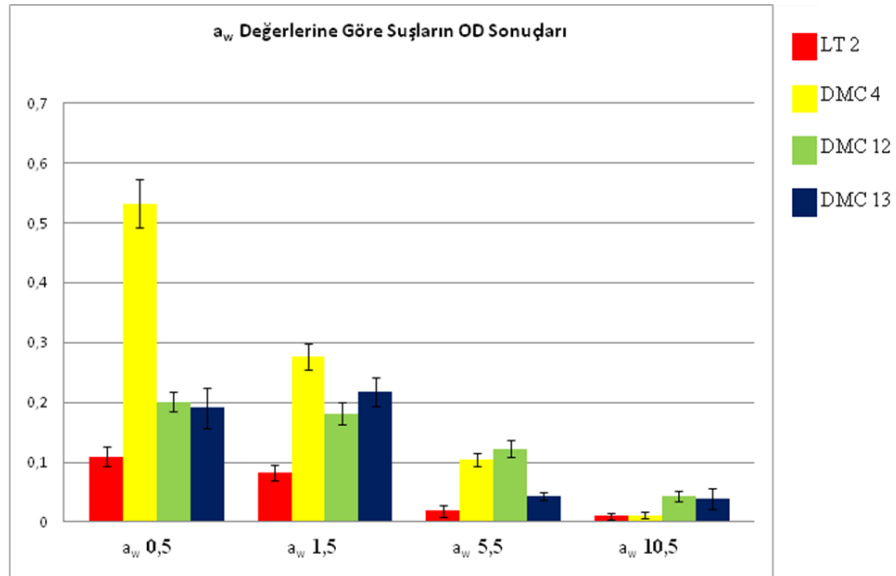
Şekil 4.17 pH'nın biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün)

Çizelge 4.15 Farklı NaCl konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün)

% 0,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,1728	0,1092	0,0652	0,0163
DMC4	0,5961	0,5325	0,1594	0,0412
DMC12	0,2647	0,2011	0,0636	0,0164
DMC13	0,2549	0,1913	0,1267	0,0340
Kontrol OD: 0,0636				
% 1,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,1171	0,0826	0,0548	0,0137
DMC4	0,3109	0,2764	0,0813	0,0217
DMC12	0,2156	0,1811	0,0716	0,0185
DMC13	0,2521	0,2176	0,0834	0,0231
Kontrol OD: 0,0345				

Çizelge 4.15 Farklı NaCl konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün) (devam)

% 5,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,0686	0,0188	0,0387	0,0097
DMC4	0,1544	0,1046	0,0430	0,0107
DMC12	0,1728	0,1230	0,0532	0,0147
DMC13	0,0932	0,0434	0,0233	0,0060
Kontrol OD: 0,0498				
% 10,5	OD_(Ortalama)	OD_(Ortalama)- Kontrol_(Ortalama)	Standart Sapma	Standart Hata
LT2	0,0536	0,0101	0,0232	0,0058
DMC4	0,0547	0,0112	0,0227	0,0057
DMC12	0,0872	0,0437	0,0335	0,00838
DMC13	0,0823	0,0388	0,0698	0,0180
Kontrol OD: 0,0435				



Şekil 4.18 A_w değerinin biyofilm oluşumu üzerine etkisi (2. gün)

Seçilen sıcaklık değerlerinin polistiren plaklarda farklı biyofilm morfortipleri üzerindeki etkilerine bakıldığında (2. gün sonunda) morfortipler arasında farklılık istatistiksel anlamda oldukça önemli bulunmuştur ($p<0,01$). İnkübasyon süresinin biyofilm miktarı üzerindeki etkisine bakıldığında 2. günün biyofilm üretimi için kritik olduğu anlaşılmıştır. Farklı morfortip içeren suşların 1. ve 2. gün sonundaki biyofilm miktarları arasındaki fark değerlendirildiğinde, önemli artışın, özellikle DMC4 ve DMC12 kodlu suşlarda, olduğu saptanmıştır (LT2 suşunda 0.26, DMC4 suşunda 3.25, DMC12 suşunda 6.87, DMC13 suşunda 1.29 katlık artışlar). Çalışılan suşlarda 5 °C’de biyofilm üretiminin neredeyse gerçekleşmediği, 20 °C’de ise tüm morfortiplerde biyofilm üretiminin optimum düzeye ulaştığı saptanmıştır. 20 °C’de DMC4 (rdar morfortipi) ve DMC12 (bdar morfortipi) kodlu suşların ürettiği biyofilm miktarları birbirine yakın bulunmuştur (sırasıyla OD: 3,418 ve 3,4785). 37 °C’de ise DMC12 ve DMC13 kodlu suşların dışında diğer suşların biyofilm değerlerinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). 2. günün sonunda bu sıcaklıktaki en yoğun biyofilm üretimi, DMC4 kodlu suşta tespit edilmiştir. Bu sıcaklıktaki biyofilm miktarlarına 1. gün sonunda bakıldığında en yoğun biyofilm üretiminin DMC13 kodlu suşta olduğu ancak 2. günün sonunda bu suşun biyofilm miktarında yaklaşık 3.39 katlık bir azalma olduğu saptanmıştır. “pdar” morfortipi içeren bu suşun 37 °C’de artan inkübasyon süresine bağlı olarak biyofilm miktarının önemli ölçüde azalması dikkate değerdir ve bu durum sıcaklık değerlerinin farklı *Salmonella* biyofilmlerinin oluşumu üzerindeki etkilerinin anlaşılmasının yanı sıra olgunlaşan biyofilm yapılarından gerçekleşen kopmaların anlaşılması için de ileri araştırmaların yapılmasını gerektirmektedir. Standart suş olarak seçilen *S. Typhimurium* LT2 suşunda ölçülen değerler, diğer suşların değerlerine kıyasla oldukça düşük bulunmuştur (Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.13).

pH değerlerinin etkileri değerlendirildiğinde (2.gün sonunda); pH 4,5 değerinde, çok düşük bir biyofilm üretimi saptanırken, DMC12 kodlu suşun ölçüm değeri diğer suşlara kıyasla yüksek bulunmuştur (OD: 0,0762). Artan pH değerlerine göre DMC4, DMC12 kodlu suşların biyofilm miktarlarında genel bir artış meydana gelmiştir. 1. günün sonunda DMC13 kodlu suşun ürettiği biyofilm miktarı pH 5,5 değerinde, diğer suşların değerlerinden yüksek bulunmuştur. 2. günün sonunda DMC12 kodlu suşun pH 6,5’te ve 7,4’te ölçülen değerleri farklı bulunmamıştır (sırasıyla OD: 2,52 ve 2,56). Seçilen pH

değerlerindeki ölçüm sonuçları, morfotiplerin 20 °C'deki (pH:7,0) değerleriyle karşılaştırıldığında polistiren plaklar üzerinde biyofilm oluşumu için en ideal pH değerinin 7,0 olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.13-4.14).

Farklı konsantrasyonlarda NaCl bulunduran ortamlarda, değişen hücre yüzey özellikleri ve biyofilm dağılımları arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu ilişki artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak azalan hücre hidrofobitesine dayanmaktadır. Yüksek hidrofobite, yüzeylerde biyofilm oluşumu için son derece önemliyken artan NaCl konsantrasyonu hücre adezyonunu engellemektedir (Xu vd. 2010). Tüm su aktivitesi (A_w) etkileri biyofilm oluşumunu önemli ölçüde kesintiye uğratmıştır. Özellikle besiyerindeki yüksek NaCl derişimi (A_w :10,5) hücrelerin polistiren yüzeylere tutunup biyofilm oluşturmalarını neredeyse tamamen engellemiştir (Çizelge 4.15).

pH değişimlerinden ve farklı tuz derişimleriyle belirlenen su aktivitesinden, gıda bozulmalarının ve gıda kaynaklı hastalıkların önüne geçilmesinde ve gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasında yararlanılmaktadır. Özellikle geleneksel tuzlama yöntemi (NaCl) gıda kaynaklı patojenlerin ve gıda bozulmalarına sebep olan mikroorganizmaların öldürülmesinde ya da gelişmelerinin önlenmesinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (Doyle ve Glass 2010). Bu sonuçlar neticesinde gıdalar üzerinde de biyofilm oluşturabildiği bilinen *Salmonella*'nın gıda yüzeylerindeki biyofilmlerinin engellenmesinde tuzlama ve pH etkileri gözetilerek gıda korumasına katkıda bulunulabilir.

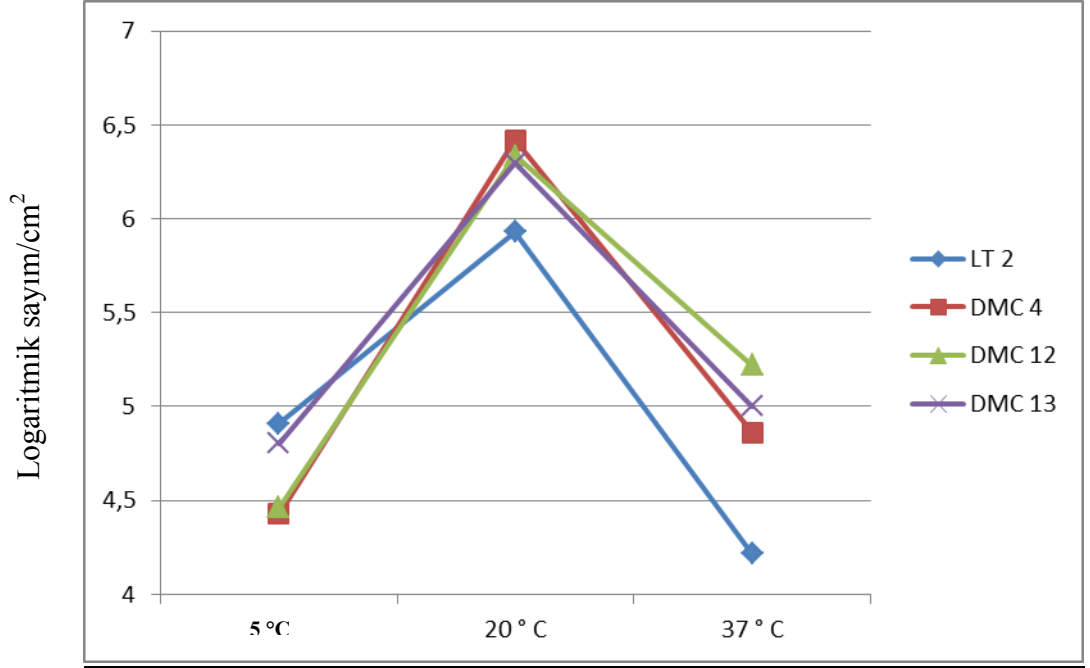
4.6 Çelik Kuponlar Üzerinde Farklı Sıcaklık, Su ve pH Uygulamalarının Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkileri

Bu çalışmada farklı biyofilm morfotipi içeren üç adet suş (DMC4; *S. Typhimurium* (rdar morfotipi), DMC12; *S. Infantis* (bdar morfotipi), DMC13; *S. subsp. Roughform* (pdar morfotipi)) ve bir adet standart suş (*S. Typhimurium* LT2) farklı etkiler altında çelik kupon yüzeylere tutunup biyofilm oluşturma özelliklerine göre değerlendirilmiştir.

Paslanmaz çelik kupon yüzeylerine tutunma araştırmalarında önemli sıcaklık değerleri olan 5 °C, 20 °C (fabrika koşullarındaki ortalama sıcaklık) ve 37 °C değerlerinin etkilerinin sonuçları Çizelge 4.16'da ve Şekil 4.19'da verilmiştir. Farklı pH ve NaCl konsantrasyon (A_w) değerlerinin etkileri ise çizelge 4.17-4.18 ve Şekil 4.20-Şekil 4.21'de verilmiştir. Biyofilm yanıtları için farklı stres koşullarında elde edilen tüm sonuçlar, her bir suşun kontrol gruplarıyla da kıyaslanmıştır. Kontrol gruplarının sonuçları, farklı morfotiplerin sıcaklık denemelerinde NaCl'siz LB broth ortamında 20 °C'deki sonuçları baz alınarak oluşturulmuştur.

Çizelge 4.16 Seçilen morfotiplerin farklı sıcaklık değerlerinde çelik kupon yüzeylerine tutunma özellikleri

5 °C			
Suş Kodu	kob/4 cm²	kob/cm²	log/cm²
LT 2	3,26x10 ⁵	8,15x10 ⁴	4,911
DMC4	1,07x10 ⁵	2,675x10 ⁴	4,427
DMC12	1,16x10 ⁵	2,9x10 ⁴	4,462
DMC13	2,55x10 ⁵	6,375x10 ⁴	4,804
20 °C			
Suş Kodu	kob/4 cm²	kob/cm²	log/cm²
LT 2	3,4x10 ⁶	8,5x10 ⁵	5,929
DMC4	1,05x10 ⁷	2,625x10 ⁶	6,419
DMC12	8,7x10 ⁶	2,175x10 ⁶	6,337
DMC13	7,9x10 ⁶	1,975x10 ⁶	6,296
37 °C			
Suş Kodu	kob/4 cm²	kob/cm²	log/cm²
LT 2	6,6x10 ⁴	1,65x10 ⁴	4,217
DMC4	2,92x10 ⁵	7,3x10 ⁴	4,863
DMC12	6,62x10 ⁵	1,655x10 ⁵	5,219
DMC13	4,0x10 ⁵	1,0x10 ⁵	5,0



Şekil 4. 19 Seçilen morfotiplerin farklı sıcaklıklarda çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşturma özellikleri

Çizelge 4.17 Seçilen morfotiplerin farklı pH değerlerinde çelik kupon yüzeylerine tutunma sonuçları

pH: 4,5

Suş Kodu	kob/4 cm ²	kob/cm ²	log/cm ²
LT 2	5,5x10 ⁵	1,375x10 ⁵	6,138
DMC 4	1,9x10 ⁶	4,75x10 ⁵	5,677
DMC 12	3,3x10 ⁶	8,25x10 ⁵	5,916
DMC 13	4,4x10 ⁶	1,1x10 ⁶	6,041

pH: 5,5

Suş Kodu	kob/4 cm ²	kob/cm ²	log/cm ²
LT 2	2,2x10 ⁶	5,5x10 ⁵	5,74
DMC 4	1,1x10 ⁶	2,25x10 ⁵	5,439
DMC 12	3,72x10 ⁶	9,3x10 ⁵	5,968
DMC 13	6,1x10 ⁶	1,525x10 ⁶	6,183

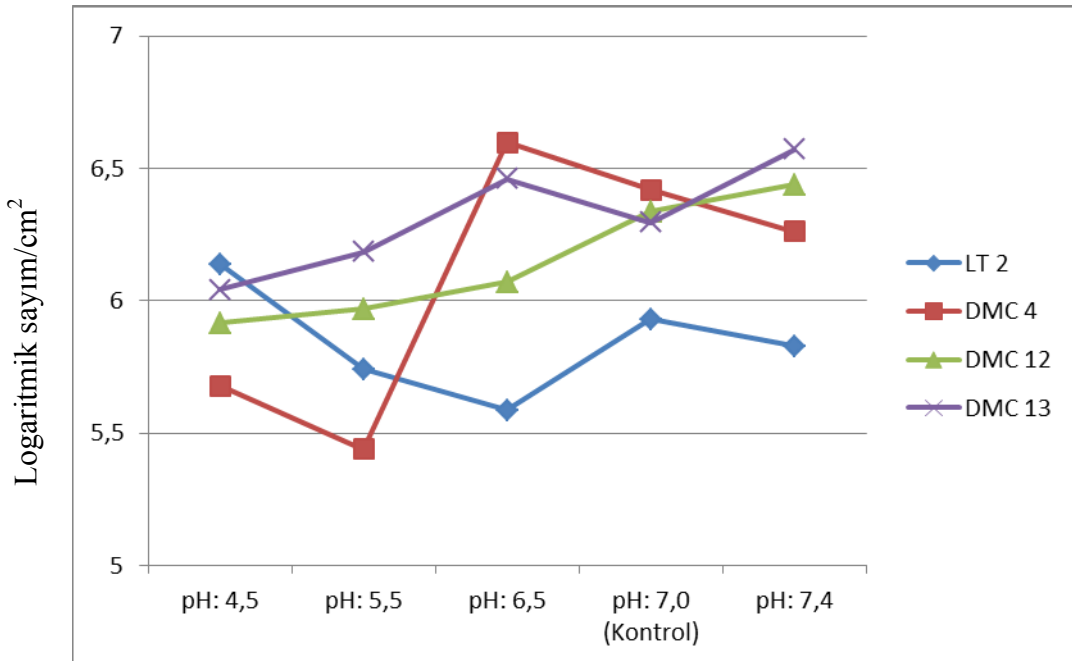
Çizelge 4.17 Seçilen morfotiplerin farklı pH değerlerinde çelik kupon yüzeylerine tutunma sonuçları (devam)

pH: 6,5

Suş Kodu	kob/4 cm ²	kob/cm ²	log/cm ²
LT 2	1,54x10 ⁶	3,85x10 ⁵	5,585
DMC 4	1,58x10 ⁷	3,95x10 ⁶	6,597
DMC 12	4,69x10 ⁶	1,1725x10 ⁶	6,069
DMC 13	1,15x10 ⁷	2,875x10 ⁶	6,459

pH: 7,4

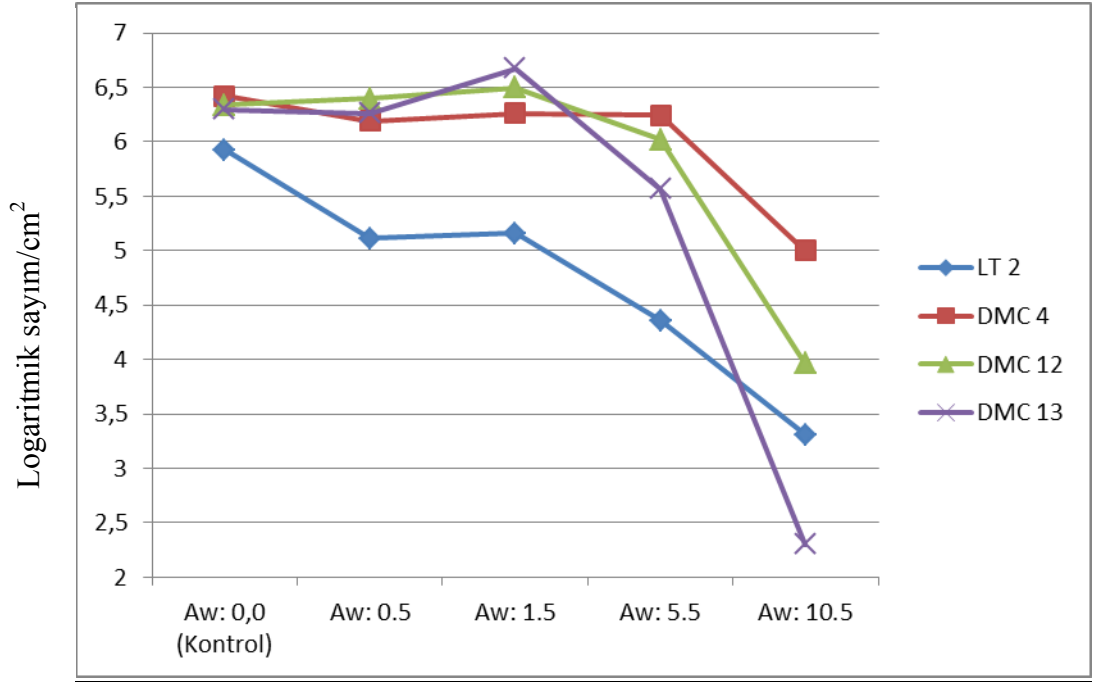
Suş Kodu	kob/4 cm ²	kob/cm ²	log/cm ²
LT 2	2,7x10 ⁶	6,75x10 ⁵	5,829
DMC 4	7,3x10 ⁶	1,825x10 ⁶	6,261
DMC 12	1,1x10 ⁷	2,75x10 ⁶	6,439
DMC 13	1,49x10 ⁷	3,725x10 ⁶	6,571



Şekil 4.20 Seçilen morfotiplerin farklı pH değerlerinde çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşturma özellikleri

Çizelge 4.18 Seçilen morfotiplerin farklı NaCl konsantrasyon (A_w) değerlerinde çelik kupon yüzeylerine tutunma özellikleri

% 0,5			
Suş Kodu	kob/4 cm²	kob/cm²	log/cm²
LT 2	4,2x10 ⁵	1,3x10 ⁵	5,114
DMC4	6,2x10 ⁶	1,55x10 ⁶	6,19
DMC12	1,0x10 ⁷	2,5x10 ⁶	6,398
DMC13	7,3x10 ⁶	1,825x10 ⁶	6,261
% 1,5			
Suş Kodu	kob/4 cm²	kob/cm²	log/cm²
LT 2	5,8x10 ⁵	1,45x10 ⁵	5,161
DMC4	7,3x10 ⁶	1,825x10 ⁶	6,261
DMC12	1,25x10 ⁷	3,125x10 ⁶	6,495
DMC13	1,9x10 ⁷	4,75x10 ⁶	6,677
% 5,5			
Suş Kodu	kob/4 cm²	kob/cm²	log/cm²
LT 2	1,11x10 ⁵	2,775x10 ⁴	4,443
DMC4	7,0x10 ⁶	1,75x10 ⁶	6,243
DMC12	4,21x10 ⁶	1,0525x10 ⁶	6,022
DMC13	1,47x10 ⁶	3,675x10 ⁵	5,565
% 10,5			
Suş Kodu	kob/4 cm²	kob/cm²	log/cm²
LT 2	8,2x10 ³	2,05x10 ³	3,312
DMC4	4,0x10 ⁵	1,0x10 ⁵	5,0
DMC12	3,7x10 ⁴	9,25x10 ³	3,966
DMC13	8,0x10 ²	2,0x10 ²	2,301



Şekil 4.21 Seçilen morfortiplerin farklı NaCl konsantrasyon (A_w) değerlerinde çelik kupon yüzeylerinde biyofilm oluşturma özellikleri

Mikrobiyel biyofilmler, gıda işleme süreçlerinde istenmeyen oluşumlardır. *Salmenella*, *Pseudomonas*, *Campylobacter* ve *E. coli* gibi patojenlerin potansiyel gıda temas yüzeylerinde biyofilm oluşturabildiği rapor edilmiştir (Somers vd 1994, Brown vd. 1995, Dhir ve Dodd 1995, Humprey vd. 1995, Jones ve Bradshaw 1996, Morin vd. 1996). Bu çalışma, temizlenmesi kolay olan, kimyasal korozyondan fazla etkilenmeyen ve potansiyel bir gıda temas yüzeyi olan paslanmaz çelik yüzeylerde farklı *Salmonella* biyofilm morfortipi içeren suşların biyofilm oluşturma kabiliyetlerini anlamak için yapılmıştır. Yöntem kendi içerisinde bazı handikaplar bulundurmaktadır. Farklı yüzeylerdeki biyofilm çalışmalarında yüzeye tutunmuş biyofilmin istikrarlı bir hücre sayımı için etkin bir şekilde yüzeyden uzaklaştırılması esastır. Paslanmaz çelik kupon yüzeylerinde bulunması muhtemel çatlaklarda, yarıklarda ve korozyon bölgelerindeki biyofilmlerin uzaklaştırılması oldukça zordur (Holah vd. 1990, Dhaliwal vd. 1992, Flint vd. 1997).

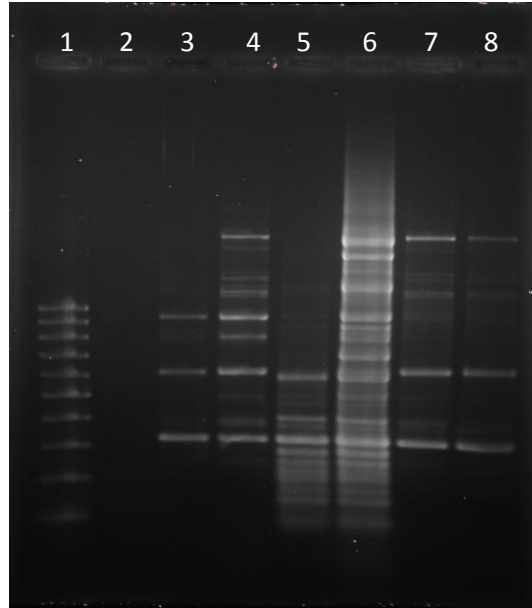
Salmonella türleri tarafından çelik yüzeylerde biyofilm oluşumu dinamik bir süreç olup, bu türlerin tutunması ve yüzeylerde biyofilm oluşturması farklı mekanizmalarla ilişkilidir (Rickard vd. 2003). Farklı stres koşullarının etkilerinin sonuçları değerlendirildiğinde; farklı *Salmonella* morfotiplerinin çelik yüzeylerde biyofilm üretimi için en ideal sıcaklık değerinin 20 °C olduğu saptanmıştır. pH değerlerinin biyofilm oluşumu üzerine etkileri değişkenlik gösterirken en ideal değerlerin pH 6,5 ile 7,4 arasında olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.19-4.20).

Fabrikalardaki rutin temizlik ve dezenfeksiyon prosedürleri yüzeyler üzerindeki biyofilm yapılarında mevcut bakterilerin sayısını azaltabilir. Ancak yüzey üzerindeki biyofilmin tamamen uzaklaştırılması ve etkisiz hale getirilmesi oldukça zordur. Bu nedenle, yüzey materyallerinin seçimine ve bu yüzeylerin temizlik ve dezenfeksiyonuna biyofilm varlığını asgari düzeye indirmek için dikkat edilmelidir (Knight ve Craven 2010).

Avrupa Standardizasyon Komitesi (CEN) bünyesindeki Teknik Komite 216 (TC 216), dezenfektanların etkilerinin değerlendirilmesi için üç fazlı bir test yaklaşımını önermektedir (Gibson vd. 1995, Van Klingeren vd. 1998, Luppens vd. 2002). Bu değerlendirme; dezenfektanın ilk olarak uygun koşullar altında süspansiyon içerisindeki bakterilere (faz 1) ve yüzeyler üzerindeki bakterilere karşı etkilerini (faz 2) ve son olarak dezenfektanın pratik kullanım durumunun belirlenmesini kapsamaktadır (faz 3). TC 216 tarafından, yüzeyler üzerindeki Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin etkisiz hale getirilmesi için geliştirilen yüzey dezenfektan testinin gelişen biyofilm yapılarını önlemede bazı sınırları vardır. Bu nedenle bu standart test, bazı modifikasyonlar gerektirmektedir (Holah, 1998). Buna bağlı olarak Türkiye kökenli *Salmonella* suşlarının farklı morfotiplerinin biyofilm oluşturma dinamikleri göz önünde bulundurularak, fabrika koşullarını ihtiva eden bir model sistem tasarlanıp, çok çeşitli fabrika çalışma yüzeylerinde (özellikle paslanmaz çelik) biyofilm gelişimine ve biyofilmin etkisizleştirilmesine yönelik araştırmalar yapılmalıdır.

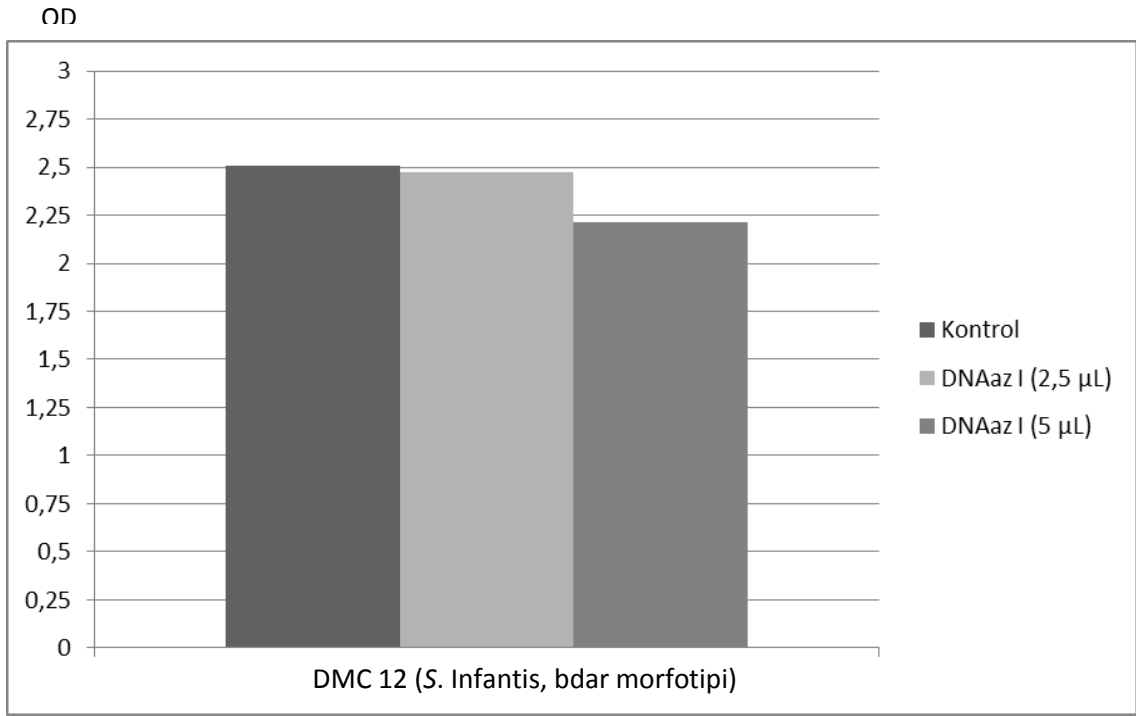
4.7 Hücre Dışı DNA'nın Biyofilm Oluşumuna Katkısı

Wilson vd. (2001) tarafından önerilen yöntem kullanılarak genomik DNA ve hücre dışı DNA izolasyonları yapılan 3 farklı biyofilm morfolopine dahil DMC4, DMC12 ve DMC13 kodlu *Salmonella* suşlarının RAPD-PZR analizi yapılarak farklılıklarının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. RAPD-PZR analizine ilave olarak mikrotitre plaklardaki 2 günlük biyofilmler üzerine DNAaz I muamelesi yapılarak hücre dışı DNA'nın *Salmonella*'nın biyofilm yapısına muhtemel bir yapısal katkısının olup olmadığı araştırılmıştır. RAPD-PZR ve mikrotitre sonuçları Şekil 4.22 ve 4.23'te verilmiştir. DNAaz I uygulaması sonucunda yalnızca DMC12 (bdar morfolopi) kodlu suşun biyofilm miktarında azalma görülmüştür.



Şekil 4.22 Hücre dışı ve genomik DNA'ların RAPD-PZR profilleri

1. Marker (100 bp)
2. Negatif kontrol
3. DMC4 hücre dışı DNA
4. DMC4 genomik DNA
5. DMC12 hücre dışı DNA
6. DMC12 genomik DNA
7. DMC13 hücre dışı DNA
8. DMC13 genomik DNA



Şekil 4.23 DNAaz I uygulaması sonucunda DMC12 suşunun biyofilm miktarındaki değişim

Hücre dışı DNA'nın (eDNA) olgun biyofilmlerin yapısallığına katkıda bulunduğu daha önceki çalışmalarla saptanmıştır (Withchurch vd. 2002). Hücre dışı DNA'nın gen transferine ve oligotrofik koşullarda biyofilm hücrelerine besinsel katkı sağladığı da bilinmektedir (Finkel vd. 2001, Molin vd. 2003). Yine de hücre dışı DNA'nın, tek türün ya da birçok türün bir araya gelerek oluşturduğu biyofilmlere sağladığı katkılarla ilgili sorular güncelliğini sürdürmektedir. Biyofilm yapılarındaki hücre dışı DNA varlığı *E. coli* gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde de kanıtlanmıştır. *E. coli*'deki hücre dışı DNA'nın hem biyofilmin yapısallığına hem de çeşitli antibiyotiklerin DNAaz I ile birlikte biyofilmler üzerine uygulanması sonucunda biyofilm içerisindeki bakterilerin antibiyotiklere karşı daha duyarlı hale gelmelerinden ötürü antimikrobiyel dirençliliğe de katkı sağladığı ileri sürülmüştür (Tetz vd. 2009).

Salmonella türlerine ait biyofilmlerin yapılarındaki muhtemel hücre dışı DNA varlığı daha ileri araştırmalarla aydınlatılmayı gerektirmektedir. Bu çalışmada hücre dışı DNA varlığını kanıtlamak için yapılan analizler yeterli değildir. Biyofilm matriksinden etkin

bir şekilde hücre dışı DNA izolasyonu ve olası genomik DNA bulaşısını asgari düzeye indirmek için enzimatik izolasyon yöntemleri gibi daha etkin yöntemler tercih edilmelidir (Wu ve Xi 2009).

5. SONUÇ

Türkiye kaynaklı *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşturma karakteristikleri, biyofilm analizlerinde yaygın olarak kullanılan metotlarla incelenmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda baskın biyofilm morfotipinin “rdar” morfotipi olduğunun anlaşılması ve suşların çoğunun yoğun biyofilm üreticisi suşlar olarak tespit edilmesi Türkiye’deki endüstriyel sanitasyon süreçlerinin daha titiz bir şekilde yapılmasını gerekli kılmaktadır.

Yapılan çalışmalar tıbbi ve endüstriyel önemi fazla olan *Salmonella* suşlarının biyofilmlerine yönelik ulusal düzeyde ilk çalışmalardan biri olmakla birlikte, ülkemiz gıda endüstrisi için önemli katkılar sağlayabilecek ileri çalışmalar için öncü niteliktedir. Bu çalışmadan sonraki aşamalarda, karmaşık komünite yapısı sergileyen biyofilm yapıları içerisinde *Salmonella*’nın diğer enterik bakterilerle olan ilişkilerinin, komünite içerisindeki organizasyon ve davranışlarının anlaşılmasına yönelik çalışmalar planlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Ahmer, B.M., van Reeuwijk, M., Timmers, C.D, Valentine, P.J. and Heffron F. 1998. *Salmonella* Typhimurium encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. *Journal of Bacteriology*, Vol. 180; pp. 1185-1193.
- Ahmer, B.M. 2004. Cell-to-cell signaling in *Echerichia coli* and *Salmonella* Enterica. *Molecular Microbiology*, Vol. 52; pp. 933-945.
- Altier, C., Suyemoto, M. and Lawhon, S. D. 2000. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by csrA. *Infect Immun*, Vol. 68; pp. 6790–6797.
- Anonymous. 2002. Web sitesi, www.microbelibrary.org. Erişim Tarihi: 04.05.2010.
- Anriany, Y.A., Weiner, R.M., Johnson, J.A., De Rezende, C.E. and Joseph, S.W. 2001. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Displays a Rugose Phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67(9); pp. 4048-4056.
- Aparna, M.S. and Yadav, S. 2008. Biofilms: Microbes and diseases. *Braz J. Infect Dis*, Vol. 12; pp. 526-530.
- Austin, J.W., Sanders, G., Kay, W.W. and Collinson, S.K. 1998. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, Vol. 162; pp. 295-301.
- Avsaroglu, D. 2007. Isolation, molecular characterization of food-borne drug resistant *Salmonella* spp. and detection of class I integrons. PhD Thesis, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, 153 p., Ankara.
- Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C. and Lee, C. A. 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression. *Mol Microbiol*, Vol. 22; pp. 703-714.
- Barnhart, M.M. and Chapman, M.R. 2006. Curli Biogenesis and Function. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 60; pp. 131-147.
- Bassler, B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 2; pp. 582-587.
- Beeston, A.L. and Surette, M.G. 2001. *pfs*-Dependent Regulation of Autoinducer 2 Production in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, Vol. 184(13); pp. 3450-3456.
- Beloin, C. and Ghigo, J.M. 2005. Finding gen-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in Microbiol*, Vol. 13; pp. 16-19.

- Boddicker, J.D., Ledebauer, N.A., Jagnow, J., Jones, B.D., and Clegg, S. 2002. Differential binding to and biofilm formation on HEp-2 cells by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the *fimH* gene of the *fim* gene cluster. *Molecular Microbiology*, Vol. 45(5); pp. 1255-1265.
- Boddicker, J.D., Knosp, B. M. and Jones, B.D. 2003. Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, *hilA*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. *J Bacteriol* Vol. 185; pp. 525-533.
- Bradshaw, D.J. and Marsh, P.D. 1999. Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms. *Methods Enzymol*, Vol. 310; pp. 279-296.
- Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L. and Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiol*, Vol. 13; pp. 20-26.
- Brand, M.T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 44; pp. 367-392
- Brown, M.L., Aldrich, H.C. and Gauthier, J.J. 1995. Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61(1); pp. 187-193.
- Burnett, S.L. and Beuchat, L.R. 2000. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J Ind Microbiol Biotech*, Vol. 25; pp. 281-287.
- Carpentier, B. and Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 75; pp. 499-511.
- Cegelski, L., Pinkner, J.S., Hammer, N.D., Cusumano, C.K., Hung, C.S., Chorell, E., Åberg, V., Walker, J.N., Seed, P.C., Almqvist, F., Chapman M.R. and Hultgren, S.C. 2009. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chemical Biology*, Vol. 5; pp. 913-919.
- Characklis, W. G. 1973. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research*, Vol. 7(9); pp. 1249-1258.
- Chilcott, G. S. and Hughes, K. T. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, Vol. 64; pp. 694-708.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D.M. and Beachey, D.M. 1985. Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates; a quantitative model for the adherence *staphylococci* to medical devices. *J. Clin. Microbiology*, Vol. 22; pp. 996-1006.

- Clarke, M. B. and Sperandio, V. 2005. Transcriptional regulation of flhDC by QseBC and sigma (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, Vol. 57; pp. 1734-1749.
- Collinson, S.K., Emody, L., Muller, K.H., Trust, T.J. and Kay, W.W. 1991. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella* Enteritidis. *J Bacteriol*, Vol. 173; pp. 4773-4781.
- Cook, K.A., Dobbs, T.E., Hlady, W.G., Wells, J.G., Barrett, T.J., Puhr, N.D., Lancette, G.A., Bodager, D.W., Toth, B.L., Genese, C.A., Highsmith, A.K., Pilot, K.E., Finelli, L. and Swerdlow, D. 1998. Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice. *Jama*, Vol. 280; pp. 1504-1509.
- Costerton, J.W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. and Marrie, T. J. 1987. Bacterial Biofilms in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 41; pp. 435-464.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappinscott, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 49; pp. 711-745.
- Costerton, J.W. 1999. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob*, Vol. 11; pp. 217-221.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E. P. 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, Vol. 284; pp. 1318-1322.
- Crump, J.A., Griffin, P.M. and Angulo, F.J. 2002. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clin Infect Dis*, Vol. 35; pp. 859-865.
- Danese, P.N., Pratt, L.A. and Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J of Bacteriol* Vol. 182; pp. 3593-3596.
- Darwin, K.H. and Miller, V.L. 1999. InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPII type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, Vol. 181; pp. 4949-4954.
- Darwin, K.H. and Miller, V.L. 2001. Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J*, Vol. 20; pp. 1850-1862.
- Davey, M.E. and O'toole, G.A. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 64(4); pp. 847-867.
- De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. and Lewandowski, Z. 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 43(11); pp. 1131-1138.

- De Keersmaecker, S.C.J., Sonck, K. and Vanderleyden, J. 2006. Let LuxA speak up in AI-2 signalling. *Trends Microbiol*, Vol. 14; pp. 114-119.
- Deighton, M.A. and Balkau, B. 1990. Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 28(11); pp. 2442-2447.
- Dhaliwal, D.S., Cordier, J.L. and Cox, L.J. 1992. Impedimetric evaluation of the efficiency of disinfectants against biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 15(5); pp. 217-221.
- Dhir, V.K. and Dodd, C.E. 1995. Susceptibility of suspended and surface-attached *Salmonella enteritidis* to biocides and elevated temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61(5); pp. 1731-1738.
- Donlan, R.M. 2001. A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 33 (8); pp. 1387-1392.
- Donlan, R.M. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol*, Vol. 15; pp. 167-193
- Doyle, M.E. and Glass, K.A. 2010. Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality, and Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 9(1); pp. 44-56.
- Dunne, W.M., Jr. 2000. Evaluating adherent bacteria and biofilm using biochemical and immunochemical methods, 273–284. *In* Y. H. An and R. J. Friedman (ed.), *Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications*, 1st ed. Humana Press, Totowa, N.J.
- Finkel, S.E. and Kolter, R. 2001. DNA as a Nutrient: Novel Role for Bacterial Competence Gene Homologs. *Journal of Bacteriology*, Vol. 183(21); pp. 6288-6293.
- Flint, S.H., Bremer, P.J. and Brooks, J.D. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, Vol. 11(1); pp. 81-97.
- Fortune, D. R., Suyemoto, M. and Altier, C. 2006. Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* Vol. 74; pp. 331-339.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria-LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriol*, Vol. 176; pp. 269-275.
- Gerstel, U., Park, C. and Romling, U. 2003. Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Molecular Microbiology*, Vol. 49; pp. 639-654.

- Giaouris, E., Chorianopoulos, N. and Nychas, G.J.E. 2005. Effect of Temperature, pH, and Water Activity on Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on Stainless Steel Surfaces as Indicated by the Bead Vortexing Method and Conductance Measurements. *Journal of Food Protection*, Vol. 68(10); pp. 2149-2154.
- Gilbert, N., Lutz-Prigge, S. and Moran, J.V. 2002. Genomic Deletions Created upon LINE-1 Retrotransposition. *Cell*, Vol. 10(3); pp. 315-325.
- Grande, R., Di Giulio, M., Bessa, L.J., Di Campli, E., Baffoni, M., Guarnieri, S. and Cellini, L. 2011. Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: a backstairs rumour. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 110(2); pp. 490-498.
- Goodier, R. I. and Ahmer, B. M. 2001. SirA orthologs affect both motility and virulence. *J Bacteriol*, Vol. 183; pp. 2249-2258.
- Gophna, U., Barlev, M., Seijffers, R., Oelschläger, T.A., Hacker, J. and Ron, E. Z. 2001. Curli Fibers Mediate Internalization of *Escherichia coli* by Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, Vol. 69(4); pp. 2659-2665.
- Hammer, B.K. and Bassler, B.L. 2003. Quorum sensing controls biofilms formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, Vol. 50; pp. 101-114.
- Heeb, S. and Haas, D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA twocomponent system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* Vol. 14; pp. 1351-1363.
- Helke, D.M. and Wong, A.C.L. 1994. Survival and Growth Characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-N Rubber. *Journal of Food Protection*, Vol. 57(11); pp. 963-968.
- Herwald, H., Mörgelin, M., Olsén, A., Rhen, M., Dahlbäck, B., Müller-Esterl, W. and Björck, L. 1998. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces—a clue to serious complications in infectious diseases. *Nature Medicine*, Vol. 4; pp. 298-302.
- Heydon, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K. and Molin, S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program. *Microbiology*, Vol. 146; pp. 2395-2407.
- Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A. and Miller, S.I. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, Vol. 436; pp. 1171-1175.
- Holah, J.T., Higgs, C., Robinson, S., Worthington, D. and Spenceley, H. 1990. A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 11(5); pp. 255-259.
- Holah, J. T., Lavaud, A., Peters, W. and Dye, K. A. 1998. Future techniques for disinfectant efficacy testing. *Inter Biodet and Biodeg*, Vol. 41(3-4); pp. 273-279.

- Hood, S.K. and Zottola, E.A. 1997. Adherence to stainless stain by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int J Food Microbiol*, Vol. 37; pp.145-153.
- Humphrey, T.J., Slater, E., McAlpine, K., Rowbury, R.J. and Gilbert, R.J. 1995. *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61(8); pp. 3161-3164.
- Jackson, D. W., Simecka, J. W. and Romeo, T. 2002. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J Bacteriol*, Vol. 184; pp. 3406-3410.
- Janssens, J. C. A., Steenackers, H., Robijns, S., Gellens, E., Levin, J., Zhao, H., Hermans, K., De Coster, D., Verhoeven, T. L., Marchal, K., Vanderleyden, J., De Vos, D. E. and De Keersmaecker, S. C. J. 2008. Brominated Furanones INHIBIT Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. and Environmental Microbiology*, Vol. 74(21); pp. 6639-6648.
- Jones, K. and Bradshaw, S.B. 1996. Biofilm formation by the Enterobacteriaceae: a comparison between *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 80(4); pp. 458-464.
- Joseph, B., Ota, S.K., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 64(3); pp. 367-372.
- Kaufman, M.E. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis, *Molecular Bacteriology*, 33-50. Totowa.
- Knight, G.C. and Craven, H.M. 2010. A model system for evaluating surface disinfection in dairy factory environments. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 137(2-3); pp. 161-167.
- Korber, D.R., Choi, A., Wolfaardt, G.M., Ingham, S.C. and Caldwell, D.E. 1997. Substratum topography influences susceptibility of *Salmonella enteritidis* biofilms to trisodium phosphate. *Appl Environ Microbiol*, Vol. 63; pp. 3352-3358.
- Kutsukake, K. 1997. Hook-length control of the export-switching machinery involves a double- locked gate in *Salmonella typhimurium* flagellar morphogenesis. *Journal of Bacteriology*, Vol. 179(4); pp. 1268-1273.
- Kumar, C. and Anand, S. 1998. Significance of microbial biofilms in the food industry: a review. *Int J Food Microbiol*, Vol. 42; pp. 9-27.
- Larsen, P., Nielsen, J.L., Dueholm, M.S., Wetzel, R., Otzen, D. and Nielsen, P.H. 2007. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environmental Microbiology*, Vol. 9(12); pp. 3077-3090.

- Lawhon, S.D., Maurer, R., Suyemoto, M. and Craig, A. 2002. Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Molecular Microbiology*, Vol. 46(5); pp. 1451-1464.
- Lin, A.W., Usera, M.A., Barrett, T.J. and Goldsby, R.A. 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 34(4); pp. 870-876.
- Lostroh, C.P., Bajaj, V. and Lee, C.A. 2000. The cis requirements for transcriptional activation by HilA, a virulence determinant encoded on SPI-1. *Mol Microbiol*, Vol. 37; pp. 300-315.
- Lundmark, K., Westermark, G.T., Olsén, A. and Westermark, P. 2005. Protein fibrils in nature can enhance amyloid protein A amyloidosis in mice: Cross-seeding as a disease mechanism. *PNAS*; Vol. 102(17); pp. 6098-6102.
- Ma, L., Conover, H. Lu., Parsek, M.R., Bayles, K. and Woznick, D.J. 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog*, 5:e1000354.
- Malcova, M., Hradecka, H., Karpiskova, R. and Rychlik, I. 2008. Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, Vol. 129(3-4); pp. 360-366.
- Martino, P.D., Fursy, R., Bret, L., Sunfararaju, B. and Philips, R.S. 2003. Indole can act as an extracellular signal regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Can J. Microbiol*, Vol. 49; pp. 443-449.
- Matthysse, A.G., Holmes, K.V. and Gurlitz, R.H. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacteriu tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol*, Vol. 145; pp. 583-595.
- Michael, B., Smith, J.N., Swift, S., Heffron, F. and Ahmer, B.M.M. 2001. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol*, Vol. 183; pp. 5733-5742.
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, Vol. 55; pp. 5733-5742.
- Mireles, J.R., Toguchi, A. and Harshey, R.M. 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol*, Vol. 183; pp. 5848-5854.
- Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 14(3); pp. 255-261.

- Momba, M.N.B. and Kaleni, P. 2002. Regrowth of survival indicator microorganisms on the surface of household container used for the storage of drinking water in rural communities of South Africa. *Water Res*, Vol. 36; pp. 3023-3028.
- Møretrø, T., Midtgaard, E.S., Nesse, L.L. and Langsrud, S. 2003. Susceptibility of *Salmonella* isolated from fish feed factories to disinfectants and air-drying at surfaces. *Vet Microbiol*, Vol. 94; pp. 207-217.
- Møretrø, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Hannevik, S., Kotlarz, K. and Langsrud, S. 2009. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *J Appl Microbiol*, Vol. 106; pp. 1005-1012.
- Morin, P., Camper, A., Jones, W., Gatel, D. and Goldman, J.C. 1996. Colonization and Disinfection of Biofilms Hosting Coliform-Colonized Carbon Fines. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62(12); pp. 4428-4432.
- Muller, K.H., Collinson, S.K., Trust, T.J. and Kay, W.W. 1991. Type-I fimbriae of *Salmonella* Enteritidis. *J Bacteriol*, Vol. 173; pp. 4765-4772.
- Nivens, D.E., Ohman, D.E., Williams, J. and Franklin, M.J. 2001. Role of Alginate and Its O Acetylation in Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Microcolonies and Biofilms. *Journal of Bacteriology*, Vol. 183(3); pp. 1047-1057.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, Vol. 54; pp. 49-79.
- Olsén, A., Jonsson, A. and Normark, S. 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, Vol. 338; pp. 652-655.
- Olsén, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S. and Normark, S. 1993. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, Vol. 7(4); pp. 523-536.
- Parkins, M.D., Ceri, H. and Storey, D.G. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol*, Vol. 40; pp. 1215-1226.
- Pernestig, A.K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S. and Melefors, O. 2003. The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J Bacteriol*, Vol. 185; pp. 843-853.
- Popoff, M. Y. and Le Minor, L.E. 2005. Genus XXXIII *Salmonella*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2; pp. 764-787.
- Pratt, L.A. and Silhavy, T.J. 1995. The response regulator SprE controls the stability of RpoS. *PNAS*, Vol. 93(6); pp. 2488-2492.

- Pratt, L.A. and Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*, Vol. 30; pp. 285-293.
- Prouty, A.M., Schwesinger, W.H. and Gunn, J.S. 2002. Biofilm formation and interaction with the surface of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect Immun*, Vol. 70; pp. 2640-2649.
- Rainey, P.B. and Travisano, M. 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature*, Vol. 394; pp. 69-72.
- Ramage, G., Walle, K.V., Wickes, B.L. and López-Ribot, J.L. 2001. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 45(9); pp. 2475-2479.
- Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E. and Handley, P.S. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, Vol. 11(2); pp. 94-100.
- Rittmann, B. E., Nerenberg, R., Lee, K., Issam, N., Gillogly, T. E., Lehman, G. E. and Adham, S. S. 2004. The Hydrogen- Based Hollow-Fiber Membrane Biofilm Reactor (HFMBfr) for Removing Oxidized Contaminants. *Water Sci. and Tech*, Vol. 49(11-12); pp. 223-230.
- Romeo, T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol*, Vol. 29; pp. 1321-1330.
- Ronner, A.B. and Wong, A.C.L. 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on stainless-steel and Buna-N Rubber. *J Food Prot*, Vol. 56; pp. 750-758.
- Römling, U., Sierralta, W.D., Eriksson, K. and Normark, S. 1998. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Molecular Microbiology*, Vol. 28(2); pp.249-264.
- Römling, U. and Rohde, M. 1999. Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 180(1); pp. 91-102.
- Römling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S. and Reinköster, J. 2000. *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, Vol. 36 (1); pp. 10-23.
- Römling, U. 2001. Genetic and phenotypic analysis of multicellular behavior in *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol*, Vol. 336; pp. 48-59.
- Römling, U. 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol*, Vol. 153; pp. 205-212.

- Römbling, U. 2005. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 62(11); pp. 1234-1246.
- Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G. and Bassler, B.L. 2001. The luxA family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol*, Vol. 41; pp. 463-476.
- Schembri, M.A., Kjaergaard, K. and Klemm, P. 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol*, Vol. 48; pp. 253-267.
- Schemeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K.N., Wenderoth, D.F., Flemming, H.C., Liesegang, H., Schmitz, R.A., Jaeger, K.E. and Streit, R. 2003. Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *American Soc for Microbiol*, Vol. 69; pp. 7298-7309.
- Scher, K., Romling, U. and Yaron, S. 2005. Effect of Heat, Acidification, and Chlorination on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells in a Biofilm Formed at the Air-Liquid Interface. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71(3); pp. 1163-1168.
- Shirtliff, M.E., Mader, J.T. and Camper, A.K. 2002. Molecular interactions in biofilms. *Chem and Bio*, Vol. 9; pp. 859-871.
- Smith, J.N. and Ahmer, B.M.M. 2003. Detection of other microbial species by *Salmonella*: Expression of the SdiA regulon. *J Bacteriol*, Vol. 185; pp. 1358-1366.
- Solano, C., Sesma, B., Alvarez, M., Humphrey, T.J., Thorns, C.J. and Gamazo, C. 1998. Discrimination of strains of *Salmonella* Enteritidis with differing levels of virulence by an in vitro glass adherence test. *J Clin Microbiol*, Vol. 36; pp. 674-678.
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J., Gamazo, C. and Lasa, I. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, Vol. 43(3); pp. 793-808.
- Somers, E.B., Schoeni, J.L. and Wong, A.C.L. 1994. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 22(4); pp. 269-276.
- Soni, K.A., Jesudhasan, P.R., Cepeda, M., Williams, B., Hume, M., Russell, W.K., Jayaraman, A. and Pillai, S.D. 2008. Autoinducer AI-2 is involved in regulating a variety of cellular processes in *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathog Dis*, Vol. 5; pp. 147-153.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A. and Bertin, P. 1999. Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the flhDC master operon. *J Bacteriol*, Vol. 181; pp. 7500-7508.

- Spiers, A.J., Kahn, S.G., Bohannon, J., Travisano, M. and Rainey, P.B. 2002. Adaptive Divergence in Experimental Populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and Phenotypic Bases of Wrinkly Spreader Fitness. *Genetics*, Vol. 161; pp. 33-46.
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M. and Rainey, P.B. 2003. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology*, Vol. 50(1); pp. 15-27.
- Starkey, M., Gray, K.A., Chang, S.I. and Parsek, M. 2004. The EPS matrix of bacterial biofilms, pp. 174-191. ASM Pres.
- 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*, Vol. 40(2); pp. 175-179.
- Sternberg, C., Christensen, B.B., Johansen, T., Nielsen, A.T., Andersen, J.B., Givskov, M. and Molin, S. 1999. Distribution of Bacterial Growth Activity in Flow-Chamber Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65(9); pp. 4108-4117.
- 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 Environmental Microbiology*, Vol. 67; pp. 5608-13.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S. and Klapper, I. 2002. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J of Ind Microbiol and Biotech*, Vol. 29; pp. 361-367.
- Surette, M.G. and Bassler, B.L. 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 95; pp. 7046-7050.
- Surette, M.G., Miller, M.B. and Bassler, B.L. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 96; pp. 1639-1644.
- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A. K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P. and Romeo, T. 2002. Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, Vol. 184; pp. 5130-5140.
- Taga, M.E., Miller, S.T. and Bassler, B.L. 2003. Lsr-mediated transport and processing of AI-2 in *Salmonella Typhimurium*. *Mol Microbiol*, Vol. 50; pp. 1411-1427.
- Teplitski, M., Goodier, R. I. and Ahmer, B. M. 2003. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol*, Vol. 185; pp. 7257-7265.

- Teplitski, M. and Ahmer, B. M. 2004. The control of secondary metabolism, motility, and virulence by the two-component regulatory system BarA/SirA of *Salmonella* and other γ -proteobacteria. In *Global Regulatory Networks in Enteric Bacteria*, pp. 107-133. Kerala, India: Research Signpost.
- Teplitski, M., Goodier, R.I. and Ahmer, B.M. 2006. Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *Journal of Medicinal Microbiology*, Vol. 296; pp. 446-466.
- Tetz, G.V., Artemenko, N.K. and Tetz, V.V. 2009. Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 53(3); pp. 1204-1209.
- Threlfall, E. J. 2005. Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections. *Bacteriology*, pp. 1398-1434.
- Tomenius, H., Pernestig, A.K., Méndez-Catalá, C.F., Georgellis, D., Normark, S. and Melefors, Ö. 2005. Genetic and Functional Characterization of the *Escherichia coli* BarA-UvrY Two-Component System: Point Mutations in the HAMP Linker of the BarA Sensor Give a Dominant-Negative Phenotype. *Journal of Bacteriology*, Vol. 187(21); pp. 7317-7324.
- Tomoyasu, T., Ohkishi, T., Ukyo, Y. and 7 other authors 2002. The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, Vol. 184; pp. 645-653.
- Tischler, A.D. and Camilli, A. 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol*, Vol. 53; pp. 857-869.
- Ueda, S. and Kuwabara, Y. 2007. Susceptibility of biofilm *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* detergents and sanitizers. *Biocontrol Science*, Vol. 12; pp. 149-153.
- Veldman, A., Vahl, H.A., Borggreve, G.J. and Fuller, D.C. 1995. A survey of the incidence of *Salmonella* species and *Enterobacteriaceae* in poultry feeds and feed components. *Vet Rec*, Vol. 136; pp. 169-172.
- Vestby, L.K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E. and Nesse, L.L. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, Vol. 5(20); pp. 1-6.
- Walters, M. and Sperandio, V. 2006. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol*, Vol. 296; pp. 125-131.
- Watnick, P.I., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Croal, L. and Kolter, R. 2001. The absence of flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol*, Vol. 39; pp. 223-235.
- Webb, J.S., Givskov, M. and Kjelleberg, S. 2003. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Cur opinion in Microbiol*, Vol. 6; pp. 578-585.

- Wei, B. L., Brun-Zinkernagel, A. M., Simecka, J. W., Pruss, B. M., Babitzke, P. and Romeo, T. 2001. Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, Vol. 40; pp. 245-256.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K. and 7 other authors 2003. A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, Vol. 48; pp. 657-670.
- Whistler, C. A., Corbell, N. A., Sarniguet, A., Ream, W. and Loper, J. E. 1998. The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigmaS and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol*, Vol. 180; pp. 6635-6641.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. and Mattick, J.S. 2002. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science*, Vol. 295(5559); pp. 1487.
- White, A. P., Gibson, D.L., Kim, W., Kay, W.W. and Surette, M.G. 2006. Thin agregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *J. Bacteriol*, Vol. 188; pp. 3219- 3227.
- Wilson, K. 2001. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocol of Molecular Biology*, 2;2
- Wolfe, A.J., Chang, D.E., Walker, J.D., Seitz-Partridge, J.E., Vidaurri, M.D., Lange, C.F., Prüb, B.M., Henk, M.C., Larkin, J.C. and Conway, T. 2003. Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Mol Microbiol*, Vol. 48; pp. 977-988.
- Woodward, M.J., Sojka, M., Sprigings, K.A. and Humphrey, T.J. 2000. The role of sef 14 and sef17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *J Med Microbiol*, Vol. 49; pp. 481-487.
- Wu, J. and Xi, C. 2009. Evaluation of Different Methods for Extracting Extracellular DNA from the Biofilm Matrix. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75(16); pp. 5390-5395.
- Xavier, K.B. and Bassler, B.L. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol*, Vol. 6; pp. 191-197.
- Xu, H., Zou, Y., Lee, H. and Ahn, J. 2010. Effect of NaCl on the Biofilm Formation by Foodborne Pathogens. *Journal of Food Science*, Vol. 75(9); pp. 580-585.
- Yildiz, F.H. and Schoolnik, G.K. 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *PNAS*, Vol. 96(7); pp. 4028-4033.

- Zhang, S., Kingsley, R.A., Santos, R.L., Andrews-Polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsolis, R.M., Adams, L.G. and Bäumler, A.J. 2003. Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. *Infection and Immunity*, Vol. 71(1); pp. 1-12.
- Zobell, E. C. and Eshter, C. A. 1935. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of Bacteriology*, Vol. 29(2); pp. 239-251
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. and Römling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, Vol. 39(6); pp. 1452-1463.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Başar KARACA

Doğum Yeri : HATAY

Doğum Tarihi : 11.07.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Atatürk Lisesi (2003)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2008)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (Eylül 2008-Haziran 2011)