



**T.C.  
HİTİT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAKTERİYEL BİYOFİLM OLUŞUMUNU  
ENGELLEYECEK MOLEKÜLLERİN SENTEZİ VE  
ANTİ-BİYOFİLM ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**Merve BİÇER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi Seçil TÜRKSOY**

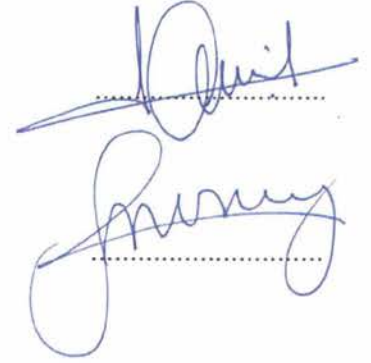
**AĞUSTOS 2018  
ÇORUM**

Merve BİÇER tarafından hazırlanan “Bakteriyel Biyofilm Oluşumunu Engelleyecek Moleküllerin Sentezi ve Anti-Biyofilm Etkinliklerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 28/08/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Münir ANIL



Dr. Öğr. Üyesi Seçil TÜRKSOY



Doç.Dr. Gökçe MEREY

Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun *05/10/2018*.. tarih ve *2018/235*... sayılı kararı ile Merve BİÇER’in Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.



Doç. Dr. Cengiz BAYKASOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BEYANI

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.

Merve BİÇER



# BAKTERİYEL BİYOFİLM OLUŞUMUNU ENGELLEYECEK MOLEKÜLLERİN SENTEZİ VE ANTI-BİYOFİLM ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Merve BİÇER

HİTİT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2018

## ÖZET

Çalışmada; akridin türevi moleküller sentezlenerek bu moleküllerin bakteriyel biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeli araştırılmıştır. Bakterilerde biyofilm oluşumundan sorumlu nükleotid, halkalı dimerik guanozin monofosfat (c-di-GMP) olup akridin türevleri bu nükleotidle etkileşerek G-kuadrupleks yapısı oluşturmaktadır ve bu yapının oluşmasıyla biyofilm oluşumunu kontrol eden mekanizma durdurulabilir. Tez çalışması kapsamında, akridin türevlerinin hem c-di-GMP ile etkileşip etkileşmeyeceği araştırılmış hem de biyofilm oluşturma özelliği bulunan *Bacillus subtilis* suşu üzerindeki etkisi test edilmiştir.

Akridin türevlerinin c-di-GMP üzerindeki etkisi, monomerik GMP ile yapılan denemeler ile belirlenmiş, etkileşim sonucu GMP konsantrasyonunda oluşan azalmalar ultraviyole (UV) spektroskopisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak saptanmıştır. Bu türevlerin biyofilm oluşumu üzerine etkisi ise kuyucuklu plakaya ekim yöntemi ile belirlenmiştir.

Sentezlenen akridin türevleri literatürde yer almayan yeni yapılar olup c-di-GMP ile etkileşmekte ve *Bacillus subtilis* suşu üzerinde biyofilm oluşumunu engelleyici etki göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyel biyofilm, *Bacillus subtilis*, akridin türevleri

# SYNTHESIS OF THE BACTERIAL BIOFILM INHIBITOR MOLECULES AND INVESTIGATION OF THEIR ANTI-BIOFILM ACTIVITY

Merve BİÇER

HİTİT UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

August 2018

## ABSTRACT

In this study, acridine derivatives have been synthesized and studied for their potential to inhibit the bacterial biofilm formation. The nucleotide responsible for the formation of biofilms in bacteria is the cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP), which interacts with acridine derivatives to form the G-quadruplex structure. In this way, the mechanism controlling biofilm formation can be blocked. Within the scope of the study, it was investigated whether the acridine derivatives interact with c-di-GMP, as well as the effect on the *Bacillus subtilis* strain, which has the ability to form biofilms, has been tested.

The effect of the acridine derivatives on c-di-GMP was determined by means of monomeric GMP assays, and the decrease in the resulting concentration of GMP were determined using ultraviolet (UV) spectroscopy and high performance liquid chromatography (HPLC). The effect of these derivatives on the formation of biofilm was determined by microtiter dish biofilm formation assay.

The synthesized acridine derivatives are novel structures that are not present in the literature and interact with c-di-GMP resulting an inhibitory effect on biofilm formation of *Bacillus subtilis* strains.

**Key Words:** Bacterial biofilm, *Bacillus subtilis*, acridine derivatives

## TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında sabır, ilgi, anlayış ve değerli eleştirileri ile beni her zaman destekleyen danışman hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Seçil TÜRKSOY'a; araştırmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren Sayın Doç. Dr. Gökçe MEREY'e; çalışmamın mikrobiyoloji analizlerini Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirmemi sağlayan Sayın Doç. Dr. Evrim GÜNEŞ ALTUNTAŞ'a; FT-IR analizlerinin yapılmasında yardımcı olan Sayın Arş. Gör. Ömer YURDAKUL'a; UV-Spektrofotometre analizlerinde desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Öğretim Üyesi Erol ALVER'e; HPLC analizlerini gerçekleştirdiğim HÜBTÜAM'da yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğretim Üyesi İbrahim BİLİCİ ile Sayın Uzm. Ömer KAYIR'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Sevgisi, ilgisi, hoşgörüsü ve tüm desteği ile her zaman yanımda olan, hayatımı anlamlı kılan değerlerim anneme ve babama; yüksek lisans öğrenimim boyunca tüm çalışmalarımızı ortak bir şekilde yürüttüğümüz arkadaşım Demet ONAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

**Bu tez çalışmasına, MUH 19001.17.002 numaralı proje kapsamında vermiş oldukları destekten dolayı, Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.**



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Biyofilm Oluşumunun Gıda Endüstrisine Etkileri.....	5
2.2. <i>Bacillus subtilis</i> ve Biyofilm Üretme Özelliği.....	9
2.3. Biyofilm Oluşum Mekanizmaları.....	10
2.3.1. Dönüşümlü tutunma.....	11
2.3.2. Dönüşümsüz tutunma.....	11
2.3.3. Koloni oluşumu.....	11
2.4. Halkalı Dimerik Guanosin 3',5'-monofosfat (c-di-GMP) Yapısı.....	12
2.5. Akridinler.....	17
2.6. Akridin Türevleri.....	18
3. MATERYAL VE METOT.....	20
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	20
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	20
3.3. Silika Destekli Akridin Türevlerinin Sentezi.....	20

3.4. Guanosin 3',5'-siklik Monofosfat (c-di-GMP) ile İnterkalasyon.....	22
3.4.1. UV spektrometre ile gerçekleştirilen analizler.....	22
3.4.2. HPLC ile gerçekleştirilen analizler.....	24
3.5. Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkinin İncelenmesi.....	25
3.5.1. Bakteri aktivasyonu.....	25
3.5.2. Akridin türevlerinin biyofilm inaktivasyon etkisinin incelenmesi...	25
3.5.3. Biyofilm oluşumunun tespiti.....	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	27
4.1. Silika Destekli Akridin Türevinin Yapı Analizi.....	27
4.2. c-GMP ile Etkileşimin Belirlenmesi.....	29
4.2.1. GMP etkileşiminin UV spektroskopisi ile belirlenmesi.....	29
4.2.2. GMP etkileşiminin HPLC ile belirlenmesi.....	32
4.3. Silika Destekli Akridin Türevlerinin Biyofilm Üzerine Etkisi.....	35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ.....	46

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. UV-Spektrofotometre için hazırlanan örnek içerikleri ve konsantrasyonları.....	23
Çizelge 3.2. HPLC için hazırlanan örnek içerikleri ve konsantrasyonları.....	24
Çizelge 4.1. c-GMP ile 9-CASi inkübasyonuna ait UV absorbanları.....	30
Çizelge 4.2. c-GMP ile SIDMA inkübasyonuna ait UV absorbanları.....	31
Çizelge 4.3. c-GMP ile 9-CASi inkübasyonuna ait HPLC sonuçları.....	33
Çizelge 4.4. c-GMP ile SIDMA inkübasyonuna ait HPLC sonuçları.....	34
Çizelge 4.5. Silika destekli akridin türevlerinin biyofilm üzerine etkisi.....	36

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Farklı yüzeylerde biyofilm yapısı.....	3
Şekil 2.2. <i>Bacillus subtilis</i> 'in morfolojik yapısı.....	9
Şekil 2.3. Biyofilm oluşum mekanizması.....	10
Şekil 2.4. c-di-GMP yapısı.....	12
Şekil 2.5. Biyofilm oluşumunda meydana gelen c-di-GMP konsantrasyon değişimi.....	14
Şekil 2.6. c-di-GMP Dimerleşmesi ile oluşan tetramoleküler ve oktamoleküler yapılar.....	15
Şekil 2.7. DNA'nın oluşturduğu G-kuadrupleks yapı.....	16
Şekil 2.8. c-di-GMP'nin oluşturduğu G-kuadrupleks yapı.....	17
Şekil 2.9. Akridinin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.10. Çeşitli interkalatörler.....	18
Şekil 3.1. Silika destekli akridin türevlerinin sentezi.....	21
Şekil 3.2. Reaksiyon düzeneği.....	21
Şekil 3.3. Süzme düzeneğinde yıkama işlemi.....	22
Şekil 3.4. Polistren plakaya <i>B.subtilis</i> eklenmesi.....	26
Şekil 3.5. Kristal viyole ile boyama.....	26
Şekil 4.1. 3-(Etileneamino) propil bağlı silikaya ait IR spektrumu.....	27
Şekil 4.2. Elde edilen ürüne (9-CASi) ait IR spektrumu.....	28
Şekil 4.3. Elde edilen ürüne (SIDMA) ait IR spektrumu.....	28
Şekil 4.4. c-GMP'nin alınkonma zamanı (Rt).....	32

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

n	Nano
Å	Ångström
μ	Mikro

### Kısaltmalar

c-di-GMP	Halkalı dimerik guanosin 3',5'-monofosfat
EDTA	Etilendiamin tetra esetik asit
EPS	Ekzopolisakarit
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometresi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KCl	Potasyum Klorür
M	Molarite
NaCl	Sodyum Klorür
O.D.	Optimum Optik Yoğunluk (Optimal Optical Density)
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
TLC	İnce tabaka kromatografisi
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultraviyole
QS	Quorum Sensing

## 1. GİRİŞ

Mikroorganizmaların dönüşümsüz olarak yüzeylerde üreyip gelişmesi ile koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz, giderilmesi güç polisakkarit matriks yapıya biyofilm denir.

Biyofilm oluşumu çevresel kirlilik unsurlarının giderilmesi, bitkilerin büyümesine katkı sağlaması, insan vücudundaki mikrobiyal dengenin korunmasını sağlaması gibi avantajlarıyla farklı süreçlerde sıkça kullanılsa da farklı endüstri dallarında çeşitli sorunlara neden olmaktadır. Özellikle patojen bakterilerin oluşturduğu biyofilmler gıda endüstrisinde başlıca et, süt, meyve-sebze ve su ürünlerinin işlenmesi süreçlerinde çeşitli problemlere yol açmaktadır. Biyofilmde bulunan patojenik mikroorganizmalar yüzeylerden, gıda işleme ekipmanlarından, işletme ortamından gıdaya bulaşarak gıda güvenliği açısından risk oluşturmaktadır. Biyofilmler gıda işleme ekipmanlarında, konveyör bantlarında, borularda, zemin ve yüzeylerde kolonize olarak bu bölgelerden ürüne ve çevreye kontamine olmaktadır. Biyofilmler; ürüne patojen mikroorganizma kontaminasyonlarından, ısı transfer verimliliğinin azalmasından, işletme ekipmanlarında oluşan hasarlardan sorumludur. Bu gibi nedenler son yıllarda biyofilm oluşum mekanizması üzerine yapılan çalışmalarla gıda endüstrisinin yakından ilgilenmesine neden olmaktadır.

Biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahip toprak kökenli bir bakteri olan *Bacillus subtilis*, “subtilisin” adı verilen toksik etkili bir enzim salgılayarak, buna maruz kalan kişilerde çeşitli alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır. *Bacillus subtilis* endospor formu sayesinde tüm yüzeylerde biyofilm oluşturabilmektedir.

Biyofilm oluşumunun engellenmesi amacıyla kullanılan kimyasalların malzemelerde ve makinelerde paslanmaya yol açması, dezenfektanların tüketici sağlığı üzerinde tehlike oluşturması ve çevreyi olumsuz etkilemesi; inaktivasyon etkisi bulunan ısıl işlemlerin, antibiyotiklerin, dezenfektanların ve ağır metallerin biyofilm üzerinde yetersiz kalması, yeni tekniklerin geliştirilmesine neden olmuştur.

Antimikrobiyal ve antiseptik nitelikteki akridin türevleri, DNA ile interkalasyon yapabilmeleri ile farmakolojik açıdan önemli moleküllerdir. Akridin türevleri floresans özellikleri sayesinde interkalatör ajan olarak mutajenik çalışmalarda tercih edilmektedir. Antikanserojen, antimalaryal, antiviral, antişlukom özelliğe sahip olan akridin türevleri biyolojik aktiviteleriyle ilaç, antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır.

Bakterilerde biyofilm oluşumu; bakteriler arasında iletişim kurulmasını sağlayan bir sinyal molekölü olan halkalı dimerik guanosin 3',5'-monofosfat (c-di-GMP) adı verilen nükleotit tarafından kontrol edilmektedir. Çalışma ile özellikle hem literatürde yer almayan yeni türevler olan hem de c-di-GMP ile interkalasyon potansiyeli taşıyan ve çözünmeyen yapılar olan silika destekli akridin türevleri sentezlenerek anti-biyofilm etkinlikleri gözlemlenmiştir. Bakteriyel biyofilm oluşumunu kontrol eden, c-di-GMP nükleotidine bağlanarak biyofilm oluşumunu engelleyecek akridin türevi bu moleküllerin biyofilm oluşturabilen *Bacillus subtilis* suşu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu türevlerin biyofilm oluşumu üzerinde etkili olan c-di-GMP nükleotidiyle interkalasyon sağlayarak biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeli bulunmaktadır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Biyofilm; bakterilerin çoğalıp topluluk halinde birbirlerine veya canlı ve cansız yüzeylere hücre dışı polimerik matriks ile bağlantı kurup çoğalmasıyla oluşturduğu polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır (Chmielewski ve ark., 2003, Wimpeny ve ark., 2000). Bu yapı opak, kaygan, yapışkan, jelsi, pürüzsüz nitelikte olup “hücre dışı polimerik yapı”, “ekzopolisakkarit (EPS)” ya da “ekzopolimer” gibi farklı isimlerle de anılmaktadır. Bakteriler, ortalama boyutları 100-500 µm arasında olan bu organik polimer matriks tabaka içine gömülmektedir (Carpentier ve ark., 1993; O'Toole ve ark., 2000; Kaya, 2012). Biyofilm tabakasına su ile temas eden tüm yüzeylerde rastlamak mümkündür (Costerton ve ark., 1981). Biyofilm tabakası, bakterileri besinsizlikten, kuraklıktan, pH değişimlerinden ve toksinlerden korur. Bu yapılar insan vücudunda kateterler, kontakt lens, protez, kalp kapakçıkları, kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı ve akciğer dokusu gibi canlı ve cansız birçok yüzeyde bulunabilir. Nazokomiyal (hastane) enfeksiyonlarının yaklaşık %65'inden mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Doğanlı, 2005). Şekil 2.1'de çeşitli yüzeylerde oluşan biyofilm yapıları görülmektedir.



**Şekil 2.1.** Farklı yüzeylerde biyofilm yapısı (Noorbakhsh, 2014; Anonim 2015a; Anonim 2015b)



Biyofilmlerle ilgili yapılan çalışmalar 1970'lerden beri sürdürülmektedir. Önceleri bakterilerin bireysel olarak sıvı ortamda bulunduğu düşünülse de yapılan çalışmalar mikroorganizmaların canlılıklarını koruyabilmek için katı yüzeylere de ihtiyaç duyduğunu göstermiştir (Kaya, 2012).

Biyofilmlerin biyokimyasal oksijen ihtiyacını karşılayabilme, azot dönüştürebilme, metan gazı üretebilme ve mikro kirlilik unsurlarını geri dönüştürebilme gibi özellikleri biyofilmlere ekolojik açıdan değerlendirilebilir nitelik kazandırmaktadır. Biyofilmler ayrıca suyun kalitesini geliştirmek için teknolojiye ve yenilenebilir enerji üretiminde kullanılmaktadır. Biyofilmlerin sanayide en yaygın kullanımları ise; damlatmalı filtreler, biyolojik kuleler, sabit ve hareketli yatak biyofiltreleri, entegre sabit film ve aktif çamur, membran biyofilm reaktörleri, anaerobik filtreler, akışkan yataklı anaerobik reaktörler ve mikrobik elektrokimyasal hücrelerin anotları şeklinde sıralanabilir (Rittmann, 2018).

Eksopolisakkarit matriks biyofilmlerin önemli yapı birimidir. Biyofilm yapısı çeşitli koşullara göre farklılık göstermekle birlikte genel yapı; %94-97 su, %1-2 EPS, %1-2 protein, %1-2 nükleik asit ve lipitlerden oluşmaktadır. Ekstra polisakkarit yapı yüzeye tutunmayı sağlayarak bakterilerin kolonize olmasına yardımcı olur. EPS üretimi dönüşümsüz olarak tutunma ile biyofilm oluşumunun göstergesidir. Son aşamasına gelen bir biyofilmin kütleli olarak %75-90'nını EPS oluşturmaktadır. Biyofilm içindeki bakteriler gerekli enerji kaynağını biyofilmde bu yolla oluşturulan enzimler sayesinde yüzeyde bulunan molekülleri parçalayarak sağlar (Gün, 2009).

Biyofilm oluşmasında ilk adım bakterinin yüzeye yapışması olduğu için yüzeyin fizikokimyasal özellikleri oldukça önemlidir. Biyofilm oluşturan bakterilerin cam, paslanmaz çelik, polipropilen, PVC, hafif çelik, polietilen, etilen-propilen yüzeylerde lateks yüzeylere göre daha zayıf tutunma sağladığı gözlemlenmiştir (Meyer, 2003).

Bakterilerin biyofilm oluşturmaları ve yüzeye tutunabilmesi; ortamdaki pH düzeyi, sıcaklık değeri, bakteri çeşidi, bakterinin yapısal özellikleri, bakterinin hareketli olup olmadığı, bakterinin tutunduğu yüzeyin özellikleri, ortamda besin madde varlığı,

ortamın iyon derişimi gibi faktörlere bağlı olarak değişim göstermektedir. Biyofilm oluşturan bakteriler için optimum çoğalma koşullarında kolonizasyon gerçekteşebilmektedir (Gün, 2009). Bakterilerin hücre zar yapısı bileşimi biyofilm oluşturmada yüzeyle göstereceği etkileşim açısından oldukça önemlidir (Kleerebezem ve ark., 2010). Gram (+) bakterilerin hücre zarında bulunan peptidoglukan, teyikoik asitler, proteinler ve polisakkaritler biyofilm oluşumunu etkilemektedir. Özellikle polisakkaritler biyofilm oluşumunda önemli rol oynar (Stewart ve Franklin, 2008).

### **2.1. Biyofilm Oluşumunun Gıda Endüstrisine Etkileri**

Gıda kaynaklı enfeksiyonların en önemli kaynaklarından biri olan biyofilmler, gıda endüstrisinde ısının yüzeiden akışını geciktirmesi, yüzeideki sıvının sürtünme direncinin artması, yüzeideki kimyasal sürtünme oranının artması gibi ciddi sorunlara neden olmaktadır (Costerton ve ark., 1999).

Çoğu patojen mikroorganizmanın uygun koşullarda gıdalarda ve gıda ile temas eden yüzeilerde biyofilm oluşturduğu bilinmektedir. Biyofilm oluşumu ısıl işleme karşı yalıtkan gibi görev yaparak ısı transfer verimliliğini azaltmaktadır. Su arıtma sistemlerinde oluşan biyofilmlerin uzaklaştırılması için kullanılan yüksek klor konsantrasyonları yetersiz kalabilmektedir. Bu amaç doğrultusunda kullanılan yoğun dezenfektanlar işlemede enerji tüketimini artırmakta, ürün maliyetini yükseltmekte, metal yüzeilerde ise korozyona neden olmaktadır (Shi, 2009).

Gıda kaynaklı patojenler insan sağlığını tehdit ettiği için biyofilmler gıda endüstrisinin her alanında önem taşımaktadır. Süt çabuk bozulabilen ve çeşitli mikroorganizmalar tarafından kontamine olmaya elverişli bir gıdadır. Süt ve süt ürünlerinde meydana gelen kontaminasyon hatalı veya eksik temizlenmiş ve sterilize edilememiş ekipmanlardan kaynaklanmaktadır. Yapılan bir çalışmada pastörize sütteki Streptokok ve Bacillus popülasyonunun çiğ sütteki popülasyonundan fazla olduğu gözlemlenmiş, bunun da pastörize sütte oluşmuş biyofilmden kaynaklandığı belirlenmiştir (Srey, 2013).

Su ürünleri işleme teknolojisinde biyofilmler hem ürün hem de işletme ekipmanları üzerinde oluşabilmektedir. Su ürünleri teknolojisinde işletmeye ekonomik katkıları nedeniyle tatlı su yerine deniz suyu kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan deniz suyundan biyofilmlerin kolaylıkla işletmeye dahil olabildiği bilinmektedir (Srey, 2013).

Et işleme teknolojisinde ekipman yüzeylerinde tutunmuş halde bulunan bakterilerin düşük sıcaklıklarda bile çoğalarak kolonize olabildiği ve kolaylıkla ürüne kontamine olabildiği belirtilmiştir (Srey, 2013).

Biyofilm yapısı bakterilere, dezenfektanlara karşı direnç kazandırmaktadır. Bu da ekonomik kayıplara ve sağlık sorunlarına yol açar (Charlebois, 2017). Biyofilm oluşumunun önlenmesinde antibiyotikler, biyositler, iyon kaplamalar gibi kimyasal yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (Satpathy, 2016).

Sıcaklık, pH, besin bileşimi ve bakteriyel popülasyon gibi çevresel faktörler biyofilm mekanizması açısından önemli faktörlerdir. Herald ve Zoottola tarafından yapılan bir çalışmada çelik yüzeyde en iyi tutunmayı *L. monocytogenes*' in pH=7 ve 30°C'de; *Y. enterocolitica* için ise pH=8-9 ve 30 °C'de sağladığı gözlemlenmiştir. Kim ve Frank (1995) tarafından yapılan bir çalışmada ise düşük fosfat seviyelerinin *Listeria*'nın biyofilm oluşturmasını indüklediği gözlemlenmiştir. Ayrıca dezenfeksiyon amacıyla kullanılan alkoller, gıda içeriğinde bulunan tuzların varlığı ve ortamdaki diğer bakterilerin varlığı bakteriyel tutunmayı ve biyofilm oluşumunu artırabileceği belirtilmiştir (Shi, 2009).

Bakteri hücre yüzeyinin sahip olduğu fizikokimyasal özellikler, bakterinin yüzeye yapışması açısından oldukça önemlidir. Çoğu bakteri yüzeyi negatif yüklü olup, hücre yüzeyindeki negatif yük elektrostatik itme kuvveti ile yüzeye tutunmayı zorlaştırır. Bakterinin sahip olduğu filagella, fibril ve lipopolisakkarit yapıların hidrofobik oluşu iki yüzey arasındaki itme kuvvetini azaltmaktadır. Fibrillerin temel işlevi hücre ile yüzey arasındaki elektrostatik itme kuvvetini aşmaktır. Bakteri yüzey proteinleri de bu etkileşime katkı sağlamaktadır. Flagella ise bakteri hücre yüzeyine

hareket özelliği kazandırır. Bu özellikler ile biyofilm oluşumu için önemli olan bakteriyel tutunma sağlanır. Ayrıca biyofilmlerin tutunmasını sağlayan yapısal öge olan polimerik matriks; UV radyasyon varlığı, farklı pH şartları, ozmotik basınç, dehidrasyon, antimikrobiyal maddeler gibi olumsuz koşullara karşı bakteriyi korumaktadır (Shi, 2009).

Biyofilmlere karşı alınması gereken önlemlerin başında biyofilm oluşumunu ilk aşamasında önlenmesi gerekliliği gelmektedir. Bu amaçla bakteriyel tutunma gerçekleşmeden önce biyofilmlerin dezenfeksiyonu için gerekli dezenfektanların belirlenmesi ve bakteriyel tutunmayı önlemek amacıyla uygun yüzey materyalinin seçilmesi gibi önlemler uygulanmalıdır. Zeraik ve Nitschke (2010) tarafından yapılan çalışmada, yüzeyin aktif madde ile şartlandırıldığında hidrofilik özellik kazanarak bakteriyel tutunmayı azalttığı gözlemlenmiştir (Srey, 2013).

Engel teknolojisi, uygulamada tek başına yetersiz gelen iki veya daha fazla uygulamanın birlikte kullanılarak etkinlik düzeyinin artırılmasıdır. Engel teknolojisinde önemli olan etkili bir uygulama sağlayabilmek için doğru kombinasyonun belirlenmesidir. DeQueiroz ve Day (2007) tarafından yapılan çalışmada NaClO ile hidrojen peroksit birlikte kullanıldığında *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilm üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Hidrojen peroksit ile UV uygulamasının biyofilm üzerindeki sinerjistik etkisi, hidrojen peroksitin tek başına olan etkisinin 10 katıdır. Hidrojen peroksitin inaktivasyon etkisinin sıcaklıkla birlikte artmaktadır. Biyofilm hücreleri üzerinde ozon ve ultrason uygulamalarının birlikte kullanımı tek başlarına olan etkisinden daha fazla olduğu belirlenmiştir (Srey, 2013).

Geleneksel kontrol stratejileri kimyasal uygulama temellidir fakat bazı mikroorganizmaların bu tür kimyasallara direnç göstermesi kullanılan uygulamaların biyofilm karşısında yetersiz kalmasına yol açmaktadır (Ahmed ve ark., 2018). Kullanılan dezenfektanların miktarının artırılmasıyla yöntem etkinliği artırılmak istense de ekipmanlarda meydana gelen korozyonlar, maliyet artışları, dezenfektan kalıntılarının uzaklaştırılma zorluğu gibi faktörler gıda endüstrisinde dezenfektan

kullanımını sınırlandırmaktadır. Böylece gıda endüstrisinde biyofilm oluşumunun kontrol edilmesi için yeni yaklaşımların getirilmesi önem kazanmıştır (Srey, 2013).

Gıda işleme teknolojisinde her aşamada kullanılan ultrasonikasyon uygulamalarının biyofilm oluşumu üzerinde de inaktivasyon etkisi olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte ultrasonikasyon uygulamalarının biyofilm inaktivasyonu konusunda tek başına yetersiz kalması diğer tekniklerle birlikte kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Ultrason uygulamasıyla etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ve ultrasonla enzim uygulamalarının birlikte kullanımı sayesinde biyofilm inaktivasyonu sağlanabilmektedir (Srey, 2013). Baumann ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada gıdayla temas eden çelik yüzeylerde oluşan biyofilmin uzaklaştırılması için kullanılan ozon ve sonikasyon uygulamaları yeterli olmuştur.

Enzimler belirli bir kimyasal molekül üzerinde katalitik etkiye sahip proteinler olup, enzim uygulaması gıda endüstrisinde biyofilmlerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan önemli yöntemler arasında yer almaktadır (Meireles ve ark., 2016). Enzimlerin biyofilmler üzerine inhibisyon etkisi bakteri türüne göre değişmektedir. Molobela ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada proteaz enziminin *P. fluorescens* tarafından oluşturulan biyofilm üzerine amilaz enziminden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Enzimlerin toksik olmaması, çevre dostu olması gibi avantajlara sahip olması biyofilm üzerinde enzim uygulamalarının tercih sebepleri olarak sıralanabilir (Srey, 2013).

İşletmelerde uygun ve etkin sanitasyon uygulamalarının yapılması, yüzey dezenfeksiyonun fırça ve basınç uygulaması ile desteklenmesi, elektriksel uygulamaların sisteme entegrasyonu ve uygun kimyasal dezenfektan kullanımı ile biyofilm oluşumu önlenmektedir. İşletmeye hakim mikroorganizma grubu tahmin edilerek biyofilmin engellenmesi veya ortadan kaldırılması için uygun şartlar sağlanmalıdır (Gün, 2009). Sanitasyon aşamalarında meydana gelen aksaklıklar biyofilmlerin tekrar oluşmasına olanak sağlar. Bu nedenle uygulanacak yöntemler ve kullanılacak dezenfeksiyon maddelerinin seçiminde özenli davranılmalı ve teknolojik gelişmeler takip edilerek sisteme entegre edilmelidir (Akan, 2014).

## 2.2. *Bacillus subtilis* ve Biyofilm Üretme Özelliği

Gıda endüstrisini en çok etkileyen ve biyofilm oluşturma özelliği bulunan bakterilerin başında *Bacillus subtilis* gelmektedir. Bu bakteri ekmeğın hamurunda sünme oluşturarak ekmeğın iç yapısına zarar veren rope hastalığına neden olmaktadır.

*Bacillus subtilis*, aerobik, Gram(+), katalaz(+), kapsülsüz, hareketli, endospor oluşturabilen toprak kökenli saprofit bir bakteri cinsidir. 1872 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. Mezofilik özellikte olup optimum gelişme sıcaklığı 25-30°C arasındadır. Vejetatif formu dayanıksız olup spor formu kaynama sıcaklıklarına birkaç saat süre ile dayanabilmektedir (Kaya, 2012). Şekil 2.2’de *Bacillus subtilis*’ in morfolojik yapısı görülmektedir.



Şekil 2.2. *Bacillus subtilis*’in morfolojik yapısı (Anonim, 2013)

Toprak kökenli olan *Bacillus subtilis* gıda işletmelerinde üretimin her aşamasında temel bölümlerden gıdaya kontamine olabilmektedir. *Bacillus subtilis* bazı besin maddelerinde “subtilisin” adı verilen düşük toksisiteye sahip proteolitik enzim salgılamaktadır. Subtilisin toksisitesine maruz kalan kişilerde çeşitli alerjik reaksiyonlar ortaya çıkmaktadır (Kaya, 2012).

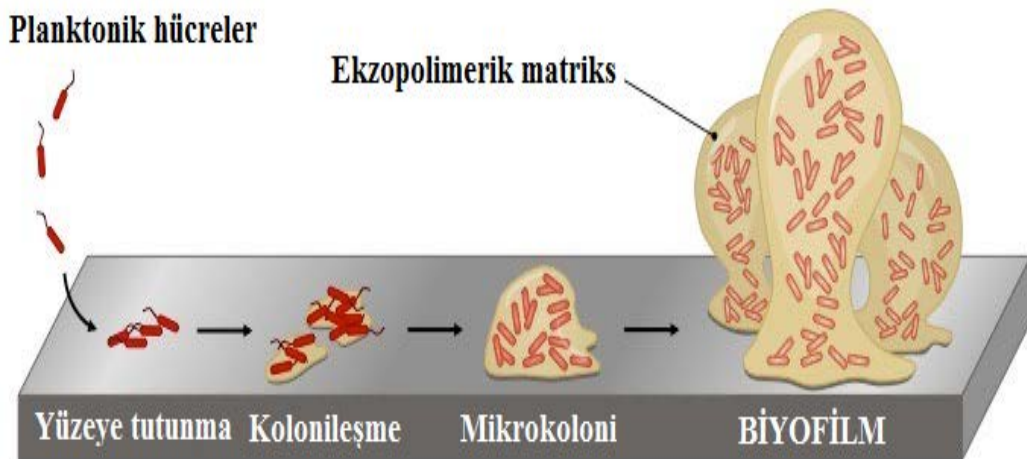
Biyofilm oluşturma özelliğine sahip olan *Bacillus subtilis* suşları; ATCC 6633, BM 19, NCIB 3610, PY 79, BAL 218, BAL 359, BAL 369, BAL 370, BAL 666, BAL

667, BAL 344, BAL 354, BAL 363, BAL 691, BAL 692, JF 642 şeklinde sıralanabilir. *Bacillus subtilis* tarafından oluşturulan biyofilm yüzeylerde zincir şeklinde büyüyerek oluşan kuvvetli bir yapıdır (Branda ve ark., 2006; Sarikhani ve ark., 2018; Chu ve ark., 2006; Kearns ve ark., 2005; Lemon ve ark., 2008; Hamon ve ark., 2006; Dacheng ve ark., 2004). *Bacillus subtilis* özellikle spor formuyla son yıllarda biyofilmle ilgili yürütülen çalışmalar için iyi birer kaynak teşkil etmektedir.

*Bacillus subtilis* endospor formu sayesinde tüm yüzeylerde biyofilm oluşturabilir. Gıda endüstrisinde bu tür biyofilmler gıda işleme ekipmanlarının yüzeylerinde, boru ve dirseklerinde birikerek ilgili ürünün bozulmasına neden olmaktadır. Mikrobiyal inaktivasyon için uygulanan temel işlemlerin biyofilme karşı yetersiz kalışı dikkate alındığında gıda işletmelerinde uygulanan sanitasyon işlemleri ve yüzey dezenfeksiyonun önemi artmaktadır (Kaya, 2012).

### 2.3. Biyofilm Oluşum Mekanizmaları

Biyofilm oluşturan bakteri türleri; *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* şeklinde sıralanabilir (Kocot ve ark., 2017; Gün, 2009). Biyofilm oluşması sırasıyla bakterinin yüzeye tutunması, yüzeyde çoğalarak kolonileşmesi, dönüşümsüz ekzopolisakkarit matriks oluşturması şeklinde 3 aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 2.3) (Gün, 2009).



Şekil 2.3. Biyofilm oluşum mekanizması (Anonim, 2016)

### **2.3.1. Dönüşümlü tutunma**

Bu aşamada bakteri tam anlamıyla tutunma sağlayamaz. Hidrofobik, elektrostatik etkileşimler, Van der Waals bağları gibi zayıf etkileşimlerle yüzeye uzun mesafeli bağlantılar oluşturur. Yüzeye teması sağlanmayan bakteriler bu aşamada kolaylıkla uzaklaştırılabilir (Gün, 2009).

### **2.3.2. Dönüşümsüz tutunma**

Bu aşamada bakteriler kısa mesafede etkili olan dipol-dipol, iyon-dipol etkileşimleri, kovalent ve iyonik bağlar ile dönüşümsüz olarak yüzeye tutunma sağlar. Organizma yüzeye pilli veya flagella ile bağlanıp EPS oluşumunu başlatarak yüzeye tutunma sağlar. Bu aşamadaki yüzeye çok güçlü teması olmayan bakterilerin uzaklaştırılması için yıkama işlemine fırçalamanın da eklenmesi gerekmektedir (Gün, 2009).

### **2.3.3. Koloni oluşumu**

Dönüşümsüz aşamada tutunan bakterilerin gelişip sayılarının artmasıyla biyofilm oluşumunun son aşaması başlar. Biyofilmi oluşan koloni ortamda bulunan diğer bakterilerle iletişim kurarak aynı yüzeyde koloni oluşturmasını sağlar. Bu şekilde sağlanan büyüme ile eksopolisakkarit matrikste kapsül oluşmaya başlar. Matriks içinde meydana gelen mikrokoloniler büyüyerek makrokolonilere dönüşür (Gün, 2009).

Son olgunluğa ulaşan biyofilm yapısından bakteriler tek veya koloni olarak koparak ortama yayılır ve bu sayede yeni bir biyofilmi ilk aşamadan itibaren tekrar oluşturmaya başlarlar. Bu kopma artan EPS düzeyi ve akış kuvveti, enzim sisteminde meydana gelen bozulmalar, ortamda bulunan besin maddelerinin tükenmesi gibi iç kaynaklı sebeplerle oluşabildiği gibi daha fazla yayılmak adına yeni biyofilm yapma veya dış kuvvetlerin etkisiyle de oluşabilir (Gün, 2009).

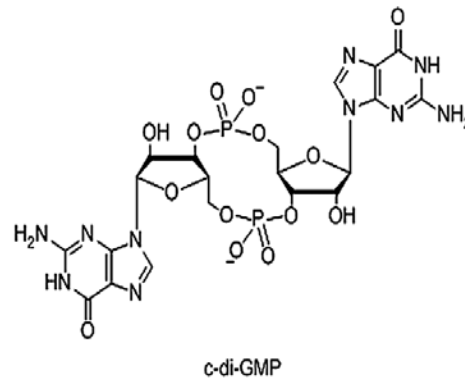


Birçok mikroorganizma aktivitelerini koordine etmek amacıyla birbirlerine sinyal verirken küçük yayılabilir molekülleri kullanırlar. Mikroorganizmalar tarafından hücreden hücreye gerçekleştirilen bu iletişim “Quorum Sensing (QS)” olarak adlandırılmıştır. QS biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizmadır. Bakteriler ürettikleri sinyal yoğunluğunu ölçebilmekte ve çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmektedirler. Bu verilerin diğerlerine iletilmesine imkân sağlayan QS sayesinde bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirleyebilir. Yüze tutunan bakterilerin sayısı arttıkça bu sinyalin konsantrasyonları artar (Turan, 2017). QS, biyofilm oluşum mekanizmasında önemli bir yer tutar. Bu iletişim serbest dolaşan mikroorganizmaların yüze tutunması takiben kolonizasyonun oluşmasını sağlar.

Yapılan araştırmalar, bakterilerde QS özelliğinin ve dolayısıyla biyofilm oluşumunun halkalı dimerik guanosin 3',5'-monofosfat (c-di-GMP) adı verilen bir nükleotit tarafından kontrol edildiğini göstermektedir (Ross ve ark., 1987; Romling ve ark., 2005). Bu nükleotitle ilgili çalışmalar hem biyofilm oluşum mekanizmasının anlaşılması hem de engellenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

#### 2.4. Halkalı Dimerik Guanosin 3',5'-monofosfat (c-di-GMP) Yapısı

Şekil 2.4'te yapısı gösterilen halkalı dimerik guanosin 3',5'-monofosfat (c-di-GMP) yaygın olarak bakteriler arası iletişimde ve sabit-hareketli bakteriyel yaşam arasında mesajcı olarak görev yapar (Ross ve ark., 1987).

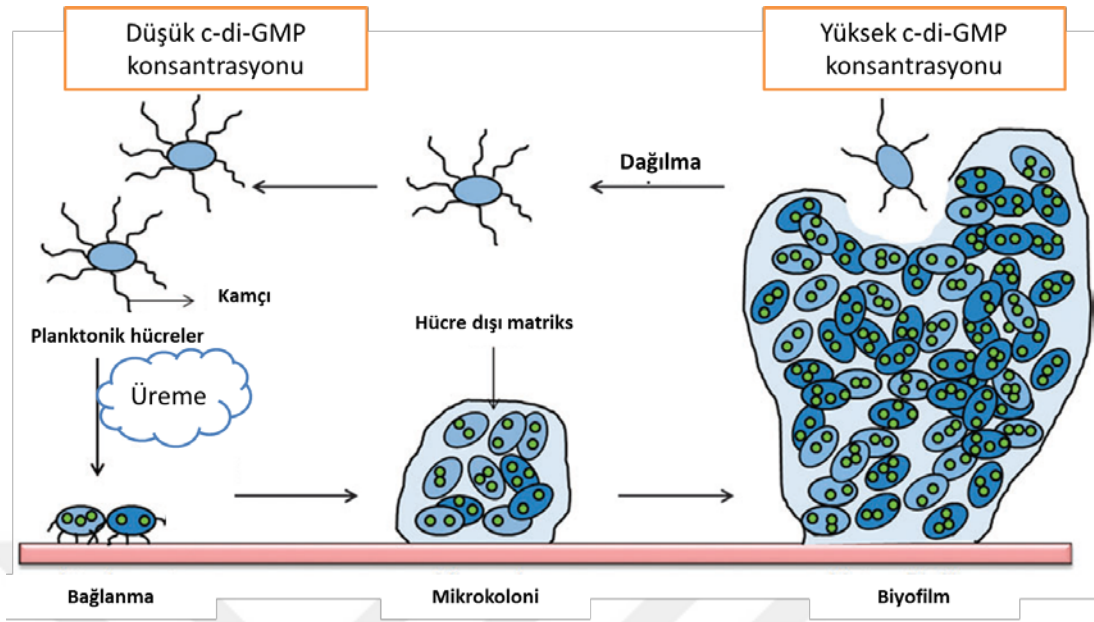


Şekil 2.4. c-di-GMP yapısı

Yapılan son çalışmalar c-di-GMP'nin biyofilm oluşum mekanizmasına etkilerinin yanı sıra bazı bakteri ve virüslerde etkili bir immünomodülatör olarak etkili olduğu gözlemlenmiştir (D'Argenio ve ark., 2004; Karaolis ve ark., 2007).

Sonuç olarak c-di-GMP, oldukça sık rastlanan ve bakteriler arasında iletişim kurulmasını sağlayan bir sinyal molekülüdür ve pek çok bakteri bu molekülü içeren proteinleri tanıyan genler bulundurmaktadır.

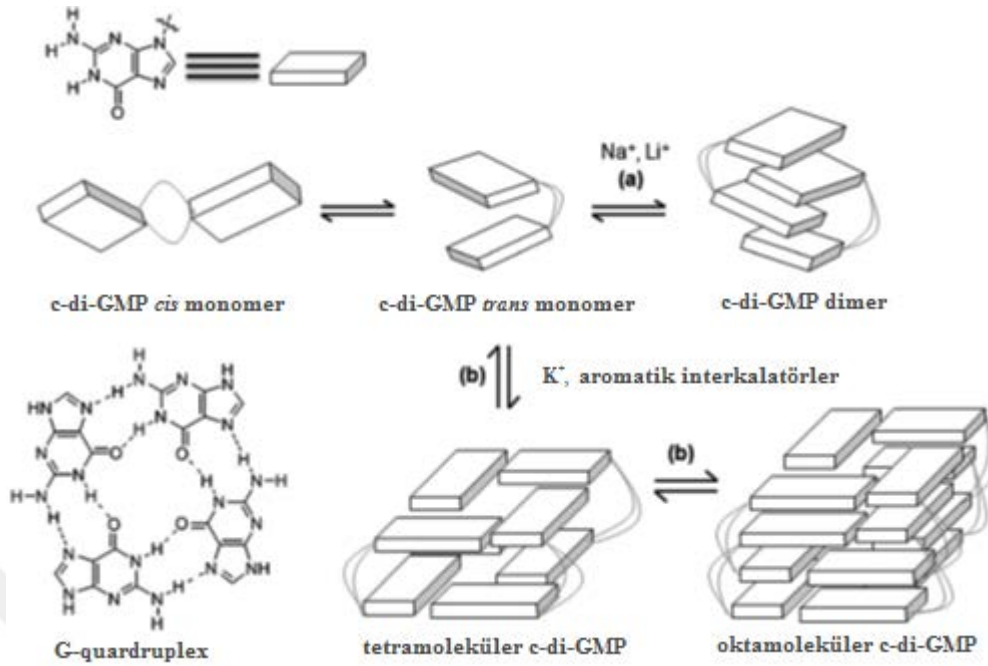
Bakteriyel biyofilm oluşum süreci boyunca c-di-GMP konsantrasyonu artmaktadır (Şekil 2.5). Çeşitli bakteriler üzerinde yapılan pek çok çalışmada c-di-GMP'nin bakterilerdeki farklı hayati fonksiyonları kontrol ettiği anlaşılmıştır (Qi ve ark., 2009; Wan ve ark., 2009; Pratt ve ark., 2007). Ancak bakteriye dışarıdan c-di-GMP verildiğinde bu fonksiyonların artması beklenirken aksine azalma gözlenmiştir. Örneğin Karolis ve ekibi, *S.aureus* hücrelerine 20 mM üzerinde *in vitro* c-di-GMP ilavesinin biyofilm oluşumunu %50 azalttığını belirtmektedir (Karaolis ve ark., 2005). Fareler üzerinde yapılan *in vivo* testler de bu veriyi desteklemiştir (Brouillette ve ark., 2005). Ayrıca *S.mutans* ve *P. aeruginosa* ile yapılan çalışmalarda da 200 mM c-di-GMP ilavesinin benzer şekilde biyofilm oluşumunu %50 azalttığı gözlemlenmiştir (Yan ve ark., 2010; Ishihara ve ark., 2010). Biyofilm oluşumunu c-di-GMP'nin kontrol ettiği göz önünde bulundurulduğunda c-di-GMP konsantrasyonundaki artışın biyofilm oluşumunu arttırması beklenirken azalttığının gözlenmesi, dışarıdan eklenen c-di-GMP'nin bakteri hücresi içine giremediğini ve hücre dışındaki reseptörlere bağlanarak biyofilm oluşumunu azalttığını göstermektedir (Kalia ve ark., 2013).



Şekil 2.5. Biyofilm oluşum aşamasında meydana gelen c-di-GMP konsantrasyon değişimi

c-di-GMP yaklaşık 20 yıl önce keşfedilmesine rağmen bu molekül ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça yenidir (Ausmees ve ark., 2001). Bu çalışmalar ağırlıklı olarak, c-di-GMP molekülünün seçici inhibisyonuna ve böylelikle bakterinin yaşamsal fonksiyonlarının durdurulmasına yöneliktir (Nakayama ve ark., 2011a; Nakayama ve ark., 2011b; Kelsey ve ark., 2012). Bunu sağlayabilmek için c-di-GMP yapısını yakından incelemek gerekir.

c-di-GMP, oldukça eşsiz bir yapıya sahip olup yapısındaki iki baz grubu *trans* ve *cis* konformasyonlar arası geçiş yapabilir. Ardından *cis*-konformasyonu tekrar dimerleşerek tetramoleküler ve oktamoleküler yapılar oluşturabilir (Şekil 2.6). Tetramoleküler ve oktamoleküler yapılar, oldukça düşük c-di-GMP konsantrasyonunda, ortamda 0-300 mM  $K^+$  tuzu bulunması durumunda rahatlıkla oluşabilir. Bu durumda reseptör proteinlerin c-di-GMP yapısına seçici olarak bağlanması mümkün olur (Egli ve ark., 1990; Zhang ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2006).



Şekil 2.6. c-di-GMP Dimerleşmesi ile oluşan tetramoleküler ve oktamoleküler yapılar

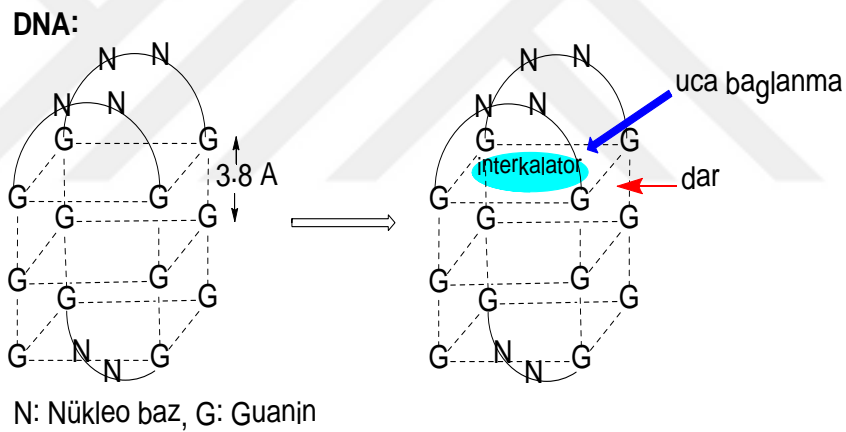
Bakteri hücrelerindeki c-di-GMP sentezi diguanylate cyclases (DGCs) ve yıkımı phosphodiesterases (PDE-As) tarafından kontrol edilmektedir (Romling ve ark. 2005, Kulasakara ve ark. 2006, Schirmer ve ark. 2005). Biyolojik süreçleri sırasında c-di-GMP, dört temel reseptör proteine bağlanır:

1. DGCs ve çeşitli inhibisyon bölgeleri (I-site) içeren proteinler<sup>37-39</sup> (Chan ve ark., 2004; Christen ve ark., 2006; Lee ve ark., 2007)
2. PDE-As ve katalitik yönden inaktif proteinler (Kulasekara ve ark., 2005; Kazmierczak ve ark., 2006)
3. PilZ proteinleri (Romling ve ark., 2006)
4. FleQ ve VpsT gibi diğer spesifik proteinler (Hickman ve ark., 2008; Krasteva ve ark., 2010)

Yukarıda belirtilen protein türlerinin her biri c-di-GMP'nin belirli konformasyonları üzerinden bağlanabilir. Örneğin DGCs proteinlerinin PleD ve WspR gibi inhibisyon

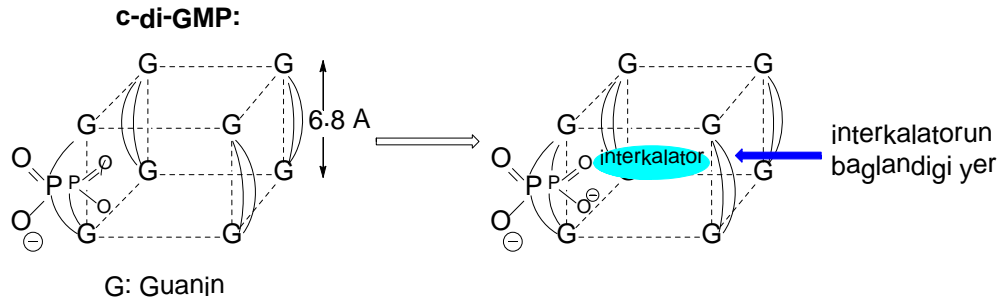
bölgeleri (I-sites), c-di-GMP dimerik *cis* yapıda olduğunda bağlanırken PDE-A'da bulunan FimX protein bölgesi monomerik *trans* yapıyı tercih eder (Gross, 2008; Navarro ve ark., 2009). Bağlanan bu farklı yapılar üzerinden araya girebilecek küçük moleküllerin tasarlanmasıyla c-di-GMP fonksiyonu inhibe edilerek biyofilm oluşumunun ve dolayısıyla bakteriyel enfeksiyonların engellenmesi mümkün görülmektedir.

Literatür verileri incelendiğinde, guanin bazı içeren yapılardan olan DNA ve RNA'nın çeşitli küçük moleküllerle interkalasyon (araya girme) üzerinden G-kuadrupleks yapı oluşturduğu gözlenmektedir (Şekil 2.7) ve bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar oldukça fazladır (Le Gresley ve ark., 2011, Read ve ark., 2001, De Cian ve ark., 2007).



**Şekil 2.7.** DNA'nın oluşturduğu G-kuadrupleks yapı

Benzer şekilde farklı tip interkalatörlerin, oldukça düşük c-di-GMP konantrasyonunda bile etkili olarak G-kuadrupleks yapısı üzerinden c-di-GMP'nin agregasyonuna neden olup etkinliğini yok edebildiği görülmektedir (Şekil 2.8) (Kelsey ve ark., 2012).



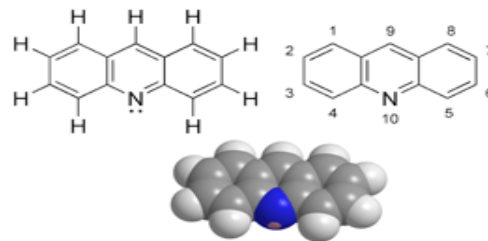
**Şekil 2.8.** c-di-GMP'nin oluşturduğu G-kuadrupleks yapı

Bakterilerde c-di-GMP ile sağlanan iletişimin bozulması için c-di-GMP'nin önemli farmakofor birimlerinin modellenmesi gerekmektedir.

Özellikle akriflavin, proflavin, antrasen, metilen mavisi, tiazol oranj gibi çoklu aromatik halkalar içeren sistemler G-kuadrupleks yapılarına bağlanabilir (Nakayama ve ark., 2011). Akridin türevleri de c-GMP'nin oluşturduğu G-kuadrupleks yapısına bağlanma potansiyeli taşıyan aromatik bileşik gruplarından biridir.

## 2.5. Akridinler

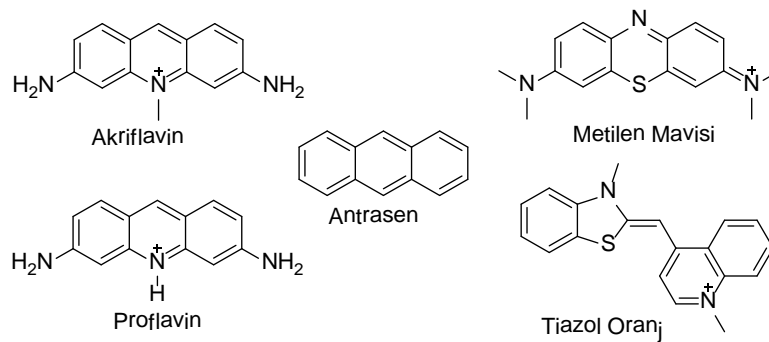
Akridinler sahip oldukları yapı sayesinde floresans özelliğe sahip olan ve boyar maddelerle bazı ilaçların sentezinde kullanılan bileşiklerdir (Acheson, 1973). Kömür katranından elde edilebilen akridinler alkol, eter ve hidrokarbonlarda çözünür, suda kısmi olarak çözünür ve zayıf bazik özellik gösterirler (Göker, 2010). Bileşiğin yapı karakterizasyonu ise Hinsberg tarafından yapılmıştır (Ulus, 2012). Akridin, antrasen yapısında bulunan orta halkadaki -CH gruplarından birinin yerine N gelmesiyle oluşan renksiz, kristal, düzlemsel yapıda halkalı bir alkaloidtir (Şekil 2.9).



**Şekil 2.9.** Akridinin kimyasal yapısı

## 2.6. Akridin Türevleri

Akridin türevleri antimikrobiyal ve antiseptik özellikleriyle farmakolojik açıdan öneme sahiptirler. En çok bilinenler türevler akriflavin ve proflavindir. Akridinler düzlemsel polisiklik yapıları sayesinde DNA ile interkalasyon yapabilmektedir (Göker, 2010). İlk kez 1961 yılında Leonard Lerman tarafından gerçekleştirilen interkalasyon; molekülün elektrostatik etkileşimle açılan DNA sarmalında bazların aralarına yerleşmesidir. Akridin türevlerinin sahip olduğu floresans özellik sayesinde interkalatör ajan olarak mutajenik çalışmalarda tercih edilmektedir. Antikanserojen, antimalaryal, antiviral, antiglukom özelliğe sahip olan akridin türevleri farmakolojik önem taşıyan molekül grubudur (Kaban ve ark., 1994; Ulus, 2012). Biyolojik aktiviteleriyle ilaç, antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılan akridinler ayrıca yaygın bir şekilde boya, floresan malzemeler ve çeşitli organik ve inorganikler için sensör olarak kullanılır (Schmidt, 2015). Akridin türevleri, çoğunlukla biyolojik aktivitelerini nükleotid yapıları arasında interkalasyon sağlayarak gösterirler. Aromatik yapının elektron dağılımı nedeniyle nükleotid yapılarıyla kolayca etkileşebilirler. İnterkalasyon yapan bazı akridin türevlerinin yapısı Şekil 2.10'da verilmektedir.



Şekil 2.10. Çeşitli interkalatörler

Çok benzer özellikte oldukları için c-di-GMP ile G-kuadrupleks oluşturabilen yapıların, DNA veya RNA ile de G-kuadrupleks oluşturması söz konusu olabilir. Ancak c-di-GMP ile DNA ve RNA G-kuadrupleksleri arasında seçicilik sağlayan çeşitli küçük moleküller bulunmaktadır. Örneğin antrasen türevleri DNA ile etkileşerek dupleks oluştururken c-di-GMP ile kuadrupleks oluşturmaz. c-di-GMP'ye

ait G-kuadrupleks yapısında her bir ünite arası mesafe  $6.8 \text{ \AA}$  iken DNA için bu mesafe  $3.7 \text{ \AA}$ 'dur. Bu durumda moleküller arasında seçicilik sağlanması söz konusu olabilmektedir.

Sonuç olarak bu seçiciliği sağlayacak moleküllerin keşfedilmesi için pek çok deneme yapılması gerekmektedir. Literatür verilerinin ışığında gerçekleştirilecek yeni çalışmalarla uygun yapıların bulunması söz konusu olabilecektir.





### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çözücü olarak kullanılan diklorometan, etil asetat, hekzan, etanol, metanol ve dimetil formamid Merck ve Sigma Aldrich firmalarından satın alınmış olup analitik saflıktadır. Deneylerde kullanılan reaktifler Sigma Aldrich ve Alfa-Aesar firmalarından satın alınan yüksek saflıktaki (>%99) kimyasallardır. İnce tabaka kromatografisi için kullanılan 60G F<sub>254</sub> silika jel plakalar Merck firmasından satın alınmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Ürünlerin FT-IR (Fourier Transform Infrared) spektrumları, Nicolet 6700 FT-IR spectrometer cihazı ile ATR (Attenuated Total Reflection) kullanılarak alınmış, veriler dalga sayısı (cm<sup>-1</sup>) cinsinden kaydedilmiştir.

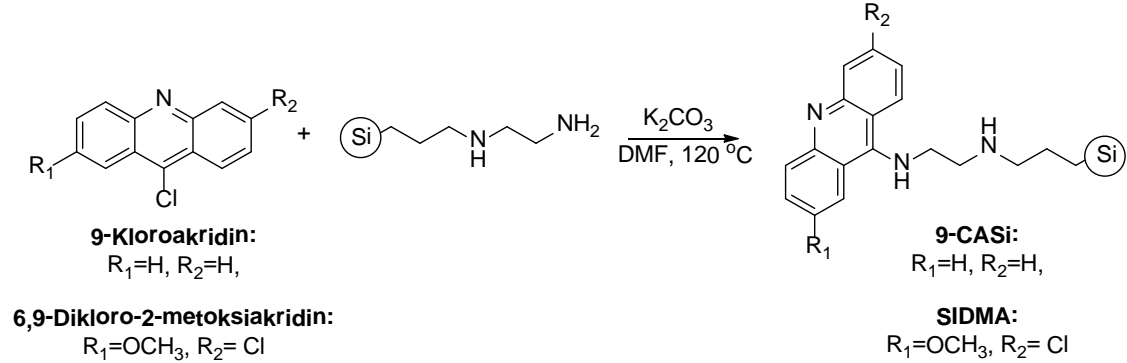
UV analizleri için Thermo Scientific / Genesys 10S UV-VIS spektrofotometre cihazı ve Perkin Elmer / Victor<sup>3</sup>V 1420 Multilabel Readers cihazı kullanılmıştır.

HPLC analizleri Thermo Scientific / Dionex Ultimate 3000 HPLC cihazı gerçekleştirilmiş, kolon olarak GL Sciences Inertsil (4.6 x 250 mm) HPLC kolonu kullanılmıştır. Analiz sırasında mobil faz olarak 1,0 mM amonyum molibdat çözeltisi (A) ve metanol (B) karışımı dereceli olarak (%15 B : %85 A ile %95 B : % 5 A arasında) 0,5 mL/dk akış hızı ile 35 dk boyunca 30 °C'de uygulanmıştır.

#### 3.3. Silika Destekli Akridin Türevlerinin Sentezi

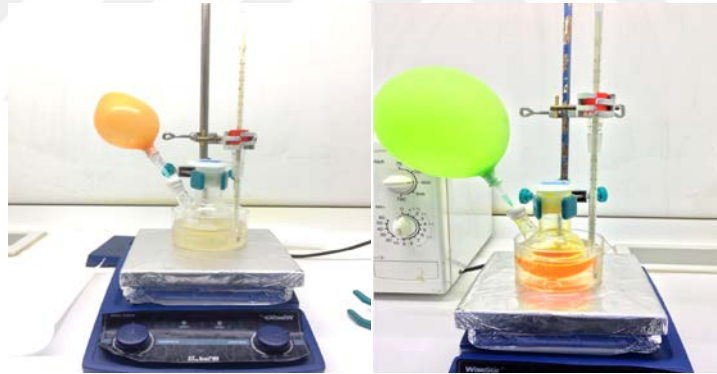
Şekil 3.1'de verilen reaksiyonları gerçekleştirmek için kuru bir balona tartılan 1g (1,14 mmol) 3-(etilenamino) propil bağlı silika jel ve 1,25 mmol akridin türevi (9-kloroakridin veya 6,9-dikloro-2-metoksiakridin) üzerine çözücü olarak 30 mL *N,N*-dimetil formamid eklenmiştir. Ardından 0,464 g (3,36 mmol) potasyum karbonat

eklenerek balon içeriği 120 °C'de 16 saat boyunca azot altında karıştırılmıştır (Şekil 3.2).



**Şekil 3.1.** Silika destekli akridin türevlerinin sentezi

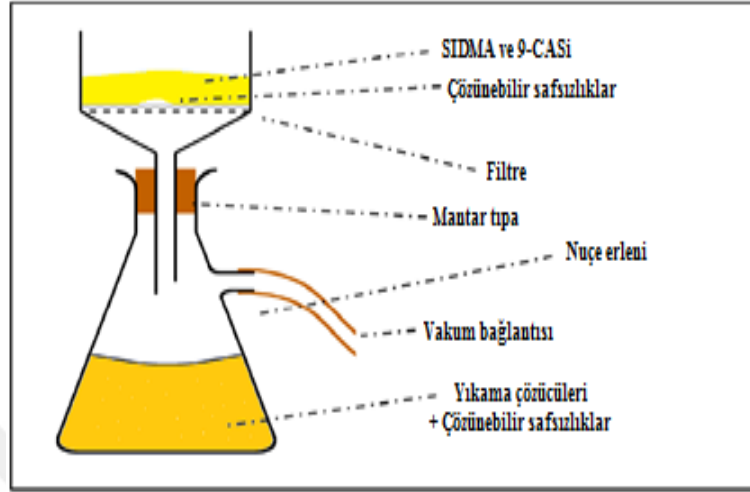
9-Kloroakridin ile gerçekleştirilen reaksiyonun ürünü **9-CASi**, 6,9-dikloro-2-metoksiakridin ile gerçekleştirilen reaksiyonun ürünü **SIDMA** olarak kodlanmıştır.



**Şekil 3.2.** Reaksiyon düzeneği

Reaksiyon içeriği soğutulduktan sonra elde edilen ham karışım, reaksiyona girmemiş olan bütün bileşenlerden ve çözünebilir safsızlıklardan kurtulmak amacıyla sırasıyla diklorometan, hekzan, etil asetat, metanol, aseton çözücülerile nuçe erleninde yıkanmıştır (Şekil 3.3). Elde edilmesi beklenen ürünlerin çözünürlüğü olmadığı için saflaştırma işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği yıkama çözücülerinden alınan örneğin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile incelenmesi sonucunda anlaşılmıştır. TLC'de UV altında hiç bir spot gözlenmediğinde yıkama işlemi sonlandırılmış ve

ürün vakumlu etüvde oda sıcaklığında bir gün boyunca kurutulduktan sonra +4 °C’de hermetikli olarak muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. Süzme düzeneğinde yıkama işlemi

Beklenen ürünün oluşup oluşmadığı Fourier transform infrared spektrofotometrede (FT-IR) kontrol edilmiş ve IR ile ürün oluşumu anlaşıldıktan sonra çalışmanın diğer aşamalarına geçilmiştir.

### 3.4. Guanosin 3',5'-siklik Monofosfat (c-di-GMP) ile İnterkalasyon

Bakterilerde biyofilm oluşumu, üreme, hareket etme gibi pek çok fonksiyonu kontrol eden dimerik formdaki guanosin 3',5'-siklik monofosfat (c-di-GMP) nükleotidine en yakın yapı olduğu için sentezlenen akridin türevlerinin monomerik yapı olan c-GMP ile etkileşimi incelenmiştir. Bunun için sentezlenen moleküllerin c-GMP ile inkübasyonu sonrası önce ultraviyole (UV) spektroskopisi, ardından yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile sonuçlar kontrol edilmiştir.

#### 3.4.1. UV spektrometre ile gerçekleştirilen analizler

Başlangıç maddesi olan 3-(etilendiamino) propil bağlı silika jel ve ürünlerin c-GMP ile etkileşimleri UV-spektrofotometrede incelenmiştir. Örnekler, Çizelge 3.1’de belirtilen şekilde hem 9-CASi hem de SIDMA için ayrı ayrı hazırlanarak 242 nm ve 309 nm dalga boylarında absorbansları belirlenmiştir.

**Çizelge 3.1.** UV-Spektrofotometre için hazırlanan örnek içerikleri ve konsantrasyonları

ÖRNEK NO	BİLEŞEN	STOK ÇÖZELTİ KONSANTRASYONU	ALINACAK MİKTAR	SON KONSANTRASYON
Şahit	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	Destile Su	-	600 µL	-
1	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM
	Destile Su	-	550 µL	-
	Boş Silika	1g/1,14 mmol	17,5 mg	28,5 mM
2	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM
	Destile Su	-	550 µL	-
	Boş Silika	1g/1,14 mmol	17,5 mg	28,5 mM
3	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	KCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL	0,179 M
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM
	Destile Su	-	500 µL	-
	Boş Silika	1g/1,14 mmol	17,5 mg	28,5 mM
4	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	NaCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL	0,179 M
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM
	Destile Su	-	500 µL	-
	Boş Silika	1g/1,14 mmol	17,5 mg	28,5 mM
5	9-CASi veya SIDMA	1g/1,12 mmol veya 1g/1,05 mmol	20 mg /22,5 mg	32 mM/33,8 mM
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	Destile Su	-	600 µL	-
6	9-CASi veya SIDMA	1g/1,12 mmol veya 1g/1,05 mmol	20 mg /22,5 mg	32 mM/33,8 mM
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	c-GMP	500 µM	50 µL	50 µL
	Destile Su	-	550 µL	-
7	9-CASi veya SIDMA	1g/1,12 mmol veya 1g/1,05 mmol	20 mg /22,5 mg	32 mM/33,8 mM
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	KCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL	0,179 M
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM
	Destile Su	-	500 µL	-
8	9-CASi veya SIDMA	1g/1,12 mmol veya 1g/1,05 mmol	20 mg /22,5 mg	32 mM/33,8 mM
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	NaCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL	0,179 M
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM
	Destile Su	-	500 µL	-

### 3.4.2. HPLC ile gerçekleştirilen analizler

Sentezlenen silika destekli akrinin türevlerinin c-GMP ile etkileşim oranının belirlenmesi amacıyla HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle c-GMP, Bölüm 3.2’de belirtilen uygun kromatografik koşul belirlenmiş ve diğer örnekler de c-GMP’nin kromatogramı referans alınarak incelenmiştir. Örnekler Çizelge 3.2’ye göre hem 9-CASi için hem de SIDMA için ayrı ayrı hazırlanmış ve sonuçlar dedektörün dalga boyu 242 nm, 253 nm ve 309 nm olacak şekilde ayrı ayrı kaydedilmiştir.

**Çizelge 3.2.** HPLC için hazırlanan örnek içerikleri ve konsantrasyonları

ÖRNEK NO	BİLEŞEN	STOK ÇÖZELTİ KONSANTRASYONU	ALINACAK MİKTAR	SON KONSANTRASYON
Şahit	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	Destile Su	-	550 µL	-
1	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM
	Destile Su	-	550 µL	-
	9-CASi veya SIDMA	1g/1,12 mmol veya 1g/1,05 mmol	20 mg/ 22,5 mg	32 mM/33,8 mM
2	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	Destile Su	-	600 µL	-
3	9-CASi veya SIDMA	1g/1,12 mmol veya 1g/1,05 mmol	20 mg/ 22,5 mg	32 mM/33,8 mM
	Tris Tampon Çözelti	50 Mm	100 µL	7,143 mM
	c-GMP	500 µM	50 µL	50 µL
	Destile Su	-	550 µL	-
4	9-CASi veya SIDMA	1g/1,12 mmol veya 1g/1,05 mmol	20 mg/ 22,5 mg	32 mM/33,8 mM
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	KCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL	0,179 M
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM
	Destile Su	-	500 µL	-
5	9-CASi veya SIDMA	1g/1,12 mmol veya 1g/1,05 mmol	20 mg/ 22,5 mg	32 mM/33,8 mM
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM
	NaCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL	0,179 M
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM
	Destile Su	-	500 µL	-

### 3.5. Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkinin İncelenmesi

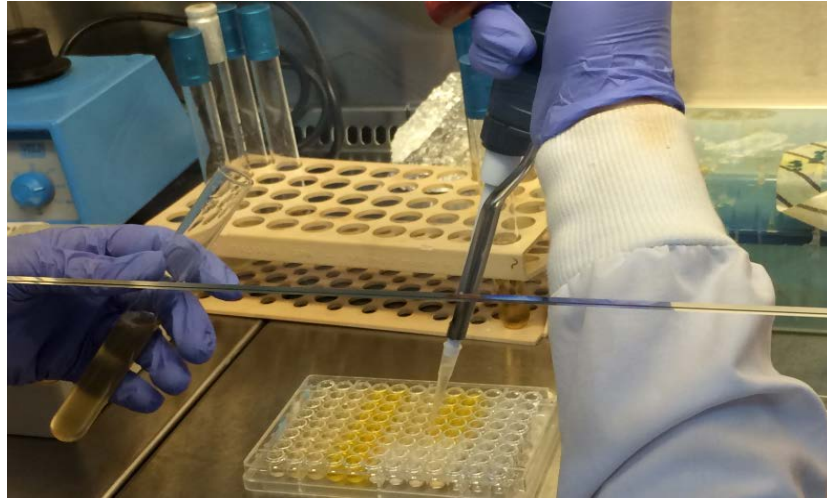
Biyofilm inaktivasyonu etkisinin belirlenmesi amacıyla O'Toole (2011) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

#### 3.5.1. Bakteri aktivasyonu

Liyofilize halde temin edilen *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 suşu Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine %10 inokülasyon oranı ile eklendikten sonra 30°C sıcaklıkta 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda yeniden pasaj ile çoğaltılan bakteri örneğinden %15 gliserollü besi ortamına aktarılarak -20°C'de saklanacak stok kültürler hazırlanmıştır.

#### 3.5.2. Akridin türevlerinin biyofilm inaktivasyon etkisinin incelenmesi

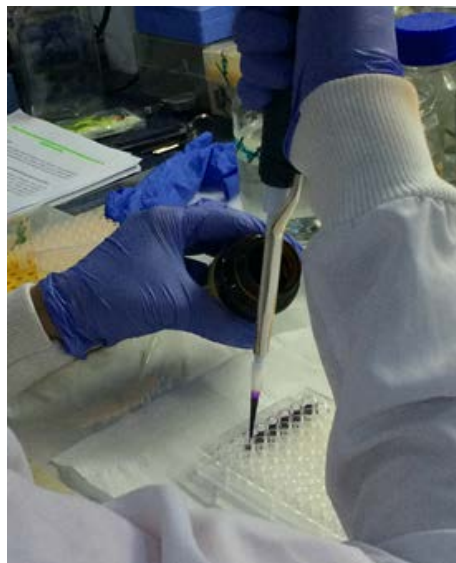
96 kuyucuklu polistren plaka kuyucuklarına; sadece besi ortamı içeren, besiyeri-tuz içeren, besiyeri-bakteri içeren, besiyeri-bakteri ve tuz içeren, besiyeri ve akridin türevi içeren, besiyeri akridin türevi ve tuz içeren kuyucuklar kontrol örnekleri olarak hazırlandıktan sonra akridin türevi maddesini içeren kuyucuklar hazırlanmıştır. Plaka UV ile sterilize edildikten sonra daha önce iki kez pasajlanarak elde edilen ve  $O.D_{600}$ : 0.5'e ayarlanan *B.subtilis* bakterisi 100 µL hacminde eklenmiştir (Şekil 3.4). 30°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından biyofilm oluşturma düzeyleri tespit edilmiştir.



Şekil 3.4. Polistren plakaya *B.subtilis* eklenmesi

### 3.5.3. Biyofilm oluşumunun tespiti

İnkübasyonun ardından kuyucuklarda bulunan içerik uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar PBS ya da steril distile su ile 2 kez yıkandıktan sonra 125  $\mu$ L %0.1 kristal viyole boyası ile 15 dakika boyanmıştır (Şekil 3.5). Boya çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra su ile 2 kez yıkanan plakalar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuyucuklarda tutunan boya 125  $\mu$ L %30 asetik asit çözeltisi ile çözülüp spektrofotometrede 595 nm’de ölçüm yapılmıştır.

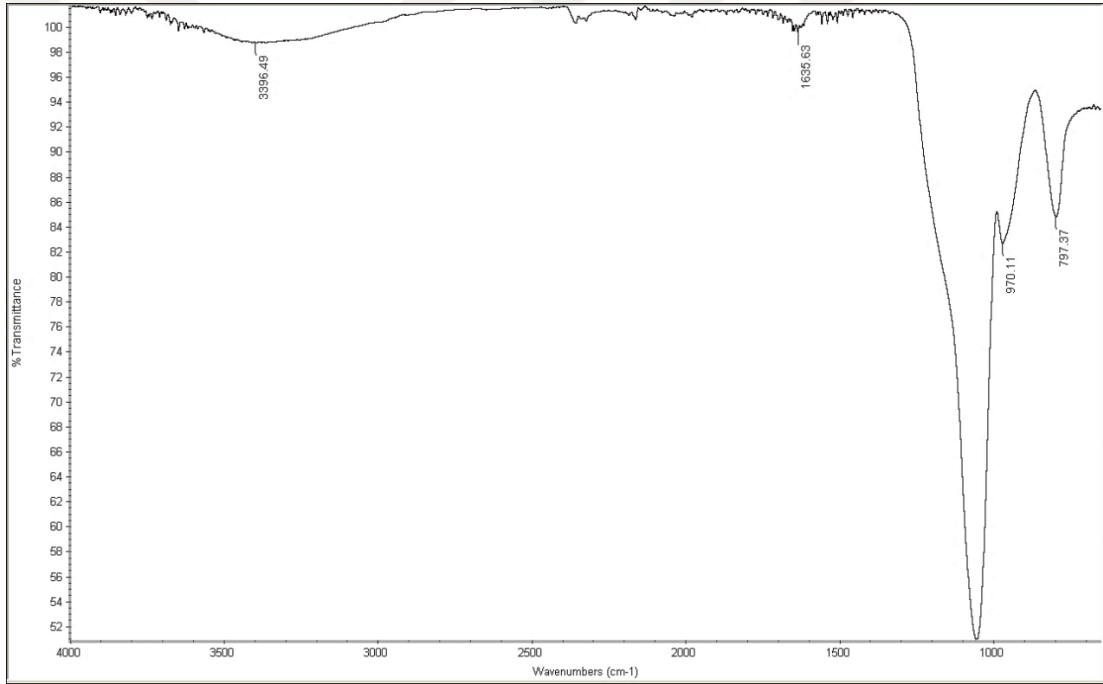


Şekil 3.5. Kristal viyole ile boyama

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

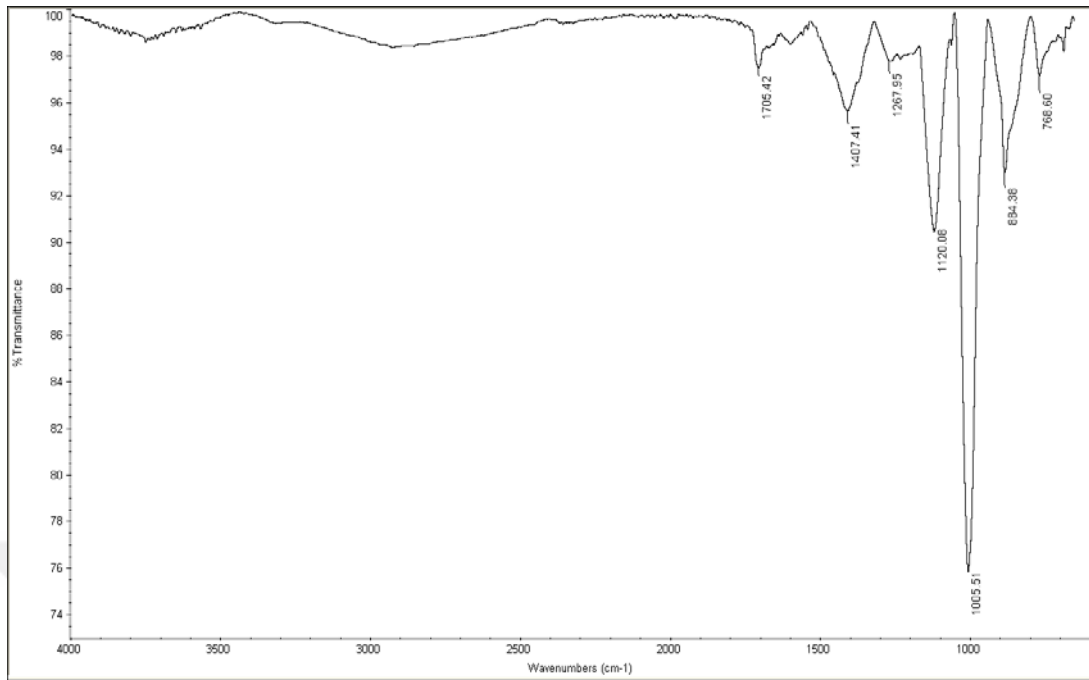
### 4.1. Silika Destekli Akridin Türevinin Yapı Analizi

Elde edilen silika destekli ürün herhangi bir çözücüde çözünmediği için yapı analizi yalnızca infrared (IR) spektroskopisi ile ATR kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyonda kullanılan 3-(etilenamino) propil bağlı silikanın IR spektrumu, reaksiyon sonrası elde edilen ürünlerin IR spektrumu ile karşılaştırılmış ve ürünlerin spektrumunda yer alan farklı bantlardan ürün oluşumunun gerçekleştiği anlaşılmıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

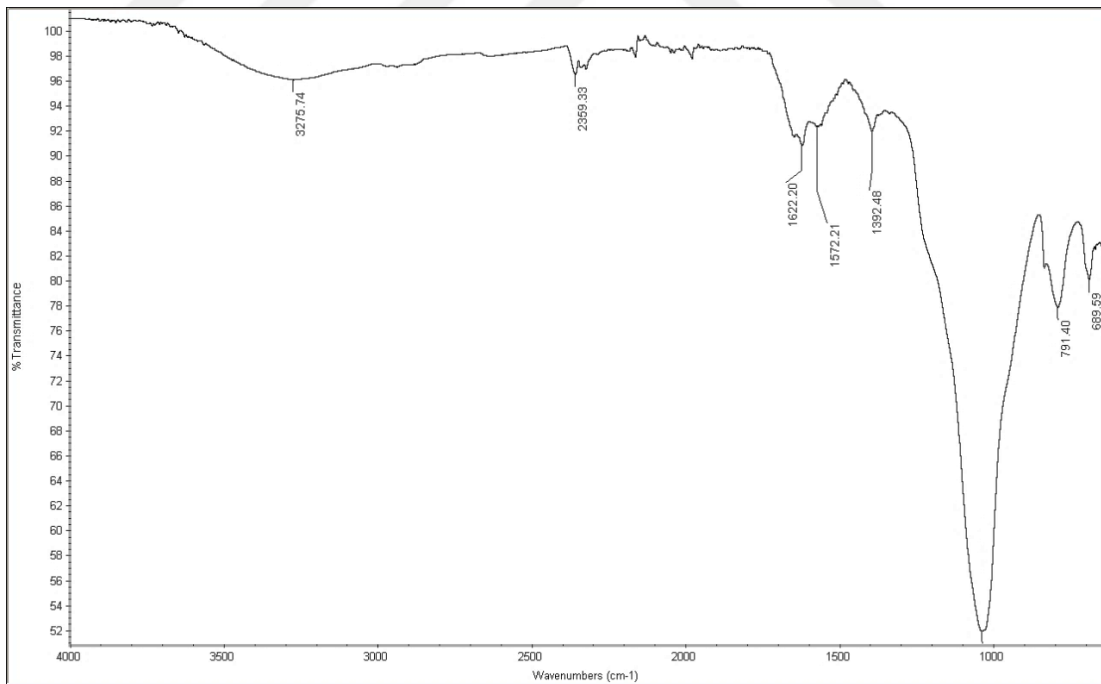


Şekil 4.1. 3-(Etilenamino) propil bağlı silikaya ait IR spektrumu





Şekil 4.2. Elde edilen ürüne (9-CASi) ait IR spektrumu



Şekil 4.3. Elde edilen ürüne (SIDMA) ait IR spektrumu

## **4.2. c-GMP ile Etkileşimin Belirlenmesi**

Sentezlenen akridin türevlerinin c-di-GMP'ye bağlanma potansiyelini belirlemek için monomerik formdaki c-GMP ile etkileşimi incelenmiştir çünkü etkileşimi sağlayan fonksiyonel gruplar her iki molekülde de aynıdır. Etkileşimi belirlemek amacıyla, akridin türevini içeren ve içermeyen örnekler hem UV spektroskopisi hem de HPLC ile analiz edilmiştir. Aynı zamanda ortamda NaCl ve KCl tuzlarının bulunması akridin c-GMP'ye bağlanmasını olumlu yönde etkileyebilmektedir. Böyle bir etkinin olup olmayacağını da gözlemek amacıyla hazırlanan örneklerin bir kısmı NaCl ve KCl tuzlarını içermektedir.

### **4.2.1. c-GMP etkileşiminin UV spektroskopisi ile belirlenmesi**

c-GMP'nin UV dalga boyu aralığında belirli bir absorbansı bulunmaktadır. c-GMP'ye herhangi bir molekülün bağlanması durumunda absorbans değerinde değişim olacağı için bu değişimin ölçülmesi, c-GMP ile herhangi bir molekülün etkileşip etkileşmediği anlamak ve etkileşim oranını belirlemek için kullanılabilir.

c-GMP için en uygun (en yüksek absorbans gözlenen) dalga boyu değerleri 242 ve 349 nm olarak belirlenmiş ve hazırlanan örneklerin absorbansları bu iki dalga boyunda ölçülmüştür. Bütün örneklerde pH'ı sabitlemek için Tris (tris-hidroksimetilaminometan) tampon çözeltisi kullanılmıştır. 9-CASi ve SIDMA için sonuçlar, sırasıyla Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verilmektedir.

**Çizelge 4.1.** c-GMP ile 9-CASi inkübasyonuna ait UV absorbanları

ÖRNEK NO	BİLEŞEN	STOK ÇÖZELTİ KONS.	ALINAN MİKTAR	SON KONS.	242 nm'de ABS.	349 nm'de ABS.
Şahit	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	Destile Su	-	600 µL	-	0	0
1	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM	0,475	0,578
	Destile Su	-	550 µL	-		
2	Boş Silika	1g/1,14 mmol	17,5 mg	28,5 mM		
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM	0,443	0,546
3	Destile Su	-	550 µL	-		
	Boş Silika	1g/1,14 mmol	17,5 mg	28,5 mM		
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
4	KCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL	0,179 M	0,439	0,538
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM		
	Destile Su	-	500 µL	-		
5	Boş Silika	1g/1,14 mmol	17,5 mg	28,5 mM		
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	NaCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL	0,179 M	0,44	0,49
6	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM		
	Destile Su	-	500 µL	-		
	9-CASi	1g/1,12 mmol	20 mg	32 mM		
7	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM	2,695	2,483
	Destile Su	-	600 µL	-		
	9-CASi	1g/1,12 mmol	20 mg	32 mM		
8	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	c-GMP	500 µM	50 µL	50 µL	2,739	2,447
	Destile Su	-	550 µL	-		
9	9-CASi	1g/1,12 mmol	20 mg	32 mM		
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	KCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL	0,179 M	2,711	2,357
10	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM		
	Destile Su	-	500 µL	-		
	9-CASi	1g/1,12 mmol	20 mg	32 mM		
11	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	NaCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL	0,179 M	2,745	2,276
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM		
12	Destile Su	-	500 µL	-		

**Çizelge 4.2.** c-GMP ile SIDMA inkübasyonuna ait UV absorbanları

ÖRNEK NO	BİLEŞEN	STOK ÇÖZELTİ KONS.	ALINAN MİKTAR	SON KONS.	242 nm'de ABS.	349 nm'de ABS.
Şahit	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM	0	0
	Destile Su	-	600 µL	-		
1	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM	0,532	0,996
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM		
	Destile Su	-	550 µL	-		
2	Boş Silika	1g/1,14 mmol	17,5 mg	28,5 mM	0,499	0,630
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM		
	Destile Su	-	550 µL	-		
3	Boş Silika	1g/1,14 mmol	17,5 mg	28,5 mM	0,519	0,600
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	KCl Çözültisi	2,5 M	50 µL	0,179 M		
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM		
	Destile Su	-	500 µL	-		
4	Boş Silika	1g/1,14 mmol	17,5 mg	28,5 mM	0,523	0,580
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	NaCl Çözültisi	2,5 M	50 µL	0,179 M		
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM		
	Destile Su	-	500 µL	-		
5	SIDMA	1g/1,05 mmol	22,5 mg	33,8 mM	0,563	0,589
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	Destile Su	-	600 µL	-		
6	SIDMA	1g/1,05 mmol	22,5 mg	33,8 mM	0,550	0,565
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	c-GMP	500 µM	50 µL	50 µL		
	Destile Su	-	550 µL	-		
7	SIDMA	1g/1,05 mmol	22,5 mg	33,8 mM	0,539	0,573
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	KCl Çözültisi	2,5 M	50 µL	0,179 M		
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM		
	Destile Su	-	500 µL	-		
8	SIDMA	1g/1,05 mmol	22,5 mg	33,8 mM	0,563	0,594
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	7,143 mM		
	NaCl Çözültisi	2,5 M	50 µL	0,179 M		
	c-GMP	500 µM	50 µL	35,714 µM		
	Destile Su	-	500 µL	-		

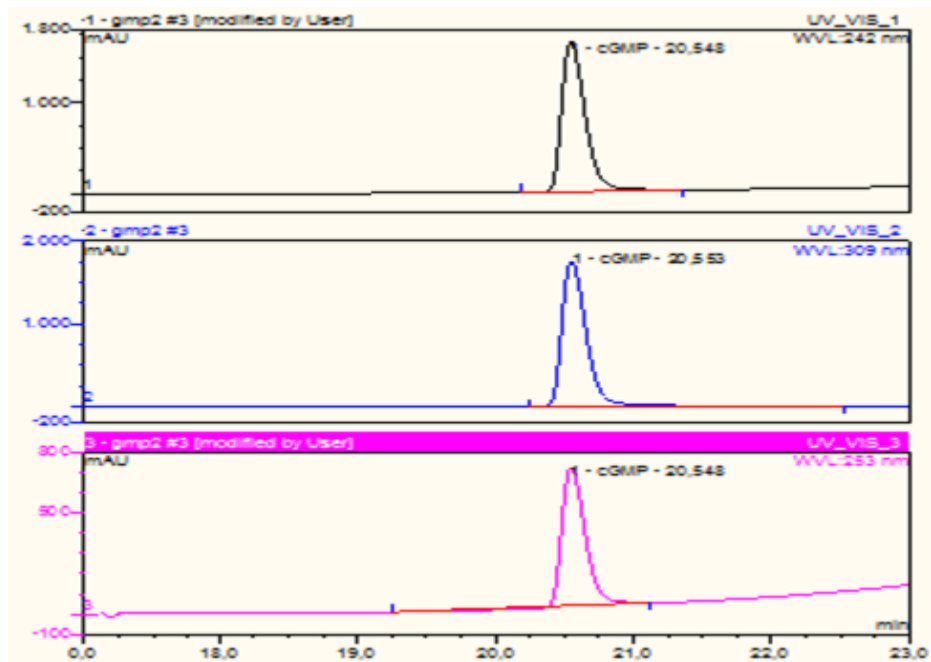
Akridin türevlerinden 9-CASi ile yapılan UV ölçümlerine bakıldığında 9-CASi'nin kendi absorbansının c-GMP'nin absorbansından daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum etkileşimin gözlenmesini güçleştirse de 9-CASi içeren tüm örnekler (5-8) karşılaştırıldığında c-GMP'nin olduğu örneklerde absorbansın daha düşük ölçülmesi arada bir etkileşim olduğunu göstermektedir.

SIDMA ile yapılan denemelerde ise, özellikle 349 nm'de çalışıldığında, SIDMA ortama eklendiğinde c-GMP absorbansında belirgin bir düşme gözlenmektedir.

Bu sonuçlardan yola çıkılarak, her iki türev için de GMP ile etkileşim söz konusudur. Ancak NaCl ve KCl tuzlarının bu etkileşime belirgin olarak arttırıcı ya da azaltıcı etkisi gözlenmemiştir.

#### 4.2.2. c-GMP etkileşiminin HPLC ile belirlenmesi

Analize başlamadan önce c-GMP standardı HPLC'de analiz edilmiş ve alıkonma zamanı (Rt) 20.548 dk olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. c-GMP'nin alıkonma zamanı (Rt)

Ardından 9-CASi için Çizelge 4.3'te belirtilen şekilde hazırlanan örnekler analiz edilmiş ve c-GMP piklerinin alanları 242 nm, 309 nm ve 253 nm'de belirlenmiş ve birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.3.** c-GMP ile 9-CASi inkübasyonuna ait HPLC sonuçları

ÖRNEK NO	BİLEŞEN	STOK ÇÖZELTİ KONS.	ALINAN MİKTAR	Alan - 242nm (mAU)	Alan - 309nm (mAU)	Alan - 253nm (mAU)
Şahit	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	0	0	0
	Destile Su	-	600 µL			
1	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	26.400	29.267	11.636
	c-GMP	500 µM	50 µL			
	Destile Su	-	550 µL			
	9-CASi	1g/1,12 mmol	22,5 mg			
2	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	0	0	0
	Destile Su	-	600 µL			
	9-CASi	1g/1,12 mmol	22,5 mg			
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL			
3	c-GMP	500 µM	50 µL	22.783	24.822	10.378
	Destile Su	-	550 µL			
	9-CASi	1g/1,12 mmol	22,5 mg			
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL			
4	KCl Çözültisi	2,5 M	50 µL	22.984	25.127	10.566
	c-GMP	500 µM	50 µL			
	Destile Su	-	500 µL			
	9-CASi	1g/1,12 mmol	22,5 mg			
5	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	23.308	25.488	10.647
	NaCl Çözültisi	2,5 M	50 µL			
	c-GMP	500 µM	50 µL			
	Destile Su	-	500 µL			

Çizelge 4.3'ten de anlaşılacağı üzere 9-CASi, c-GMP konsantrasyonunu belirgin bir şekilde azaltmıştır. Kullanılan NaCl ve KCl tuzlarının etkileşim üzerinde önemli bir etkisi görülmemiştir.

Aynı yöntemle SIDMA ürünü de analiz edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.4' de verilmiştir.

**Çizelge 4.4.** c-GMP ile SIDMA inkübasyonuna ait HPLC sonuçları

ÖRNEK NO	BİLEŞEN	STOK ÇÖZELTİ KONS.	ALINAN MİKTAR	Alan - 242nm (mAU)	Alan - 309nm (mAU)	Alan - 253nm (mAU)
Şahit	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	0	0	0
	Destile Su	-	600 µL			
1	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL	38626	38508	38794
	c-GMP	500 µM	50 µL			
	Destile Su	-	550 µL			
2	SIDMA	1g/1,05 mmol	22,5 mg	0	0	0
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL			
	Destile Su	-	600 µL			
3	SIDMA	1g/1,05 mmol	22,5 mg	33534	33741	33794
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL			
	c-GMP	500 µM	50 µL			
	Destile Su	-	550 µL			
4	SIDMA	1g/1,05 mmol	22,5 mg	36502	36553	37198
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL			
	KCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL			
	c-GMP	500 µM	50 µL			
	Destile Su	-	500 µL			
5	SIDMA	1g/1,05 mmol	22,5 mg	37262	36936	37235
	Tris Tampon Çözelti	50 mM	100 µL			
	NaCl Çözeltisi	2,5 M	50 µL			
	c-GMP	500 µM	50 µL			
	Destile Su	-	500 µL			

Benzer şekilde, SIDMA da c-GMP üzerinde etkili olmuştur. Ancak burada kullanılan KCl ve NaCl tuzları, SIDMA'nın c-GMP ile etkileşimini büyük ölçüde engellemiştir.

Sonuç olarak, UV spektroskopisi ve HPLC ile yapılan analizler sentezlenen akridin türevlerinin c-GMP ile etkileşime girdiğini göstermektedir. c-GMP konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak absorbansta (UV) ve pik alanında (HPLC) azalma gözlenmiştir.

### 4.3. Silika Destekli Akridin Türevlerinin Biyofilm Üzerine Etkisi

Silika destekli akridin türevlerinin *B. subtilis*'in biyofilm oluşturma gücü üzerindeki inaktivasyon etkisinin belirlenmesinde O'Toole (2011) tarafından önerilen yöntem esas alınmıştır. Çizelge 4.5' te görüldüğü gibi farklı içerikler halinde hazırlanarak polistren mikro-kuyucuklu plakalara ekim yapıldıktan sonra biyofilm aktivitesindeki azalma 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.5'teki ilk 9 örnek kontrol örneklerini temsil etmektedir. İçeriklerde bulunan farklı maddelerin etkisi, absorbans değerindeki değişimle belirlenmektedir. Maksimum biyofilm oluşumu 10 numaralı örneğin bulunduğu kuyucuklarda gerçekleşmiştir. Yönteme göre sadece *B. subtilis* içeren kuyucuklarda biyofilm oluşumu en üst düzeyde olacağı için bu kuyucuklardan elde edilen absorbans değerlerinin de en yüksek değerler olması beklenmektedir. Fakat sonuçlar incelendiğinde SIDMA içeren kuyucuklardan elde edilen absorbans değerlerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu değer kristal viyole ile SIDMA'nın etkileşime girerek absorbans değerini arttırdığı şeklinde yorumlanmaktadır.

Ayrıca SIDMA'nın suda çözünmemesi, plaka kuyucuklarında dip kısma çökmesi, biyofilmin yüzeye yakın kısımlarda oluşması gibi nedenler SIDMA ile biyofilmin etkileşime girmesini engelleyen faktörlerdir. Belirtilen nedenler ışığında SIDMA'nın biyofilm ile etkileşim sağlayamaması sonucunda biyofilm üzerine inaktivasyon etkisi hakkında sağlıklı bir yorum yapılamamıştır. Çizelge 4.5'te görülen absorbans değerleri 9-CASi'nin anti-biyofilm etkisinin olduğunu göstermektedir.



**Çizelge 4.5.** Silika destekli akradin türevlerinin biyofilm üzerine etkisi

Örnek No	İçerik	Miktar	ABS <sup>1</sup>	ABS <sup>2</sup>	ABS <sup>3</sup>	ABS <sup>4</sup>
1	Besiyeri	100 µL*	0,138	0,149	0,156	0,163
2	Besiyeri 9-CASi	100 µL* 5 mg	0,187	0,237	0,156	0,163
3	Besiyeri SIDMA	100 µL* 5,63 mg	2,015	2,079	0,217	0,169
4	Besiyeri KCl	100 µL* 3,7 mg	0,147	0,162	0,159	0,158
5	Besiyeri NaCl	100 µL* 2,9 mg	0,231	0,149	0,167	0,219
6	Besiyeri KCl 9-CASi	100 µL* 3,7 mg 5 mg	0,207	0,204	0,236	0,180
7	Besiyeri NaCl 9-CASi	100 µL* 2,9 mg 5 mg	0,178	0,147	0,189	0,680
8	Besiyeri KCl SIDMA	100 µL* 3,7 mg 5,63 mg	0,207	0,193	0,185	0,178
9	Besiyeri NaCl SIDMA	100 µL* 2,9 mg 5,63 mg	0,169	0,165	0,184	0,363
10	<i>Bacillus subtilis</i>	100 µL	0,469	0,489	0,400	0,380
11	<i>Bacillus subtilis</i> 9-CASi	100 µL* 5 mg	0,175	0,183	0,285	0,123
12	<i>Bacillus subtilis</i> SIDMA	100 µL* 5,63 mg	3,185	2,157	3,112	2,707
13	<i>Bacillus subtilis</i> KCl	100 µL* 3,7 mg	0,382	0,402	0,334	0,303
14	<i>Bacillus subtilis</i> NaCl	100 µL* 2,9 mg	0,302	0,374	0,294	0,298
15	<i>Bacillus subtilis</i> KCl 9-CASi	100 µL* 3,7 mg 5 mg	0,571	1,384	1,402	1,122
16	<i>Bacillus subtilis</i> NaCl 9-CASi	100 µL* 2,9 mg 5 mg	0,239	0,460	0,433	1,269
17	<i>Bacillus subtilis</i> KCl SIDMA	100 µL* 3,7 mg 5,63 mg	3,298	2,956	1,862	2,405
18	<i>Bacillus subtilis</i> NaCl SIDMA	100 µL* 2,9 mg 5,63 mg	2,653	3,181	3,040	3,552

\* Spektrofotometrede bakterinin OD<sub>600nm</sub>; 0,5 ayarlaması yapıldı. Buna göre en uygun seyreltme oranı için hacim %35'i besiyeri veya bakteri (35 µL) %65'i saf su (µL) olacak şekilde hazırlandı.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında bakteriyel biyofilm oluşumunu kontrol eden, c-di-GMP nükleotidinde bağlanarak biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeli taşıyan farklı akridin türevlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen bu moleküllerin c-GMP ile etkileşip etkileşmeyeceği test edilmiş ve bakteri ortamında biyofilm oluşumu üzerine etkisi belirlenmiştir.

Sentezlenen bütün akridin türevlerinin c-GMP konantrasyonunda meydana getirdiği azalma UV spektroskopisi ve HPLC ile yapılan analizlerle belirlenmiştir. Ayrıca bu aşamada akridin türevi ile c-GMP etkileşiminde NaCl ve KCl tuzlarının etkisi de incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar silika destekli akridin türevlerinin c-GMP ile etkileşimi bu türevlerin anti-biyofilm aktivitesi olduğunu göstermektedir. Fakat NaCl ve KCl tuzları bu etkileşimde belirgin düzeyde bir etki sağlayamamıştır.

Anlamli bir etkinlik sağlayan akridin türevlerinin *B. subtilis* suşu üzerindeki etkinliği laboratuvar ortamında test edilmiştir. c-GMP konsantrasyonunda anlamli bir azalma sağlayan akridin türevlerinin (9-CASi) *B. subtilis*' in biyofilm oluşturma gücü üzerinde de inaktivasyon etkisine sahip olduğu saptanmıştır. SIDMA'nın kristal viyole ile etkileşime girmesi biyofilm inaktivasyonu etkisinin belirlenmesi amacıyla kullanılan yöntem açısından sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle SIDMA'nın biyofilm üzerine etkisi hakkında yorum yapılamamıştır.

Çalışma kapsamında sentezlen akridin türevlerinin güncel literatürde yer almayan özgün yapılar olması, elde edilen sonuçların hem akademik alanda hem de sağlık ve gıda sektörüne sağlayacağı katkılar açısından oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Elde edilen veriler özellikle sağlık açısından tehdit oluşturan ve hastane enfeksiyonlarının % 65'ine neden olan biyofilm oluşumunun engellenmesi için önemli bulgulardır.

Aynı zamanda bu türevler, herhangi bir çözücüde çözünürlüğü olmayan silika jele bağlı yapılardır ve böylece katı bir destek üzerinde c-di-GMP molekülünü tutabilmektedirler. Tutma miktarı ölçülebildiği için herhangi bir ortamda bulunan

bakteri miktarının belirlenmesinde kullanılabilir biyosensörlerin geliştirilmesi mümkün olabilir.

Çalışmadan elde edilen veriler ışığında, sentezlenen yeni moleküllerin farklı mikroorganizmaların biyofilm oluşturma potansiyelleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi gelecekte yapılması planlanan çalışmalar arasında yer almaktadır.



## KAYNAKLAR

- Acheson, R.M., 1973. The Acridines. John Wiley&Sons, New Jersey, USA, 878 p.
- Ahmed, H.A., El Bayomi, R.M., Hussein, M.A., Khedr, M.H., Abo Remela, E. M., El-Ashram, A.M., 2018. Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolated from crustaceans and humans. International Journal of Food Microbiology, 274, 31-37.
- Akan, E., Kınık, Ö., 2014. Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi. Gıda Ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi, 14, 42-51.
- Anonim, 2016. Biofilm development, <http://ib.bioninja.com.au/options/untitled/b3-environmental-protection/biofilms.html> (30.04.2018).
- Anonim, 2015b. Electron micrograph images of biofilms. <https://tr.depositphotos.com/85987250/stock-illustration-dental-plaque.html> (30.04.2018).
- Anonim, 2015a. Dental biofilm. <http://ib.bioninja.com.au/options/untitled/b3-environmental-protection/biofilms.html> (01.06.2018).
- Anonim, 2014. Akridin Nedir?. <http://www.nkfu.com/akridin-nedir/> (30.04.2018).
- Anonim, 2013. *Bacillus subtilis*. <https://www.indiamart.com/proddetail/bacillus-subtilis-14199524530.html> (30.04.2018).
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., Lindberg, M., 2001. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. FEMS Microbiology Letters, 204, 163-167.
- Baumann, A.R., Martin, S.E., Feng, H., 2009. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. Journal of Food Protection, 72(6), 1306-1309.
- Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R., Kolter, R., 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. Molecular Microbiology, 59(4), 1229-1238.
- Brouillette, E., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Karaolis, D.K.R., Malouin, F., 2005. 3', 5'-Cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains in a mouse model of mastitis infection, Antimicrobial Agents Chemother, 49, 3109-3113.

- Carpentier, B., Cerf, O., 1993. Biofilm and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, 499-511.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Giese, B., Jenal, U., Schirmer, T., 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 17084-17089.
- Charlebois, A., Jacques, M., Boulianne, M., Archambault, M., 2017. Tolerance of *Clostridium perfringens* biofilms to disinfectants commonly used in the food industry. *Food Microbiology*, 62, 32-38.
- Chmielewski, R.A.N., Frank, J.F., 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 22-32.
- Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M., Jenal, U., 2006. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 32015-32024.
- Chu, F., Kearns, D.B., Steven, S., Branda, S.S., Kolter, R., Losick, R., 2006. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1216-1228.
- Costerton, J.W., Irvin, R.T., 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 83, 299-324.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.
- Dacheng, R.D., Bedzyk, L.A., Setlow, P., Thomas, S.M., Ye, R.W., Wood, T.H., 2004. Gene expression in *Bacillus subtilis* surface biofilms with and without sporulation and the importance of *yveR* for biofilm maintenance. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 344-364.
- De Cian, A., Cristofar, G., Reichenbach, P., Lemos, E., Monchaud, D., Teulade-Fichou, M., Shin-Ya, K., Lacroix, L., Lingner, J., Mergny, J.L., 2007. Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 17347-17352.
- DeQueiroz, G.A., Day, D.F., 2007. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 794-802.
- Doğanlı, G.A., 2015. Medikal İmplantlarda Biyofilm Oluşumu. *Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi*, 459-462.

- D'Argenio, D.A., Miller, S.I., 2004. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology*, 150, 2497-2502.
- Egli, M., Gessner, R.V., Williams, L.D., Quigley, G.J., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Rich, A.; Frederick, C.A., 1990. Atomic-resolution structure of the cellulose synthase regulator cyclic diguanylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 3235-3239.
- Gross, L., 2008. Structural insight into a biofilm signaling molecule. *PLoS Biology*, 6, 89.
- Göker, F., 2010. 3,6 Diamino akridin türevlerinin serum albüminlerle etkileşiminin floresans sönüm yöntemi ile incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gün, İ., Ekinci, F.Y., 2009. Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34(3), 165-173.
- Hamon, M.A., Lazazzera, B.A., 2001. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 42(5), 1199-1209.
- Herald, P.J., Zoottola, E.A., 1988. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science*, 53(5), 1549-1562.
- Hickman, J.W., Harwood, C.S., 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular microbiology*, 69, 376-389.
- Ishihara, Y., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Kamegaya, T., Yamada, K., Okamoto, A., Hasegawa, T., Ohta, M., 2009. Effect of cyclic bis (3'-5') diguanylic acid and its analogs on bacterial biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 301, 193-200.
- Kaban, Ş., Turgut, Z., 1994. 7,14 Dihidro akridin türevleri sentezi. Yıldız Teknik Üniversitesi. Proje no:90-A-01-02-02, 324-325.
- Kalia, D., Merey, G., Nakayama, S., Zheng, Y., Zhou, J., Luo, Y., Guo, M., Roembke, B.T., Sintim, H.O., 2013. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chemical Society Reviews*, 42, 305-341.
- Karaolis, D.K.R., Means, T.K., Yang, D., Takahashi, M., Yoshimura, T., Muraille, E., Philpott, D., Schroeder, J.T., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Talbot, B.G., Brouillette, E., Malouin, F., 2007. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *The Journal of Immunology*, 178, 2171-2181.

- Karaolis, D.K.R., Rashid, M.H., Chythanya, R., Luo, W., Hyodo, M., Hayakawa, Y., 2005. c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrobial Agents Chemother*, 49, 1029-1038.
- Kaya, F.T., 2012. Adana ekşi hamurdan izole edilen ve biyofilm üreten bazı laktik asit bakterilerinin *Bacillus subtilis* üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kazmierczak, B.I., Lebron, M.B., Murray, T.S., 2006. Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 60, 1026-1043.
- Kearns, D.B., Chu, F., Branda, S.S., Kolter, R., Richard Losick, R., 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 55 (3), 739-749.
- Kelsey, I., Nakayama S., Sintim, H.O., 2012. Diamidinium and iminium aromatics as new aggregators of the bacterial signaling molecule, c-di-GMP. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 881-885.
- Kim, K.Y., Frank, J.F., 1995. Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. *Journal of Food Protection*, 58(1), 24-28.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R., Bron, P., 2010. The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 199-230.
- Kocot, A.M., Olszewska, M.A., 2017. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food processing context. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 47-57.
- Krasteva, P.V., Fong, J.C.N., Shikuma, N.J., Beyhan, S., Navarro, M.V.A.S., Yildiz, F.H., Sondermann, H., 2010. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science*, 327, 866-868.
- Kulasakara, H.D., Ventre, I., Kulasekara, B.R., Lazdunski, A., Filloux, A., Lory, S., 2005. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Molecular Microbiology*, 55, 368-380.
- Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D.G., Neeley, A. N., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ausubel, F.M., Lory, S., 2006. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')- cyclic-GMP in virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 2839-2844.

- Le Gresley, A., Abdullah, A., Desai, P., Ghosh, U., Gollapalli, U., Kiran, M., Lafon, S., 2011. Scope of the heck reaction in the synthesis of a new family of anthracene diacrylamide G-Quadruplex ligands. *Synthetic Communications*, 41, 2483-2492.
- Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Lory, S., 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular Microbiology*, 65, 1474-1484.
- Lemon, K.P., Earl, A.M., Vlamakis, H.C., Aguilar C., Kolter R., 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 1-16.
- Meireles, A., Borges, A., Giaouris, E., Simoes, M., 2016. The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *Food Research International*, 86, 140-146.
- Meyer B., 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 249-253.
- Molobela, I.P., Cloete, T.E., Beukes, M., 2010. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *Journal of Microbiology*, 4(14), 1515-1524.
- Nakayama, S., Kelsey, I., Wang, J.X., Roelofs, K., Stefane, B., Luo, Y.L., Lee, V.T., Sintim, H.O., 2011a. Thiazole orange-induced c-di-GMP quadruplex formation facilitates a simple fluorescent detection of this ubiquitous biofilm regulating molecule. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 4856–4864.
- Nakayama, S., Kelsey, I., Wang J.X., Sintim, H.O., 2011b. c-di-GMP can form remarkably stable G-quadruplexes at physiological conditions in the presence of some planar intercalators. *Chemical Communications*, 47, 4766-4768.
- Navarro, M.V., De, N., Bae, N., Wang, Q., Sondermann, H., 2009. Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. *Structure*, 17, 1104-1116.
- Noorbakhsh C., 2014. Testing antimicrobials using minimum biofilm eradication concentration (MBEC). <https://emerypharma.com/blog/testing-antimicrobials-using-minimum-biofilm-eradication-concentration-mbec/> (01.06.2018).
- O'Toole, G.A., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79.
- O'Toole, G.A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiment*, 47, 2437.



- Pratt, J. T., Tamayo, R., Tischler A. D., Camilli, A., 2007. PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. The Journal of Biological Chemistry, 282, 12860-12870.
- Read, M., Harrison, R., Romagnoli, B., Tanious, F.A., Gowan, S.H., Reszka, A., Wilson, W.D., Kelland, L., Neidle, S., 2001. Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98, 4844-4849.
- Rittmann, B.E., 2018. Biofilms, active substrata, and me. Water Research, 132, 135-145.
- Romling, U., Amikam D., 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. Current Opinion in Microbiology, 9, 219-228.
- Romling, U., Gomelsky, M., Galperin, M.Y., 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system, Molecular Microbiology, 57, 629-639.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., Vroom, E., Marel, G.A., Boom, J.H., Benziman, M., 1987. High intracellular concentrations of c-di-GMP result in the expression of adhesive matrix components and biofilm formation. Nature, 325, 279-281.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., Vroom, E., Marel, G.A., Boom, J.H., Benziman, M., 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. Nature, 325, 279-281.
- Sarikhani, M., Kermanshahi, R.K, Ghadam, P., Gharavi, S., 2018. The role of probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 bacteriocin on effect of HBSu on planktonic cells and biofilm formation of *Bacillus subtilis*. International Journal of Biological Macromolecules, 115, 762-766.
- Satpathy, S., Sen, S.K., Pattanaik, S., Raut, S., 2016. Review on bacterial biofilm: an universal cause of contamination. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 56-66.
- Schirmer, T., Jenal, U., 2009. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling, Nature Reviews Microbiology, 7, 724-735.
- Schmidt, A., Liu, M., 2015. Chapter Four: Recent Advances in The Chemistry of Acridines. Advances in Heterocyclic Chemistry, Elsevier, London, USA, 287-353.
- Shi, X., Zhu, X., 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends in Food Science & Technology, 20, 407-413.

- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S., 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.
- Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 6, 199-210.
- Ulus R., 2012. Karbonik anhidraz inhibitörü olarak yeni akridin sülfanamid türevlerinin sentezi ve karakterizasyonları. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Yan, W., Qu, T., Zhao, H., Su, L., Yu, Q., Gao J., Wu, B., 2010. The effect of c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) on the biofilm formation and adherence of *Streptococcus mutans*, *Microbiological Research*, 165, 87-96.
- Zeraik, A.E., Nitschke, M., 2010. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity. *Current Microbiology*, 61(6), 554-559.
- Zhang, Z., Kim, S., Gaffney, B.L., Jones, R.A., 2006. Polymorphism of the signaling molecule c-di-GMP. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 7015-7024.
- Zhang, Z., Gaffney, B.L., Jones, R.A., 2004. c-di-GMP displays a monovalent metal iondependent polymorphism. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 16700-16701.
- Qi, Y., Rao, F., Luo Z., Liang, Z.X., 2009. A flavin cofactor-binding PAS domain regulates c-di-GMP synthesis in Ax DGC2 from *Acetobacter xylinum*. *Biochemistry*, 48, 10275-10285.
- Wan, X., Tuckerman, J.R., Saito, J.A., Freitas, T.A., Newhouse, J.S., Denery, J.R., Galperin, M.Y., Gonzalez, G., Gilles-Gonzalez M.A., Alam, M., 2009. Globins synthesize the second messenger bis-(3'-5')-cyclic diguanosine monophosphate in bacteria. *Journal of the American Chemical Society*, 388, 262-270.
- Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U., 2000. Heterogeneity in biofilms, *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 661-71.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Merve BİÇER
Doğum Yeri	Çorum
Doğum Tarihi	03 / 02 / 1992
e-mail	mrwbcr@gmail.com
Yabancı Dili	İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise	Çorum Mehmetçik Lisesi	2006-2010
Lisans	Uludağ Üniversitesi	2010-2014
Lisans	Gıda Mühendisliği Anadolu Üniversitesi	2010-2014
Yüksek Lisans	İşletme Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2015-...
	Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı	

### İş Tecrübeleri

2017	ERASMUS <sup>+</sup> Staj Hareketliliği (2 ay) Max-Rubner Institute, Detmold – Germany
2015 – 2016	Hitit Yemek Hizmetleri
2013	T.C. Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Çorum Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü (Staj)

### **Akademik Çalışmalar**

- 2015-2017 Türkiye'de yetişen buğday örneklerinin Aflatoksin ve Okratoksin A varlığı bakımından incelenmesi  
Proje Asistanı (Proje Yöneticisi: Dr. Öğr. Üyesi Seçil TÜRKSOY)
- 2017-... Bakteriyel biyofilm oluşumunu engelleyecek moleküllerin sentezi ve anti-biyofilm etkinliklerinin incelenmesi  
Proje Asistanı (Proje Yöneticisi: Doç. Dr. Gökçe MEREY)

### **Uluslararası Kongrelerde Sunulan Poster Bildirileri**

- Biçer, M.,** Merey, G., Türksoy, S. 2016. Protein isolates of grain legumes: Extraction methods and applications in food and other industries. 15th International Cereal and Bread Congress, Istanbul, TURKEY.

