



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SALMONELLA INFANTIS SUŞLARININ OLUŞTURDUĞU
BİYOFİLM ÜZERİNE ÇEVRESEL VE GENETİK
FAKTÖRLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

H. Dilşad AÇIKALIN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK

ANKARA

2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SALMONELLA INFANTIS SUŞLARININ OLUŞTURDUĞU
BİYOFİLM ÜZERİNE ÇEVRESEL VE GENETİK
FAKTÖRLERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

H. Dilşad AÇIKALIN

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
16L0239014 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2017

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	i
Önsöz	iii
Simgeler ve Kısaltmalar	iv
Şekiller	vi
Çizelgeler	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyofilm ve Biyofilmin Tarihçesi	2
1.2. Biyofilm Oluşumunda Bakteriler Arası Haberleşme	4
1.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları	5
1.4. <i>Salmonella</i> 'da Biyofilm Genetiği	8
1.5. <i>Salmonella</i> 'da Biyofilm Morfotipleri	11
2. GEREÇ ve YÖNTEM	13
2.1. GEREÇ	13
2.1.1. <i>Salmonella</i> İzolatları	13
2.1.2. Besiyerleri, Ticari Kimyasal ve Solüsyonlar	13
2.1.3. Laboratuvar Ekipmanları	14
2.2. YÖNTEM	16
2.2.1. <i>Salmonella</i> Suşlarının Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi	16
2.2.2. <i>Salmonella</i> Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi	17
2.2.3. Biyofilm Üzerine Çevresel Faktörlerin Etkisinin Araştırılması	18
2.2.4. Biyofilm Düzeyinin Belirlenmesi	18

2.2.5. Biyofilm Oluşumu İle İlişkili Genlerin <i>S. Infantis</i> ve Bazı Serotiplerde Belirlenmesi	20
2.2.5.1. Primerler	20
2.2.5.2. PCR Optimizasyonu	21
2.2.5.3. Agaroz Jel Elektroforez	22
3. BULGULAR	23
3.1. Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi	23
3.2. Biyofilm Üretim Sürelerinin Belirlenmesi	23
3.3. Biyofilm Üzerine Çevresel Faktörlerin Etkisi	25
3.3.1. Sıcaklık	25
3.3.2. pH'nın Etkisi	27
3.3.3. Tuz Konsantrasyonunun Etkisi	28
3.4. Biyofilm Oluşumu ile İlişkili Genlerin Belirlenmesi	29
4. TARTIŞMA	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
ÖZET	35
SUMMARY	36
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	48

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, 2014-2017 yılları arasında yürütülen 113R036 numaralı TUBİTAK projesi kapsamında ISO 6579 ile izole ve identifiye edilen *Salmonella* *Infantis*, *Salmonella* *Typhimurium*, *Salmonella* *Kentucky*, *Salmonella* *Hadar* ve *Salmonella* *Enteritidis* suşlarının biyofilm oluşturma özellikleri konvansiyonel ve moleküler yönden incelenmiştir. Bu çalışma ile ülkemizde kanatlı materyallerinden en sık izole edilen *Salmonella* suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin belirlenmesi ve yapılacak eradikasyon çalışmalarına ışık tutabilmesi amaçlanmıştır.

Yüksek lisans öğrenimim süresince büyük desteklerini gördüğüm danışman hocam Doç. Dr. H. Kaan Müştak'a, eğitimim ve tez aşamasında katkılarından dolayı başta Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. K. Serdar Diker olmak üzere, değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Müjgan İzgür, Prof. Dr. Hakan Yardımcı, Prof. Dr. Mehmet Akan, Prof. Dr. Barış Sareyyüpoğlu'na, çalışma arkadaşlarıma ve aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

bp	Base pair
<i>bdar</i>	Kahverengi, kuru ve pürüzlü
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eDNA	Hücre dışı DNA
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EPS	Ekzopolisakkarit
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
LB	Luria Bertani
µl	Mikro litre
µg	Mikro gram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mRNA	Mesajcı RNA
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
OD _c	Cut-off optik dansite
OD _{ort}	Ortalama optik dansite
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>pdar</i>	Pembe, kuru ve pürüzlü
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
<i>rdar</i>	Kırmızı, kuru ve pürüzlü

RNA	Ribonükleik asit
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
<i>saw</i>	Düz ve beyaz
SPI	<i>Salmonella</i> Patojenite Adası



ŞEKİLLER

Şekil 1. Stafilokokkal bir biyofilmin medikal bir alet üzerindeki görüntüsü (Donlan ve ark., 2001)	3
Şekil 2. Biyofilm gelişimi (Stoodley ve ark., 2002)	5
Şekil 3. <i>Salmonella</i> 'da rdar (A ve C) ve bdar (B ve D) morfotipleri (Vestby ve ark., 2009)	12
Şekil 4. <i>Salmonella</i> 'da rdar morfotipinin Kongo Kırmızılı LB agarda görünümü	16
Şekil 5. Mikroplate tabanındaki biyofilm oluşumunun görünümü	19
Şekil 6. <i>Salmonella</i> serotiplerinin farklı inkübasyon sürelerinde OD _{ort} değerleri	25
Şekil 7. <i>Salmonella</i> serotiplerinin farklı sıcaklıklarda OD _{ort} değerleri	26
Şekil 8. <i>Salmonella</i> serotiplerinin farklı pH'larda OD _{ort} değerleri	27
Şekil 9. <i>Salmonella</i> serotiplerinin farklı tuz konsantrasyonlarında OD _{ort} değerleri	28
Şekil 10. <i>csrC</i> geninin optimizasyonu sonucu agaroz jel elektroforez görüntüsü	29
Şekil 11. <i>csrB</i> , <i>fimI</i> ve <i>fimA</i> genlerinin optimizasyonu sonucu agaroz jel elektroforez görüntüsü	29

ÇİZELGELER

Çizelge 1. PCR tanısı için kullanılan primerler 20

Çizelge 2. Amplifikasyon karışımı 21

1. GİRİŞ

Salmonella genusu, *Enterobacteriaceae* familyasına içindedir; *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki türden oluşur. *Salmonella enterica* subspecies *enterica*'nın altı alt türü bulunur. Memeli hayvanlarda en çok hastalığa yol açan serotiplerin *Salmonella enterica* subspecies *enterica*'da olduğu bilinmektedir. Diğer *Salmonella enterica* alt türleri *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* ve *Salmonella enterica* subsp. *indica*'dır. (Popoff ve ark., 2005; Threlfall ve ark., 2005). Bu alt türlerin çoğu, insan ve diğer memeliler için genellikle patojendir. Sıklıkla sıcak kanlı hayvanların bağırsaklarında kolonize olurlar (Popoff ve ark., 2005; Threlfall ve ark., 2005). Bu bakteriler yüksek asitlik derecesi, düşük su aktivitesi ve yüksek sıcaklık gibi stres koşullarına adapte olabilirler. Bu sebeple çeşitli yerlerde aylarca canlılıklarını koruyabilirler (Kaufman, 1998; White ve ark., 2006).

Salmonella'lar Gram negatif, küçük ve kısa (0,7-1,5 × 2,0-5,0 µm) çomaklardır ve *Enterobacteriaceae* familyasına ait genel özellikleri gösterirler. *Salmonella* etkenlerinin fakültatif anaerobtur. 37°C'lik inkübasyonda 24-48 saatte küçük, yuvarlak ve S tipli koloniler oluştururlar. Sıvı besiyerinde ise homojen bir şekilde üreyip, hafif bulanıklık meydana getirirler. *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* hareketsiz *Salmonella* serotipleridir. Hareketli serotipler ise peritrik flagella ile hareket ederler (Kaufman, 1998, White ve ark., 2006).

Salmonella'lar sınıflandırılırken antijenik yapıları dikkate alınmaktadır. *Salmonella* izolasyonu ise tüm dünyada altın standart olarak kabul edilen ISO 6579'a göre yapılır. Serotiplendirme; alt türlere ait serotiplerin belirlenmesi işlemidir ve Kauffmann-White-Le Minor şemasına göre yapılır. Bu şemada belirleyici ana unsurlar

flagellar “H”, somatik “O”, virülens “Vi” ve kapsüler “K” antijenleridir. Yapılan çalışmalara göre bu şema önceleri 20 serotipten meydana gelirken, şu anda 2500 serotipin üzerindedir (Ahmer ve ark., 1998; ISO 6579, 2002; ISO 6579, 2012).

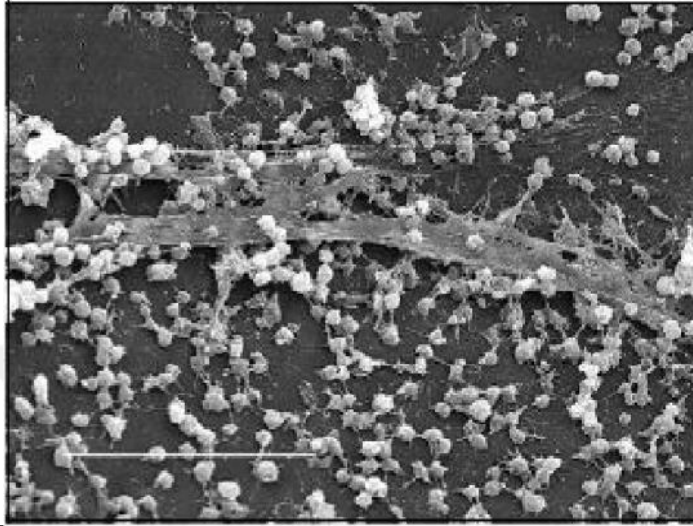
Salmonella enfeksiyonları kısa sürede hızla yayılabilirler. Bunun sebebi çapraz kontaminasyonlar olarak belirtilmektedir. Bunların yanında biyofilm oluşturma yeteneklerinin de olması ile uzun süre canlılıklarını koruyabilirler. Kanatlı hayvanların yetiştirildiği kümes ve kesimhanelerde *Salmonella* bulaşları önemli sorun oluşturmaktadır. Bu sebeple bu gıdaları tüketen bireyler *Salmonella* enfeksiyon riskini taşımaktadır (Crump ve ark., 2002). *Salmonella*'lar kümeslerde bulunan havalandırmalarda, soğutucularda, suluklarda, su depolarında ve hava teması olan yerlerde biyofilm oluşmaktadır. Salmonellozis vakalarının bir kısmının, kanatlı kaynaklı gıdaların yanında, çeşitli meyve ve sebzelerin tüketilmesi sonucunda da bulaştığı bilinmektedir (Cook ve ark., 1998; Burnett ve ark., 2000).

1.1. Biyofilm ve Biyofilmin Tarihçesi

Salmonella dezenfeksiyonu tam anlamıyla gerçekleştirilmezse, değişik yüzeylerde biyofilm oluşumu gözlenir. Biyofilmler, bir nesneye, yüzeye veya birbirlerine yapışık halde bulunan bakteri toplulukları olarak adlandırılır (Costerton ve ark., 1995).

Biyofilmler yapısal olarak ilk defa Anthony van Leewenhoek tarafından 1648'de diş plaklarındaki bakteri topluluklarının eldesi ile keşfedilmiştir. Henrici ise 1933'de kümeleşmiş bu bakterileri mikrobiyoloji tarihinde ilk defa fotoğraflamıştır (Davey ve ark., 2000; Donlan ve ark., 2002). Watnick ve ark., (2001), biyofilm yapılarını canlı veya cansız herhangi bir yüzeye tutunmuş çok sayıda bakteri tarafından salgılanan

mukoz yapı içerisinde tutunmalarıyla oluşan, “mikroplar şehri” olarak ifade etmişlerdir.



Şekil 1. Stafilokokkal bir biyofilmin medikal bir alet üzerindeki görüntüsü (Donlan ve ark., 2001)

Biyofilm oluşturan bakteriler, endüstriyel alanlarda ve tıp alanında ciddi sorunlara yol açmaktadır. Bu sorun biyofilm yapılarının içinde bulunan bakterilerin matriks içine gömülü halde bulunmalarından kaynaklanır. Biyofilm matriksi biyofilm oluşturan bakteriler tarafından üretilerek dış çevreye karşı mekanik ve kimyasal olarak koruma sağlar. Aynı zamanda bu matriks çeşitli bileşiklerin birikmesine de olanak sağlar. (Møretrø ve ark., 2003; Møretrø ve ark., 2009). Biyofilm yapısı içindeki bakterilerin dezenektanlara karşı oldukça dirençli oldukları bilinmektedir (Zogaj ve ark., 2001). Yapılan çalışmalar; *Salmonella*'nın cansız yüzeylerin yanında canlı yüzeylerde de biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğunu göstermiştir (Møretrø ve ark., 2009).

Gram negatif bakterilerde bazı çevresel koşullar (besin gereksinimi, konağın metabolitleri, kolonize olunan yüzeylerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, ısı, oksijen

ihtiyacı, tuz konsantrasyonu) ve bakterinin kendisi tarafından üretilen kimyasallar (indol, siklik diguanilat, asetil fosfat, N-asilhomoserin laktonlar) biyofilm yapılarının oluşmasında, olgunlaşmasında ve dağılmasında önemli rol oynar (Prouty ve ark., 2002; Shirtliff ve ark., 2002; Hammer ve Bassler, 2003; Martino ve ark., 2003; Wolfe ve ark., 2003; Tischler ve Camilli, 2004).

Biyofilm yapıları çeşitli süreçlerde, klasik temizlik prosedürleriyle yok edilememekte; bu sebeple de, gıda üretim sürecinde yüzeylerde oluşan biyofilmler, temas ettikleri gıdalarda kontaminasyon kaynağı olmaktadır (Joseph ve ark., 2001). Çevresel koşullarda biyofilmler suyun kontaminasyonuna da sebep olmaktadır (Larsen ve ark., 2007). Bu durumlar sıklıkla tüketilen gıdaların raf ömrünü azaltmaktadır. Böylece gıda kaynaklı gelişen hastalıkların yayılmasında büyük risk teşkil etmektedir. *Salmonella*, kümes hayvanlarının yetiştirildiği nemli ortamlarda da ideal bir biyofilm üreticisidir. (Helke ve Wong, 1994; Heydon ve ark., 2000; Joseph ve ark., 2001).

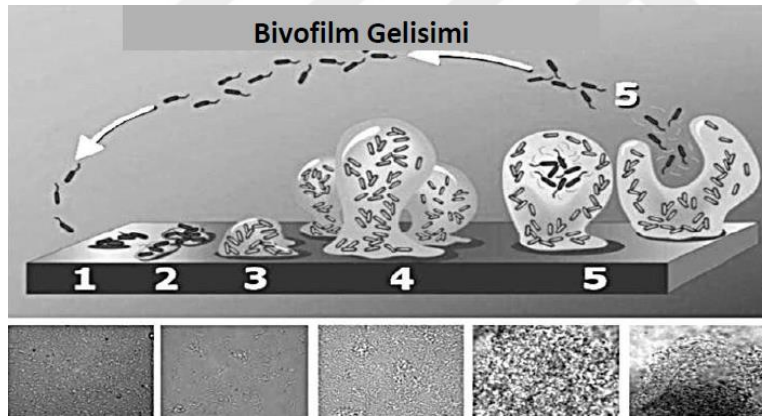
1.2. Biyofilm Oluşumunda Bakteriler Arası Haberleşme

Mikroorganizmalar bazı sinyaller aracılığı ile biyofilm oluşum sürecinin iletişim kısmını kontrol eder. Bu sistem “quorum sensing” olarak adlandırılmıştır. Mikroorganizmalar kolonizasyon sürecinde ilk aşamada bulunduğu çevreye uyum sağlar, çevredeki uyarıları algılar ve bu uyarılara bazı yanıtlar verir. Bu sistemin kolonizasyon sürecindeki bakterilere besin kaynaklarına adaptasyon geliştirerek besin için savaşması veya konağın immün yanıtından korunabilmesi gibi bazı avantajlar sağlar (Bassler ve ark., 1999; Prouty ve ark., 2002; Shirtliff ve ark., 2002; Hammer ve Bassler, 2003; Martino ve ark., 2003; Wolfe ve ark., 2003; Tischler ve Camilli, 2004). Quorum sensing sisteminde sinyal molekülleri en önemli görevi üstlenir, bu sinyal moleküllerine “autoinducer” da denilir. Farklı Gram negatif bakterilerin aynı

familyaya ait sinyal molekülleri sentezleme yeteneği farklı araştırcılar tarafından belirtilmiştir (Surette ve ark., 1998; Walters ve ark., 2006).

1.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilmler çeşitli basamaklarda oluşurlar. Bu basamaklar bakterilerin yüzeye teması, yüzeye sıkıca tutunmaları için ekzopolisakkarit üretmesi, biyofilm yapılarının erken gelişimi, biyofilm yapılarının olgunlaşması, olgun biyofilm üzerinden hücrelerin biyofilm yapılarından koparak ayrılması şeklinde olup 5 adımdan oluşmaktadır (Stoodley ve ark., 2002).



şekil 2. Biyofilm gelişimi (Stoodley ve ark., 2002).

Biyofilm oluşumunun ilk aşaması; bakterilerin yüzeye tutunmalarıdır. Tutunma sonrasında bakteriler bir araya gelip mikrokoloniler oluşturmak için tek tabakalı hücre hatlarını meydana getirirler. Tutunma sürecinde bakterilerin yüzeye ve biyofilm oluşturacakları diğer bakterilere tutunabilmeleri için gerekli hücre dışı polimerleri sentezlemesi gerekmektedir. Bu süreç aktif bir süreçtir ve bakteriler geri dönüşümlü olarak bağlanma gerçekleştirirler (Costerton ve ark., 1995). Bakteriler bağlandıktan

sonra ürerler, ardından ekzopolisakkarit (EPS) üretirler (Kumar ve Anand, 1998). Bakteriyel biyofilmler, yüksek derecede esnek yapılardır (Stoodley ve ark., 2001). Biyofilm yapılarını oluşturan bakterilerin türlerine bağlı olarak, biyofilmler; %10 ile %25 oranlarında bakteri hücrelerinden; %75 ile %90 oranlarında ekzopolisakkarit matriksten meydana gelirler. Biyofilmlerin mantara benzeyen yapılar sergiledikleri bilinmektedir. Bu yapıdaki baş kısmında bulunan hücresel yoğunluğun, sap kısmındaki hücresel yoğunluğa göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (Costerton ve ark., 1995). Olgun biyofilmlerin üç boyutlu yapıları incelendiğinde, bakteriyel kümelerin arasında su dolu kanalların bulunduğu gözlemlenir. Bu kanallar metabolik ve toksik maddelerin atılımının yanı sıra besinlerin alımında da görev yapar. Biyofilm yapılarının ileri safhalarında, biyofilmden kopmalar gözlenir. Bu safhalarda biyofilmden köken alan yavru hücreler, hayatta kalabilmek ve yeniden kolonize olabilmek için biyofilm yapılarından ayrılırlar (Costerton ve ark., 1995; Aparna ve Yadav, 2008).

Mikrobiyoloji tarihinde ilk kez 1975 yılında Loeb ve Neihof , “conditioning film” adı verilen ince film tabakasını tanımlamışlardır. Bu tabaka tutunma yüzeyinin üzerinde oluşur ve bakterilerin bu yapıya bağlanmaları gerçekleşir. Doğal ortamda bakteriler belirli bir yüzeye tutunmuş halde değildir. Bu tabaka, oluştuğu yüzeyi kimyasal olarak modifiye ederek, mikrobiyal tutunmayı kuvvetlendirir (Matthysse ve ark., 1981; Michael ve ark., 2001). Diğer yandan, değişik araştırmacılar bu ince tabakanın bakteriyel tutunmanın biyofilm oluşumunu başlattığını belirtmişlerdir (Miller ve ark., 2001; Martino ve ark., 2003). Bazı araştırmalarda; hidrofobik özellikteki teflon ve plastik yüzeylerdeki tutunmanın, hidrofilik ve polar yüzeylere kıyasla daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Yüzeydeki pürüzlenme arttıkça biyofilm oluşumu da artmaktadır. Özetle biyofilm oluşacak yüzeyin topografisi, fizikokimyasal özellikleri bakteriyel tutunmada belirleyici niteliklerdendir (Pernestig ve ark., 2003; Popoff ve ark., 2005).

Mikroorganizmaların yüzeye tam bir temas kurduğu aşama tutunma aşamasıdır. Bu süreçte bakteriler ile yüzey arasında zayıf etkileşimler gerçekleşir. Etkileşimleri elektrostatik kuvvetler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçleri olarak sıralamak mümkündür. Bu aşama sonrasında geri dönüşümsüz tutunma gerçekleşir. Bu etkileşimleri ise dipol-dipol etkileşimleri, iyon-dipol etkileşimleri, kovalent bağlar, iyonik bağlar ve hidrojen etkileşimleri olarak sıralamak mümkündür. Bu etkileşimlerden bağımsız olarak bakteri hücreleri, flagella ve pillus gibi organellerin yanında EPS (Ekstraselüler Polimerik Matriks) oluşturarak yüzeylere geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar (Pernestig ve ark., 2003; Popoff ve ark., 2005).

EPS, yapısında hidrofilik ve hidrofobik kısımlar bulundurur ve yüksek seviyede su içerir (Pratt, 1998). Rainey ve ark. (2000), yaptıkları benzer bir çalışmada, hidrofilik bölümlerin yapısının %93'ünün su olduğunu belirtmişlerdir. EPS, birçok bakteri biyofilminde de tanımlanmıştır. Pratt (1995), biyofilm yapılarının iki ana özelliğini tanımlamıştır. Bunların ilki; ana iskeleti polisakkarit yapısının belirlediği, hiçbir biyofilmin benzerlik göstermediği, çünkü biyofilm yapılarının zamana ve uzaya karşı değişiklik gösterdiği. İkinci olarak bakteriyel biyofilmlerde EPS yapısının içeriğinin bakterinin olgunluğuna ve bakteri türüne göre arttığını ya da azaldığını belirtilmiştir. Bazı biyofilmlerde mikroorganizmalar biyofilm kuru ağırlığının %10'undan daha azdır ve geri kalan %90'dan fazla kısmı matriks oluşturur (Costerton, 1999). Matriks içeriği; eksopolisakkaritler, proteinler ve ekstraselüler DNA'dan oluşur. (Olsen ve ark., 1989; Costerton ve ark., 1999).

EPS'ler antimikrobiyallerin biyofilmin içine alımını büyük ölçüde önleyerek veya geciktirerek konağın savunma mekanizmasından bakterileri korumaktadır. Bunu bakteri hücrelerini yüzeylere veya birbirlerine sıkıca bağlayarak yaparlar (Olsen ve ark., 1993; Danese ve ark., 2000; Xu ve ark., 2010). EPS içinde bulunan selüloz ve kıvrımlı fimbria gibi bazı proteinler, oluşan biyofilmin morfoloğunu belirleyen önemli iki yapıdır. Bunun nedeni bu proteinlerin çeşitliliğinin bakteri hücrelerinin türüne göre değişmesidir (Mireles ve ark., 2001; Molin ve ark., 2003).

Tutunma evresinden sonra, tutunmuş bakterilerin olgunlaşma evresi gelir. Gelişim tamamlandıktan sonra bölünmeler gerçekleşir. Böylece mikrokolonilerin büyümesi gerçekleşir ve daha kompleks yapılar haline gelirler. Böylece bakteri hücreleri UV ışınlarına karşı direnç kazanırlar veya başka bakterilere genetik aktarım gerçekleştirirler (Zogaj ve ark., 2001).

Son evre kopma ve ayrılma evresidir. Bu evrede tek bir bakteri hücresi veya bakteri kümesi bu tabakalardan koparak ayrılırlar. Konağın immün sistemi herhangi bir sebeple zayıfladığında ise biyofilmden ayrılan serbest formdaki bu mikroorganizmalar akut enfeksiyonlara yol açar (Zogaj ve ark., 2001).

1.4. *Salmonella*'da Biyofilm Genetiği

Salmonella serotiplerinin biyofilm matriksinde bulunan kıvrımlı fimbria ve selülozun yapısal karakterizasyonda belirleyici olduğu bilinmektedir (Bradshaw ve ark., 1999). Fimbriya, fimbrin monomerlerinin biraraya gelmesiyle oluşur ve temelde bakterilerin yüzeylerle olan etkileşiminde görev alır (Collinson ve ark., 1991, Muller ve ark., 1991, Costerton ve ark., 1998; Woodward ve ark., 2000; Starkey ve ark., 2004; Branda ve ark., 2005).

Salmonella Typhimurium'da ve bazı yakın evrimsel ilişkili olduğu bilinen bakterilerde, flagellar hareket, pillus, lipopolisakkarit ve selüloz sentezi ile ilgili olduğu bilinen genlerin, çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir (Pratt ve Silhavy., 1995; Mireles ve ark., 2001; Zogaj ve ark., 2001; Solano ve ark., 2002; Boddicker ve ark., 2003).

BarA/SirA hareket ve virülens gibi görevlerin yanında biyofilm oluşumu regülatörüdür. Bu regülatörler *S. Typhimurium*'un yanında *E. coli* ve *Pseudomonas*'da da biyofilm oluşumu ve virülens gibi özelliklerin gelişiminde önem taşımaktadır (Parkins ve ark., 2001; Jackson ve ark., 2002; Suzuki ve ark., 2002; Teplitski ve Ahmer, 2004). SirA, *crsB* ve *crsC*'yi aktifleştirir. *crsB* ve *crsC* karbon depo regülasyonundan sorumlu RNA'lardır. Regülatör nitelikteki bu RNA'lar virülens genlerinin trasnlastonuna izin verir, flagellar genlerin translasyonunu inhibe eder. İlaveten SirA ve Csr sistemi tip I fimbriyayı kodlayan *fim* operonunu da kontrol eder. *S. Typhimurium*'da SirA regülonunun biyofilm oluşumu üzerine etkisi *in vitro* şartlarda belirlenmiştir. SirA mutantlarının, *crsB* ve *crsC* ikili mutantlarının ve *fimI* mutantlarının, biyofilm oluşturma yeteneklerini kaybettiği bazı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Suzuki ve ark., 2002; Teplitski ve ark., 2003; Weilbacher ve ark., 2003, Fortune ve ark., 2006).

Biyofilm oluşumunun başlaması için SirA'nın *crsB*, *crsC* ve *fim* operonlarını aktive etmesi gerekmektedir. Bunun yanında biyofilm oluşumunu inhibe eden flagellanın translasyonu da SirA tarafından gerçekleştirilir (Whistler ve ark., 1998; Teplitski ve ark., 2006).

CsrA'nın dışında CsrB ve CsrC'nin transkripsiyonu, *Salmonella*'da olduğu gibi *E. coli*'de de BarA ve SirA'nın kontrolündedir (Suzuki ve ark., 2002; Teplitski ve ark., 2003; Weilbacher ve ark., 2003; Beloin ve Ghigo, 2005; Fortune ve ark., 2006).

CsrA, 61 aminoasitten meydana gelen bir proteindir. CsrA hedef genlerin mRNA'larına bağlanır. Bu bağlanmayla birlikte hedef mesaj kaldırılabilir, translasyon sürecine eklenebilir veya ifadesi durdurulabilir. CsrB molekülü, 18 CsrA proteinine bağlanır, CsrC ise 9 CsrA proteinine bağlanır (Altier ve ark., 2000; Lawhon ve ark., 2002; Fortune ve ark., 2006) *csr* genleri evrimsel olarak korunmuştur ve çeşitli

virülens genlerinin regülasyonundan da sorumludur (Romeo, 1998; Whistler ve ark., 1998; Weilbacher ve ark., 2003; Teplitski ve ark., 2006).

Tip I fimbriyayı kodlayan *fim* operonunu regüle ettiği saptanmıştır. Tip I fimbriya *Salmonella*'nın biyofilm oluşumunda önemli rol oynar ve tip I fimbriyayı kodlayan *fim* operonu da BarA/SirA tarafından regüle edilir (Boddicker ve ark., 2002). CsrB ya da CsrC küçük düzenleyici RNA'lardır. Bunların ifade edilmemesi biyofilm oluşumunu azaltmaktadır. Ayrıca ikili *csrB/csrC* mutasyonları biyofilm oluşumunu ciddi derecede azaltmaktadır. Bu sonuçlar, hem *sirA* hem de *csrB* ve *csrC*'nin tüm biyofilm oluşum aşamalarında kritik önemi olduğunu gösterir. *sirA* protein aktivasyonunun gerçekleşmesi için, düzenleyici RNA'lar ise translasyonun devamlılığı için gereklidir (Teplitski ve ark., 2006).

Escherichia coli'de *csrA* mutantlarının iyi gelişim gösterdiği belirlenmişken; *S. Typhimurium*'da *csrA* mutantları zayıf gelişme göstermiştir. Bunların mutasyonları hızlı biriktirdiği de saptanmıştır (Altier ve ark., 2000; Romling ve ark., 2000). *csrB* ya da *csrC* genlerinin çok sayıda kopyasını bulunduran *S. Typhimurium* suşlarının *csrA* mutantlarındaki gibi çok yavaş çoğalmaktadır. Bu çalışmalar gelişme yetersizliği göstermiş *csrA* mutantlarıyla yapılan önceki çalışmalarla uyum göstermiştir (Altier ve ark., 2000, Lawhon ve ark., 2002; Romling, 2002; Romling, 2005). CsrC, *Salmonella*'nın hareketlilik ilişkili genleri düzenler. CsrC aynı zamanda SPI-1 üzerindeki bazı virülens genlerinin regülasyonundan da sorumludur (Romling ve ark., 1998; Romling ve ark., 1999; Fortune ve ark., 2006, Teplitski ve ark., 2006).

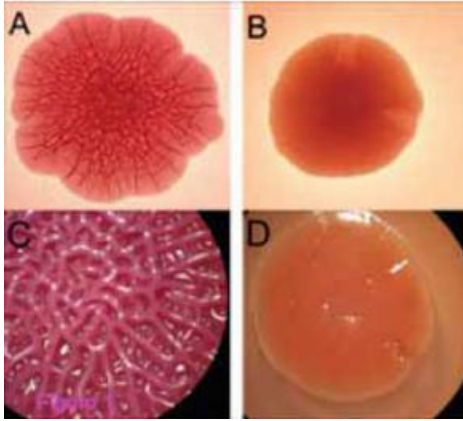
1.5. *Salmonella*'da Biyofilm Morfotipleri

Salmonella'da biyofilmlerin yapısal karakterizasyonu değişkenlik göstermektedir. Bu değişkenlik ekstraselüler matriksin iki ana bileşeni olan selüloz ve kıvrımlı fimbriya ile ölçülmektedir. İki ana bileşeni birlikte içeren serotiplerin oluşturduğu koloniler Kongo kırmızısı içeren agar besiyerinde kırmızı, kuru ve pürüzlü (rdar) bir morfotip oluşumu gösterirler. Kıvrımlı fimbria ve selüloz, *agfD* tarafından pozitif olarak regüle edilir. Delesyonu durumunda ise rdar morfotipini beyaz düz bir koloni olan “*saw*” haline getirir (Romling ve ark., 1998).

Kıvrımlı fimbriyanın alt ünitelerinden biri olan AgfA sentezinden sorumlu bir gen susturulduğunda, biyofilm matriksi oluşumunda yalnız selüloz sentezlenir. Bu şartlarda ise *pdar* yani pembe, kuru ve pürüzlü olarak tanımlanan koloni morfotipi gözlemlenir. *bdar* (kahverengi, kuru ve pürüzlü) morfotipi ise *adrA* transmembran proteini açısından mutant suşlarda gözlemlenmektedir (White ve ark., 2006).

Besin gereksinimi, tuzluluk, pH, sıcaklık gibi çevresel etkiler biyofilm oluşumunda ve gelişiminde ciddi rol oynar (Altier ve ark., 2000; Lawhon ve ark., 2002). *Salmonella*'nın da genetik ifadesi diğer Gram negatif bakterilerde olduğu gibi çevresel koşullardan etkilenmektedir (Whitchurch ve ark., 2002).

Xu ve ark. (2010), farklı NaCl oranları bulunduran besiyeri ortamlarında, yüzey özellikleri ve biyofilm miktarları arasında bir ilişki olduğunu belirlemişlerdir. Bu ilişkiyi azalan hücre hidrofobisine bağlamışlar ve bu sistemin hücrelerin adezyonunu engelleyerek çalıştığını göstermişlerdir (Xu ve ark., 2010). Geleneksel tuzlama yöntemleri, mikroorganizmaların öldürülmesinde veya mikroorganizmaların gelişiminin engellemesinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (Doyle ve Glass, 2010).



Şekil 3. *Salmonella*'da rdar (A ve C) ve bdar (B ve D) morfotipleri (Vestby ve ark., 2009).

Kanatlı gıda ve kanatlı kaynaklı materyallerin yüzeylerinde oluşan *Salmonella* biyofilmlerinin oluşumu engellenerek, gıdaların daha uzun süre korunmasına ve raf ömürlerinin uzamasına olanak sağlanacaktır. Bu eradikasyonun sağlanmasında kullanılan başka yöntemler de vardır. Bunlar; oluşturulan elektrik alanlar, enzimler, amonyak ve formaldehit kullanılması, yüksek basınçta temizleme sistemleri, çeşitli detarjanların kullanımındır (Giaouris ve ark., 2005).

Klinik ve endüstriyel açıdan önemli sorun teşkil eden *Salmonella* enfeksiyonlarına etkin çözümler bulmada amaç ve yaklaşım, biyofilm üretimi sırasındaki etkili olan temel faktörleri belirlemektir. Bu esaslar göz önüne alınarak planlanan bu çalışmada; Türkiye'den izole edilen kanatlı kökenli. *S. Infantis* suşları kullanılarak, suşların farklı çevresel koşullarda oluşturduğu biyofilm yapılarındaki incelenmesi ve optimum şartların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu açıdan bu tez çalışması ile elde edilen parametrelerin belirlenmesi ile biyofilm yapıları ile endüstriyel ve klinik alanda yürütülen mücadeleye yeni boyutlar kazandırılacaktır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. *Salmonella* İzolatları

Salmonella suşları, 2014-2017 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen 113R036 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında, broiler tavuk kümeslerinin altlık, toz, çevresel (kümes duvarı), kemirici (kapanlar), yem ve su örneklerinden en fazla izole edilmiş olan serotipler arasından; 100 *Salmonella* Infantis, 5 *Salmonella* Enteritidis, 5 *Salmonella* Kentucky, 5 *Salmonella* Typhimurium ve 5 *Salmonella* Hadar olacak şekilde seçildi. Ayrıca pozitif kontrol olarak güçlü biofilm üreticisi olan *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşu kullanıldı.

2.1.2. Besiyerleri, Ticari Kimyasal ve Solüsyonlar

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck, Germany): Tripton (Fluka, France) 10g, maya ekstraktı (Merck, Germany) 5g, Sodyumklorid 10g, Agar agar 15g. Besiyeri içeriği distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon işleminden önce pH 7,0 ± 0,2'ye ayarlandı. Sıvı besiyeri cam tüplere dağıtıldıktan, katı besiyeri ise agar ilave edildikten sonra, otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildi. Katı besiyerleri 55°C'ye soğutulduktan sonra petrilere dağıtıldı.

Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (NaCl'siz): Tripton (Fluka, France) 10g, maya ekstraktı (Merck, Germany) 5g, Agar agar 15g. Besiyeri içeriği distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon işleminden önce pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Sıvı besiyeri cam tüplere dağıtıldıktan, katı besiyeri ise agar ilave edildikten sonra, otoklavda 121°C 'de 15 dk sterilize edildi. Katı besiyerleri 55°C 'ye soğutulduktan sonra petrilere dağıtıldı.

Kongo Kırmızısı İçeren (40 µg/mL) Luria Bertani (LB) Agar (NaCl'siz): Tripton (Fluka, France) 10g, maya ekstraktı (Merck, Germany) 5g, Agar agar 15g, Kongo kırmızısı (Sigma-Aldrich, USA) 0.04g. Besiyeri içeriği distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sterilizasyon işleminden önce pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlandı. Sıvı besiyeri cam tüplere dağıtıldıktan, katı besiyeri ise agar ilave edildikten sonra, otoklavda 121°C 'de 15 dk sterilize edildi. Katı besiyerleri 55°C 'ye soğutulduktan sonra petrilere dağıtıldı.

2.1.3. Laboratuvar Ekipmanları

Biyolojik güvenlik kabini: Safe 2020 Laminar flow içerisinde çalışmalar gerçekleştirildi.

Isıtıcı blok: DryBlock Heating Thermostat Bio TDB-200 kullanıldı.

Vortex: Fine Vortex (FinePCR) kullanıldı.

Santrifüj: Thermo Scientific MicroCL21 santrifüjü kullanıldı.

Spektrofotometre: Thermo Scientific NanoDrop 1000 cihazı kullanıldı.

Pipetler: Thermo Scientific (Finnpipette F1) 0.5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl'lik pipetler kullanıldı.

Termal cycler: Çalışmada Thermo Scientific ARKTIK Thermocycler PCR cihazı kullanıldı.

Jel elektroforez ünitesi: Thermo Scientific Thermo Owl A2 large Gel System, 20 x 25 cm ebatındaki jel elektroforez ünitesi kullanıldı.

Jel elektroforez ünitesi tarakları: Thermo Scientific A2-24D tarak (1.5 mm kalınlık, 6.5 mm genişlik, 7 µl hacim, 24 adet kuyucuk) ve A2-36D tarak (1.5 mm kalınlık, 3.5 mm genişlik, 4 µl hacim, 36 adet kuyucuk) kullanıldı.

Güç kaynağı: Gel elektroforez ünitesi olarak WEALTEC ELITE 300 Plus Power Supply kullanıldı.

Hassas terazi: SCALTEC hassas terazi kullanıldı.

Görüntüleme cihazı: SYNGENE G:Box, UV transillüminatörlü görüntüleme sistemi kullanıldı.

ELISA okuyucu: Biotech ELX 800 ELISA reader

2.2. YÖNTEM

2.2.1. *Salmonella* Suşlarının Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi

Salmonella Infantis ve diğer serotiplere ait suşlar 5'er mL'lik LB broth besiyelerine %1 inokülasyon oranı ayarlanaca şekilde dağıtıldı ve bir gece boyu çalkalamalı koşullarda (200 rpm/dk) 37°C'deki inkübasyon koşullarına bırakıldı. İnkübasyonu gerçekleşmiş aktif kültürler 5 mL'lik NaCl'siz sıvı LB besiyerine aktarıldı. Aktarılan suşlar 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, daha önceden hazırlanmış Kongo kırmızılı (40 µg/mL), NaCl'siz LB agar besiyelerine aktif kültürlerden besiyerinin tam ortasına gelecek şekilde 50 µl aktarıldı. Kongo kırmızısı içeren NaCl'siz LB agar, biyofilm matriksinin ana bileşenleri için indikatör özellik gösteren bir besiyeridir. Aktarım yapılan petripler daha sonra 20°C'de 8 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda biyofilm oluşumu gözlenen tüm petripler stereo mikroskopta incelendi. Çalışma, 2 paralel olarak gerçekleştirildi. Suşların içerdiği morfotipler, rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü), bdar (kahverengi, kuru ve pürüzlü), pdar (pembe, kuru ve pürüzlü) ve saw (düz ve ıslak) olacak şekilde gruplara ayrıldı (Romling ve ark., 2000).



Şekil 4. *Salmonella*'da rdar morfotipinin Kongo Kırmızılı LB agarda görünümü.

2.2.2. *Salmonella* Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi

Tez çalışmasında tüm biyofilm üretimi aşamalarında besiyeri olarak NaCl içermeyen LB broth kullanıldı. Bunun ana nedeni artan ozmolarite sebebiyle *Salmonella* suşlarının oluşturduğu biyofilm matriksindeki kıvrımlı fimbriya genlerinin ifadesinin transkripsiyonel düzeyde engellenmesidir (Kauffman, 1998). *Salmonella* Infantis ve diğer serotiplere ait suşlar 5 mL'lik NaCl'siz LB broth besiyerlerinde bir gece boyunca 37°C'de çalkalamalı koşullarda inkübasyona bırakıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra aktif kültürler McFarland 0,5 (10^8 mikroorganizma/ml)'e göre ayarlanarak, tüm tüplerde standart bir bulanıklık oluşturuldu ve bu tüplerden 30'ar µl alınarak 100 µl NaCl'siz LB broth besiyeri içeren mikrotitre plak kuyularına aktarımı sağlandı. Hazırlanan mikrotitre plalar biyofilm oluşumunu belirlemek amacıyla 24, 48, 72 ve 96 saat süresince 20°C'lik sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlanan plaklardaki kültürler kristal viyole ile boyandı. Ölçümler, biyofilm yapısında tutunan boyanın optik dansite 595 (OD_{595}) dalga boyunda ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak okunması sonucu Stepanović yöntemine göre belirlendi (Stepanović ve ark., 2000). Bu yöntemin esasları, cut-off (OD_c) değerinin hesaplanmasına, sonrasında da mevcut OD değerlerinin kıyaslanmasına dayanmaktadır. Cut-off değeri, negatif kontroldür ve esasen bakteri içermeyen steril besiyerinin optik dansite (OD) değerini ifade eder. Spektrofotometrik ölçümler sonucu elde edilen değerler;

- $OD \leq OD_c$ ise biyofilm üretimi gerçekleşmemiş,
- $OD_c \leq OD \leq 2 \times OD_c$ ise zayıf biyofilm üreticisi,
- $2 \times OD_c \leq OD \leq 4 \times OD_c$ ise orta düzeyde biyofilm üreticisi,
- $OD > 4 \times OD_c$ ise güçlü biyofilm üreticisi olarak değerlendirildi.

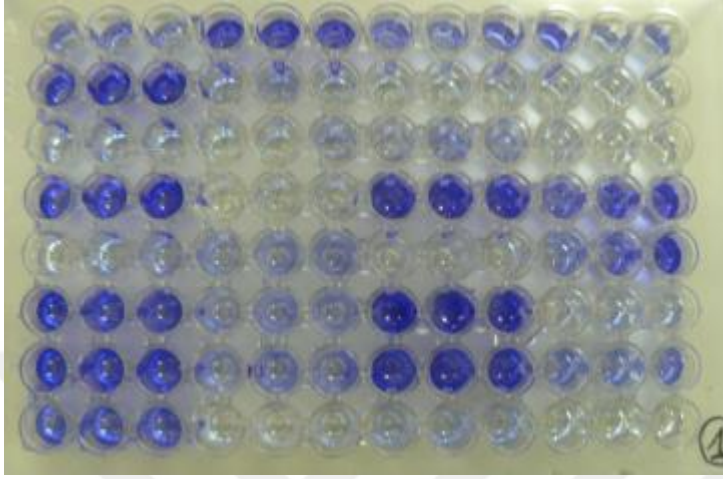
2.2.3. Biyofilm Üzerine Çevresel Faktörlerin Etkisinin Araştırılması

Tez çalışmasında kullanılacak olan serotiplerin biyofilm oluşturma gücü üzerine sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu gibi çevresel faktörlerin etkisi araştırıldı. Sıcaklık olarak 4°C, 20°C ve 37°C, pH değerleri için 4,5, 6,6, 7,3; tuz konsantrasyonu için %0,5, %4,5 ve %8 seçildi (Threlfall, 2005). Bu çalışmayı gerçekleştirmek için farklı tuz konsantrasyonları ve pH ile hazırlanmış besiyerleri hazırlandı. Hazırlanan besiyerleri uygun koşullarda steril edildi. Bu koşulların etkisinin araştırılması mikrotitre plak yöntemine göre yapıldı. Seçilen *S. Infantis* ve diğer serotiplere ait suşlar 5 ml'lik NaCl'siz Luria-Bertani broth besiyerinde bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda elde edilen aktif kültürler McFarland 0,5 (10^8 mikroorganizma/ml)'e göre ayarlandı, standart bir bulanıklık oluşturuldu ve bunlardan 30 µl alınarak 100 µl NaCl'siz LB broth besiyeri içeren mikrotitre plak kuyularına aktarıldı, plaklar 20°C'de 72 saat boyunca, araştırılması planlanan farklı çevresel koşullar (pH, tuz konsantrasyonu ve sıcaklık) altında inkübe edildi (Romling ve ark., 2000).

2.2.4. Biyofilm Düzeyinin Belirlenmesi

Mikroorganizmaların oluşturdukları biyofilm miktarları, çeşili mikrotitre plak yöntemleri ve farklı bolalar kullanılarak ölçülebilir (Christensen ve ark., 1985; Deighton ve Balkau 1990; Stepanovic ve ark., 2000; Ramage ve ark., 2001). Biyofilmin miktarının belirlenmesinde indikatör boya olarak kristal viyole yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu yöntem, mikrotitre plak kuyularının çeperlerine tutunmuş biyofilmlerin indikatör boya kristal viyole ile işaretlenmesi, biyofilm matriksine tutunan boyanın ise glasiyel asetik asit çözeltisiyle çözdürülüp, ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esaslarına dayanmaktadır. Elde edilen OD değerlerinin aritmetik ortalamaları (OD_{ort}), biyofilm üretim sürelerinin

karşılaştırılmasında ve biyofilm üzerine çevresel faktörlerin etkisinin açıklanmasında kullanıldı.



Şekil 5. Mikrotitre plak kuyulardaki biyofilmlerin kristal viyole ile boyanması.

Seçilen suşların biyofilm düzeylerinin belirlenmesinde Stepanovic yöntemi kullanıldı (Stepanovic ve ark., 2000). Bu yöntemde bakteri içermeyen ve negatif kontrol olarak kullanılan besiyeri üzerinden cut-off OD yani OD_C değeri hesaplandı ve suşların biyofilm üretim düzeyleri OD_C değerinden küçük ve eşit değerler için biyofilm oluşumunun gerçekleşmediğini; OD_C 'den büyük ve OD_C değerinin iki katından küçük olan değerler için zayıf biyofilm üreticisi, OD_C değerinin iki katından büyük ve dört katından küçük değerler için orta düzeyde biyofilm üreticisi ve OD_C değerinin dört katından büyük değerler için güçlü biyofilm üreticisi ifadesi kullanıldı ve bu şekilde sınıflandırma yapıldı (Gilbert ve ark., 2002).

2.2.5. Biyofilm Oluşumu İle İlişkili Genlerin *S. Infantis* ve Bazı Serotiplerde Belirlenmesi

Biofilm oluşumundan sorumlu olan ve güçlü biyofilm üreticisi olarak bilinen *S. Typhimurium*'da bulunduğu bildirilen (Bajaj ve ark., 1996; Fortune ve ark., 2006; Teplitski ve ark., 2006) *csrB*, *csrC*, *fimA* ve *fimI* genlerinin varlığı *S. Infantis* (n: 100), *S. Enteritidis* (n: 5), *S. Typhimurium* (n: 5), *S. Kentucky* (n: 5) ve *S. Hadar* (n: 5) serotiplerinde araştırıldı.

2.2.5.1. Primerler

Bu çalışmada kullanılan primerlerin tamamı NCBI-BLAST ve Primer3 web tabanlı programlar kullanılarak dizayn edildi. Dizayn edilen primerlerin baz çifti uzunluklarına, erime sıcaklıklarına, primerlerin kendi içinde komplementer çift ve sık tekrarlayan bölgeler bulundurmamasına dikkat edildi. Kullanılan primer dizileri ve çoğaltılan gen bölgelerinin büyüklüğü Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. PCR tanısı için kullanılan primerler.

Hedef Gen	5'-3' Dizini	Elde edilen ürün büyüklüğü
<i>fimA</i>	F: TGTGCCGTCAGCACTAAATC	181 bp
	R: TGGTGTTATCTGCCTGACCA	
<i>fimI</i>	F: GTCAGCGTTCCATTTTCGTT	217 bp
	R: AAATGGGCGTGTAATGAAGC	
<i>csrB</i>	F: CAAGGAAAGGCTTCAGGATG	232 bp
	R: TACTTTTCGTGCTCCCTGCT	
<i>csrC</i>	F: CAAGGAAAGGCTTCAGGATG	217 bp
	R: TACTTTTCGTGCTCCCTGCT	

2.2.5.2. PCR Optimizasyonu

Salmonella Typhimurium'un biyofilm ile ilişkili olduğu bilinen *csrB*, *csrC*, *fimA* ve *fimI* genlerinin varlığı: *S. Infantis* (n: 100), *S. Enteritidis* (n: 5), *S. Typhimurium* (n: 5), *S. Kentucky* (n: 5) ve *S. Hadar* (n: 5) serotiplerinde araştırıldı. Tüm suşların DNA ekstraksiyonu Qiagen DNeasy™ DNA ekstraksiyon kiti (Qiagen, U.S.A.) ile yapıldı. Ekstraksiyonu yapılan suşlara ait DNA'lar belirtilen genler yönünden PCR ile araştırıldı. Bu amaçla her bir gene spesifik primer dizilerinin kullanıldığı optimize edilmiş, farklı PCR amplifikasyon prosedürleri denenerek en uygun elektroforez görüntüsünün alındığı amplifikasyon karışımı (Çizelge 2) ve döngü ısıları bütün suşlara uygulandı. Bütün testlerde pozitif kontrol ve negatif kontrol kullanıldı (Teplitski ve ark., 2006).

Çizelge 2. Amplifikasyon karışımı.

Reaksiyon Karışımı	Miktar (µl)
Steril dH ₂ O	14,8 µl
10x Reaksiyon Tampon Çözeltisi	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP (10mM)	0,5 µl
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
Taq DNA polimeraz (500 U/ml)	0,2 µl
DNA	2 µl
Toplam	25 µl

Karışım her bir primer için ayrı ayrı hazırlandıktan sonra 23'er µl tüplere dağıtıldı. Her bir tüpe 2 µl örnek DNA'sı eklenerek toplam hacim 25 µl'ye tamamlandı. Hazırlanan örnekler amplifikasyon için termal cyclus cihazına yerleştirildi. Örneklerin hazırlanması sırasındaki hatalar için pozitif kontrol, kontaminasyonlar için negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrolde DNA yerine steril

PCR suyu kullanıldı. Amplifikasyon koşulları olarak gerekli Ta (bağlanma sıcaklığı)'nın belirlenmesi için 55°C ve 60°C arasında gradient PCR yapılarak en uygun sıcaklık 58°C olarak belirlendi. PCR sıcaklık ve döngü koşulları; Ön denatürasyon için 96°C'de 1 dk; denatürasyon için 96°C'de 10 sn; bağlanma için 50°C'de 5 sn ve uzama 60°C'de 4 dk olacak şekilde optimize edildi.

2.2.5.3. Agaroz Jel Elektroforez

Agaroz jel %1,5'lük olacak şekilde hazırlandı. Tampon solüsyon olarak 0,5 TBE kullanıldı. Agaroz 200 ml TBE içerisinde homojen şekilde eritmek üzere 3 defa 45 saniyelik periyotlarla mikrodalga fırına konulduktan sonra, içerisine 13 µl SafeView boya ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan karışım 20 cm'lik jel tablasına döküldü ve uygun boyutlarda taraklar takıldı. Jel donduktan sonra içerisinde TBE solüsyonu olan tankın içine jel yerleştirildi ve elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 10 µl alınarak 2 µl 6X yükleme boyası ile karıştırıldı ve jele yüklendi. PCR ürünleri 180 voltta 60 dk koşturuldu. Elektroforez sonrası örnekler, bilgisayarlı UV transillüminatör cihazında ve klasik UV görüntüleme cihazında pozitif ve negatif olarak incelendi (Teplitski ve ark., 2006).

3. BULGULAR

3.1. Biyofilm Morfotiplerinin Belirlenmesi

NaCl içermeyen besiyeri ortamı, düşük ozmolarite nedeniyle kıvrımlı fimbriya üretimi için ideal bir ortam teşkil eder. İncelenen 100 *S. Infantis*, 5 *S. Enteritidis*, 5 *S. Typhimurium*, 5 *S. Kentucky* ve 5 *S. Hadar* serotipinde biyofilm morfotiplerinin belirlenmesi amacıyla; indikatör bir boya özelliği gösterdiği bilinen Kongo kırmızısı içeren (40 µg/mL) LB agar kullanıldı (Olsen ve ark., 1989). Morfotip analizleri sonucunda *S. Infantis* suşlarının 96'sı *rdar* morfotipinde 4'ü ise *bdar* morfotipinde bulunurken; *S. Typhimurium* (n: 5), *S. Kentucky* (n: 5) ve *S. Enteritidis* (n: 5) serotiplerinin biyofilm morfotipleri *rdar*, *S. hadar* ise *bdar* morfotipinde bulundu.

3.2. Biyofilm Üretim Sürelerinin Belirlenmesi

Suşların biyofilm üretimlerinin optimum sürelerini belirlemek amacıyla Woodward ve ark., (2000) tarafından kullanılan mikrotitre plak yöntemi kullanıldı. Suşların biyofilm üretim miktarlarının değerlendirilmesinde güçlü biyofilm üreticisi *S. Typhimurium* ATCC 14028 suşu pozitif kontrol; bakteri içermeyen besiyeri ise negatif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyon öncesi, bakteri içermeyen besiyeri üzerinden hesaplanan cut-off OD_c değeri 0,094 olarak hesaplandı.

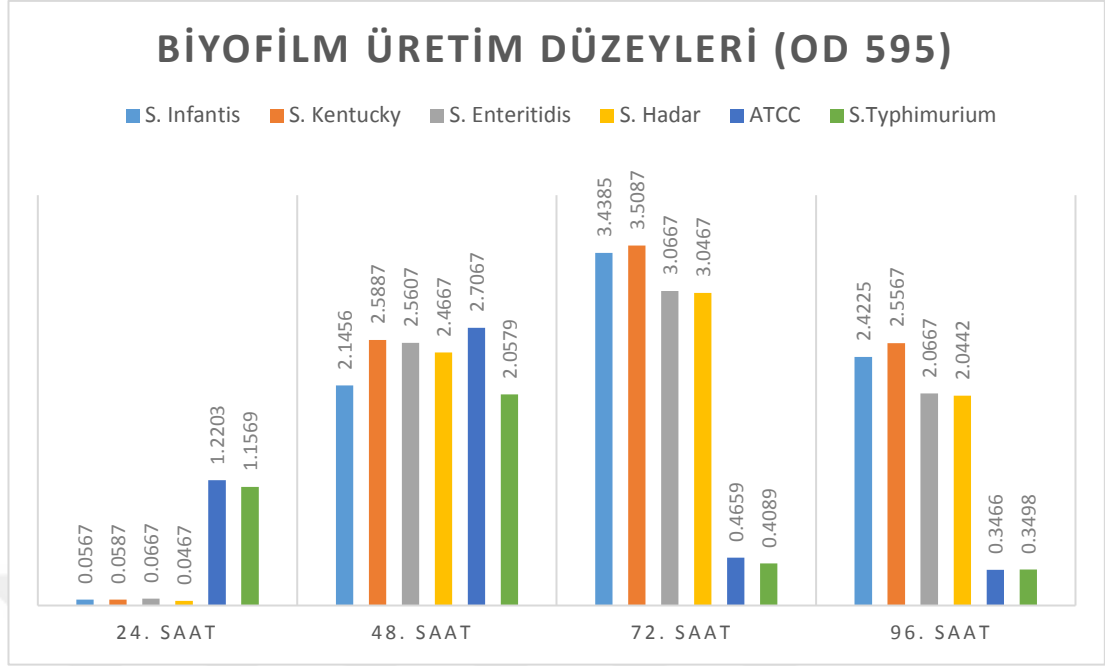
İnkübasyonun ilk 24 saati için bütün *S. Infantis* suşlarında (n: 100) zayıf biyofilm üretimi (OD 0,0567) belirlendi. İncelenen suşlar içinde sadece *S. Typhimurium* ATCC 14028 kontrol suşu (OD 1,2203) ve diğer 5 *S. Typhimurium* (OD_{ort} 1,1569) suşu ilk

24 saatte güçlü biyofilm üreticisi olarak bulundu. Bununla birlikte incelenen *S. Enteritidis* (n: 5; OD_{ort} 0,0667), *S. Kentucky* (n: 5; OD_{ort} 0,0587) ve *S. Hadar* (n: 5; OD_{ort} 0,0467) serotiplerinin zayıf biyofilm ürettikleri belirlendi.

İncelenen tüm *S. Infantis* suşlarının, inkübasyon süresi 48 saate çıkarıldı. 48'inci saat 24 saatlik inkübasyonla kıyaslandığında biyofilm üretim miktarlarının belli oranlarda arttığı görüldü. 48 saat sonunda ise biyofilm üretim düzeyleri açısından *S. Infantis* suşları (n: 100; OD 2,1456), *S. Enteritidis* (n: 5; OD_{ort} 2,5607), *S. Kentucky* (n: 5; OD_{ort} 2,5887), *S. Typhimurium* (n: 5; OD_{ort} 2,0579) ve *S. Hadar* (n: 5; OD_{ort} 2,4667) serotiplerinin güçlü biyofilm ürettikleri belirlendi.

Biyofilm üretiminin devamı incelendiğinde, 72 saat inkübasyon sonunda da biyofilm üretiminin incelenen bütün *Salmonella* serotiplerinde devam ettiği belirlenmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonunda bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm miktarı 24 ve 48 saatlik inkübasyonla kıyaslandı ve kontrol suşu olan *S. Typhimurium* ATCC 14028 ve incelenen diğer 5 *S. Typhimurium* suşunun biyofilm üretim düzeyinde düşme (OD 0,4089) gözlenirken; diğer tüm *Salmonella* serotiplerinin [*S. Infantis* (n: 100; OD_{ort} 3,4385), *S. Enteritidis* (n: 5; OD_{ort} 3,0667), *S. Kentucky* (n: 5; OD_{ort} 3,5087) ve *S. Hadar* (n: 5; OD_{ort} 3,0467)] biyofilm düzeylerinde artış gözlemlendi.

96 saatlik inkübasyon süresi incelendiğinde ise, tez çalışması kapsamında incelenen bütün *Salmonella* serotiplerinin biyofilm üretimlerinde azalma tespit edildi. *S. Infantis* (n: 100; OD_{ort} 2,4225), *S. Enteritidis* (n: 5; OD_{ort} 2,0667), *S. Kentucky* (n: 5; OD_{ort} 2,5567) ve *S. Hadar* (n: 5; OD_{ort} 2,0442) olarak hesaplandı ve tüm denemelerin sonucu olarak, tüm suşlar için optimum biyofilm üretim zamanları 72 saat olarak belirlendi (Şekil 6).



Şekil 6. *Salmonella* serotiplerinin farklı inkübasyon sürelerinde OD_{ort} değerleri.

3.3. Biyofilm Üzerine Çevresel Faktörlerin Etkisi

Salmonella serotiplerinin biyofilm oluşturma gücü üzerine sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu gibi çevresel faktörlerin etkisi araştırıldı. Sıcaklık olarak 4°C, 20°C ve 37°C; pH değerleri için 4,5; 6,6; 7,3; tuz konsantrasyonu için %0,5; %4,5 ve %8 değerleri ve oranları araştırılmak üzere seçildi.

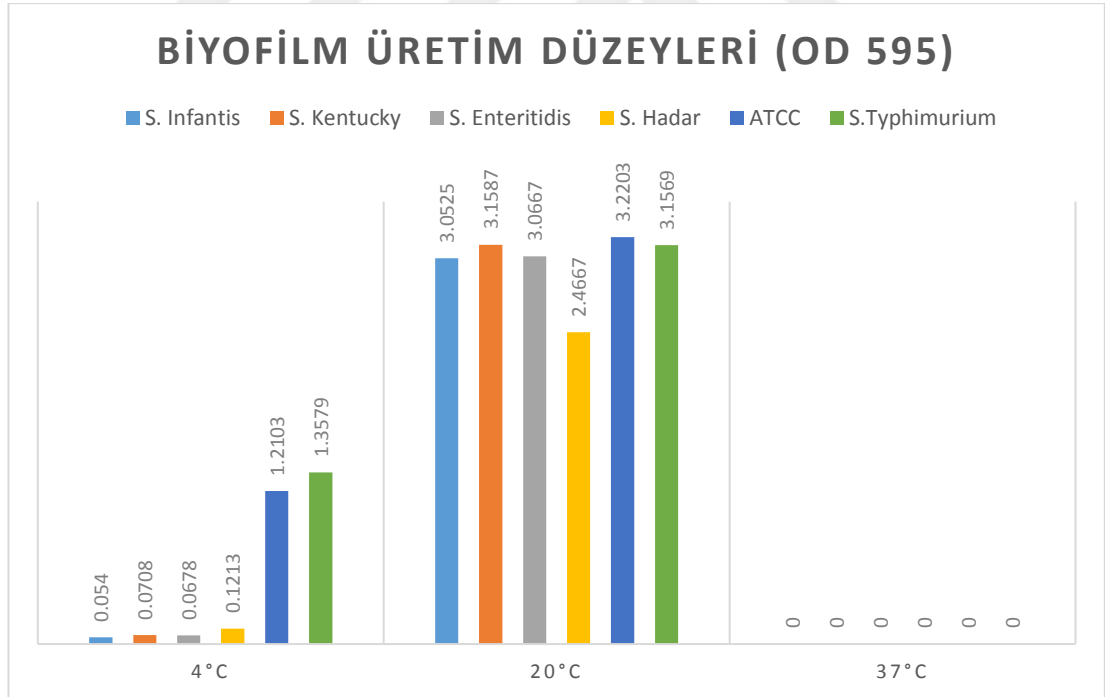
3.3.1. Sıcaklık

4°C'lik sıcaklıkta inkübasyon sonunda, *S. Typhimurium* ATCC 14028 için OD 1,2103; 5 *S. Typhimurium* suşu için OD_{ort} 1,3579; 100 *S. Infantis* için OD_{ort} 0,0540; 5

S. Enteritidis için OD_{ort} 0,0678; 5 *S. Kentucky* için OD_{ort} 0,0708 ve 5 *S. Hadar* için OD_{ort} 0,1213 olarak hesaplandı.

20°C'lik inkübasyon sıcaklığında ise *S. Typhimurium* ATCC 14028 için OD 3,2203; 5 *S. Typhimurium* suşu için OD_{ort} 3,1569; 100 *S. Infantis* için OD_{ort} 3,0525; 5 *S. Enteritidis* için OD_{ort} 3,0667; 5 *S. Kentucky* için OD_{ort} 3,1587 ve 5 *S. Hadar* için OD_{ort} 3,0467 olarak hesaplandı.

Denemeler sonucunda biyofilm oluşumu için optimum inkübasyon sıcaklığı 20°C olarak belirlenmiştir. 4°C'de zayıf biyofilm üretimi gerçekleşirken, 37°C'de biyofilm üretimi gerçekleşmemiştir (Şekil 7).



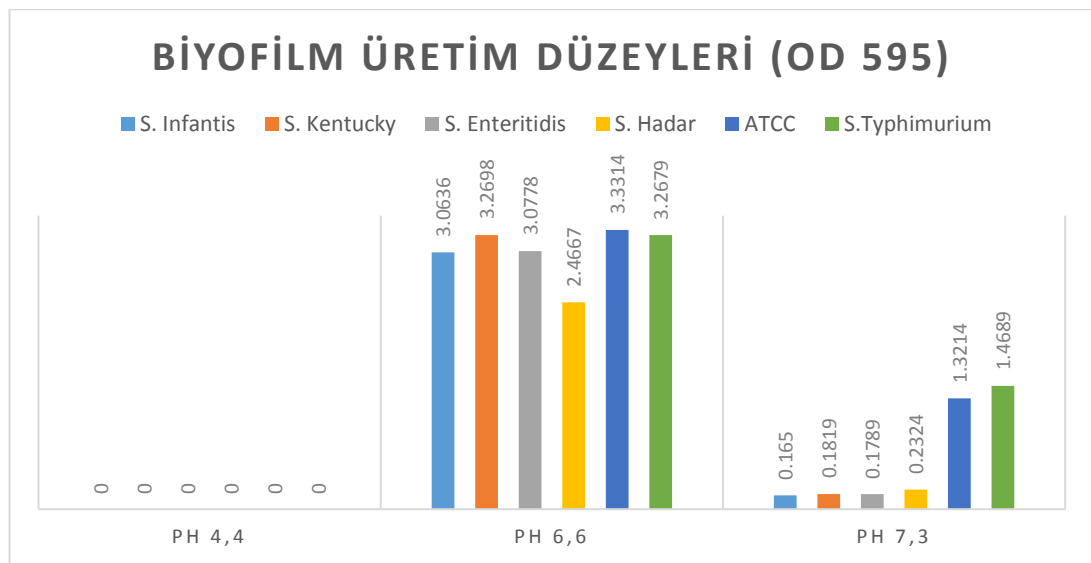
Şekil 7. *Salmonella* serotiplerinin farklı sıcaklıklarda OD_{ort} değerleri.

3.3.2. pH'nın etkisi

pH 6,6'da inkübasyon sonrasında, incelenen suşlar içinde kontrol suşu *S. Typhimurium* için OD 3,3314; 5 *S. Typhimurium* için OD_{ort} 3,2679; 100 *S. Infantis* için OD_{ort} 3,1636; 5 *S. Enteritidis* için OD_{ort} 3,1778, 5 *S. Kentucky* için OD_{ort} 3,2698 ve 5 *S. Hadar* için OD_{ort} 3,1578 olarak hesaplandı.

pH 7,3'de inkübasyon sonrasında kontrol suşu *S. Typhimurium* için OD 1,3214; 5 *S. Typhimurium* için OD_{ort} 1,4689; 100 *S. Infantis* için OD_{ort} 0,1651; 5 *S. Enteritidis* için OD_{ort} 0,1789; 5 *S. Kentucky* için OD_{ort} 0,1819 ve 5 *S. Hadar* için OD_{ort} 0,1314 olarak hesaplandı.

Biyofilm üretimi bakımından bütün suşlar için ideal pH değerinin 6,6 olduğu belirlendi. pH 7,3'de tüm suşlarda zayıf biyofilm üretimi hesaplanırken; pH 4,4'de ise biyofilm üretimi gerçekleşmedi (Şekil 8).

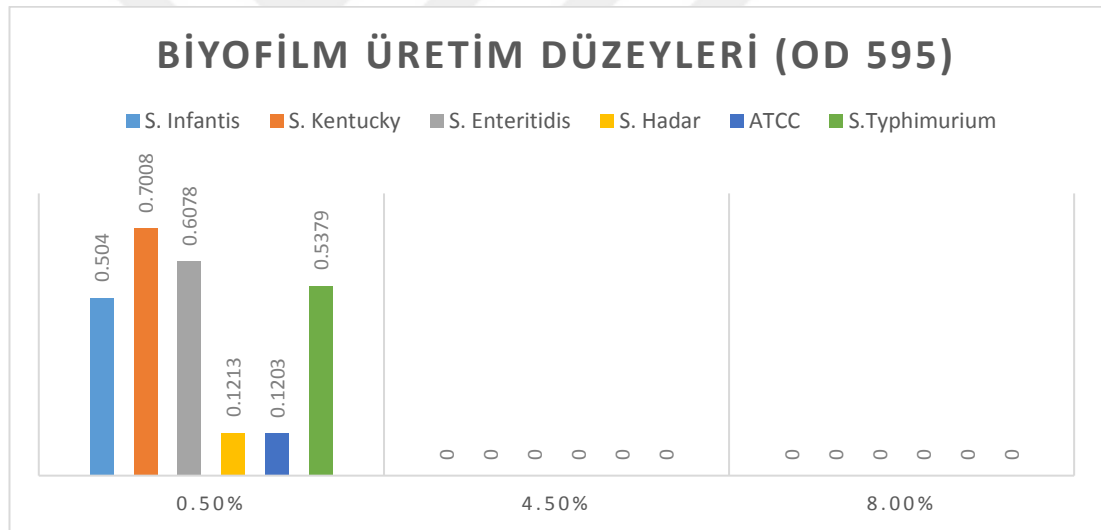


Şekil 8. *Salmonella* serotiplerinin farklı pH'larda OD_{ort} değerleri.

3.3.3. Tuz Konsantrasyonunun Etkisi

Son olarak 4°C’de inkübasyon sonunda kontrol suşu *S. Typhimurium* için OD 0,1203; 5 *S. Typhimurium* için OD_{ort} 0,5379; 100 *S. Infantis* için OD_{ort} 0,5040; 5 *S. Enteritidis* için OD_{ort} 0,6078; 5 *S. Kentucky* için OD_{ort} 0,7008 ve 5 *S. Hadar* için OD_{ort} 0,1213 olarak belirlendi.

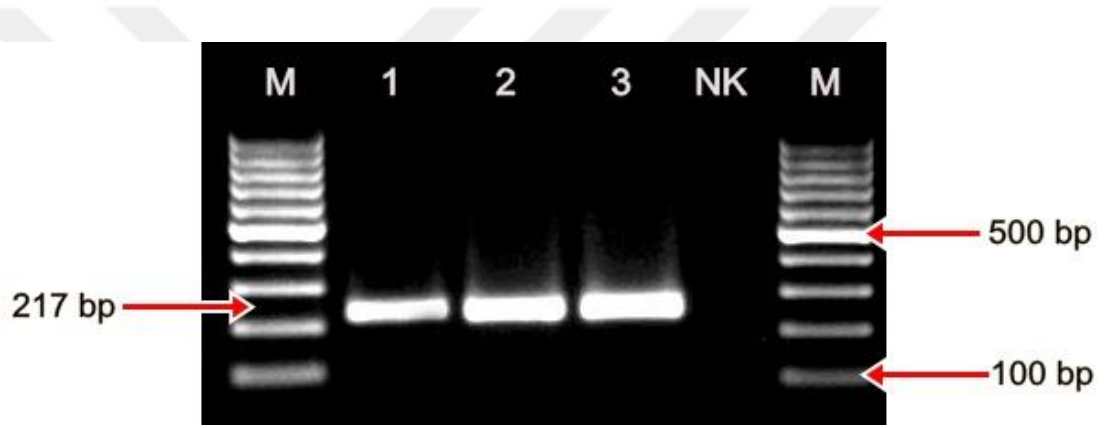
Biyofilm üretimim için NaCl konsantrasyonu optimum %0,5 olarak bulundu. %4,5 ve % 8’lik tuz konsantrasyonlarında ise biyofilm oluşumu gözlenmedi (Şekil 9).



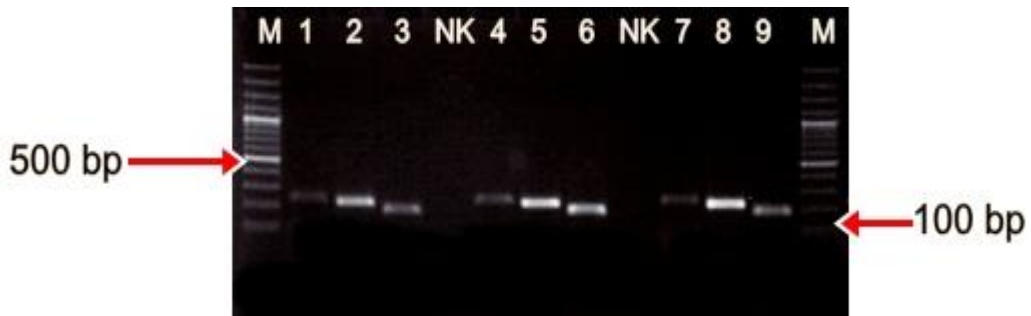
Şekil 9. *Salmonella* serotiplerinin farklı tuz konsantrasyonlarında OD_{ort} değerleri.

3.4. Biyofilm oluşumu ile ilişkili genlerin belirlenmesi

Güçlü biyofilm üreticisi olarak bilinen *S. Typhimurium*'da bulunan biyofilm ile ilişkili *csrB* (232 bp), *csrC* (217 bp), *fimA* (181 bp) ve *fimI* (217 bp) genlerini çoğaltmak için PCR optimizasyonu yapıldı (Şekil 10 ve Şekil 11). Bu genlerin varlığı çalışmada kullanılan serotiplerin [*S. Infantis* (n: 100), *S. Enteritidis* (n: 5), *S. Kentucky* (n: 5), *S. Typhimurium* (n: 5) ve *S. Hadar* (n: 5)] tamamında belirlendi.



Şekil 10. *csrC* geninin optimizasyonu sonucu agaroz jel elektroforez görüntüsü. M, molekuler marker (100 bp); 1-3, pozitif örnekler; 1, 57°C; 2, 58°C; 3, 59°C; NK, negatif kontrol.



Şekil 11. *csrB*, *fimI* ve *fimA* genlerinin optimizasyonu sonucu agaroz jel elektroforez görüntüsü. M, molekuler marker (100 bp); 1, 4, 7, *csrB* pozitif örnekler (232 bp); 2, 5, 8, *fimI* pozitif örnekler (217 bp); 3, 6, 9, *fimA* pozitif örnekler (181 bp); 1, 2, 3, 57°C; 4, 5, 6, 58°C; 7, 8, 9, 59°C; NK, negatif kontrol.

4. TARTIŞMA

Salmonella Infantis serotipi, son yıllarda Türkiye’de, Avrupa ve Amerika’da kanatlı hayvan işletmelerinden en sık izole edilen serotip olması sebebiyle dikkat çekmektedir (Miranda ve ark., 2017; Papadopoulos ve ark., 2017) *Salmonella* enfeksiyonlarının hızlı yayıldıkları bilinmektedir. Buna çapraz kontaminasyonların etkisi büyüktür. Ayrıca biyofilm oluşturabilme yetenekleri de canlılıklarını sürdürebilmesine ek olarak dirençliliklerine de etki etmektedir. Bu yüzden kanatlı kesimhane ve kümeslerinde meydana gelen *Salmonella* kontaminasyonu büyük bir sorun teşkil etmektedir (Crump ve ark., 2002). Bu tez çalışmasında, kanatlı işletmelerinde çevresel örneklerden sıklıkla izole edilen *S. Infantis*’in biyofilm morfoloğlarının belirlenerek oluşturduğu biyofilm üzerine etkili olan faktörler ve biyofilm üretim gücünün araştırılması amaçlandı.

Speranza ve ark., (2011)’nın yaptığı bir çalışmada, *S. Typhimurium*’un kendi serotipleri arasında, aynı şartlar oluşturulduğunda dahi biyofilm üretim miktarları, biyofilm morfoloğları ve optimum biyofilm üretim sürecinin farklılık gösterdiği belirtilmiştir. *S. Infantis* için ise daha önce bu tip çalışmalar yapılmamış olup; *S. Infantis* suşlarının farklı çevresel koşullarda ve farklı üreme sürelerinde biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi ve biyofilm üretim miktarlarının tayin edilmesi açısından bu tez ilk çalışmadır.

rdar morfoloğının biyofilm matriksinde hem kıvrımlı fimbriya hem de selüloz bulunmaktadır. Kıvrımlı fimbriya, *Enterobacteriaceae* familyası üyeleri için ortak bir yüzey yapısıdır. *Salmonella* cinsi üyeleri de bu familyaya ait olduğundan bu bakterinin ürettiği biyofilm matrikslerinin ana bileşeni olarak, kıvrımlı fimbriyanın tespit edilmesi doğaldır (Romling, 2001). Ayrıca kıvrımlı fimbriya *Enterobacteriaceae* üyelerinin; memeli ve bitki hücrelerinin yanında cam, plastik ve çelik gibi abiyotik

yüzeyle tutunmasında ilk basamak olarak tanımlanan adezyona ciddi katkılarının olduğu belirlenmiştir (Ueda ve ark., 2007). Bununla birlikte *Salmonella*'nın biyofilm yapılarında bulunan selülozun, biyofilm yapılarının elastikiyetini ve böylece stres ajanlarına karşı biyofilm yapılarının stabilitesini arttırdığı saptanmıştır (Solano ve ark., 1998; Barnhart ve Chapman, 2006; Schemeisser ve ark., 2003). Özetle, *rdar* morfotipindeki biyofilmlerde kıvrımlı fimbriyanın, tutunma ve biyofilm oluşumunun; selülozun da, yapısal stabilitenin ve kararlılığın temel unsurlarından olduğu bilinmektedir. Yalnız selüloz (*pdar*) ya da yalnız kıvrımlı fimbria (*bdar*) içeren biyofilmlerin, çevresel stres koşullarına, çeşitli antibiyotiklere ve dezenfektanlara direncinin, *rdar* morfotipindeki biyofilmlere kıyasla daha az olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Cegelski ve ark., 2009; Characklis ve ark., 1973). Olsén ve ark., (1989), *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakterileri inceledikleri bir çalışmada, *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis* serotiplerinin biyofilmlerini *rdar* olarak tanımlamıştır. Bu tez çalışmasında ise incelenen *S. Typhimurium* (n: 5), *S. Kentucky* (n: 5) ve *S. Enteritidis* (n: 5) serotiplerinin biyofilm morfotipleri *rdar*, *S. Hadar* ise *bdar* olarak bulundu. Diğer çalışmalar (Olsen ve ark., 1989; Austin ve ark., 1998; Barnhart ve Chapman, 2006) ile de karşılaştırıldığında bu tez çalışmasından elde edilen *Salmonella* serotiplerinin oluşturmuş oldukları biyofilm morfotipleri uyumlu bulundu.

Bu tez çalışması, *S. Infantis*'in oluşturduğu biyofilmlerin morfotiplerinin araştırıldığı ve oluşan biyofilmler üzerine çevresel faktörlerin etkisinin incelendiği ilk çalışmadır. Bu çalışmada yapılan analizler sonucunda kanatlı kökenli *S. Infantis*'te yaygın biyofilm morfotipinin *rdar* olduğu (%96) gösterildi. Bu çalışmadan elde sonuca göre çevresel stres koşullarına ve dezenfektanlara karşı daha dayanıklı olduğu bilinen *rdar* morfotipinin yüksek oranda bulunması, bu serotipin alınan çevresel örneklerden *S. Infantis*'in son yıllarda yüksek oranda izolasyonunu açıklayabilir niteliktedir.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen biyofilm üretim süreleri incelendiğinde *S. Typhimurium* suşlarının optimum biyofilm üretme zamanının 24 saat, çalışılan diğer tüm serotiplerin optimum biyofilm üretme zamanının ise 72 saat olduğu belirlendi. Yapılan çalışmalar, benzer olarak, *S. Typhimurium* için biyofilm üretim düzeyinin 24'üncü ve 72'nci saattlerde optimum, diğer *Salmonella* serotiplerinin üretmiş oldukları biyofilm miktarlarının ise sadece 72'nci saatte optimum düzeyde olduğunu göstermektedir (Darwin ve ark., 1999; Darwin ve ark., 2001; Scher ve ark., 2005).

Biyofilm üretiminin engellenmesi için çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturan *Salmonella* serotiplerine göre değişkenlik gösteren bu parametrelerin belirlenmesi zorunludur (Lavhon ve ark., 2002; Larsen ve ark., 2007; Ma ve ark., 2009). Bu tez çalışmasında, *S. Infantis* suşları için optimum biyofilm oluşturma sıcaklığı 20°C, süresi 72 saat, pH'sı 6,6, tuz konsantrasyonu ise %0,5 olarak belirlendi. Lin ve ark., (1996) *Salmonella* suşlarında ideal inkübasyon sıcaklığını 20-22°C olarak belirlemişken; Kumar ve ark., (1998) bu değeri 28-30°C olarak saptamıştır. Aynı şekilde biyofilm oluşumu için gerekli optimum pH düzeylerinde de literatürde farklı bulgular mevcuttur. Lianou ve ark., (2012) 60 *Salmonella enterica* suşu ile yaptığı farklı çevre koşullarında biyofilm üretiminin test edildiği bir çalışmada pH 5,5 (%58,3), %0,5 NaCl (%48,3) ve 25°C'de (%53,3) yüksek oranda biyofilm oluştuğunu göstermişlerdir. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlardan, uyumsuz olan pH ve sıcaklık değerlerinin çalışılan suşların serotiplerinin belirlenmemesinden dolayı olduğu düşünüldü. Bahsi geçen *Salmonella enterica* türü içerisinde yer alan 6 alt tür ve 2500'den fazla serotip bulunduğu düşünüldüğünde serotipler arasında, ürettikleri biyofilm üzerine etkili olan faktörlerin farklı olmasının doğal olduğu düşünüldü.

Speranza ve ark., (2011) ortam sıcaklığının 30°C ve pH'nın 6,0 tutulduğu çalışmada, güçlü biyofilm üretiminin olduğunu belirtmişlerdir. Giaoruis ve ark. (2005) biyofilm üretimi için optimum pH'yı 5,5 olarak belirlerken, bu tez çalışmasında ise

optimum pH 6,6 olarak hesaplanmış; bu sonuç söz konusu pH değerinin 6,5 olarak belirlendiği Chavant ve ark., (2007) tarafından yapılan çalışmayla uyumluluk göstermiştir. *Salmonella* genusunda bulunan bakterilerin optimum yaşam sıcaklıkları (37°C), pH (ort. 7.0)'sı ve tuz konsantrasyonu (%0) düşünüldüğünde, bu tez çalışması ve diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlar, *Salmonella* suşlarının standart yaşam koşullarının dışına çıktıkça, canlı kalabilmek için biyofilm oluşturma eğilimlerini arttırdıklarını göstermektedir.

Tez çalışmasının son aşamasında biyofilm oluşumu ile ilişkili *csrB*, *csrC*, *fimA* ve *fimI* genlerin varlığı *S. Infantis* ve bazı *Salmonella* serotiplerinde araştırıldı. Altier ve ark., (2000), *S. Typhimurium csrA* mutantlarının zayıf biyofilm gelişimi gösterdiklerini gözlemlemişlerdir. Mutant olmayan *S. Typhimurium* suşlarının güçlü biyofilm üreticileri olması bu genlerin biyofilm üretimi üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Fortune ve ark., (2006) ve Teplitski ve ark., (2006), *csrC* geninin *Salmonella*'nın hareketlilik ile ilgili özelliklerini düzenlediğini bildirmişlerdir. Lawhon ve ark., (2002) *S. Typhimurium*'da bulunan SirA'nın flagellar genler üzerinde etkisinin bulunduğunu ve bu etkinin CsrA'nın antagonisti olan CsrB'nin aktivasyonu ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında daha önce *S. Infantis* için araştırılmamış olan bu genler hem *S. Infantis* hem de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar* ve *S. Kentucky* serotipleri için araştırıldı. Çalışma sonunda bu genlerin varlığı tüm serotiplerde belirlendi. Hareketlilik ile ilişkili *csrB* ve *csrC* genleri ile *Enterobacteriaceae* üyelerinde bulunan kıvrımlı fimbria oluşumundan sorumlu *fimA* ve *fimB* genlerinin bütün serotiplerde belirlenmesinin nedeni, bu serotiplerin *Enterobacteriaceae* familyası içerisinde yer alan hareketli serotipler olmasından kaynaklandığı düşünüldü.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Türkiye’de son yıllarda kanatlı hayvanlardan, kanatlı hayvan kökenli gıdalardan; altlık, toz, su, yem gibi kümes ve kesimhane materyallerinden en çok izole edilen serotip olan *S. Infantis*’in biyofilm oluşturma düzeyleri ve buna etkili olan faktörler belirlendi. En yaygın morfotip %96’lık oranla; ekstraselüler matriksin ana bileşenleri olan selüloz ve kıvrımlı fimbrianın sentezini birlikte yapan suşlarda görülen morfotip olan kırmızı, kuru ve pürüzlü (*rdar*) morfotipi olarak bulundu. Yaygın morfotipin *rdar* olarak belirlenmesi özellikle kanatlı kökenli gıda üretiminde dezenfeksiyon ve sterilizasyon aşamalarının etkili şekilde yapılması gerektiğine işaret etmektedir. Bu durum ayrıca broiler tavuk kümes ve kesimhanelerindeki Salmonelloz vakalarının yaygınlığını da açıklar niteliktedir.

Elde edilen diğer önemli bir sonuç ise *S. Infantis* suşlarının farklı çevresel koşullarda ve farklı üreme saatlerinde biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi ve miktarlarının tayin edilmesidir. *S. Infantis* için biyofilm oluşturma süresi uygun şartlar altında 72 saat olarak belirlenirken optimum sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyon oranları sırasıyla 20°C, 6,6 ve %0,5 şeklinde tespit edildi. pH 4,5’te ve %0,5’in üzerindeki tuz konsantrasyonlarında ise tüm serotiplerin biyofilm oluşturmadığı görüldü.

Bu tez çalışmasında daha önce *S. Infantis* için araştırılmamış olan *csrB*, *csrC*, *fimA* ve *fimB* genleri hem *S. Infantis* serotip hem de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar* ve *S. Kentucky* serotipleri için araştırılarak bu genlerin tüm serotiplerde var olduğu belirlendi. Biyofilm oluşumunun engellenmesinde en önemli nokta; düzenli ve etkili dezenfeksiyon işlemlerinin yapılmasıdır. Bu işlemler ile, hücrelerin yüzeye tutunmalarını engellemek amaçlanmaktadır (Carpentier ve Cerf, 1993). *Salmonella Infantis* için ilk kez yapılan bu araştırma sonucunda elde edilen bulgular, bu serotipin biyofilm yapılarının eradikasyonu için yapılacak çalışmalarda, doğru parametrelerin belirlenmesi açısından yol gösterici olacaktır.

ÖZET

***Salmonella* Infantis Suşlarının Oluşturduğu Biyofilm Üzerine Çevresel ve Genetik Faktörlerin Etkisinin Araştırılması**

Biyofilm oluşumu, endüstriyel, çevresel, halk sağlığı ve tıbbi alanlarda ciddi sorunlara neden olmaktadır. *Salmonella* serotipleri arasında biyofilm oluşturma yeteneği ve miktarı arasında farklılıklar vardır ve bu özellikler çeşitli çevresel ve genetik faktörlere bağlı değişiklikler göstermektedirler. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Salmonella* Infantis'in ülkemizdeki kanatlı kümes ve kesimhanelerinde en sık gözlenen serotip olduğu belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında, 100 *S. Infantis* suşu ile bazı *Salmonella* serotiplerinin (5 *Salmonella* Kentucky, 5 *Salmonella* Hadar, 5 *Salmonella* Enteritidis, 5 *Salmonella* Typhimurium) biyofilm morfolojileri belirlenerek biyofilm oluşumu üzerine sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu gibi çevresel etkilerin ve bazı genetik faktörlerin etkisi araştırıldı. Morfolojisi olarak *S. Infantis*'te *rdar* (%96), *S. Typhimurium* (%100), *S. Kentucky* (%100) ve *S. Enteritidis* (%100) serotiplerinin biyofilm morfolojileri *rdar*, *S. hadar* (%100) ise *bdar* morfolojisinde bulundu.

S. Infantis için biyofilm oluşturma süresi uygun şartlar altında 72 saat olarak belirlenirken, optimum sıcaklık 20°C, pH 6,6 ve tuz konsantrasyon oranı %0,5 olarak belirlendi. pH 4,5'te ve %0,5'in üzerindeki tuz konsantrasyonlarında ise tüm serotiplerin biyofilm oluşturmadığı görüldü. Bu tez çalışmasında daha önce *S. Infantis* için araştırılmamış olan *csrB*, *csrC*, *fimA* ve *fimB* genleri hem *S. Infantis* serotip hem de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar* ve *S. Kentucky* serotipleri için araştırılarak bu genlerin tüm serotiplerde var olduğu belirlendi. *Salmonella* Infantis için ilk kez yapılan bu araştırma sonucu elde edilen bulguların, bu serotipin biyofilm yapılarının eradikasyonu için yapılacak çalışmalarda, doğru parametrelerin belirlenmesi açısından yol gösterici olacağı düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: Kanatlı, *Salmonella*, biyofilm, çevresel etkiler.

SUMMARY

Effect of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation of The *Salmonella* Infantis Strains in Turkey

Biofilm formation causes serious problems in industrial, environmental, public health and medical fields. There are differences between *Salmonella* serotypes' ability to form biofilm quantity; these characteristics change due to various environmental factors. Because of the existing of *Salmonella* Infantis as the most common poultry serotype in recent years, it is a need to investigate the genetic and environmental factors' effects on the biofilm formation of this serotype. In this thesis, the environmental impacts such as different salt concentrations, temperature and pH and some of genetic factors on biofilm formation of *Salmonella* Infantis and other 4 different serotypes (*S. Enteritidis*, *S. Kentucky*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*) which is the most common serotype in poultry in Turkey were used to show the environmental impacts such as different salt concentrations, temperature and pH and some of genetic factors on biofilm. The most common morphotype was shown as *rdar* at rate of %96 for *S. Infantis*, *rdar* for *S. Typhimurium* (%100), *S. Kentucky* (%100) and *S. Enteritidis* (%100), *bdar* for *S. Hadar* (%100).

For the *S. infantis*, the optimal temperature was 20°C, pH 6,6, and the salt concentration ratio was 0.5%, while the biofilm formation time was 72 hours under appropriate conditions. At pH 4,5 and salt concentrations above 0,5%, all serotypes did not form biofilms. In this thesis study, *csrB*, *csrC*, *fimA* and *fimB* genes which have not been previously investigated for *S. Infantis* were investigated for both *S. Infantis* serotype and *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Hadar* and *S. Kentucky* serotypes and found that these genes exist in all serotypes determined. The findings of this first study for *Salmonella* Infantis will show the determination of the correct parameters in studies to eradicate this serotype biofilm constructs.

Keywords: Poultry, *Salmonella*, biofilm, environmental effects.

KAYNAKLAR

- AHMER BM, VAN REEUWIJK M., TIMMERS, CD, VALENTINE PJ, 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 Bacteriol*, **180**: 1185-1193.
- ALTIER C, SUYEMOTO M, LAWHON SD (2000). Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by csrA. *Infect Immun*, **68**: 6790-6797.
- APARNA MS YADAV S (2008). Biofilms: Microbes and diseases. *Braz J. Infect Dis*, **12**: 526-530.
- AUSTIN JW, SANDERS G, KAY WW, COLLINSON, S.K (1998). Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, **162**: 295-301.
- BAJAJ V, LUCAS RL, HWANG C, LEE CA (1996). Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of hilA expression. *Mol Microbiol*, **22**: 703-714.
- BARNHART MM, CHAPMAN MR (2006). Curli Biogenesis and Function. *Annu Rev Microbiol*, **60**: 131-147.
- BASSLER BL, (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*, **2**: 582-587.
- BELOIN C, GHIGO JM (2005). Finding gen-expression patterns in bacterial biofilms *Trends Microbiol*, **13**: 16-19.
- BODDICKER JD, LEDEBOER NA, JAGNOW J, JONES BD, 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. *Mol Microbiol*, **45(5)**: 1255-1265.
- BODDICKER JD, KNOSP BM, JONES BD (2003). Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, hilA, requires HilD activation in the absence of negative regulators. *J Bacteriol* **185**: 525-533.

- BRADSHAW DJ, MARSH PD (1999). Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms. *Method Enzymol*, Vol. **310**: 279-296.
- BRANDA SS, VIK A, FRIEDMAN L, KOLTER R (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*, **13**: 20-26.
- BURNETT SL, BEUCHAT LR (2000). Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J Ind Microbiol Biot*, **25**: 281-287.
- CARPENTIER B, CERF O (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Microbiol*, **75**: 499-511.
- CEGELSKI L, PINKNER JS, HAMMER ND, CUSUMANO CK, HUNG CS, CHORELL E, ÅBERG, V, WALKER JN, SEED PC., ALMQVIST F, CHAPMAN MR, HULTGREN, SC (2009). Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature*, **5**: 913-919.
- CHARACKLIS WG (1973). Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res*, **7(9)**: 1249-1258.
- CHAVANT P, GAILLARD-MARTINIE B, TALON R, HÉBRAUD M, BERNARDI T (2007) A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Meth*, **68(3)**: 605-12.
- CHRISTENSEN GD, SIMPSON WA, YOUNGER JJ, BADDOUR LM, BARRETT FF, MELTON DM, BEACHEY DM (1985). Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates; a quantitative model for the adherence *staphylococci* to medical devices. *J. Clin. Microbiol*, **22**: 996-1006.
- COLLINSON SK, EMODY L, MULLER KH, TRUST TJ, KAY WW (1991). Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella* Enteritidis. *J Bacteriol*, **173**: 4773-4781.
- COOK KA, DOBBS TE, HLADY WG, WELLS JG, BARRETT TJ, PUHR ND, LANCETTE GA, BODAGER DW, TOTH BL, GENESE CA, HIGHSMITH AK, PILOT KE, FINELLI L, SWERDLOW D (1998). Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice. *Jama*, **280**: 1504-1509.

- COSTERTON JW, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPINSCOTT HM (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, **49**: 711-745.
- COSTERTON JW (1999). Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob*, Vol. 11; pp. 217-221.
- COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, **284**: 1318-1322.
- CRUMP JA, GRIFFIN PM, ANGULO FJ (2002). Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. *Clin Infect Dis*, **35**: pp. 859-865.
- DANESE PN, PRATT LA, KOLTER R (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol*, **182**: 3593-3596.
- DARWIN KH, MILLER VL (1999). InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, **181**: 4949-4954.
- DARWIN KH, MILLER VL (2001). Type III secretion chaperone-dependent regulation activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J*, **20**: 1850-1862.
- DAVEY ME, O'TOOLE GA (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol R*, **64(4)**: 847-867.
- DEIGHTON MA, BALKAU B (1990). Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *J Clin Microbiol*, **28(11)**: 2442-2447.
- DONLAN RM (2001). A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin Infect Dis*, **33 (8)**: 1387-1392.
- DONLAN RM, COSTERTON JW (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol*, **15**: 167-193

- DOYLE ME, GLASS KA (2010). Sodium Reduction and Its Effect on Food Safety, Food Quality, and Human Health. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **9(1)**: 44-56.
- FORTUNE DR, SUYEMOTO M, ALTIER C (2006). Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun*, **74**: 331-339.
- GIAOURIS E, CHORIANOPOULOS N, NYCHAS GJE (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. *J Food Protect*, **68(10)**: 21492154.
- GILBERT N, LUTZ-PRIGGE S, MORAN JV (2002). Genomic Deletions Created upon LINE-1 Retrotransposition. *Cell*, **10(3)**: 315-325.
- HAMMER BK, BASSLER BL (2003). Quorum sensing controls biofilms formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, **50**: 101-114.
- HELKE DM, WONG ACL (1994). Survival and Growth Characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-N Rubber. *J Food Protect*, **57(11)**: 963-968.
- HEYDON A, NIELSEN AT, HENTZER, M, STERNBERG C, GIVSKOV M, ERSBØLL BK, MOLIN S (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program. *Microbiology*, **146**: 2395-2407.
- ISO 6579 (2002) . General guidance on methods for the detection of *Salmonella*. International organisation for standardization. *4th Ed. Microbiology*.
- ISO 6579 (2012). Microbiology of food and animal feed - horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique (EN ISO/TS 6579-2). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- JACKSON DW, SIMECKA JW, ROMEO T (2002). Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J Bacteriol*, **184**: 3406-3410.
- JOSEPH B, OTTA SK, KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International J Food Microbiol*, **64(3)**: 367-372.

KAUFMAN ME (1998). Pulsed-field gel electrophoresis, *Mol Bacteriol*, 33-50. Totowa.

KUMAR C, ANAND S (1998). Significance of microbial biofilms in the food industry: a review. *Int J Food Microbiol*, **42**: 9-27.

LARSEN P, NIELSEN JL, DUEHOLM MS, WETZEL R, OTZEN D, NIELSEN PH (2007). Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ Microbiol*, **9(12)**: 3077-3090.

LAWHON SD, MAURER R, SUYEMOTO M, CRAIG A (2002). Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol*, **46(5)**: 1451-1464.

LIANOU A, KOUTSOUMANIS KP (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int J Food Microbiol*, **160**: 171-8.

LIN AW, USERA MA, BARRETT TJ, GOLDSBY RA (1996). Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J Clin Microbiol*, **34(4)**: 870-876.

MA L, CONOVER H LU, PARSEK MR, BAYLES K, WOZNICK DJ (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog*, **5**: e1000354.

MARTINO PD, FURSY R, BRET L, SUNFARARAJU B, PHILIPS RS (2003). Indole can act as an extracellular signal regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Can J. Microbiol*, **49**: 443-449.

MATTHYSSE AG, HOLMES KV, GURLITZ RH (1981). Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacteriu tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol*, **145**: 583-595.

MICHAEL B, SMITH JN, SWIFT S, HEFFRON F, AHMER BMM (2001). SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol*, **183**: 5733-5742.

MILLER MB, BASSLER BL (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **55**: 5733-5742.

- MIRANDA AL, CORDEIRO SM, REIS JN, CARDOSO LG, GUIMARÃES AG (2017). Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* spp. isolated from foods and clinical samples in Brazil. *An Acad Bras Cienc*, **15**: 1590-1601.
- MIRELES JR, TOGUCHI A, HARSHEY RM (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol*, **183**: 5848-5854.
- MOLIN S, TOLKER-NIELSEN T (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotech*, **14**(3): 255-261.
- MØRETRØ T, MIDTGAARD ES, NESSE LL, LANGSRUD S (2003). Susceptibility of *Salmonella* isolated from fish feed factories to disinfectants and air-drying at surfaces. *Vet Microbiol*, **94**: 207-217.
- MØRETRØ T, VESTBY LK, NESSE LL, HANNEVIK S, KOTLARZ K, LANGSRUD S (2009). Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *J Appl Microbiol*, **106**: 1005-1012.
- MULLER KH, COLLINSON SK, TRUST TJ, KAY, W.W. 1991. Type-I fimbriae of *Salmonella* Enteritidis. *J Bacteriol*, **173**: 4765-4772.
- PAPADOPOULOS T, PETRIDOU E, ZDRAGAS A, MANDILARA G, VAFEAS G, PASSIOTOU M, VATOPOULOS A (2017). Multiple clones and low antimicrobial resistance rates for *Salmonella enterica* serovar Infantis populations in Greece. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **51**:54-58.
- PARKINS MD, CERIH, STOREY DG (2001). *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol*, **40**: 1215-1226.
- PERNESTIG AK, GEORGELLIS, D, ROMEO T, SUZUKI K, TOMENIUS H, NORMARK S, MELEFORS O (2003). The *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J Bacteriol*, **185**: 843-853.
- POPOFF MY, LE MINOR LE (2005). Genus XXXIII *Salmonella*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, **2**: 764-787.

PRATT LA, SILHAVY TJ (1995). The response regulator SprE controls the stability of RpoS. *PNAS*, **93(6)**: 2488-2492.

PRATT LA, KOLTER R (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*, **30**: 285-293.

PROUTY AM, SCHWESINGER WH, GUNN JS (2002). Biofilm formation and interaction with the surface of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect Immun*, **70**: 2640-2649.

OLSÉN A, JONSSON A, NORMARK S (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, **338**: 652-655.

OLSÉN A, ARNQVIST A, HAMMAR M, SUKUPOLVI S, 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*. *Mol Microbiol*, **7(4)**: 523-536.

RAINEY PB, TRAVISANO M (1998). Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature*, **394**: 69-72.

RAMAGE G, WALLE KV, WICKES BL, LÓPEZ-RIBOT JL (2001). Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agents Ch*, **45(9)**: 2475-2479.

ROMEO T (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol*, **29**: 1321-1330.

ROMLING U, SIERRALTA WD, ERIKSSON K, NORMARK S (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol*, **28(2)**: 249-264.

ROMLING U, ROHDE M (1999). Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level. *FEMS Microbiol Lett*, **180(1)**: 91-102.

- ROMLING U, ROHDE M, OLSÉN A, NORMARK S, REINKÖSTER J (2000). *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol*, **36** (1): 10-23.
- ROMLING U (2001). Genetic and phenotypic analysis of multicellular behavior in *Salmonella typhimurium*. *Meth Enzymol*, **336**: 48-59.
- ROMLING U (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol*, **153**: 205-212.
- ROMLING U (2005). Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Sci*, **62**(11): 12341246.
- SCHEMEISSER C, STOCKIG C, RAASCH C, WINGENDER J, TIMMIS KN, WENDEROTH, DF, FLEMMING, HC, LIESEGANG, H, SCHMITZ RA, JAEGER KE, STREIT R (2003). Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Mbio*, **69**: 7298-7309.
- SCHER K, ROMLING U, YARON S (2005). Effect of Heat, Acidification, and Chlorination on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells in a Biofilm Formed at the Air-Liquid Interface. *Appl Environ Microbiol*, **71**(3): 1163-1168.
- SHIRTLIFF ME, MADER JT, CAMPER AK (2002). Molecular interactions in biofilms. *Chem and Bio*, **9**: 859-871.
- SOLANO C, SESMA B, ALVAREZ M, HUMPHREY TJ, THORNS CJ, GAMAZO C (1998). Discrimination of strains of *Salmonella* Enteritidis with differing levels of virulence by an in vitro glass adherence test. *J Clin Microbiol*, **36**: 674-678.
- SOLANO C, GARCIA B, VALLE J, BERASAIN C, GHIGO J, GAMAZO C, LASA I (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol*, **43**(3): 793-808.
- SPERANZA B, CORBO MR, (2011). Sinigaglia M. Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. *J Food Sci*, **76**: S12-6.
- STARKEY M, GRAY KA, CHANG SI, PARSEK M (2004). The EPS matrix of bacterial biofilms, 174-191. ASM Pres.

- STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ D, DAKIĆ I, SAVIĆ B, ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ M (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J of Microbiol Meth*, **40(2)**: 175-179.
- STOODLEY P, WILSON S, HALL-STOODLEY L, BOYLE JD, LAPPIN-SCOTT HM, COSTERTON JW (2001). Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol*, **67**: 5608-13.
- STOODLEY P, CARGO R, RUPP CJ, WILSON S, KLAPPER I (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotech*, **29**: 361-367.
- SURETTE M.G. AND BASSLER, B.L. (1998). Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci*, **95**: 7046-7050.
- SURETTE MG, MILLER MB BASSLER BL (1999). Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci*, **96**: 1639-1644.
- SUZUKI K, WANG X, WEILBACHER T, PERNESTIG AK, MELEFORS O, GEORGELLIS D, BABITZKE P, ROMEO T (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **184**: 5130-5140.
- TEPLITSKI M, GOODIER RI, AHMER BM (2003). Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in *Salmonella*. *J Bacteriol*, **185**: 7257-7265.
- TEPLITSKI M, AHMER BM (2004). The control of secondary metabolism, motility, and virulence by the two-component regulatory system BarA/SirA of *Salmonella* and other c-proteobacteria. *Global Regulatory Networks in Enteric Bacteria*, 107-133.
- TEPLITSKI M, GOODIER RI, AHMER BM (2006). Catabolite repression of the SirA regulatory cascade in *Salmonella enterica*. *J Med Microbiol*, **296**: pp. 446-466.
- THRELFALL EJ (2005). Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections. *Bacteriology*, 1398-1434.

- TEPLITSKI M, AL-AGELY A, AHMER BMM (2006). Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, **152**: 3411–3423
- TISCHLER AD, CAMILLI A (2004). Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol*, **53**: 857-869.
- UEDA S, KUWABARA Y (2007). Susceptibility of biofilm *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* detergents and sanitizers. *Biocontrol Sci Techn*, **12**: 149-153.
- VESTBY LK, MØRETRØ T, LANGSRUD S, HEIR E, NESSE LL (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Vet Res*, **5(20)**: 1-6.
- WALTERS M, SPERANDIO V (2006). Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol*, **296**: 125-131.
- WATNICK PI, LAURIANO CM, KLOSE KE, CROAL L, KOLTER R (2001). The absence of flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol*, **39**: 223-235.
- WEILBACHER T, SUZUKI K, DUBEY AK (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **48**: 657-670.
- WHISTLER CA., CORBELL NA, SARNIGUET A, REAM W, 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*, **180**: 6635-6641.
- WHITCHURCH CB, TOLKER-NIELSEN, T, RAGAS PC, MATTICK JS (2002). Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science*, **295(5559)**: 1487.
- WHITE AP, GIBSON DL, KIM W, KAY WW, SURETTE MG (2006). Thin agregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *J. Bacteriol*, **188**: pp. 3219- 3227.

WOLFE AJ, CHANG DE, WALKER JD, SEITZ-PARTRIDGE JE, VIDAURRI MD, PRUB BM, HENK MC, LARKIN JC, CONWAY T (2003). Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Mol Microbiol*, **48**: 977-988.

WOODWARD MJ, SOJKA M, SPRIGINGS KA, HUMPHREY TJ (2000). The role of sef 14 and sef17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces. *J Med Microbiol*, **49**: 481-487.

XU H, ZOU Y, LEE H, AHN J 2010. Effect of NaCl on the Biofilm Formation by Foodborne Pathogens. *J Food Sci*, **75(9)**: 580-585.

ZOGAJ X, NIMTZ M, ROHDE M, BOKRANZ W, ROMLING U (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molec Microbiol*, **39(6)**: 1452-1463.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Hafize Dilşad
Soyadı: AÇIKALIN
Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 02/07/1990
Uyruğu: TC
Medeni durumu: Bekar
E-mail adresi: acikalindilsad@gmail.com
Telefon: 05385463880

II- Eğitimi

208-2012 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
2004- 2008 Yahya Kemal Beyatlı Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi
2004-1996 Ziya Gökalp İlköğretim Okulu

Yabancı dili: İngilizce, İtalyanca

III- Ünvanları

Biyolog

IV- Mesleki Deneyimi

09/2011 Università Degli Studi Di Milano Biologia
ERASMUS Bursiyeri
09/2014 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji A.B.D.
TÜBİTAK Proje Bursiyeri

07/2017 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü
TÜBİTAK Proje Bursiyeri

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Derneği

VI- Projeler

Kanatlı Hayvanlardan ve Gıdalardan Salmonella İzlenmesi Ve Kontrol Programları Geliştirilmesi. TÜBİTAK 1003 Öncelikli Alanlar Ar-Ge Destekleme Projesi. Araştırmacı.

Salmonella Infantis Suşlarının Oluşturduğu Biyofilm Üzerine Çevresel Ve Genetik Faktörlerin Etkisinin Araştırılması
Bilimsel Araştırma Projesi. Araştırmacı.

VII- Yayınlar

AÇIKALIN HD, MÜŞTAK HK. Bakteriyel Taksonomi ve Yeni Türlerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler (2016). *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 13/1: 50-57.

VIII- Seminer ve Kongreler

- IX. Ankara Biyoteknoloji Günleri (2007)
- VIII. Ulusal Moleküler Ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (2014)
- XI. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (2014)
- XI. Ankara Biyoteknoloji Günleri (2015)
- Önemli Kanatlı Hastalıkları: Epidemiyoloji Ve Kontrol-1 (2015)
- V. Lösemi Lenfoma Miyelom Hastalıkları Kongresi (2017)
- Önemli Kanatlı Hastalıkları: Epidemiyoloji Ve Kontrol-2 (2017)
- IX. Ulusal Viral Hepatit Sempozyumu (2017)