

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

***Geobacillus kaustophilus*‘ta**
BİYOFİLM OLUŞUMUNA
ÇEVRESEL KOŞULLARIN ETKİSİ

Tuba KORKMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK
ANABİLİM DALI

GEBZE

2012

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

Geobacillus kaustophilus‘ta
BİYOFİLM OLUŞUMUNA
ÇEVRESEL KOŞULLARIN ETKİSİ

Tuba KORKMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK
ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yard. Doç. Dr. Fatma İnci ÖZDEMİR

GEBZE

2012



YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 31.05.2012 tarih ve 2012/20... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 06.07.2012 tarihinde tez savunma sınavı yapılan ...Tuba...Korkmaz... 'ın tez çalışması Melekler...Biyofizik... Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Yrd. Doç. Dr. F. İnci Özdemir

ÜYE

: Doç. Dr. Melek Özkan

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Saliha İşsever Öztürk

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../20... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: *Geobacillus kaustophilus*'ta BİYOFİLM OLUŞUMUNA ÇEVRESEL KOŞULLARIN ETKİSİ

YAZAR ADI: TUBA KORKMAZ

Bacilluslar pek çok çevrede çok yaygın olarak bulunan ve spor oluşturan mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmaların gıda endüstrisi, ısıtma sistemleri, arıtma sistemleri gibi pek çok sistemin önemli kontaminantları oldukları ve bu sistemler içinde biyofilm tabakaları oluşturdıkları bilinmektedir. Bu bakterilerin büyük çoğunluğu hem gıda sektöründe önemli indikatörler olduklarından, hem de pek çok endüstriyel sistemde enerji kaybına sebep olduklarından oluşturdıkları biyofilm yapılarıyla mücadele son derece önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında termofilik bir mikroorganizma olan *Geobacillus kaustophilus*'un polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşumuna çeşitli çevresel faktörlerin etkisi araştırılmıştır. *Geobacillus kaustophilus* polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşturmuş ve en iyi tutunmayı 168. saatte gerçekleştirmiştir. *Geobacillus kaustophilus* biyofilm oluşumu için optimum sıcaklığın optimum büyüme sıcaklığı olan 55°C olduğu tespit edilmiştir. Tutunma ortamına %5 glukoz ya da %3 tuz eklendiğinde biyofilm oluşumunda artış meydana gelmiştir. Glukoz ve NaCl'nin birlikte en etkin olduğu konsantrasyonlar ise sırasıyla %3 ve %1.5'tur. Isı şoku ve UV uygulanan hücrelerde tutunma gözlenmemiştir. SDS ve lizozim gibi hücre duvarını denatüre edici ajanların varlığı vejetatif hücrelerde biyofilm oluşumunu azaltmış/engellemiştir ve lizozim muamelesinin SDS'ye oranla biyofilm oluşumunda daha etkili olduğu saptanmıştır. Vejetatif hücrelerle karşılaştırıldığında *Geobacillus kaustophilus* spor yapıları polistiren yüzeylere daha güçlü tutunma göstermiştir. Spor yapıları lizozim muamelesine direnç gösterirken SDS muamelesi sonucu polistiren yüzeye tutunmada azalma meydana gelmiştir.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: BIOFILM FORMATION BY *Geobacillus kaustophilus* UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS

AUTHOR: TUBA KORKMAZ

The bacilli are a group of spore forming bacteria that are a common flora of multitude of area. These bacteria are important contaminants of the food industry, heating and waste treatment systems and they have found to form biofilm structures in these systems. Because most of these bacteria are both indicators of poor hygiene in food industry and the reason of loss of energy in many industrial systems it is essential to cope with biofilm structures that these bacteria form.

In this thesis, biofilm formation by *Geobacillus kaustophilus* on polystyrene surface under some environmental conditions was studied. *Geobacillus kaustophilus* vegetative cells were found to adhere to polystyrene surface and biofilm formation after 168- hour- incubation was considerably greater when compared to each tested incubation periods. The optimum temperature for biofilm formation by *Geobacillus kaustophilus* was 55°C which is the optimum growth temperature of this bacterium. Addition of 5% of glucose or 3% of NaCl increased biofilm formation. The combined presence of NaCl and glucose enhanced biofilm formation and the optimum concentrations of NaCl and glucose for biofilm formation were 3% and 1% respectively. Heat shock and UV treatments inhibited biofilm formation formed by vegetative cells. Destroying surface layer of vegetative cells by using SDS or lysozyme applied significant reduction/complete inhibition on biofilm formation and the effect of lysozyme on attachment of vegetative cells was greater than effect of SDS. When compared to vegetative cells, *Geobacillus kaustophilus* spores were found to attach polystyrene surfaces more efficiently. Treatment with SDS appeared to be more effective for reducing spore attachment compared with lysozyme treatment.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman desteğini üzerimde hissettiğim, tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadarki süreçte bana değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, anlayışını, sabrını ve güler yüzünü benden hiç esirgemeyen ve değerli bilgi ve görüşleriyle hayatımın her alanında bana yön gösteren, sevgili hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. F. İnci Özdemir’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca her konuyu danışabildiğim, her zaman desteğini ve sonsuz sabrını gördüğüm Arş. Gör. Tuğrul Doruk’a, insani ve ahlaki değerleriyle de örnek edindiğim, manevi desteğinin yanında çalışmalarım da çok büyük emek sahibi olan arkadaşım Veysel Süzerer’e, varlıklarıyla kendimi çok şanslı hissettiğim sadece çalışma ortamımı değil her türlü sıkıntımı ve mutluluğumu paylaştığım arkadaşlarım Şerif Yılmaz, Zişan Asal Kılıç, Zeynep Girgin Ersoy, Aybike Yedekçi, Ceyda Ketenci ve Zeynep Demir’e, ablam gibi gördüğüm, uzak mesafelerden bile olsa varlığını hissettiğim Özlem Asker’e teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca pek çok konuda desteğini gördüğüm arkadaşlarım Gamze Tanrıverdi ve Fulya Dursun’a teşekkür ederim.

Elimin uzandığı her işin, attığım her adımın sonsuz destekçisi ve gizli mimarları olan ailem Fatma Korkmaz, Nevzat Korkmaz ve Selin Korkmaz’a ve arkadaşım Merve Gökçelik’e teşekkür ederim.

Son olarak, manevi varlıklarını yaşadığım süre boyunca hissedeceğim Hatice Korkmaz ve Hidayet Aslantaş’a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyofilm Nedir?	1
1.2. Biyofilmin Yapısı	2
1.2.1. EPS	2
1.2.2. Biyofilm Yapısının Diğer Bileşenleri	4
1.3. Biyofilm Oluşumunun Basamakları	6
1.4. Biyofilm Oluşumunda Hareketliliğin Önemi	7
1.5. Hareketlilik, Spor Oluşumu ve Biyofilm İlişkisi	8
1.6. Biyofilm Yapılarının Önemi	8
1.6.1. Biyofilm Yapılarının Mikroorganizmalara Sağladığı Avantajlar	8
1.6.1.1. Çevresel Faktörlere Direnç	8
1.6.1.2. Besinlerin Depolanması ve Atıkların Uzaklaştırılması	9
1.6.1.3. Fagositozdan ve Antibiyotiklerden Korunma	9
1.6.1.4. Metabolik İşbirliği ve Yeni Genetik Özelliklerin Kazanılması	10
1.6.2. Biyofilmlerin Endüstriyel Önemi	11
1.6.2.1. Yararlı Biyofilm Faaliyetleri	11

Sayfa

1.6.2.2. Zararlı Biyofilm Faaliyetleri	12
1.7. Biyofilm Oluşumu ile Quorum Sensing Haberleşme Sistemi İlişkisi	12
1.8. Termofilik Bacilluslar ve Önemi	14
1.8.1. Termofilik Bacilluslar	14
1.8.2. Termofilik Bacillusların Süt ve Süt Ürünleri Proseslerindeki Önemi	15
1.8.2.1. Termofilik Bacilluslar ve Gıda Bozulmaları	15
1.8.2.2. Termofilik Bacillusların Isıya Dayanıklı Sporları	16
1.8.2.3. Termofilik Bacilluslarda Vejetatif Hücrelerin ve Sporların Oluşturduğu Biyofilmler	17
1.8.3. <i>Geobacillus</i> Cinsinin Özellikleri	18
1.8.3.1. <i>Geobacillus kaustophilus</i>	18
1.9. Tez Çalışmasının Amacı	19
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	20
2.1. Gereçler	20
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	20
2.1.2. Kullanılan Enzimler	20
2.1.3. Kullanılan Cam ve Plastik Gereçler	20
2.1.4. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler	21
2.1.5. Kullanılan Cihazlar	23
2.1.6. Kullanılan Bakteri Soyları	24
2.2. Yöntemler	24
2.2.1. Biyofilm Oluşumunun Derecelendirilmesi	24
2.2.2. Hücre Süspansiyonunun Yoğunluk Tayini	25
2.2.3. Vejetatif Hücrelerde Biyofilm Oluşumuna Hücre Miktarının Etkisi	26

Sayfa

2.2.4. İnkübasyon Süresinin Biyofilm Oluşumuna Etkisi	27
2.2.4.1. Biyofilm Oluşumuna İnkübasyon Süresinin Etkisinin Kristal Viole Yöntemiyle Belirlenmesi	27
2.2.4.2. Biyofilm Oluşumuna İnkübasyon Süresinin Etkisinin Yayma Plaka Yöntemiyle Belirlenmesi	27
2.2.5. Sıcaklığın Biyofilm Oluşumuna Etkisi	28
2.2.6. Glukozun Biyofilm Oluşumuna Etkisi	28
2.2.7. NaCl'nin Biyofilm Oluşumuna Etkisi	28
2.2.8. Glukoz ve NaCl'nin Biyofilm Oluşuma Ortak Etkisi	29
2.2.9. Isı Şoku Uygulamasının Biyofilm Oluşumuna Etkisi	29
2.2.10. UV Uygulamasının Biyofilm Oluşumuna Etkisi	29
2.2.11. Denatüre Edici Ajanların Biyofilm Oluşumuna Etkisi	30
2.2.11.1. Lizozimin Biyofilm Oluşumuna Etkisi	30
2.2.11.2. SDS'nin Biyofilm Oluşumuna Etkisi	30
2.2.12. <i>Geobacillus kaustophilus</i> Sporlarında Biyofilm Oluşumu	31
2.2.12.1. <i>Geobacillus kaustophilus</i> Sporlarının Hazırlanması ve Polistiren Yüzeye Tutunması	31
2.2.12.2. Denatüre Edici Ajanların <i>Geobacillus kaustophilus</i> sporlarının Polistiren Yüzeye Tutunmasına Etkisi	32
2.2.13. İstatistiksel Analizler (Verilerin Değerlendirilmesi)	32
3. BULGULAR	33
3.1. Hücre Süspansiyonu Yoğunluk Tayini	33
3.2. Vejetatif Hücrelerde Hücre Miktarının Biyofilm Oluşumuna Etkisi	34
3.3. İnkübasyon Süresinin Biyofilm Oluşumuna Etkisi	37

Sayfa

3.3.1. İnkübasyon Süresinin Biyofilm Oluşumuna Etkisinin Kristal Viole Yöntemiyle Belirlenmesi	37
3.3.2. İnkübasyon Süresinin Biyofilm Oluşumuna Etkisinin Yayma Plaka Yöntemiyle Belirlenmesi	38
3.4. Sıcaklığın Biyofilm Oluşumuna Etkisi	41
3.5. Glukozun Biyofilm Oluşumuna Etkisi	43
3.6. NaCl'nin Biyofilm Oluşumuna Etkisi	46
3.7. Glukoz ve NaCl'nin Biyofilm Oluşumuna Ortak Etkisi	48
3.8. Isı Şoku Uygulamasının Biyofilm oluşumuna Etkisi	50
3.9. UV Uygulamasının Biyofilm Oluşumuna Etkisi	52
3.10. Denatüre Edici Ajanların Biyofilm Oluşumuna Etkisi	53
3.10.1. Lizozimin Biyofilm Oluşumuna Etkisi	53
3.10.2. SDS'nin Biyofilm Oluşumuna Etkisi	56
3.11. <i>Geobacillus kaustophilus</i> Sporlarının Polisistiren Yüzeye Tutunması	59
3.12. Denatüre Edici Ajanların <i>Geobacillus kaustophilus</i> Sporlarının Polistiren Yüzeye Tutunmasına Etkisi	60
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇLAR	70
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

~	Yaklaşık
AI ₂	Otoindükleyici 2
BAP	Biyofilm İlişkili Proteinler
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
dH ₂ O	Distile Su
FeSO ₄	Demir Klorür
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potasyum Fosfat
L	Litre
LB	Luria Broth
ml	Mililitre
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MnSO ₄	Mangan Sülfat
NA	Nutrient Agar
NaCl	Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄	Sodyum Fosfat
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
OD	Optik Densidite
PBS	Tuzla Doyurulmuş Fosfat Tamponu
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat Tuzu

SRH	S-ribozil Homosistein
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultraviole
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Biyofilm oluşumunda gerekli bileşenler ve dağılımı	4
1.2. <i>Bacillus subtilis</i> 'te EPS ve Tas A varlığında biyofilm oluşumu	5
1.3. Biyoofilmin büyümesi	6
2.1. 96 kuyucuklu doku kültür platelerinde kristal viole boyama yöntemi ile biyofilm oluşumunun belirlenmesi	25
3.1. <i>Geobacillus kaustophilus</i> büyüme eğrisi	32
3.2. İnkübasyon süresi ve hücre miktarına bağlı olarak biyofilm oluşumu	36
3.3. İnkübasyon süresinin biyofilm oluşumuna etkisi	38
3.4. 168. saat inkübasyonun ardından oluşan biyofilm yapısının floresans mikroskopunda 4x objektif büyütme ile görüntülenmesi	40
3.5. 168. saat inkübasyonun ardından oluşan biyofilm yapısının floresans mikroskopunda 10x objektif büyütme ile görüntülenmesi	41
3.6. Sıcaklığa bağlı olarak biyofilm oluşumu	43
3.7. Glukozun biyofilm oluşumuna etkisi	45
3.8. Glukozun <i>Geobacillus kaustophilus</i> 'un büyüme eğrisine etkisi	45
3.9. NaCl'nin biyofilm oluşumuna etkisi	47
3.10. NaCl'nin <i>Geobacillus kaustophilus</i> hücre büyümesine etkisi	48
3.11. Glukoz ve NaCl'nin ortak etkisine bağlı olarak biyofilm oluşumu	50
3.12. Biyofilm oluşumunun ısı şokuna bağlı olarak değişimi	51
3.13. UV'nin biyofilm oluşumuna etkisi	53
3.14. Lizozimin biyofilm oluşumuna etkisi	55
3.15. Lizozimin <i>Geobacillus kaustophilus</i> hücre büyümesine etkisi	55
3.16. SDS'nin biyofilm oluşumuna etkisi	58

Sekil**Sayfa**

3.17. SDS'nin *Geobacillus kaustophilus* hücre büyümesine etkisi

59

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kristal viole ile boyama yönteminden elde edilen OD değerlerine dayanarak oluşan tutunmaların hesaplanması	24
3.1. Hücre miktarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel verileri	35
3.2. Hücre miktarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun derecelendirilmesi	36
3.3. İnkübasyon süresinin biyofilm oluşumuna etkisinin istatistiksel verileri ve biyofilm oluşumunun derecelendirilmesi	37
3.4. Biyofilm oluşumuna inkübasyon süresinin etkisinin yayma plaka yöntemiyle belirlenmesi	39
3.5. Farklı inkübasyon sıcaklıklarına bağlı olarak biyofilm oluşumu	42
3.6. Sıcaklık değişimine bağlı olarak biyofilm oluşumunun derecelendirilmesi	42
3.7. Glukoz miktarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi	44
3.8. Glukoz miktarına bağlı olarak oluşan tutunmanın derecelendirilmesi	44
3.9. NaCl'nin biyofilm oluşumuna etkisinin istatistiksel değişimi	46
3.10. NaCl miktarının değişimine bağlı olarak oluşan biyofilm miktarlarının derecelendirilmesi	47
3.11. Farklı glukoz ve NaCl kombinasyonu derişimlerine bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi	49
3.12. Isı muamelesine bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi	51
3.13. UV muamelesine bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi	52
3.14. Farklı lizozim konsantrasyonlarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi	54
3.15. Farklı SDS konsantrasyonlarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi	57

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.16. Farklı SDS konsantrasyonlarına baēlı olarak biyofilm oluşumunda meydana gelen deēiřimin derecelendirilmesi	58
3.17. <i>Geobacillus kaustophilus</i> sporlarının polistiren yūzeye tutunması	60
3.18. <i>Geobacillus kaustophilus</i> sporlarının polistiren yūzeye tutunmasına lizozim uygulamasının etkisi	61
3.19. <i>Geobacillus kaustophilus</i> sporlarının polistiren yūzeye tutunmasına SDS uygulamasının etkisi	62

1. GİRİŞ

1.1. Biyofilm Nedir?

Biyofilmler bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelimsi bir matriks içinde yaşayan, substrata kaynaşmış ve yüksek oranda fonksiyonlaşmış mikroorganizmaların oluşturduğu mikrobiyal komünitelerdir (Cooksey, 1992). Başka bir deyişle biyofilmler, bakteri, alg, fungus ve protozoaların hücre dışı polimerik yapılar olarak bilinen ve polisakkarit ağırlıklı bir yapıya sahip olan EPS tabakası içinde yaşamını sürdürebildiği ve yaşamlarını tehdit eden pek çok koşula karşı direnç sağlayabildiği dinamik yapılardır (Vu ve ark., 2009). Oluşturulan biyofilm yapıları sayesinde bakteriler yüksek/düşük sıcaklık, yüksek ozmotik basınç, antimikrobiyal maddeler ve toksik bileşikler gibi pek çok çevresel koşul varlığında yaşamını sürdürebilmektedir. Bu özellikleriyle biyofilmler pek çok endüstriyel sistemde ciddi sorunlar meydana getirmekte, antimikrobiyal hastalıkların tedavisini geciktirmekte ya da engellemektedir.

Biyofilm oluşumunu tetikleyen bir takım çevresel koşullara ihtiyaç duyulduğu düşünülmekle birlikte bu çevresel koşullar mikroorganizmadan mikroorganizmaya değişiklik göstermektedir. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa* ve *P. fluorescens* büyüebildiği tüm çevresel koşullarda biyofilm oluşturma yeteneğine sahipken *Escherichia coli*'nin bazı suşları ve *Vibrio cholerae* özgül bazı aminoasitlerden yoksun büyüme ortamında biyofilm oluşumu göstermemektedir. Besin içeriğinin yanında sıcaklık, ozmotik basınç, pH, oksijen miktarı da biyofilm oluşumunu etkileyen çevresel faktörlerin başında gelmektedir (O'Toole ve ark., 2000).

Biyofilm yapılarının bileşenleri incelendiğinde mikroorganizmaların yanında çeşitli organik ve inorganik maddelerin varlığı göze çarpmaktadır. Biyofilm yapılarının en önemli inorganik bileşeni, toplam biyofilm içeriğinin yaklaşık %97'sini oluşturan su olup en önemli organik bileşen ise karbohidratlar başta olmak üzere yağlar, proteinler ve nükleik asitler gibi pek çok organik maddeyi yapısında bulunduran EPS'dir (Vu ve ark., 2009).

1.2. Biyofilmin Yapısı

1.2.1. EPS

Mikrobiyal biyofilmlerin temel yapısal organik bileşeni EPS (hücre dışı polisakkarit)'dir. Biyofilm yapısı içindeki mikroorganizmalar tarafından üretilen ve hücre dışına salınan EPS, polisakkarit ağırlıklı olmak üzere proteinler, nükleik asitler, lipidler ve daha pek çok organik maddenin katılımıyla oluşan polimerik bir yapıdır. EPS, biyofilm yapılarının toplam organik madde içeriğinin yaklaşık %50-90'ını oluşturmaktadır (Cooksey, 1992).

EPS'nin miktarı ve içeriği farklı mikroorganizmalarda, farklı çevre koşullarında hatta biyofilm oluşumunun farklı evrelerinde bile farklılıklar göstermektedir. EPS'nin kimyasal kompozisyonunu etkileyen en önemli faktör bakterinin tutunma yüzeyinin doğasıdır. Örneğin, üronik asit gibi polianyonik polisakkaritlerin varlığı, bu grup canlılardaki EPS'nin anyonik özelliğini arttırarak kalsiyum ve magnezyum iyonları gibi divalent katyonlarla etkileşim sağlamayı ve böylece katyonik yüzeylerde biyofilm yapılarında bağlanma gücünü arttırmayı sağlamaktadır (Sutherland, 2001). Asidik polisakkaritlerin yanında proteinler, nükleik asitler ve lipidler de katyonik yüzeylere tutunmada önem teşkil etmektedir.

Bakterinin tutunduğu yüzeyin iyon yükünün yanında mikroorganizmanın tipinin, biyofilmin oluştuğu çevredeki nitrojen, oksijen, besin miktarı, pH ve sıcaklık gibi çevresel koşulların ve biyofilm evresinin de EPS'nin miktar ve içeriğini etkilediği bilinmektedir. Bu durum biyofilm yapılarının değişken ve dinamik olduklarına kanıt oluşturmaktadır (Mayer ve ark., 1999).

Düşük ve yüksek sıcaklık, yüksek miktarda tuz varlığı gibi pek çok koşulda EPS'nin belli özel konfigürasyonlarda bulunduğu saptanmıştır. Bu özel konfigürasyonların yapısına bakıldığında ise birbirine kaynaşmış heliks yapılarının

varlığına sıklıkla rastlanmıştır. Bu heliks yapılarını oluşturan bağların çeşidinin biyofilm yapılarının esnekliği ya da kararlılığında önemli olduğu düşünülmektedir (Sutherland, 2001). Bunun yanında birden fazla türün birlikte oluşturduğu biyofilm yapılarının çevresel stres koşullarına tek bir tür tarafından oluşturulan biyofilm yapılarına göre daha dayanıklı olduğu *Lactobacillus plantarum* ve *Listeria monocytogenes* üzerinde yapılan çalışmada ortaya konmuştur (Van der Veen ve ark., 2010).

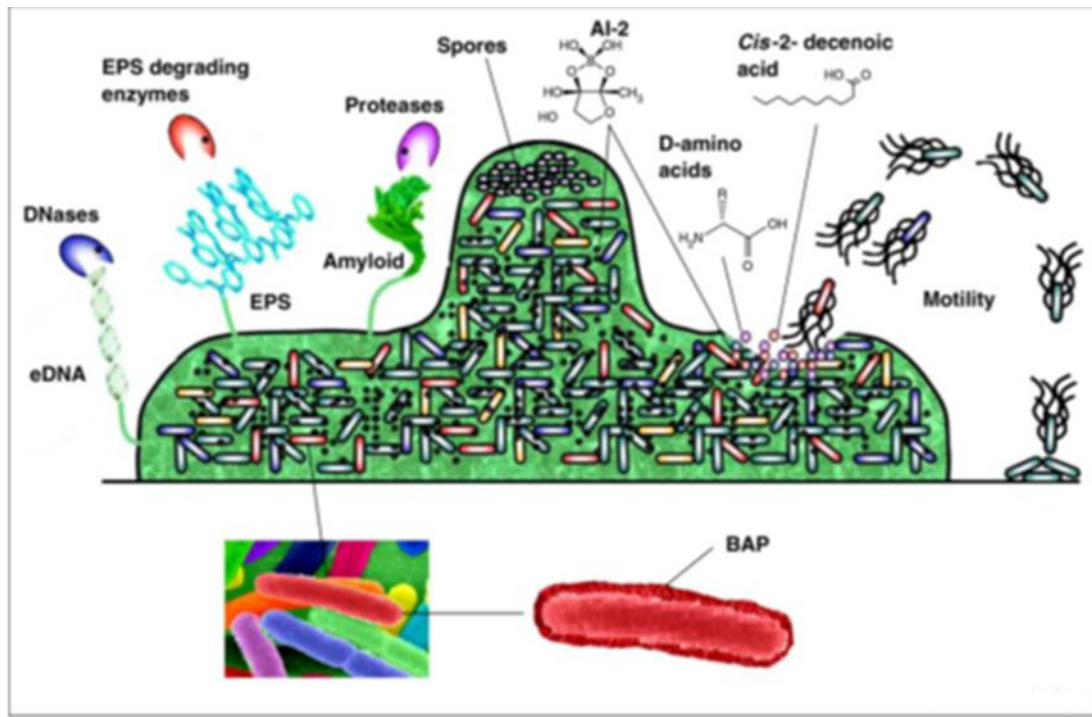
Dünya üzerinde bilinen mikroorganizmaların %99'undan fazlasının EPS ürettiği bilinmektedir. EPS'nin en önemli rolü hücrelerin farklı substratlara başlangıç tutunmasına aracılık etmektir. EPS bundan başka:

- Hücre için gerekli besin maddelerini, iz miktardaki organik molekülleri, iyonları bağlama ve aşırı besinsizlik durumunda bakterilerin kendilerinin ya da biyofilm yapılarındaki diğer türlerin ürettiği EPS tabakasını yıkarak beslenme amacıyla tüketmelerini sağlama (Christensen, 1989),
- Jelimsi fakat yüksek oranda hidratlanmış polisakkarit varlığından dolayı kuraklığa, parçalanmaya, pH dalgalanmalarına, antibiyotikler, biositler, ağır metaller gibi toksik bileşiklerin penetrasyonuna karşı hücreleri fiziksel olarak koruma (Ophir ve Gutnick, 1994),
- Patojenik bazı durumlarda konak canlının makrofajlarının bağlanması ve antikörlerin penetrasyonuna karşı hücreleri koruma (Douglas, 2003),
- Biyofilm yapısında bulunan hücrelerin hücrelerarası boşluklarını doldurarak hücreleri bir arada tutma gibi görevlere sahiptir (Vu ve ark., 2009).

1.2.2. Biyofilm Yapısının Diğer Bileşenleri

Biyofilmler, hücre dışı DNA (eDNA), hücre dışı polisakkaritler, amiloid fiberler, biyofilm ilişkili proteinler (BAP), çeşitli enzimler (DNAazlar, proteazlar, hücre dışı polisakkaritleri yıkan enzimler vb.) gibi pek çok biyopolimer içermektedirler. Biyofilm yapısında bulunan bu sindirim enzimlerinin biyofilmlerin yayılmasında önemli rollerinin olduğu düşünülmektedir.

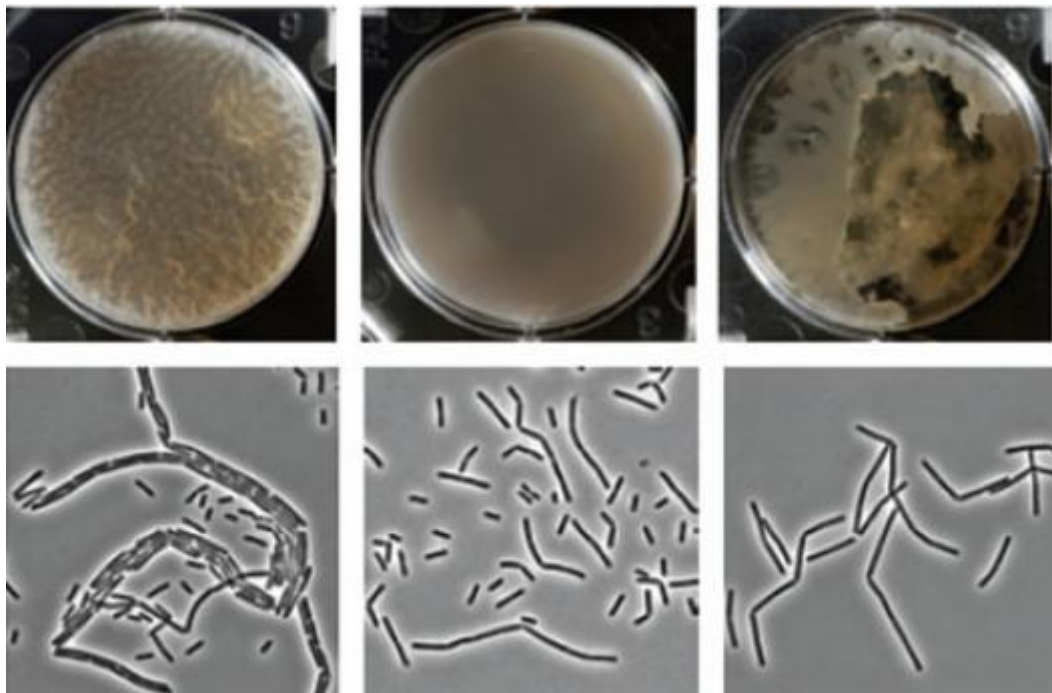
Biyofilm oluşumu ve dağılımı esnasında hücreler arasındaki iletişim quorum sensing sistemi ve otoindükleyici molekül 2 (A1-2), D- amino asitleri gibi moleküller vasıtasıyla ile sağlanmaktadır.



Şekil 1.1. Biyofilm oluşumunda gerekli bileşenler ve dağılımı (Singh ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalar biyofilm yapılarında bulunan bu polisakkarit ve proteinlerin farklı mikroorganizmalarda önemli farklar taşıdığını göstermiştir. Örneğin; hücre dışı polisakkaritlerin ve Tas A adı verilen bir proteinin kodlanmasından sorumlu genlerden yoksun olan *Bacillus subtilis*'te biyofilm oluşumunun gerçekleşmediği

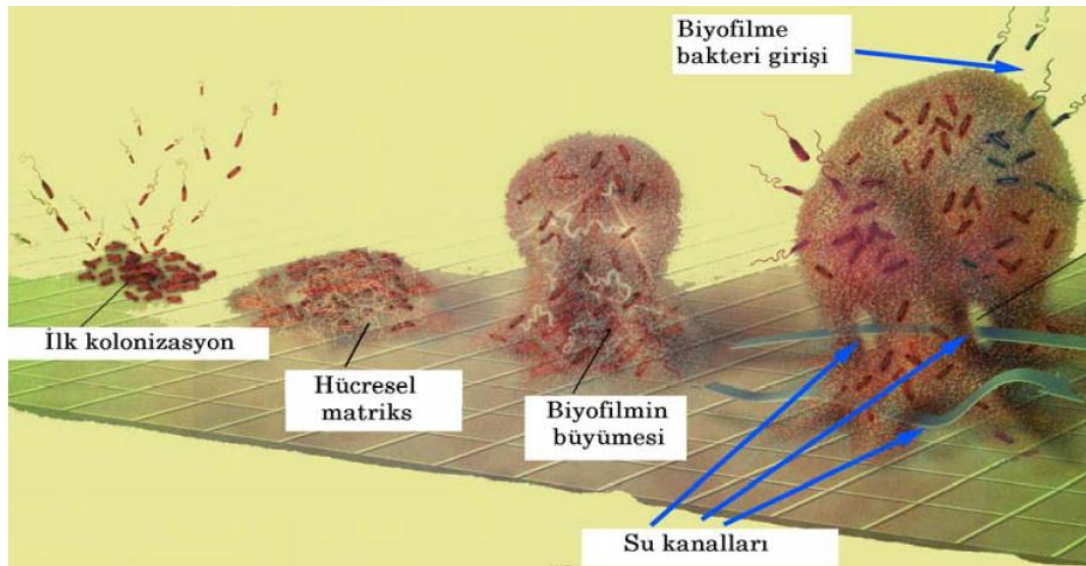
gözlenmiştir. Sadece *tas A* geninden yoksun *Bacillus subtilis*'te de biyofilm oluşumuna rastlanmamıştır. Bu durum *Bacillus subtilis*'te biyofilm oluşumunda Tas A proteinin anahtar bir role sahip olduğunu göstermektedir. Biyofilm oluşturma yeteneği yüksek bir başka bakteri olan *Listeria monocytogenes*'te ise biyofilm yapısının temel protein bileşeninin Bap L olduğu bulunmuştur. Bu örnekler farklı bakterilerde pek çok farklı proteinin var olduğu ve biyofilm oluşumunda esansiyel olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır (Branda ve ark., 2006).



Şekil 1.2. *Bacillus subtilis*'te EPS ve Tas A varlığında biyofilm oluşumu. *Bacillus subtilis*'te sırasıyla EPS ve Tas A sentezinden sorumlu genlerin varlığında, sadece Tas A sentezinden sorumlu genlerin varlığında ve sadece EPS oluşumundan sorumlu genlerin varlığında biyofilm oluşumu (Branda ve ark, 2006).

1.3. Biyofilm Oluşum Basamakları

Biyofilm oluşumu birbirini izleyen fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçlerin bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Biyofilm tabakasının oluşumundaki ilk basamak mikroorganizmanın yüzeye yaklaşmasıdır (Van Loosdrecht ve ark., 1990). Ancak bunun öncesinde yüzeyin yapışmaya uygun bir yapısının olması gerekmektedir. Bu aşamada sudaki cansız partiküller, elementler, organik ve/veya inorganik moleküller yüzeye yapışmakta ve ince bir film tabakası oluşturarak mikrobiyal biyofilm oluşumu için yüzeyi hazır hale getirmektedir. Bu film tabakası tutunma yüzeyinin özelliklerini değiştirerek mikrobiyal tutunmayı kolaylaştırmaktadır (Simoes ve ark., 2010). Tutunma için yüzeye yeterli mesafe sağlandığında (yaklaşık 1 nm) mikroorganizmalar; elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler, hidrojen ve Van der Waals bağlarının kuvveti, asit-baz etkileşimi ve sterik etkileşimler yardımıyla yüzeye temas etmeden özgül olmayan bir şekilde bağlanmaktadır. Primer tutunmanın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimler büyük önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra yüzeyin çeşidi, pH, besin miktarı, su akış hızı, sıcaklık da yüzeye tutunmasında etkili role sahiptir.



Şekil 1.3. Biyofilmin büyümesi (Costerton ve Stewart, 2001)

Primer tutunma dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Primer tutunmanın ardından bazı bakteriler tekrardan planktonik durumlarına geri dönerken bazıları yüzeylere dönüşümsüz olarak tutunmaktadır. Yüzeye dönüşümsüz tutunmada EPS oluşumu önemli bir yer tutmakta ve EPS oluşumuyla primer kolonizasyon tamamlanmaktadır. Sonuçta oluşan yapı mikrokoloni olarak adlandırılmaktadır ve mikrokoloniler biyofilmin en küçük yapı birimidir. Yüzeye dönüşümsüz olarak tutunmuş hücreleri bu yüzeylerden uzaklaştırabilmek için kazıma ve fırçalama gibi işlemler gerekmektedir.

Primer kolonilerin salgılamış olduğu EPS tabakası yeni mikroorganizmalar için tutunma yüzeyi oluşturmakta ve sekonder kolonizasyon gerçekleşmektedir. Böylece biyofilm kuleleri oluşmaktadır. Sekonder koloniler, primer kolonilerin metabolik artıklarıyla beslenmektedirler. Sonuçta farklı türleri barındıran, metabolik olarak birarada yaşamaya uyum sağlamış olgun biyofilm yapısı oluşmaktadır. Mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve atık maddelerin uzaklaştırılmasından sorumlu su kanalları bulunmaktadır. Olgun biyofilmlerin yapısından zamanla kopan mikrokoloniler çeşitli faktörlerin yardımıyla farklı tutunma yüzeylerine taşınmakta ve böylece yeni biyofilm kulelerinin oluşumunu sağlamaktadırlar (Schachter, 2003).

1.4. Biyofilm Oluşumunda Hareketliliğin Önemi

Pek çok bakteri için biyofilm oluşumu ve hücrelerin yüzeye tutunmasında mikroorganizmaların hareketinin önemli bir faktör olduğu bilinmektedir; ancak flajelden yoksun bakterilerde de biyofilm oluşumunun gerçekleştiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Lemon ve ark., 2007).

Biyofilm oluşumunda hareketlilik, mikroorganizmaların başlangıç tutunmasında ve biyofilm yapılarındaki mikroorganizmaların yeni yüzeylere taşınmasında önemlidir. Özellikle statik koşullarda biyofilm oluşumunda flajel çok büyük önem teşkil etmekte ve biyofilm oluşumunu önemli ölçüde etkilemektedir.

Statik olmayan ortamlarda biyofilm oluşumunda ise ortamın akışkan doğasından dolayı flajelin önemini büyük ölçüde yitirdiği gözlenmiştir (Todhanakasem ve ark., 2008).

1.5. Hareketlilik, Spor Oluşumu ve Biyofilm İlişkisi

Hareketlilik, biyofilm oluşumu ve sporulasyon birbirleriyle sıkıca bağlantılı yollar olup global düzenleyicilerle kontrol edilmektedirler. Bu yollar aynı zamanda spatio-temporal (zaman-uzamsal) olup ilk olarak hareketlilikten sorumlu genler ardından hücre dışı polimer sentezinden sorumlu genler ve en son olarak da spor oluşumundan sorumlu genler aktifleştirilmektedir (Vlamakis ve ark., 2008).

Hareketli, matriks oluşturan ve sporulasyon gerçekleştiren hücreler biyofilm içinde farklı yerlerde konumlanmakta ve bu konumlanmada her hücre grubunun yüzdesi biyofilm oluşumunun farklı evrelerinde değişmektedir. Hücre dışı matriks üretemeyen mutant hücrelerin oluşturduğu biyofilmlerde bu yapılaşmanın görülmediği ve sporulasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. Bu durum sporulasyonun biyofilm oluşumunun bir parçası olduğu ve mikrobiyal komünite oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermektedir (Van der Veen ve ark., 2010).

1.6. Biyofilm Yapılarının Önemi

1.6.1. Biyofilm Yapılarının Mikroorganizmalara Sağladığı Avantajlar

1.6.1.1. Çevresel Faktörlere Direnç

Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan

korumaktadır. Ayrıca, sıcaklık, osmolarite, demir ve oksijen varlığı gibi diğer çevresel faktörler de biyofilm oluşumu üzerinde rol oynamaktadırlar (Post ve ark., 2007).

1.6.1.2. Besinlerin Depolanması ve Atıkların Uzaklaştırılması

Biyofilm içerisindeki mikrokolonileri çevreleyen alanlardan geçen, yüksek geçirgenliğe sahip ve dolaşım sistemine benzeyen su kanalları bulunmaktadır. Bu sistem hem besinlerin biyofilm içerisinde eşit bir şekilde dağıtılması, hem de potansiyel olarak toksik metabolitlerin uzaklaştırılması görevini üstlenmektedir (Post ve ark., 2007).

1.6.1.3. Fagositozdan ve Antibiyotiklerden Korunma

Bakterilerin kümeler halinde ve hücre dışı matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşmekte ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmektedir. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekzopolisakkaritler savunmada önemli rol oynayan moleküller olup biyofilm yapılarındaki hücreleri bağışıklık sistemine ait hücrelerin fagositozundan korumaktadırlar. Biyofilm oluşturmuş organizmalar oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençli olup biyofilmlerin bakteriyal enfeksiyonlara kronik özellik kazandıran önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (Donlan ve Costerton, 2002).

Biyofilm yapılarına katılan mikroorganizmalar yaşadıkları çevrelerde bulunan antimikrobiyal maddelerin etkisinden planktonik mikroorganizmalara göre daha fazla korunabilmektedirler. Bu durum biyofilm matriksi içerisindeki polimerik maddelerin antibiyotik difüzyonunu güçleştirilmesi ve antimikrobiyal maddelerin biyofilmin tüm tabakaları boyunca penetre olamaması sonucu mikroorganizmalara ulaşamamasından kaynaklanmaktadır.

EPS'nin antimikrobiyal maddelere karşı koruyucu etkisinin yanında biyofilm içerisindeki bakteriler arasında direnç genlerinin aktarılma frekansının yüksek olması da biyofilm yapılarının antimikrobiyal maddelere karşı koruyucu etkisini arttırmaktadır. Ayrıca biyofilm yapısı içindeki mikroorganizmalar planktonik mikroorganizmalara oranla daha yavaş bir büyüme göstermekte ve bu nedenle antimikrobiyal maddelerden daha az etkilenmektedirler (Donlan ve Costerton, 2002).

1.6.1.4. Metabolik İşbirliği ve Yeni Genetik Özelliklerin Kazanılması

Bakteriler bulundukları ortamın doğasına göre fenotipik özelliklerini değiştirebilmekte, uygun koşullar sağlandığında biyofilm oluşturdıkları gibi değişen ortam koşullarına bağlı olarak hızla planktonik hale de geçebilmektedirler. Bu durum ortama uygun olarak ifade ettikleri genler aracılığı ile sağlanmaktadır. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve ortak fenotipik değişiklikler sergilemeleri metabolik işbirliğinin en önemli göstergesi olup biyofilm içindeki hücreler arasındaki bu metabolik etkileşim Quorum Sensing mekanizmasıyla sağlanmaktadır (Davey ve O'toole, 2000).

Yatay gen transferi mikroorganizmaların evrimi ve genetik çeşitliliğinin sağlanmasında gerekli olup özellikle çoklu ilaç dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında büyük önem taşımaktadır. Biyofilm yapısı, mikroorganizmalara "izole" bir ortam sağladığından konjugasyonun kolaylıkla yapılabilmesine imkan vermekte ve genetik materyalin hücrelerarası transferini gerçekleştirmeyi kolaylaştırmaktadır (Roberts ve ark., 1999).

1.6.2. Biyofilmlerin Endüstriyel Önemi

1.6.2.1. Yararlı biyofilm faaliyetleri

Mikroorganizmalarca oluşturulan biyofilm yapılarının endüstride ve tıpta pek çok yararlı faaliyeti bulunmaktadır. Bu amaçla biyoteknolojik bazı reaktörler biyofilm üretimini arttırıcı bir biçimde tasarlanmakta ve endüstriyel atıklar, kontamine yeraltı suları gibi çevresel atıkların kontrolü başta olmak üzere pek çok alanda mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneklerinden faydalanılmaktadır.

- Biyofilm matriksi oluşturan mikrobiyal EPS'ler saflaştırıldıktan sonra ilaçlar, gıda katkıları, kozmetikler veya temizlik ürünleri için kimyasal katkı maddeleri olarak kullanılabilirler. Özellikle patojenik biyofilmlerin EPS içeriği antijenik özelliğe sahiptir ve saflaştırılarak neden oldukları enfeksiyonlara karşı aşı olarak faydalanılabilmektedirler.
- Biyoliçing, mikroorganizmalar yardımıyla maden cevherlerinden metallerin geri kazanılması işlemidir. Biyoliçing olayında metallerin geri kazanımı amacıyla biyofilmlerden yararlanılmaktadır.
- Bazı tarımsal bitkilerin köklerine tutunmuş biyofilmler bitkilere besin sağlama yoluyla zirai üretimin artmasına yardımcı olmaktadır (Hall Stoodley ve ark., 2004).

1.6.2.2. Zararlı biyofilm faaliyetleri

Biyofilmlerin yararlı faaliyetlerinin yanında pek çok zararlı faaliyeti de bilinmektedir:

- EPS üreten mikroorganizmalar; birçok su temaslı yüzey, insan dokusuna yerleştirilen medikal araç-gereç, ekipman ve protez üzerinde biyofilm oluşturmakta ve dezenfektanların hedef patojenlere ulaşmasını güçleştirmektedir (Donlan, 2002). Bunun yanı sıra oluşturulan bu biyofilmlerden kopan parçalar vücudun diğer bölgelerine yayılmada rol oynayabilmektedir. Biyofilmler konakçı immun sisteme karşı direnci de sağlamaktadırlar. Bütün mikrobiyal kaynaklı enfeksiyonların %60'ından fazlasının biyofilm kaynaklı olması dikkat çekmektedir (Donlan, 2002).
- İnsanlarda mikrobiyal enfeksiyonlar yanında biyofilmler birçok endüstriyel üretimde ürün kontaminasyonu ve bozulmasına, ekipman hasarı ve üretimde düşümlere, artan enerji giderlerinden dolayı maddi kayıplara yol açmaktadırlar (Elhariry, 2008).

1.7. Biyofilm Oluşumu ile Quorum Sensing Haberleşme Sistemi İlişkisi

Bakterilerin izole varlıklar olarak yaşamadıkları, değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası haberleşme sistemleri kullanan topluluklar halinde bulundukları bilinmektedir. Bakteriler arasındaki bu haberleşme sistemi Quorum Sensing (QS) olarak adlandırılmakta ve değişik bakteri türlerinde bioluminesens, antibiyotik biyosentezi, konjugasyon ve hayvan, bitki ve balık patojenleri tarafından oluşturulan virulens faktörlerinin üretimi gibi çeşitli fizyolojik işlemler bu haberleşme sistemiyle kontrol edilmektedir. Bu sistemle kontrol edilen biyolojik süreçlerden biri de biyofilm oluşumudur (Christopher ve Bonnie, 2005).

Quorum Sensing mekanizması genel olarak hücre dışı işaretleşmeler yolu ile çalışmaktadır (Morikawa, 2006). Bakteriler bu işaretleri yerel yoğunluklarını değerlendirmek amacı ile kullanmakta ve bu işaretler yeterli yoğunluğa ulaştığında düzenleyici bir geri bildirim mekanizması kullanılarak hücre nüfusundaki fenotiplerin ifadesinde hızlı bir artış meydana gelmektedir (Labbate ve ark., 2004). Quorum Sensing haberleşme sisteminde bakteriler hücre yoğunluğuna bağlı olarak otoindükleyici veya feromon olarak adlandırılan küçük sinyal molekülleri ile bulundukları mikroçevreyi taramakta, bu moleküllerden gelen yanıtlara göre cevap oluşturmakta ve bu tür etkileşimlerin sonucunda da bir grup hedef genin düzenlenmesini sağlamaktadırlar (Christopher ve Bonnie, 2005). Otoindükleyicilerin ortamdaki konsantrasyonları yeterli seviyeye ulaştığında bakteriler bu sinyalleri algılayarak bunları belirli hedef genlerin aktivasyonunda ya da baskılanmasında kullanılmaktadırlar. Türe özgü olan bu sinyaller ile bakterinin diğer bakteri hücreleri tarafından tanınabildiği gösterilmiştir. Hücre dışı sinyallerin EPS üretimi ile biyofilm oluşumu ve devamlılığı için önemli olduğu kabul görmektedir (Labbate ve ark., 2004). EPS'nin lifli ve gözenekli yapısı, düşük molekül ağırlıklı hücre sinyal moleküllerinin hücreler arası geçişine izin vermekte ve hücreler arası etkileşimleri arttırarak hücreleri birarada tutma özelliğinden dolayı hücre sinyal moleküllerinin etki derecesini arttırabilmektedir.

Biyofilm oluşumunda görev aldığı bilinen önemli Quorum Sensing mekanizması örnekleri mevcut olup bunlardan en bilineni otoindükleyici 2 (AI 2) sentezinde görev alan ve *luxS* geni tarafından kodlanan Lux S enzime ihtiyaç duymaktadır (Hardie ve Heurlier, 2008). *In vivo* ortamda sentezlenen Lux S enziminin biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilediği; ancak *in vitro* sentezlenen AI 2'nin bulunduğu ortamda oluşturulan biyofilmin yaban tipte aynı seviyeye ulaşmadığı gözlenmiştir (Challan ve ark., 2006). Bununla birlikte ortama AI 2 yol izinin öncül maddelerinden biri olan SRH (S-ribozil homosistein)'nin eklenmesinin biyofilm oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir. *Bacillus cereus*'ta *in vitro* sentezlenen AI 2'nin eklenmesinin biyofilm oluşumunu engellediği ve olgun biyofilm yapılarındaki hücrelerin planktonik duruma geçtikleri gözlenmiştir (Auger ve ark., 2006). *Bacillus subtilis*'te AI 2 üretiminin Lux S enziminin aktivitesinin yanında biyofilm düzenleyicilerinden Spo0A ve SinR tarafından da düzenlendiği bilinmektedir.

Biyofilm oluşumunda rolü olan bir diğer iletişim molekülü de *Bacillus subtilis*'te tanımlanan D- aminoasitlerdir. D- aminoasit komplekslerinin (D-lösin, D-metionin, D-tirozin, D-triptofan) biyofilm oluşumundan önce ortama eklenmesinin işlevsel matriks oluşumunu engellediği gösterilmiştir. D- aminoasitlerin bu işlevi Tas A proteini ile hücre duvarı arasındaki bağlantıyı yqxM proteini vasıtasıyla değiştirme yoluyla gerçekleştirdiği bulunmuştur. YqxM proteininin C terminali yakınlarında bir domainin hücre duvarındaki D- aminoasitlerin varlığına cevap olarak Tas A proteininin salınımını tetiklediği düşünülmektedir. D- aminoasitlerin *S. aureus*'ta biyofilm oluşumunu benzer biçimde etkilemesi, D- aminoasitlerinin üretiminin biyofilm yapılarının oluşumunu engelleyen veya oluşan yapıları bozan genel bir sinyal mekanizması olduğu düşüncesini güçlendirmektedir (Van der Veen ve ark., 2010).

Bunun yanında mikroorganizmalarda biyofilm oluşum mekanizmasında birden fazla Quorum Sensing mekanizmasının rol aldığı bulunmuştur. *V. cholerae*'da biyofilm oluşumunun genetik düzenlemesine bakıldığında en az üç farklı metabolik yolağın varlığı keşfedilmiştir. Metabolik yollara, organizmanın tutunma yüzeyinin çeşidine göre karar verildiği düşünülmektedir (O'Toole ve ark., 2000).

1.8. Termofilik Bacilluslar ve Önemi

1.8.1. Termofilik Bacilluslar

Termofilik bacillusların süt ve süt ürünleri endüstrisi, şeker endüstrisi, içecek pastörizasyonu, jelatin üretimi gibi pek çok endüstriyel sistemin önemli kontaminantları olduğu bilinmektedir (Chen ve ark., 2006, Scott ve ark., 2007). Süt ve süt ürünlerinden izole edilen termofilik bakteriler incelendiğinde izolatların sıcaklık isteklerine göre zorunlu termofiller ve fakültatif termofiller olmak üzere iki gruba ayrıldıkları gözlenmiştir. Zorunlu termofiller sadece 37-75°C sıcaklık aralığında büyüebilmektedirler ve *Anoxybacillus flavithermus* ve *Geobacillus spp.* bu gruba örnektir (Ronimus ve ark., 2003). Fakültatif termofiller ise *Bacillus*

genusuna ait olup suşlara bağlı olarak mezofilik ya da termofilik olarak büyüebilmektedirler. Bu grubun süt ve süt ürünlerinden izole edilen bazı örnekleri *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans* ve *Bacillus subtilis*'tir (Scheldeman ve ark., 2005).

Termofilik bacilluslar özel beslenme istekleri (özellik aminoasitler) olmaksızın Triptik soy agar gibi temel büyüme ortamlarında büyüme yeteneğine sahip bakterilerdir (Nazina ve ark., 2001, Scheldeman ve ark., 2005).

1.8.2. Termofilik Bacillusların Süt ve Süt Ürünleri Proseslerindeki Önemi

Süt ve süt ürünleri işletmeciliğinde termofilik bacilluslar hijyen belirtici olarak kullanılmaktadırlar. Bu suşlar, hem sıcaklığa dayanıklı endosporlara sahip olmaları hem de biyofilm oluşturma yetenekleri nedeniyle özellikle gıda endüstrisinde büyük önem teşkil etmektedirler. Bunun yanında ürettikleri enzimler ve asitler nedeniyle gıda bozulmalarına ve son üründe istenmeyen tatların oluşumuna neden olmaktadır.

1.8.2.1. Termofilik Bacilluslar ve Gıda Bozulmaları

Termofilik bacilluslar proteinazlar ve lipazlar gibi ısıya dayanıklı enzimleri sayesinde asitler başta olmak üzere pek çok ürün oluşturma yeteneğine sahiptirler. Oluşturmuş oldukları bu ürünler gıda bozulmaları ve gıdalarda istenmeyen tat oluşumlarına neden olmaktadır (Chen ve ark., 2004). Zorunlu termofillerin büyüme sıcaklıklarından dolayı gıda sistemlerini tehdit edecek önemli kontaminantlar olmadıkları düşünülse de *Geobacillus* türlerinin özellikle metal ambalajlarla paketlenmiş gıdalarda flat sour bozunma (düz ekşime) ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Kalogridou-Vassiliadou, 1992).

1.8.2.2. Termofilik Bacillusların Isıya Dayanıklı Sporları

Sporulasyon, termofilik bacilluslar gibi belli grup bakterilerin büyüme döngülerinin önemli bir parçasıdır. Spor oluşum mekanizmasının çeşitli stres koşulları tarafından uyarıldığı bilinmektedir. Gıda sistemlerinin kontaminantları olan bakterilerce oluşturulan bu sporlar da vejetatif hücreler gibi ürün kalitesini etkilemektedir (Burgess ve ark., 2010).

Sporlar, protoplazma olarak da adlandırılan, nüklear materyali barındıran ve etrafı bir membranla çevrili bir kor bölgesi ile kor bölgesinin etrafını saran peptidoglikan yapıli korteks tabakasından oluşmaktadır. Korteks yapısı ise farklı türlerde farklı sayı ve yapılar da bulunan spora özgü proteinlerden oluşan spor kılıfıyla çevrilmektedir. Sporların çoğunluğu bir iç ve bir dış olmak üzere iki spor kılıfı bulundurmaktadır. *Geobacillus* türleri ve bazı *Bacillus* türleri, spor kılıfının üstünde “ekzospor “ adı verilen bir tabaka daha taşımaktadır (Ellar, 1966). Ekzospor tabakası kalın, protein yapıli bir tabakadır. Türler arasındaki spor farklılıklarının temelini spor kılıflarının yapısı ve sayısı belirlerken korteks ve kor yapısı tüm türlerde çok benzemektedir (Ankolekar ve ark., 2010).

Endüstriyel sistemlerde termofilik bakterilerin spor oluşumunu indükleyen faktörlerle ilgili bilinenler sınırlı olmakla birlikte magnezyum, kalsiyum, potasyum gibi minerallerin spor oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir. Spor protoplazmasında kalsiyum iyonları başta olmak üzere pek çok iyon depo edilmektedir ve bu iyonlar olgun biyofilm oluşumunda önem taşımaktadır. Ayrıca bu iyonların spor oluşum sürecinin aktivasyonunda gerekli olduğu bilinmektedir (Ellar, 1966). Kalsiyumun ayrıca sporulasyon sürecinde görev alan genlerin ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (Burgess ve ark., 2010).

Mineral tuzları süt ve süt ürünleri işletmeciliği başta olmak üzere pek çok sistemde yüksek miktarlarda bulunduğundan bu sistemlerde termofilik bakterilerin spor oluşumu uyarılabilmektedir. Bu durum *Geobacillus*'ta spor oluşumunun laboratuvar ortamında ve mineral tuzlarının varlığında çalışılmasıyla gözlenmiştir.

Geobacillus izolatlarının TSB temelli bir büyüme ortamında ve CaCl_2 , MnSO_4 , FeSO_4 , MgCl_2 gibi mineral tuzlarının varlığında 12-18 saat içinde sporulasyon gerçekleştirebildiği gösterilmiştir. Özellikle mangan tuzları sporulasyondan sorumlu enzimlerin kofaktörü olduğundan, kalsiyum iyonları ise ısıya karşı koruma sağladığından sporulasyonda önem taşımaktadır (Seale ve ark., 2008).

1.8.2.3. Termofilik Bacilluslarda Vejetatif Hücrelerin ve Sporların Oluşturduğu Biyofilmler

Geobacillus, *Anoxybacillus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* ve *B. pumilus* gibi pek çok termofilik *Bacillus* türü çeşitli endüstriyel sistem yüzeylerine tutunabilmektedir. Termofilik bacilluslarda biyofilm oluşumunun hem vejetatif hücreler hem de sporlarca yüzeylere tutunmayla başlatıldığı bilinmektedir. Parkar ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda bacilluslarda sporların vejetatif hücrelere oranla daha fazla tutunma eğilimine sahip olduğunu göstermiştir (Parkar ve ark., 2001).

Geobacillus spor yapıları ekzospor yapılarına sahiptirler. Ekzospordan yoksun *Geobacillus* spor yapılarının tutunma miktarının azaldığı; ancak dış kılıf yapısından yoksun sporlarının tutunmasında bir değişiklik gözlenmediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Parkar ve ark., 2003). Termofilik bacilluslarda tutunmayı etkileyen bir diğer faktör de sporun hidrofobisitesidir. Protein yapılı kılıf tabakaları sporlara yüksek bir hidrofobisite kazandırmakta ve sporların özellikle hidrofilik yüzeylerle etkileşime girerek bu yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır (Seale ve ark., 2008).

1.8.3. *Geobacillus* Cinsinin Özellikleri

Geobacillus cinsi bakteriler; Gram (+), çubuk şekilli, tek ya da zincirler halinde bulunabilen hareketli ve spor oluşturabilen bakterilerdir. Sporları terminal ya da subterminal olarak konumlanmaktadır. Peritrik flajellere sahiptirler. Obligat termofilik olup sıcaklık gereksinimleri 37-75°C arasında değişmektedir. Optimum büyüme sıcaklıkları 55-65°C, büyüebildikleri optimum pH aralığı 6.2-7.5'tir. Kemoorganotrofik mikroorganizmalar olup aerobik ya da fakültatif anaerobik olarak büyümektedirler. G-C içerikleri 48.2-58 mol%'dür. TSB ve NA ortamlarında iyi büyüebildikleri gözlenmiştir (Zeigler, 2001).

1.8.3.1. *Geobacillus kaustophilus*

Geobacillus kaustophilus (HTA426) tür adı kausto (sıcaklık) + philus (seven) sözcüklerinden oluşmaktadır. Genel olarak pastörize sütlerden izole edilmiş olan, zorunlu termofilik, aerobik ya da fakültatif anaerobik, endospor oluşturan, flagellalı, çubuk şeklinde gram pozitif bir bakteridir (Takami ve ark., 2004). Bakterinin genel yaşam alanı sulu ortamlardır fakat petrol rezervlerinde ya da toprakta yaşayabilen soylarının da olduğu bilinmektedir. Fenotipik benzerliklerinden dolayı, daha önceleri *Bacillus stearothermophilus* olarak tanımlanmış, 16S rRNA çalışmaları sonucu sistematikteki yeni yerini almıştır. Optimal büyüme sıcaklığı 55-60°C olan *Geobacillus kaustophilus*'un genel büyüme aralığı 37-74°C'tir. *G. kaustophilus* pH 2-12 aralığında yaşayabilmektedir; ancak büyüebildiği en uygun pH aralığı 6-7.5'tur. Bakteri aynı zamanda %0-2 tuzlulukta yaşam koşullarına dayanabilmektedir (Priest ve ark., 1993). Kolonileri konveks ve şeffaftır. Hücreleri hareketsiz, 1.5 µm × 3.5 µm boyutlarında, ovalden silindire sporlar oluşturan bakterilerdir. GC içeriği %51-55'tir. *G. kaustophilus*'ta protamin, spermin sentetaz ve tRNA metiltransferaz proteinleri kodlanmaktadır ve bu proteinlerin DNA'nın daha sıkı ve kararlı olmasında ve bakterinin yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmasında görev yaptıkları düşünülmektedir (Takami ve ark., 2004).

1.9. Tez Çalışmasının Amacı

Termofilik bacilluslar, gıda üretim tesislerinden su dağıtım şebekelerine, ısıtma sistemlerine kadar pek çok ortamda yaşamını sürdürebilen ve oluşturdukları biyofilm yapıları sayesinde dezenfektan, antimikrobiyal maddeler, sıcaklık, pH gibi varlıklarını tehdit eden pek çok koşulla başa çıkabilen mikroorganizmalardır. Gerek gıda üretim sistemleri ve su arıtım sistemlerine karışarak insan sağlığını tehdit etmeleri, gerekse ısıtma sistemlerinde olduğu gibi enerji kaybına neden olmaları bu biyolojik yapılarla mücadeleyi gerektirmektedir. Termofilik bacillusların oluşturdukları spor yapıları sayesinde dezenfeksiyon işlemlerine dirençli hale gelmeleri bu yapılarla mücadeleyi daha da gerekli kılmaktadır. Bu amaçla, *Geobacillus kaustophilus* vejetatif ve spor yapılarında biyofilm oluşumunu etkileyen çeşitli çevresel faktörlerin biyofilm oluşumu üzerindeki rollerinin anlaşılması biyofilm yapılarının kontrolüne dair yarar sağlayacaktır.

Tez çalışmasında termofilik bir bacillus olan *Geobacillus kaustophilus* kullanılmıştır. *Geobacillus kaustophilus* termofilik bir bakteri olduğundan ve gerek hücre yüzey proteinleri gerekse hücre yüzey polisakkaritleri mezofilik bakterilere göre farklılıklar gösterdiğinden farklı çevresel koşullara vereceği cevapların mezofilik bakterilere göre farklı olması beklenmektedir. Bu nedenle bu çalışmada *Geobacillus kaustophilus*'un kullanılması farklı bulgulara ulaşılmasına imkan vermesi açısından önem teşkil etmektedir. Bunun yanında, patojen mikroorganizmalarla çalışma birtakım sorunları ve riskleri de beraberinde getirdiğinden, patojen olmayan bu mikroorganizmada biyofilmle mücadelenin çalışılması ve patojen mikroorganizmalar için bu hücrenin önemli bir model oluşturması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Asetik Asit	: Merck
Metanol	: Merck
Sodyum Hidroksit	: Merck
Hidroklorik Asit	: Merck
Bakto Tripton	: BD
Bakto Maya Özütü	: BD
Agar	: Fluka
Sodyum Fosfat	: Riedel de Haen
Mangan Sülfat	: Merck
Glukoz	: Sigma
Sodyum Dodesil Sülfat	: Merck
Kristal Viole	: Merck
Tryptic Soy Broth (TSB)	: Merck

2.1.2. Kullanılan Enzimler

Lizozim (Roche)

2.1.3. Kullanılan Cam ve Plastik Gereçler

96 Kuyucuklu Polistiren Plateler (TPP)
24 Kuyucuklu Polistiren Plateler (TPP)
2 mm çaplı cam boncuklar (RitterChemie)

2.1.4. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

Kullanılan tüm solüsyon, besiyeri ve çözeltiler 121°C’de 20 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmek suretiyle hazırlanmıştır.

Luria Broth (1 L, pH 7.5)

Trypton.....	10 g
Maya Özütü.....	5 g
NaCl.....	10 g

Tryptic Soy Broth (1L, pH7.3)

Kazeinden elde edilmiş pepton.....	17 g
Soyadan elde edilmiş pepton.....	3 g
Glukoz	2,5 g
NaCl.....	5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g

Nutrient Broth (1L, pH 7.2)

Beef Ekstratı.....	3g
Pepton	5g
Distile su.....	1000ml

Asetik Asit Çözeltisi (1 L)

%100’lük asetik asit.....	330 ml
Distile su	670 ml

Kristal Viole Çözeltisi

%100'lük kristal viole çözeltisi.....10 ml
Distile su 990 ml

PBS Tamponu (pH 7.2, 1 L 1X)

NaCl.....8 g
KCl.....0.2 g
Na₂HPO₄.....1.44 g
KH₂PO₄.....0.24 g

MnSO₄ Çözeltisi (1L)

MnSO₄.....0.01 g
Distile su.....1000 ml

Lizozim (1 mL, %1)

Lizozim.....1 g
Distile su 1 ml

SDS Çözeltisi (1L, %10)

SDS.....10g
Distile su 1000ml

Glukoz Çözeltisi (1L, %10)

Glukoz.....100g
Distile su.....1000ml

NaCl Çözeltisi (1L,%10)

NaCl.....100g
Distile su.....1000ml

2.1.5. Kullanılan Cihazlar

+4°C ve -20 °C Buzdolabı	Arçelik
-80 °C derin dondurucu	Thermo, Forma -86 °C ULT Freezer
Steril Kabin	Heraeus, HP48
Masa Üstü Santrifüj	Heraeus, Labofuge 400R
Masa Üstü Santrifüj	Beckman Coulter, Microfuge 22R
Spektrofotometre	Bio-Rad, Smartspec 3000
Otoklav	HIRAYAMA, HICLA HVE-50
pH metre	Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter
Su Banyosu	TECHNE, TE-10A Tempette
Buz Makinesi	BAR-LINE BF85
UV Spektrofotometre	Beckman Coulter DU 530
Mikrodalga Fırın	Kumtel
İnkübatör	Hereus TipB6
Floresans Mikroskobu	Nikon Eclipse Ti-S

2.1.6. Kullanılan Bakteri Soyları

Genom projesi yakın bir zamanda tamamlanan *G. kaustophilus* türü, The Bacillus Genetic Stock Center, Department of Biochemistry, The Ohio State University'den temin edilmiştir. *G. kaustophilus* hücreleri, nutrient agar besiyerine ekilerek 55°C'ta gece boyu büyütülmüş ve hücrelerin bulunduğu plateler ayda bir pasajlanarak +4°C'ta saklanmıştır. Ayrıca hücre stokları, %20 gliserol içeren Nutrient Broth besiyerinde -80°C'ta saklanmıştır.

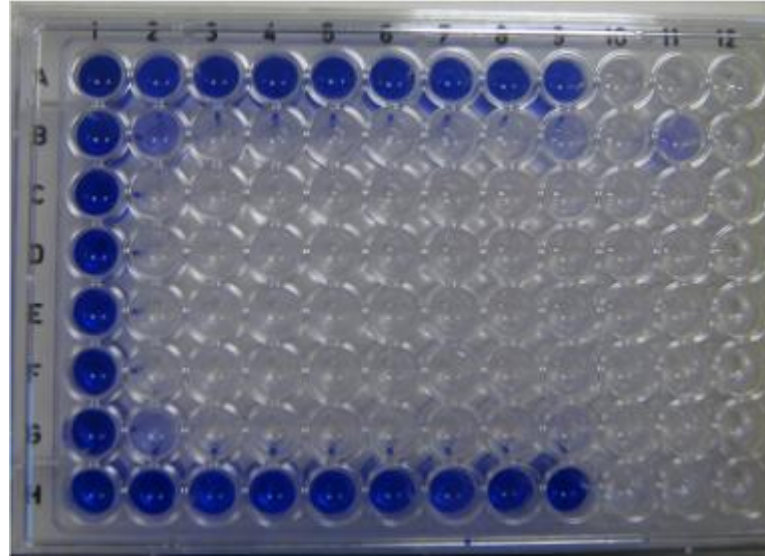
2.2. Yöntemler

2.2.1. Biyofilm Oluşumunun Derecelendirilmesi

Spektrofotometrik ölçümler sonucunda biyofilm oluşumu ve biyofilm oluşum derecesi Bose ve arkadaşlarının çalışması referans alınarak belirlenmiştir (Bose ve ark., 2009). Buna göre 570 nm'de yapılan absorbans ölçümleri sonucunda 0.120'nin altında değer alınan kuyucuklar, tutunmanın olmadığı kuyucuklar olarak belirlenmiştir. 0.120-0.240 arasında değere sahip olan kuyucuklar orta dereceli biyofilm oluşumunun, 0.240'ın üzerinde değere sahip olan kuyucuklar ise güçlü biyofilm oluşumunun görüldüğü kuyucuklar olarak kabul edilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Kristal viole ile boyama yönteminden elde edilen OD değerlerine dayanarak oluşan tutunmaların hesaplanması

OD (570)	Biyofilm Oluşumu	Gösterimi
<0.120	Tutunma yok	-
0.120-0.240	Orta Dereceli Tutunma	+
>0.240	Güçlü Tutunma	++



Şekil 2.1. 96 kuyucuklu doku kültür platelerinde kristal viole boyama yöntemi ile biyofilm oluşumunun belirlenmesi. A1 kuyucuğu güçlü biyofilm oluşumu. B2 kuyucuğu orta dereceli biyofilm oluşumu. C3 kuyucuğu biyofilmin oluşmadığı kuyucuk

2.2.2. Hücre Süspansiyonunun Yoğunluk Tayini

Kullanılacak hücre süspansiyon yoğunluğunu tayin edebilmek amacıyla *Geobacillus kaustophilus* büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Bu amaçla, gece boyu büyütülen kültürlerden 1/100 oranında inokülasyon yapılarak 55° C’da 175 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. 0. saatten başlayarak iki saat aralıklarla örnekler alınarak 600 nm’de spektrofotometrede optik yoğunluk değerleri ölçülmüştür. Ayrıca alınan bu örneklerin 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} oranlarında seyreltmeleri yapılmış, yayma plaka tekniğinden yararlanılarak nutrient agar üzerinde koloni sayımları gerçekleştirilmiştir. Koloni sayımları sonucunda 1×10^6 CFU/ml hücre sayısına karşılık gelen OD değeri 0.1 olarak belirlenmiş ve devamında yapılan tüm deneylerde hücreler 0.1 değerine kadar büyütülmüştür.

2.2.3. Vejetatif Hücrelerde Biyofilm Oluşumuna Hücre Miktarının Etkisi

Hücrelerin biyofilm oluşturma yeteneği polistiren 96 kuyucuklu doku kültür plate kuyucuklarına tutunma miktarının belirlenmesiyle ölçülmüştür. Genel olarak kullanılan bu metot daha önce yapılan çalışmaların kısmi modifikasyonu ile yapılmıştır (Elhariry, 2008, Wang ve ark., 2007). *Geobacillus kaustophilus* hücreleri Tryptic Soy Broth (TSB)'da 55°C'da, 100 rpm'de gece boyunca ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra 1/10 oranında taze TSB'ye inoküle edilmiş ve hücre yoğunluğu 10^6 CFU/ml (OD_{600} 0.1) hücre sayısına ulaşincaya kadar büyütülmüştür. İnkübasyonun ardından hücreler +4°C'da 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek toplanmış ve 3 kez PBS (pH 7,2) ile yıkanmıştır.

Biyofilm oluşumu için 240, 235, 230, 225 veya 220 µl TSB paylaştırılan 96 kuyucuklu doku kültürü plate kuyucukları, toplam hacim 250 µl olacak şekilde sırasıyla 10,15, 20, 25, 30 µl seyreltilmiş kültür (10^6 CFU) ile inokule edilmiştir ve 55°C'da inkübasyona bırakılmıştır. Bu deney düzeneği 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168. saatler için ayrı ayrı kurulmuştur.

Biyofilm oluşturan hücreler kristal viole boyama metodu kullanılarak belirlenmiştir (Wang ve ark., 2007). 24-148 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından kuyucukların içeriği pipet yardımıyla dikkatlice boşaltılmış ve kuyucuklar tutunmamış hücrelerden ve besiyeri kalıntılarından uzaklaştırılmak amacıyla 300 µl PBS (pH 7.2) ile üç kez yıkanmıştır. Kuyuların tabanlarında kalan tutunmuş bakterileri sabitlemek amacıyla her bir kuyucuğa 250 µl %99.5 metanol ile 15 dk muamele edilmiştir. Kuyucuklar kurumaya bırakıldıktan sonra her bir kuyucukta tutunan bakteriler 5 dk boyunca 250 µl %1'lik kristal viole ile boyanmış ve fazla boya uzaklaştırıldıktan sonra plate su ile yıkanmıştır. Kuyucuklar tekrar kurutulduktan sonra %33'lük asetik asit yardımıyla kuyucukların içeriğinin çözülmesi sağlanmış ve her bir kuyucuktaki biyofilm oluşumu spektrofotometrik olarak 570 nm'deki absorbans ölçümleri ile belirlenmiştir.

2.2.4. İnkübasyon Süresinin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

2.2.4.1. Biyofilm Oluşumuna İnkübasyon Süresinin Etkisinin Kristal Viole Yöntemiyle Belirlenmesi

Hücre süspansiyonu daha önce belirtildiği gibi 1×10^6 CFU/ml hücre yoğunluğuna sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Bundan sonraki çalışmalar için deney düzeneği en iyi biyofilm oluşumunun gözlemlendiği toplam hacim 250 µl olacak şekilde 230 µl TSB ve 20 µl hücre süspansiyonu kullanılarak kurulmuştur. Hücreler, en iyi biyofilm oluşumu için gerekli inkübasyon süresini belirlemek amacıyla 55°C’da farklı sürelerde (24, 48, 72, 96, 120 ve 148 saat) inkübe edilmiştir. Hücreler, yukarıda belirtilen yöntem kullanılarak spektrofotometrik ölçüme hazırlanmış ve biyofilm oluşturma miktarı 570 nm’deki absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir.

2.2.4.2. Biyofilm Oluşumuna İnkübasyon Süresinin Etkisinin Yayma Plaka Yöntemiyle Belirlenmesi

Biyofilm yapılarındaki koloni sayımı tayininde 24 kuyucuklu plateler kullanılmıştır. Bu amaçla 920 µl TSB eklenmiş her bir kuyucuk 80 µl 10^6 CFU/ml hücre süspansiyonu ilave edilerek 55°C’da farklı sürelerde (24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saatlik) inkübe edilmiştir. Daha sonra süpernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve kuyucuklar PBS (pH 7.2) ile üç kez yıkanmıştır. Biyofilm oluşturan bakteriler steril kürdan yardımıyla kuyulardan toplanmış ve PBS’de çözülmüştür.

Kuyucuklardan toplanan bakteri kümelerini ayırmak için bakteri süspansiyonu 2 mm çaplı cam boncukların bulunduğu kapaklı steril tüplere alınarak 5 dk kuvvetlice karıştırıldıktan sonra 10^{-1} – 10^{-12} arası seyreltmeler yapılarak nutrient agarda 24 saat 55°C’da inkübe edilmiş ve gelişen kolonilerin sayımı gerçekleştirilmiştir (Wang ve ark., 2007). Sayımlarda 30-300 koloni oluşumunun gözlemlendiği seyreltmeler dikkate alınmıştır.

2.2.5. Sıcaklığın Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Bakterilerin en iyi biyofilm oluşumunu optimum büyüyebildikleri sıcaklıkta gerçekleştirdikleri bilinmektedir; ancak bazı bakteriler büyüme sıcaklıklarının altında veya üstünde biyofilm oluşturabilmektedirler. *Geobacillus kaustophilus*'ta biyofilm oluşumunun inkübasyon sıcaklığı ile ilişkisini belirlemek amacıyla en iyi tutunmanın gözlemlendiği 144. ve 168. saatlerde okunmak üzere 45, 50, 55, 60, 65 ve 70°C inkübasyon sıcaklıklarında deney düzenekleri kurulmuş ve inkübasyon sürelerinin sonunda biyofilm oluşumu 570 nm absorbans değerinde ölçülmüştür (Wang ve ark., 2007).

2.2.6. Glukozun Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Besin miktarının mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunda çok önemli etkisinin olduğu bilinmektedir. Glukoz birçok yiyecek ve içecek içinde bulunan temel gıda maddesi olduğundan *Geobacillus kaustophilus*'ta biyofilm oluşumunun glukoz ile ilişkisini saptayabilmek amacıyla, deney düzenekleri farklı glukoz konsantrasyonları içeren TSB besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Bu amaçla %1, %3, %5 ve %7'lik glukoz konsantrasyonları kullanılmıştır. Hücreler, daha önce belirtilen şartlarda Kristal Viole Yöntemi kullanılarak 55°C'da farklı sürelerde (72, 96, 120 ve 144 ve 168. saatlerde) inkübe edilmiş ve biyofilm oluşturma miktarı 570 nm'deki absorbans değerleri okunarak belirlenmiştir (Elhariry ve ark., 2008). Ayrıca hücrelerin farklı glukoz konsantrasyonları varlığında ve çalkalamasız ortamda 81 saatlik büyüme eğrileri daha önce belirtildiği gibi oluşturulmuştur.

2.2.7. NaCl'nin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Mikroorganizmaların büyüme davranışlarıyla doğrudan ilişkili olan bir diğer besin maddesi NaCl'dir. NaCl'nin biyofilm oluşumuna etkisini inceleyebilmek amacıyla %1, %3, %5 ve %7'lik tuz konsantrasyonları içeren TSB besiyeri kullanılarak hazırlanan deney düzeneklerinin 55°C'da 96, 120, 144 ve 168 saat süren inkübasyon sürelerinin sonundaki tutunma miktarları 570 nm'deki absorbans

değerleri okunarak belirlenmiştir (Elhariry ve ark., 2008). Ayrıca hücrelerin farklı NaCl konsantrasyonları varlığında ve çalkalamasız ortamda 81 saatlik büyüme eğrileri daha önce belirtildiği gibi oluşturulmuştur.

2.2.8. Glukoz ve NaCl'nin Biyofilm Oluşumuna Ortak Etkisi

Glukoz ve NaCl'nin biyofilm oluşumu üzerine ortak etkisini incelemek amacıyla %1 glukoz-%0,5 NaCl, %2 glukoz-%1 NaCl, %3 glukoz-%1,5 NaCl, %4 glukoz-%2 NaCl ve %5 glukoz-%3 NaCl konsantrasyonlarında glukoz ve NaCl içeren besiyerleri kullanılarak hazırlanan deney düzeneklerinin 55°C'da 96, 120, 144 ve 168 saatlik inkübasyon sürelerinin ardından tutunma miktarını belirlemek amacıyla 570 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur.

2.2.9. Isı Şoku Uygulamasının Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Hücre canlılığının *Geobacillus kaustophilus* vejetatif hücrelerinde biyofilm oluşumuna etkisini belirlemek amacıyla hücreler ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Bu amaçla hücre süspansiyonu 1×10^6 CFU/ml hücre yoğunluğuna sahip olacak şekilde hazırlanmış ve her bir kuyucuğa 230 µl TSB eklenerek 20 µl hücre süspansiyonu ile inokule edilmiştir. Hücreler önce 100°C'da 20 dakika ısı şokuna maruz bırakılmış ve daha sonra 55°C'da en iyi biyofilm oluşturdukları 144. ve 168. saatlerde inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda hücrelerin biyofilm oluşumu 570 nm'deki absorbansları ölçülerek ısı şoku uygulanmamış olan kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir (Elhariry ve ark., 2008).

2.2.10. UV Uygulamasının Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Biyofilm yapısının en önemli bileşenleri, biyofilm yapısına katılan hücrelerin sentezlemiş olduğu polimerlerdir. Polimer sentezinin ancak canlı hücreler tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir. Hücre canlılığının biyofilm oluşumu ve tutunma

üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla canlılar üzerinde olumsuz etkiler yarattığı bilinen ultraviole uygulaması kullanılmıştır. Çalışmada, 230 µl TSB bulunan kuyucuklar 20 µl, 10^6 CFU/ml hücre süspansiyonuyla inokule edilmiş ve plateler kapakları açık bir biçimde steril kabinde 15 dk ultraviole ışınlar maruz bırakılmıştır. UV uygulamasının ardından 55°C'da 144 ve 168 saat inkübe edilen plateler, inkübasyon sürelerinin sonunda daha önce belirtilen yöntemler kullanılarak spektrofotometrik olarak 570 nm'de okunmuştur (Elhariry ve ark., 2008).

2.2.11. Denatüre Edici Ajanların Biyofilm Oluşumuna Etkisi

2.2.11.1. Lizozimin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Biyofilm oluşumunda hücre çeper yapısını oluşturan polisakkaritlerin önemli bir rolünün olduğu bilinmektedir. Bu amaçla hücrelere polisakkaritlerin yapısında bulunan β -1,4 glikozidik bağların yıkımından sorumlu olan lizozim enzimi ile muamele edilmiştir. Daha önce belirtilen şartlarda hazırlanan ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan lizozim (%0.02, %0.05, %0.1, %0.2, %0.5 ve % 1) ilave edilen hücre süspansiyonu, 37°C'da 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek toplanmıştır. Elde edilen hücre pelleti 1 ml TSB içinde çözüldükten sonra 230 µl TSB içeren her bir kuyucuğa 20 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. 55°C'da 72, 96, 120, 144 ve 168'er saat inkübasyonun ardından biyofilm oluşumu daha önce belirtilen şartlarda hazırlanarak 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ayrıca hücrelerin farklı lizozim konsantrasyonları varlığında ve çalkalamasız ortamda 81 saatlik büyüme eğrileri daha önce belirtildiği gibi oluşturulmuştur.

2.2.11.2. SDS'nin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Biyofilm oluşumu hücre çeperini oluşturan polisakkaritlerinin yanında hücre çeper proteinleri ile de ilişkilidir. Bu amaçla daha önce belirtilen şartlarda hazırlanan hücre süspansiyonuna, hücrelerin çeper proteinlerini yıkıcı bir ajan olan SDS'nin

farklı konsantrasyonları ile (%0.1, %0.2, %0.3, %0.4, %0.5, %1 ve %2) muamele edilmiş ve ardından 37°C'da 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücreler 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek toplanmış ve TSB'de çözüldükten sonra 230 µl TSB içeren her bir kuyucuğa 20 µl olacak şekilde paylaştırılmıştır. 55°C'da 72, 96, 120, 144 ve 168'er saat inkübasyonun ardından deney düzeneği daha önce belirtildiği şekilde hazırlanmış ve biyofilm oluşumu 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ayrıca hücrelerin farklı SDS konsantrasyonları varlığında ve çalkalamasız ortamda 81 saatlik büyüme eğrileri daha önce belirtildiği gibi oluşturulmuştur.

2.2.12. *Geobacillus kaustophilus* Sporlarında Biyofilm Oluşumu

2.2.12.1. *Geobacillus kaustophilus* Sporlarının Hazırlanması ve Polistiren Yüzeğe Tutunması

Vejetatif hücrelerin yanında bakteriyal sporların da çeşitli yüzeylere tutunarak endüstriyel sistemlerde sorun teşkil ettiği bilinmektedir. Bu çalışmada, *Geobacillus kaustophilus* sporlarının polistiren yüzeye tutunma miktarları ve tutunmaya etki eden çevresel faktörler araştırılmıştır. Bu amaçla, *Geobacillus kaustophilus* hücreleri sporlanmayı indüklediği bilinen MnSO₄ (10 mg/L) içeren TSB'de 5 gün boyunca 55°C'da 175 rpm'de büyütüldükten sonra sporlar 4000 rpm'de 20 dk santrifüj ile toplanmıştır. Pelletler steril distile suda çözüldükten sonra spor süspansiyonundaki vejetatif hücreleri öldürmek amacıyla %50'lik etanolde 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra 4000 rpm'de 20 dk santrifüj ile toplanan sporlar üç kez PBS (pH 7.2) ile yıkanmıştır. 10⁶ CFU/ml olacak şekilde hazırlanan spor süspansiyonu 230 µl TSB içeren her bir kuyucuğa 20 µl ilave edilerek 55°C'da farklı sürelerde (2, 4, 6 saat) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucukların içerikleri mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar steril distile su ile üç kez yıkanmıştır. Devamında, kuyucuklara 100 µl %2'lik tween 80 ile muamele edilmiş, tutunmuş sporlar kuyucuk çeperlerinden steril kürdan yardımıyla toplanarak PBS'de çözülmüştür. Uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan sporlar nutrient agar üzerinde 55°C'da 48 saat büyütülmüş ve oluşan kolonilerin sayımı yapılmıştır.

2.2.12.2. Denatüre Edici Ajanların *Geobacillus kaustophilus* Sporlarının Polistiren Yüzeye Tutunmasına Etkisi

Vejetatif hücrelerde olduğu gibi spor yapılarının tutunmasında da yüzey etkileşimleri önemlidir. SDS ve lizozim gibi denatüre edici ajanların yüzey etkileşimlerini olumsuz yönde etkileyerek sporların çeşitli yüzeylere tutunmasını engellediği/azalttığı düşünülmektedir. Bu amaçla, 10^6 CFU/ml spor içeren hücre süspansiyonlarına %0.2, %0.5 ve %1'lik lizozim ve %0.5, %1 ve %2'lik SDS çözeltileri ile 37°C'da 1 saat muamele edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin ardından 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek toplanan spor pelletleri PBS'de çözüldükten sonra 230 µl TSB içeren kuyucuklara 20 µl paylaştırılmıştır. Plateler 55°C'da 2 saat inkübe edildikten sonra sporlar yukarıda belirtilen yöntemle sayıma hazırlanmış ve gerekli seyreltmelerin ardından nutrient agar üzerinde koloni sayımları gerçekleştirilmiştir.

2.2.13. İstatistiksel Analizler (Verilerin Değerlendirilmesi)

Bütün çalışmalar tesadüf blokları deneme desenine göre yapılmıştır. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görmek için bütün çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri SPSS 18.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Test edilen işlemler arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için veriler ANOVA'ya tabi tutulmuştur. İstatistiki önem görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar $P \leq 0.05$ seviyesinde *LSD* çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Analizlerde aşağıdaki önemlilik seviyeleri kullanılmıştır:

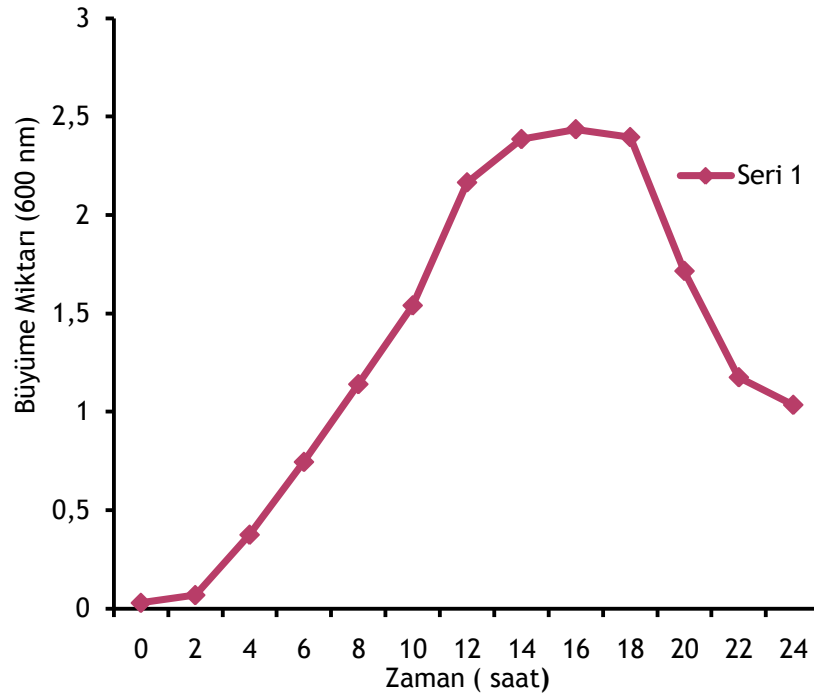
$P \geq 0.05$ = önemli değil

$P \leq 0.05$ = önemli

3. BULGULAR

3.1. Hücre Süspansiyonu Yoğunluk Tayini

Deney düzeneklerinde kullanılacak hücre süspansiyonunun yoğunluğu 1×10^6 CFU/ml olarak hesaplanmış ve *Geobacillus kaustophilus*'un büyüme eğrisi oluşturularak (Şekil 3.1) 1×10^6 CFU/ml hücre yoğunluğuna karşılık gelen OD değeri 0.1 olarak belirlenmiştir. Yapılan tüm deneyler için kültürler 0.1 değerine kadar büyütülmüş ve ardından santrifüjle toplanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.1. *Geobacillus kaustophilus* büyüme eğrisi

3.2. Vejetatif Hücrelerde Hücre Miktarının Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Geobacillus kaustophilus biyofilm oluşumuna çevresel faktörlerin etkisinin araştırılabilmesi için öncelikle deneylerde kullanılacak optimum hücre miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla farklı besiyeri oranları ve hücre süspansiyonu miktarları kullanılarak 24 saatten 168 saate kadar farklı sürelerde inkübe edilen hücrelerin biyofilm oluşumu kristal viole boyama yöntemi kullanılarak 570 nm'deki absorbanlarının ölçülmesi sonucu belirlenmiştir.

Ölçümlerden elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklılıklar Post Hoc çoklu karşılaştırmalı test yardımıyla hesaplanmış (Tablo 3.1) ve bu sonuçlardan yararlanılarak kuyucuklarda meydana gelen biyofilm oluşumunun derecesi Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Ayrıca hücre miktarı ve inkübasyon süresine bağlı olarak biyofilm oluşumunda meydana gelen değişim Şekil 3.2'de grafiksel olarak gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre en iyi biyofilm oluşumunun 20 µl hücre süspansiyonu varlığında gerçekleştirildiği belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Hücre miktarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel verileri

HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (Ort±SH) ^b (OD 570)							
<i>İnkübasyon Zamanı (Saat)</i> <i>Hücre Miktar (μl)</i>	24	48	72	96	120	144	168
10	0.0133±0.0077 a	0.0154±0.0010 b	0.2979±0.1941 b	0.5765±0.3291 b	1.4430±0.5951 b	1.3255±0.5094 b	2.5101±0.1831a
15	0.0035±0.0022 a	0.0351±0.0240 b	0.4151±0.2650 b	0.6485±0.2474 b	1.0898±0.5401 b	2.0430±0.5160 ab	1.5636±0.4853b
20	0.0120±0.0025 a	0.1383±0.0577 a	1.4496±0.3381 a	2.7966±0.0857 a	2.6912±0.1692 a	3.0629±0.1707 a	1.8641±0.1490b
25	0.0080±0.0071 a	0.0233±0.0181 b	0.2046±0.1429 b	0.5780±0.3861 b	0.8665±0.5614 b	0.7964±0.4672 b	1.3653±0.5326b
30	0.0020±0.0011 a	0.0095±0.0066 b	0.3314±0.2365 b	0.4980±0.3277 b	1.1111±0.5298 b	1.1324±0.5258 b	1.6359±0.6085b

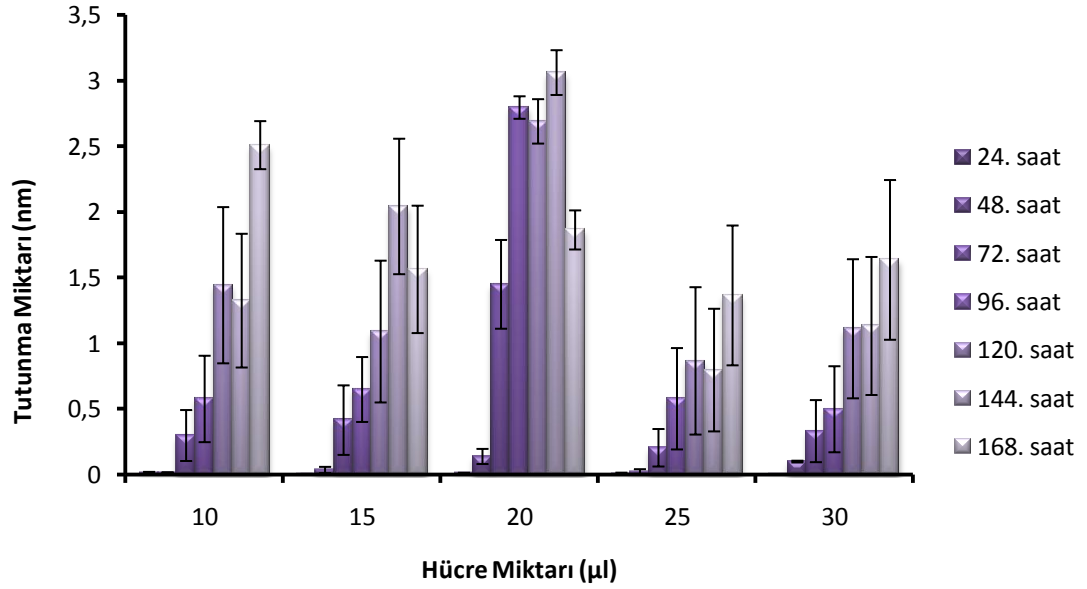
^aVeriler kültür başlatılmasından 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saat sonra toplanmıştır. Her deneme en az 8 kuyucukta yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, istatistiksel analizler Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı (LSD) teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^cSH: Standart hata.

Tablo 3.2. Hücre miktarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun derecelendirilmesi

HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (Ort±SH) ^b (OD 570)							
İnkübasyon Süresi (saat) Hücre Miktarı(μl)	24	48	72	96	120	144	168
10	-	-	++	++	++	++	++
15	-	-	++	++	++	++	++
20	-	+	++	++	++	++	++
25	-	-	++	++	++	++	++
30	-	-	++	++	++	++	++

**Şekil. 3.2.** İnkübasyon süresi ve hücre miktarına bağlı olarak biyofilm oluşumu

3.3. İnkübasyon Süresinin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

3.3.1. İnkübasyon Süresinin Biyofilm Oluşumuna Etkisinin Kristal Viole Yöntemiyle Belirlenmesi

Geobacillus kaustophilus türünün en iyi biyofilm oluşturduğu inkübasyon süresini belirleyebilmek amacıyla, 20 µl hücre süspansiyonu içeren mikrolateler farklı sürelerde inkübe edilmiş ve kristal viole boyama yöntemi kullanılarak hücrelerin tutunma miktarları belirlenmiştir. Boyama sonucunda okunan absorbans değerlerinin karşılaştırmalı istatistiksel ölçümleri Post Hoc çoklu karşılaştırmalı analiz yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. İnkübasyon süresinin biyofilm oluşumuna etkisinin istatistiksel verileri ve biyofilm oluşumunun derecelendirilmesi

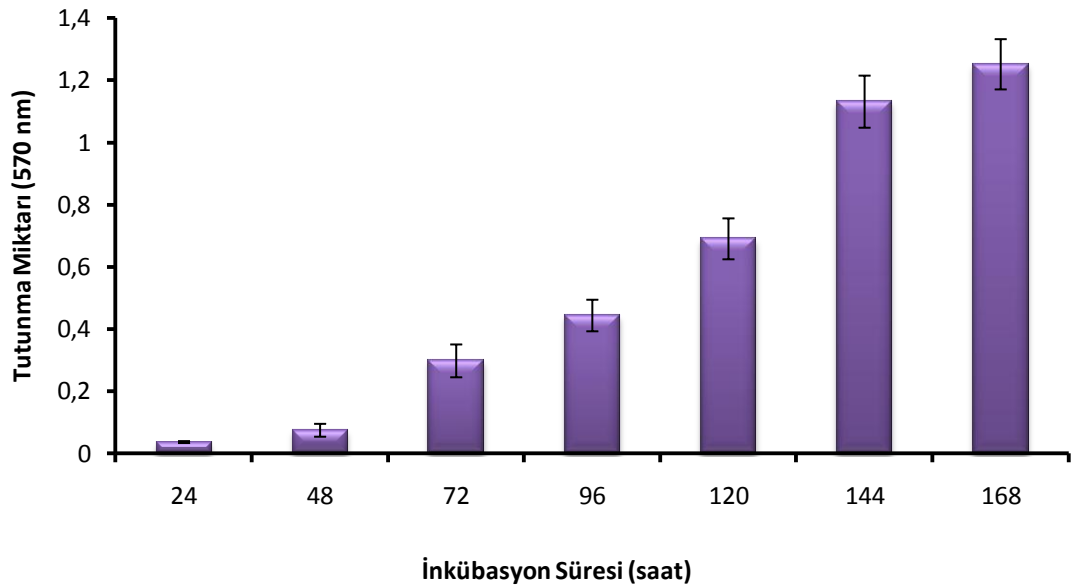
HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (Ort±SH ^c) ^b		
İnkübasyon Süresi (saat)	OD Değerleri (570)	Tutunma Miktarının Derecesi
24	0.0366±0.0031 e	-
48	0.0745±0.0207 e	-
72	0.2977±0.0528 d	++
96	0.4435±0.0507 c	++
120	0.6901±0.0658 b	++
144	1.1311±0.0838 a	++
168	1.2513±0.0808 a	++

^aVeriler kültür başlatılmasından 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saat sonra toplanmıştır. Her deneme en az 144 kuyucukta yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, istatistiksel analizler Post Hoc çoklu karşılaştırmalı (LSD) teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^cSH: Standart hata.

Bu verilerden yararlanılarak inkübasyon süresine bağlı olarak biyofilm oluşumundaki değişim Şekil 3.3'te grafiksel olarak gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en iyi biyofilm oluşumunun gerçekleştiği inkübasyon süresinin 168. saat olduğu belirlenmiş ve inkübasyon süresindeki artışının biyofilm oluşum miktarını olumlu yönde etkilediği gözlenmiştir. 168 saat sonucu oluşan biyofilm miktarı ile 144. saat sonucu oluşan biyofilm miktarı arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmemekle birlikte 168 saat sonunda, 120. saate göre iki, 96 saate göre 3 ve 72. saate göre dört kat fazla biyofilm oluşumu gözlenmiştir. 48. ve 24. saatlerin sonunda ise biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.



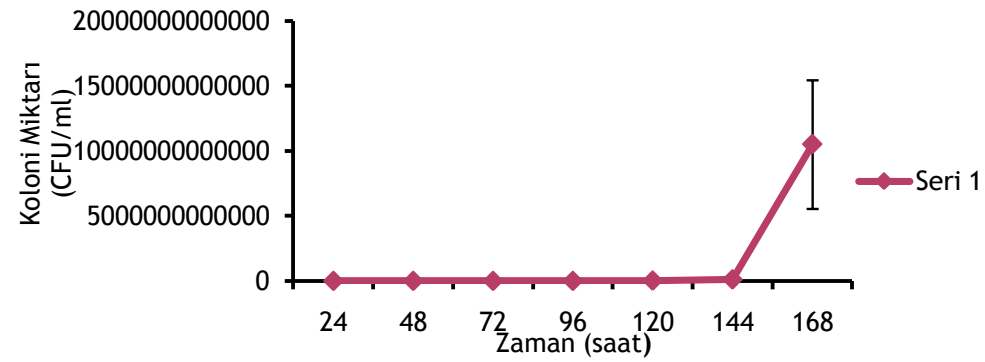
Şekil 3.3. İnkübasyon süresinin biyofilm oluşumuna etkisi

3.3.2. İnkübasyon Süresinin Biyofilm Oluşumuna Etkisinin Yayma Plaka Yöntemiyle Belirlenmesi

Kristal viole ile boyama yöntemi ile gösterilen biyofilm oluşumunu desteklemek amacıyla kuyucuklara tutunan hücrelerin koloni sayımları gerçekleştirilmiştir. Daha önce belirtildiği gibi uygun sürelerde inkübe edildikten sonra, biyofilm oluşturan hücreler kuyucuklardan toplanıp 10^0 - 10^{12} oranlarında seyreltilmiş ve nutrient agar üzerinde koloni sayımları gerçekleştirilmiştir. İki kez tekrarlanan koloni sayım sonuçları Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

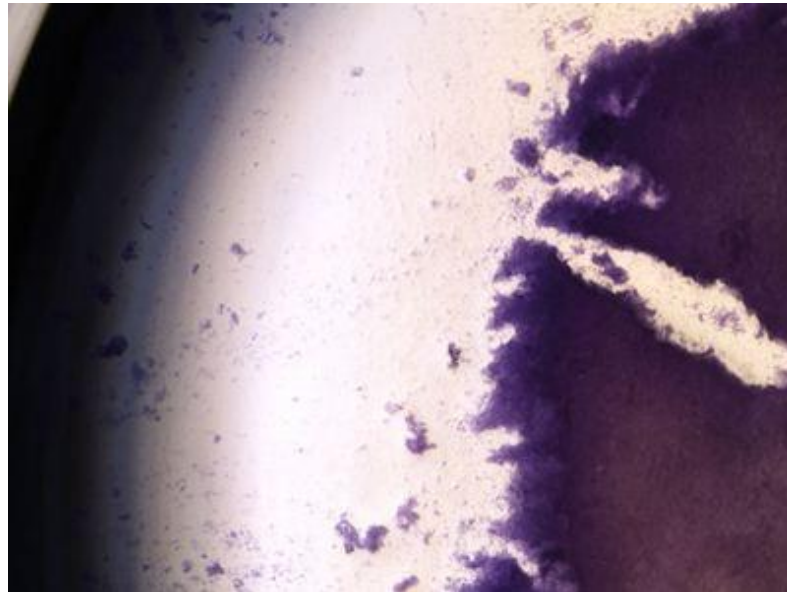
Tablo 3.4. Biyofilm oluşumuna inkübasyon süresinin etkisinin yayma plaka yöntemiyle belirlenmesi**a.**

İnkübasyon Süresi (saat) / Koloni Sayısı(CFU/ml)	24	48	72	96	120	144	168
I. Sayım	6×10^5	2.4×10^7	1.8×10^8	9×10^8	1.8×10^{10}	1.1×10^{11}	7×10^{12}
II. Sayım	1.2×10^6	8×10^6	1×10^8	1.1×10^9	3.3×10^{10}	1.2×10^{11}	1.4×10^{13}
Ortalama	9×10^5	1.6×10^7	1.4×10^8	2×10^9	2.6×10^{10}	1.2×10^{11}	1.1×10^{13}

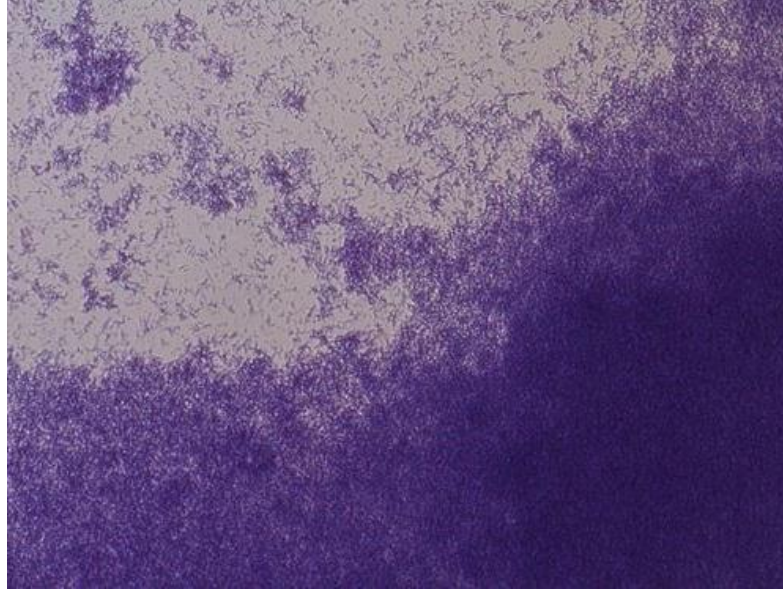
b.

Elde edilen sonuçlara göre 24 saat aralıklarla yapılan hücre koloni sayımları arasında en az 10 kat artış gözlenmiş ve en yüksek koloni sayısına en iyi biyofilm oluşumunun gözlemlendiği 168 saat inkübasyon süresi sonunda ulaşılmıştır. Bu sonuçlar kristal viole boyama yöntemi ile yapılan deney sonuçları ile de paralellik göstermektedir.

Ayrıca 168. saat sonunda hücreler 96 kuyucuklu doku kültür platelerinin bir kuyucuğunda vejetatif hücreler tarafından oluşturulan biyofilm yapıları floresans mikroskobu ile görüntülenmiştir (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).



Şekil 3.4. 168. saat inkübasyonun ardından oluşan biyofilm yapısının floresans mikroskobunda 4x objektif büyütme ile görüntülenmesi



Şekil 3.5. 168. saat inkübasyonun ardından oluşan biyofilm yapısının floresans mikroskopunda 10x objektif büyütme ile görüntülenmesi

3.4. Sıcaklığın Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Sıcaklığın *Geobacillus kaustophilus* biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hücreler farklı sıcaklıklarda ve en iyi tutunmanın gözleendiği 144. ve 168. saatlerde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda kristal viole boyama yöntemi kullanılarak hazırlanan kuyucukların 570 nm'deki absorbanları okunmuş ve istatistiksel analizleri yapılmıştır (Tablo 3.5). Elde edilen istatistiksel verilere göre biyofilm oluşumuna farklı inkübasyon sıcaklıklarının etkisi grafiksel olarak Şekil 3.6'da ve hücreler tarafından oluşturulan biyofilmlerin derecelendirilmesi Tablo 3.6'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre *Geobacillus kaustophilus* en iyi büyüebildiği sıcaklık olan 55°C'da en iyi biyofilm oluşumunu göstermiştir. Ayrıca hücreler düşük sıcaklıklara oranla optimum büyüme sıcaklıklarından yüksek sıcaklıklarda daha fazla biyofilm oluşumu gözlenmiştir. 50°C'nin altında ve 65°C'nin üstündeki sıcaklıklarda biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Tablo 3.5. Farklı inkübasyon sıcaklıklarına bağlı olarak biyofilm oluşumu

HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (Ort±SH) ^c OD 570		
<i>İnkübasyon Zamanı (Saat)</i> <i>İnkübasyon Sıcaklığı (°C)</i>	144	168
45	0.0257±0.0015 c	0.0316±0.0026 c
50	0.2473±0.0357 c	0.084±0.0154 c
55	1.1311±0.0838 a	1.2513±0.0808 a
60	0.5700±0.0895 b	0.7095±0.1066 b
65	0.4596±0.0671 b	0.2320±0.0285 c
70	0.0419±0.0062 d	0.0465±0.0225 c

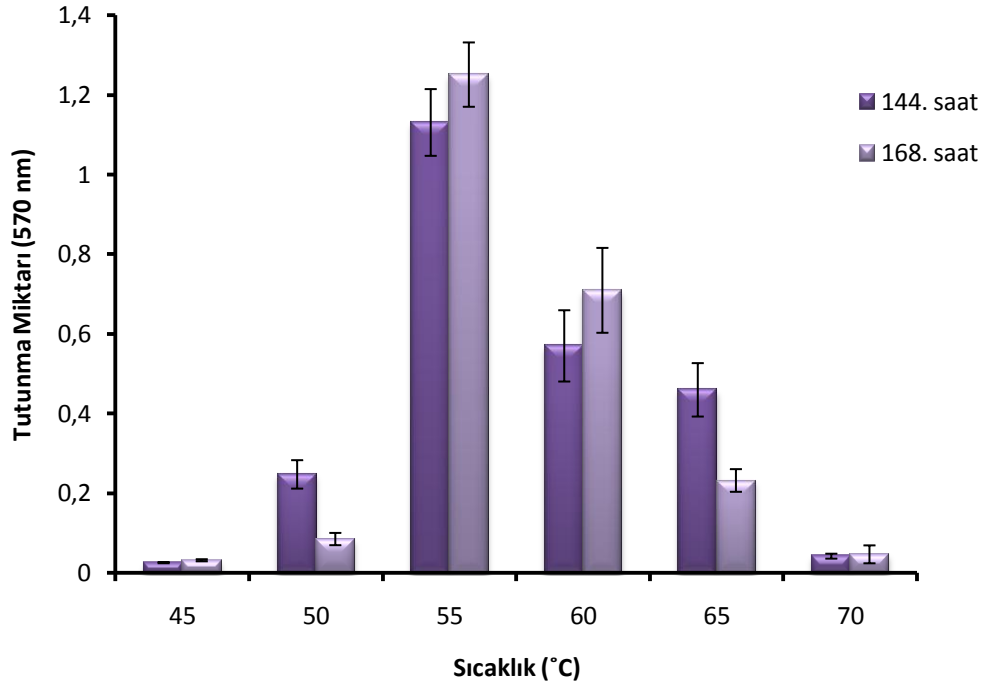
^aVeriler kültür başlatılmasından 144 ve 168 saat sonra toplanmıştır. Her deneme en az 72 kuucukta yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, istatistiksel analizler Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı (LSD) teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^cSH: Standart hata.

Tablo 3.6. Sıcaklık değişimine bağlı olarak biyofilm oluşumunun derecelendirilmesi

<i>İnkübasyon Süresi (saat)</i> <i>Sıcaklık(°C)</i>	144	168
45	-	-
50	++	-
55	++	++
60	++	++
65	++	+
70	-	-



Şekil 3.6. Sıcaklığa bağlı olarak biyofilm oluşumu

3.5. Glukozun Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Glukoz miktarının biyofilm oluşumuna etkisini araştırmak amacıyla, %1, %3, %5 ve %7 konsantrasyonlarında glukoz kullanılarak kurulan deney düzenekleri uygun inkübasyon sürelerinin sonunda kristal viole boyama yönteminden yararlanılarak hazırlanmıştır. Kuyucukların 570 nm’de absorbanları okunmuş, istatistiksel analizleri yapılmıştır (Tablo 3.7) ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.7’de grafiksel olarak gösterilmiştir. Glukoz miktarına bağlı olarak oluşan tutunmanın derecelendirilmesi ise Tablo 3.8’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, glukoz varlığında 24 saat aralıkla 72 ile 144 saat süren inkübasyon sonundaki biyofilm oluşumunda azalma gözlenmiştir. 168. saatin sonunda ise %1-%5 oranında glukoz bulunan ortamda biyofilm oluşumu kontrol

grubuna göre artış göstermektedir. Glukoz oranı %7 üzerine çıkarıldığında ise biyofilm oluşumunda belirgin olarak azalma gözlenmiştir

Tablo 3.7. Glukoz miktarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi

HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (570 nm) (Ort±SH) ^{c b}					
<i>İnkübasyon Süresi (Saat)</i> <i>Glukoz (%)</i>	72	96	120	144	168
TSB	0.2977±0.0528 a	0.685±0.0187 d	0.7134±0.0925 a	0.5716±0.1082 a	0.7697±0.1535 a
TSB+%1	0.0641±0.0060 b	0.1427±0.0121 b	0.1757±0.0231 c	0.3588±0.0297 b	0.8233±0.0450b
TSB+%3	0.1133±0.0119 b	0.1660±0.0088 b	0.1711±0.0373 c	0.3970±0.0361 b	0.8184±0.1112 a
TSB+%5	0.1373±0.0215 b	0.2612±0.0336 a	0.3614±0.0366 b	0.3317±0.0465 b	0.9597±0.0899 a
TSB+%7	0.1303±0.0066 b	0.1041±0.0057 c	0.2309±0.0151 b	0.3026±0.0147 b	0.4272±0.0318b

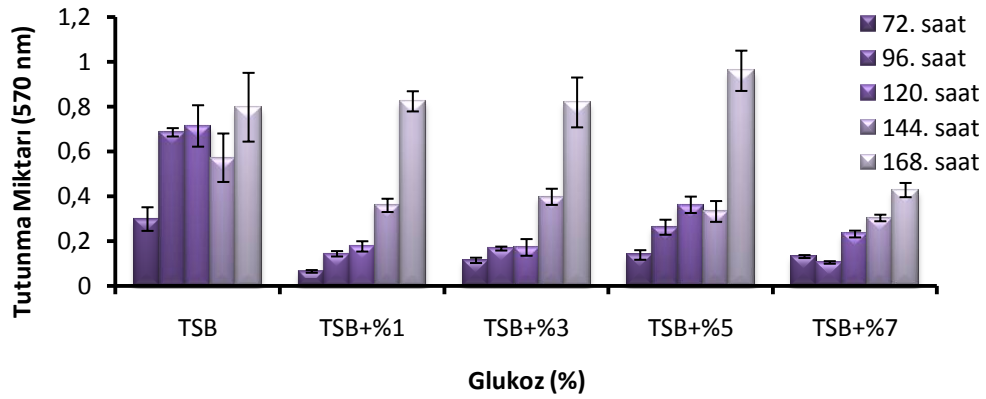
^aVeriler kültür başlatılmasından 72, 96, 120, 144 ve 168 saat sonra toplanmıştır. Her deneme en az 72 kuyucukta yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, istatistiksel analizler Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı (LSD) teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^cSH: Standart hata.

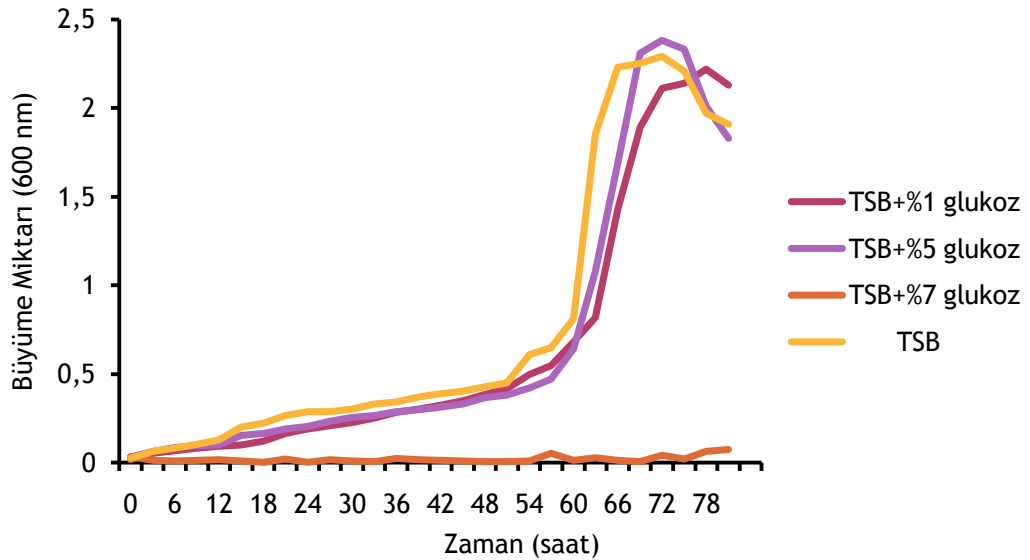
Tablo 3.8. Glukoz miktarına bağlı olarak oluşan tutunmanın derecelendirilmesi

<i>İnkübasyon Süresi (saat)</i> <i>Glukoz (%)</i>	72	96	120	144	168
TSB	++	++	++	++	++
TSB+%1	-	+	+	++	++
TSB+%3	-	+	+	++	++
TSB+%5	+	++	++	++	++
TSB+%7	+	+	+	++	++



Şekil 3.7. Glukozun biyofilm oluşumuna etkisi

Glukozun biyofilm oluşumundaki olumlu etkisinin hücre yoğunluğundan bağımsız olarak gerçekleştiğini doğrulamak amacıyla *G. kaustophilus*'un büyüme ortamına (Tryptic Soy Broth) farklı glukoz konsantrasyonları (TSB, TSB+%1, TSB+%5, TSB+%7) ilave edilerek büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Kontrole göre %1 ve %5'lik glukoz varlığında hücre büyümesinde önemli bir farklılık gözlenmezken TSB+%7 glukoz varlığında hücre büyümesi önemli derecede inhibe olmuştur.



Şekil 3.8. Glukozun *Geobacillus kaustophilus* hücre büyümesine etkisi

3.6. NaCl'nin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Farklı NaCl miktarlarının biyofilm oluşumuna etkisini araştırmak amacıyla %1, %3, %5 ve %7 konsantrasyonlarında NaCl miktarları kullanılarak kurulan deney düzenekleri inkübasyon sürelerinin sonunda kristal viole boyama yönteminden yararlanılarak hazırlanmış, kuyucukların 570 nm'de absorbansları okunmuş ve istatistiksel analizleri (Tablo 3.9) yapılmıştır. Bu verilerden yararlanılarak farklı NaCl miktarlarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun derecelendirilmesi Tablo 3.10'da ve grafiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 3.9'da gösterilmiştir. Alınan sonuçlara göre en iyi biyofilm oluşumu %3 NaCl konsantrasyonu varlığında ve 168 saatlik inkübasyon sonrasında gerçekleşmiştir. %3'ten daha büyük NaCl konsantrasyonlarında tutunma gözlenmemiştir. 96. saatte kontrol grubunda biyofilm oluşumu gerçekleşmezken %1 ve %3 NaCl konsantrasyonlarının bulunduğu kuyucuklarda 96. saatten itibaren biyofilm oluşumu gözlenmiştir.

Tablo 3.9. NaCl'nin biyofilm oluşumuna etkisinin istatistiksel verileri

HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (570 nm) (Ort±SH ^c)				
<i>İnkübasyon Süresi (Saat)</i> <i>NaCl (%)</i>	96	120	144	168
TSB	0.0685±0.0187 d	0.7134±0.0925 a	0.5716±0.1082 a	0.7697±0.1535 a
TSB+%1	0.2448±0.0449 b	0.8719±0.1462 b	0.7945±0.1227 a	0.5790±0.1391 a
TSB+%3	0.4268±0.0751 a	1.0340±0.1628 a	0.8837±0.1423 a	1.0581±0.1323 a
TSB+%5	0.0261±0.0028 c	1.0340±0.1628 a	0.0978±0.0153 b	0.0667±0.0061 b
TSB+%7	0.0087±0.0032 c	0.0512±0.0032 c	0.0462±0.0036 c	0.0311±0.0028 c

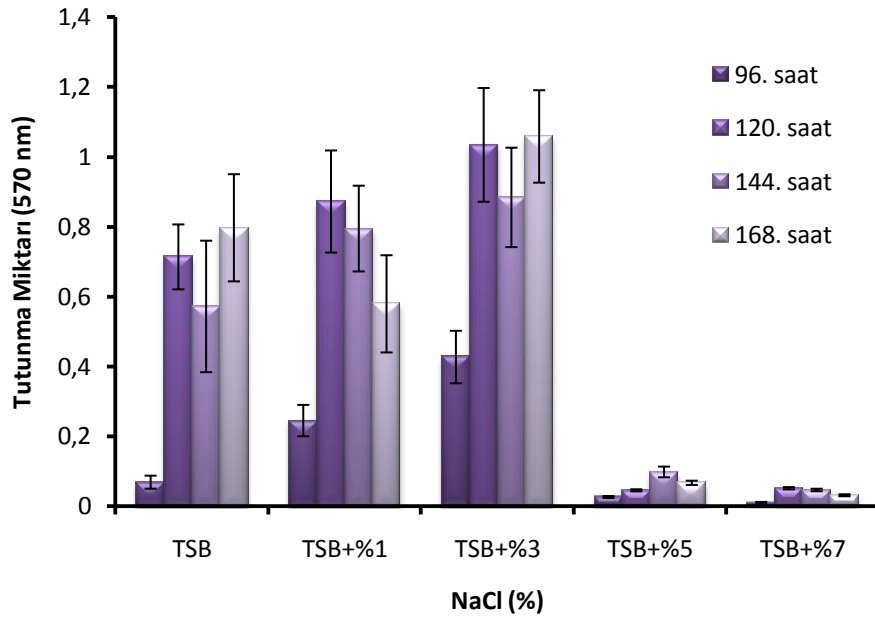
^aVeriler kültür başlatılmasından 96, 120, 144 ve 168 saat sonra toplanmıştır. Her deneme en az 72 kuyucukta yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, istatistiksel analizler Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı (LSD) teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^cSH: Standart hata.

Tablo 3.10. NaCl miktarının değişimine bağlı olarak oluşan biyofilm miktarlarının derecelendirilmesi

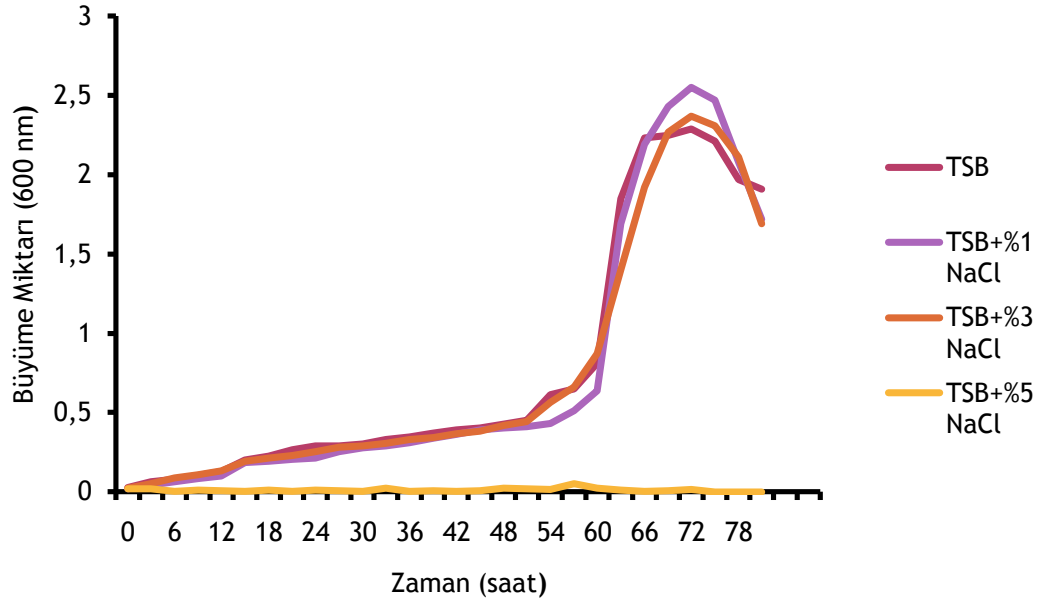
İnkübasyon Süresi (saat) / NaCl (%)	96	120	144	168
TSB	-	++	++	++
TSB+%1	+	++	++	++
TSB+%3	+	++	++	++
TSB+%5	-	-	-	-
TSB+%7	-	-	-	-



Şekil 3.9. NaCl'nin biyofilm oluşumuna etkisi

NaCl'nin biyofilm oluşumundaki olumlu etkisinin hücre yoğunluğundan bağımsız olarak gerçekleştiğini doğrulamak amacıyla *G. kaustophilus*'un büyüme ortamına (TSB) farklı NaCl konsantrasyonları (TSB, TSB+%1, TSB+%3, TSB+%5) ilave edilerek büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Kontrole göre %1 ve %3'lük NaCl'nin

varlığında hücre büyümesinde önemli bir farklılık gözlenmezken TSB+%5 NaCl varlığında hücre büyümesi önemli derecede inhibe olmuştur.



Şekil 3.10. NaCl'nin *G. kaustophilus* hücre büyümesine etkisi

3.7. Glukoz ve NaCl'nin Biyofilm Oluşumuna Ortak Etkisi

Biyofilm oluşumuna glukoz ve NaCl'nin ortak etkisini inceleyebilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda glukoz ve NaCl içeren besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Kristal viole boyama yöntemi ile hücrelerin boyanmasının ardından biyofilm oluşumu 570 nm'de absorbansları okunarak belirlenmiş ve istatistiksel analizleri yapılmıştır (Tablo 3.11). Bu sonuçlara bağlı olarak farklı glukoz ve NaCl konsantrasyonları varlığında biyofilm oluşumunun grafiksel değişimi Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en iyi tutunma %3 glukoz ve %1.5 NaCl varlığında gerçekleşirken inkübasyon süresi ve glukoz ile NaCl derişimi arttıkça (%4 glukoz - %2 NaCl konsantrasyonuna kadar) biyofilm oluşum miktarı artmıştır. %4 glukoz - %2 NaCl konsantrasyonunun kullanıldığı kuyucuklarda biyofilm oluşumu yaklaşık 2 kat azalmış ve %5 glukoz - %3 NaCl konsantrasyonunun kullanıldığı kuyucuklarda ise tutunma gözlenmemiştir.

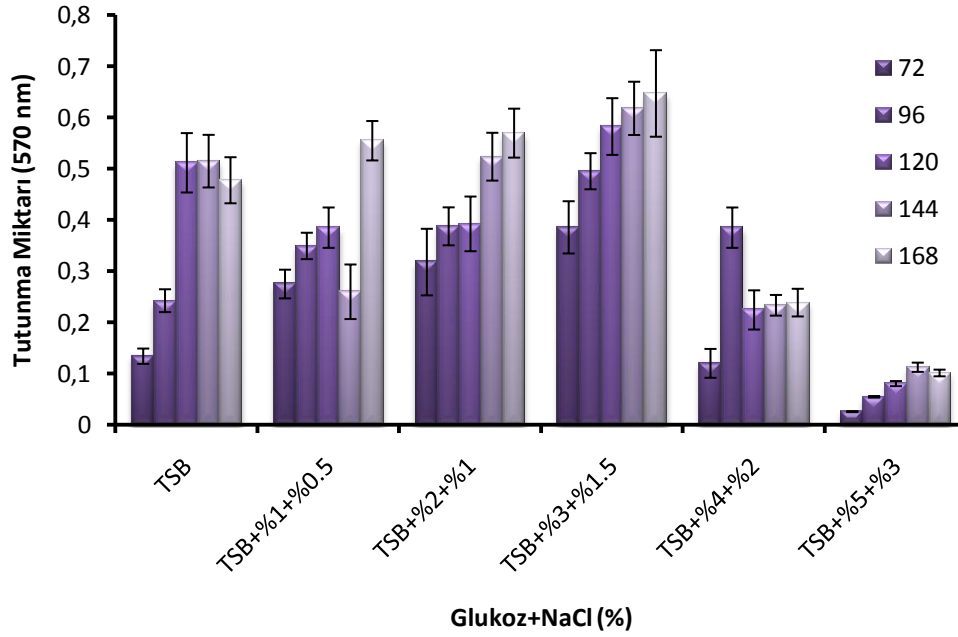
Tablo 3.11. Farklı glukoz ve NaCl kombinasyonu derişimlerine bağı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değışimi

HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (570 nm) (Ort±SH) ^{c b}					
<i>İnkübasyon Süresi (Saat)</i> <i>Glukoz+NaCl (%)</i>	72	96	120	144	168
TSB	0.1343±0.0150 c	0.2428±0.0223 c	0.5121±0.0580 a	0.5153±0.0514 a	0.4780±0.0450 b
TSB+%1+%0.5	0.2753±0.0280 b	0.3497±0.0258 b	0.3854±0.0394 b	0.2602±0.0533 b	0.5552±0.0385 a
TSB+%2+%1	0.3182±0.0650 a	0.3880±0.0371 b	0.3928±0.0534 b	0.5240±0.0467 a	0.5700±0.0478 a
TSB+%3+%1.5	0.3860±0.0510 a	0.4956±0.0353 a	0.5829±0.0554 a	0.6184±0.0520 a	0.6475±0.0845 a
TSB+%4+%2	0.1204±0.0282 c	0.3854±0.0394 b	0.2247±0.0383 c	0.2338±0.0202 b	0.2390±0.0270 c
TSB+%5+%3	0.0262±0.0009 d	0.0551±0.0015 d	0.0808±0.0050 d	0.1128±0.0090 c	0.1016±0.0065 d

^aVeriler kültür başlatılmasından 72, 96, 120, 144 ve 168 saat sonra toplanmıştır. Her deneme en az 40 kuyucukta yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, istatistiksel analizler Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı (LSD) teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^cSH: Standart hata.



Şekil 3.11. Glukoz ve NaCl'nin ortak etkisine bağlı olarak biyofilm oluşumu

3.8. Isı Şoku Uygulamasının Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Isı şoku uygulamasının biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hücreler 230 µl TSB içeren kuyucuklara her kuyucuğa 20 µl olacak şekilde paylaştırılmış ve ardından 100°C'da 20 dk ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Isı şokunun ardından sırasıyla 144 ve 168 saat inkübe edilen hücreler, inkübasyon süresinin sonunda kristal viole boyama yöntemi kullanılarak hazırlanmış ve kuyucukların 570 nm'de absorbanları okunmuştur. İstatistiksel analizler Tablo 3.12'de gösterilmiş ve ısı şoku uygulamasına bağlı olarak biyofilm oluşumunda meydana gelen değişim Şekil 3.12'de grafiksel olarak ifade edilmiştir. Bu sonuçlara göre ısı şoku uygulamasına maruz bırakılan hücrelerde biyofilm oluşumu gözlenmezken kontrol deneyindeki hücreler biyofilm oluşturmuştur.

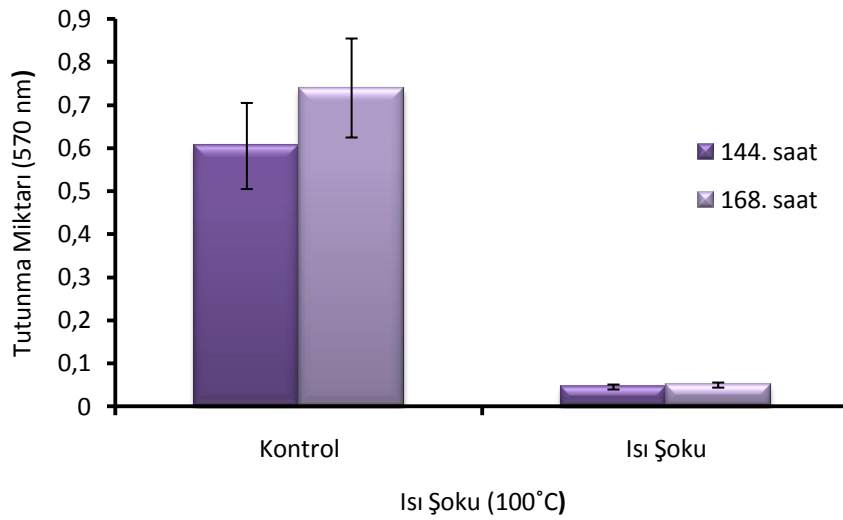
Tablo 3.12. Isı muamelesine bağı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi

HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (570 nm) (Ort±SH) ^c		
<i>İnkübasyon Zamanı (Saat)</i>	<i>144</i>	<i>168</i>
<i>Isı Şoku (100°C-20 dk.)</i>		
<i>Kontrol</i>	0.6046±0.1000 a	0.7393±0.1150 a
<i>Isı Şoku</i>	0.0446±0.0058 b	0.0491±0.0059 b

^aVeriler kültür başlatılmasından 144 ve 168 saat sonra toplanmıştır. Her deneme en az 72 kuyucukta yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, istatistiksel analizler Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı (LSD) teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^cSH: Standart hata.

**Şekil 3.12.** Biyofilm oluşumunun ısı şokuna bağı olarak değişimi

3.9. UV Uygulamasının Biyofilm Oluşumuna Etkisi

UV uygulamasının biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hücreler 230 µl TSB içeren kuyucuklara her kuyucuğa 20 µl olacak şekilde paylaştırılmış ve ardından hücrelere platelerin kapakları açık olacak şekilde 15 dk UV uygulanmıştır. Uygulamanın ardından 144 ve 168. saatlerde inkübe edilen kuyucuklar kristal viole boyama yöntemi kullanılarak hazırlanmış ve kuyucuklardaki tutunmuş hücrelerin 570 nm'deki absorpsanları okunmuştur. Tablo 3.13'te gösterilen istatistiksel analiz sonuçlarına göre UV uygulamasına bağlı olarak meydana gelen değişim Şekil 3.13'te grafiksel olarak gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre UV uygulamasına maruz bırakılan hücrelerde tutunma gözlenmezken kontrol hücrelerde biyofilm oluşumu gözlenmiştir.

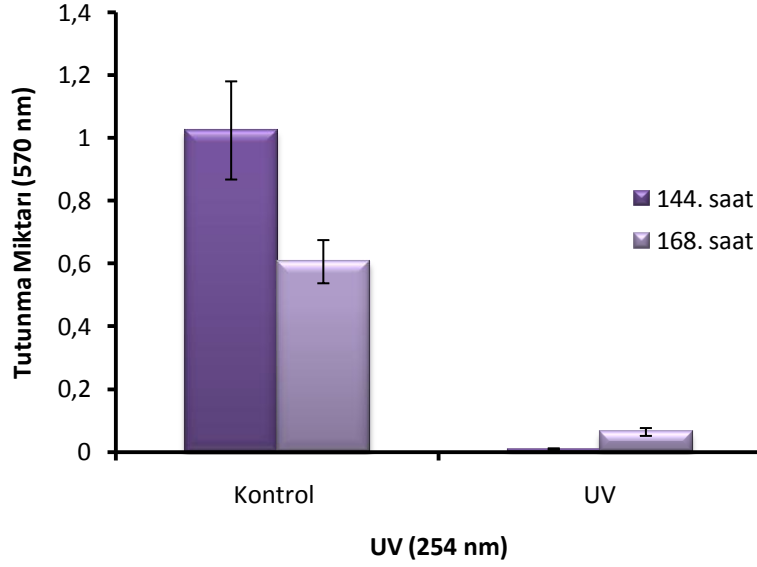
Tablo 3.13. UV muamelesine bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi

HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (570 nm) (Ort±SH) ^b		
<i>İnkübasyon Zamanı (Saat)</i>	144	168
<i>UV (15 dk)</i>		
Kontrol	1.0250±0.1564 a	0.6069±0.0688 b
UV	0.0098±0.0024 c	0.0643±0.0125 c

^aVeriler kültür başlatılmasından 144 ve 168 saat sonra toplanmıştır. Her deneme en az 72 kuyucukta yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, istatistiksel analizler Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı (LSD) teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^cSH: Standart hata.



Şekil 3.13. UV'nin biyofilm oluşumuna etkisi

3.10. Denatüre Edici Ajanların Biyofilm Oluşumuna Etkisi

3.10.1. Lizozimin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Farklı lizozim konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 37°C'da 1 saat farklı lizozim derişimlerine maruz bırakılan hücreler santrifüj ile toplanmış ve deney düzenekleri daha önce belirtilen şartlarda hazırlanmıştır. Hücreler 144 ve 168 saat inkübasyon süresinin sonunda kristal viole ile boyama yöntemi kullanılarak hazırlanmış ve kuyucuklardaki tutunmuş hücrelerin 570 nm'deki absorbansları okunarak istatistiksel analizleri yapılmıştır (Tablo 3.14). Farklı lizozim konsantrasyonlarına bağlı olarak biyofilm miktarındaki değişim grafiksel olarak da Şekil 3.14'te gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre biyofilm oluşumu sadece kontrol grubu hücrelerde gözlenirken lizozimin uygulandığı hücrelerin bulunduğu kuyucukların hiçbirinde tutunma gözlenmemiştir.

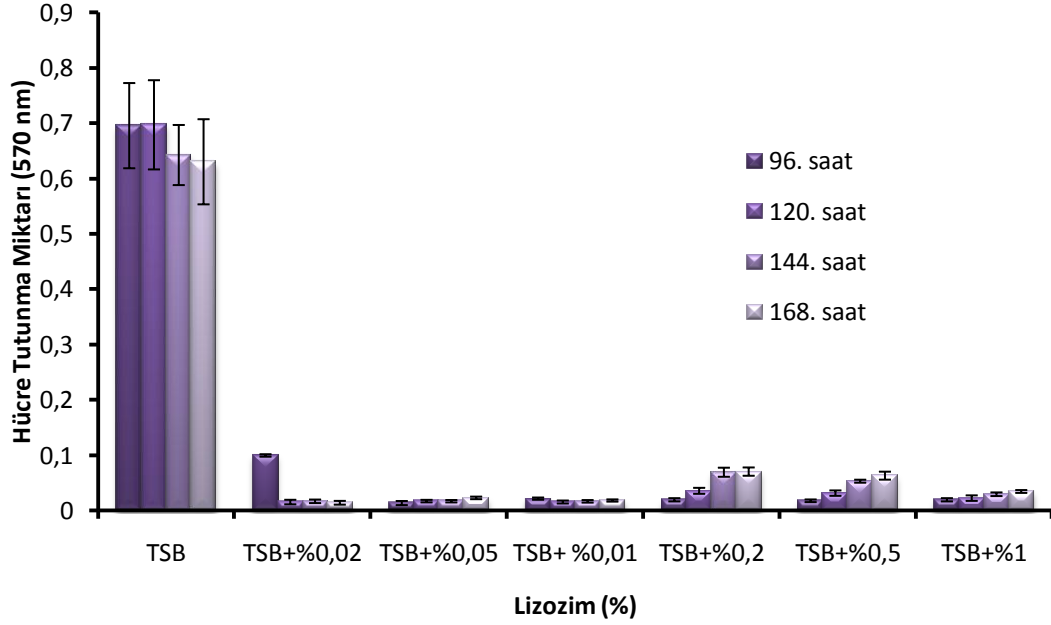
Tablo 3.14. Farklı lizozim konsantrasyonlarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi

HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (570 nm) (Ort ^b ±SH ^c)				
<i>İnkübasyon Zamanı (Saat)</i> <i>Lizozim (%)</i>	<i>96</i>	<i>120</i>	<i>144</i>	<i>168</i>
<i>TSB</i>	0.6960±0.0770 a	0.6975±0.0806 a	0.6429±0.0543 a	0.6307±0.0769 a
<i>TSB+%0.002</i>	0.1000±0.0022 b	0.0158±0.0041 b	0.0171±0.0032 b	0.0145±0.0034 b
<i>TSB+%0.005</i>	0.0140±0.0037 b	0.0175±0.0023 b	0.0173±0.0022 b	0.0233±0.0023 b
<i>TSB+%0.01</i>	0.0220±0.0020 b	0.0175±0.0023 b	0.0171±0.0023 b	0.0186±0.0020 b
<i>TSB+%0.2</i>	0.0199±0.0029 b	0.0380±0.0071 b	0.0697±0.0082 b	0.0708±0.0075 b
<i>TSB+%0.5</i>	0.0181±0.0024 b	0.0315±0.0039 b	0.0535±0.0027 b	0.0635±0.0072 b
<i>TSB+%1</i>	0.0199±0.0025 b	0.0229±0.0050 b	0.0299±0.0033 b	0.0349±0.0026 b

^aVeriler kültür başlatılmasından 96, 120, 144 ve 168 saat sonra toplanmıştır. Her deneme en az 64 kuyucukta yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

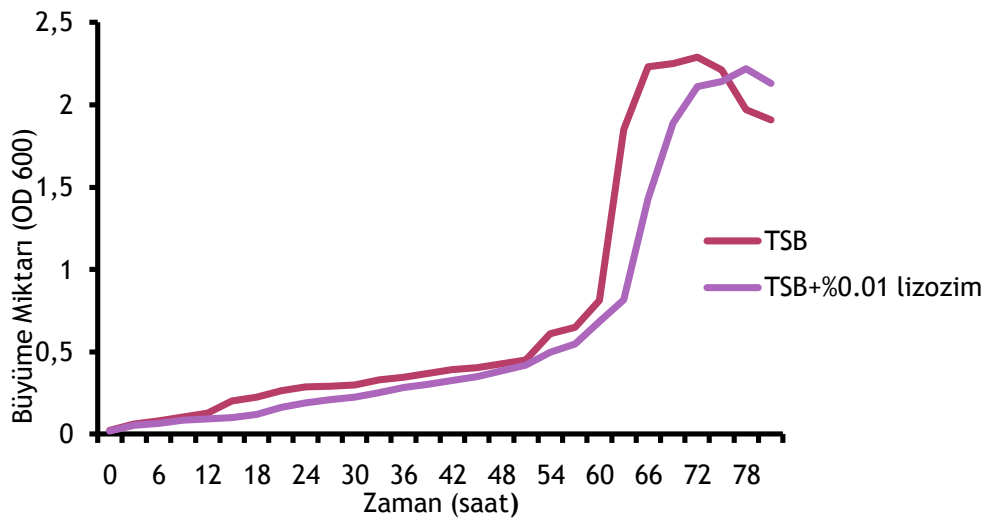
^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, istatistiksel analizler Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı (LSD) teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^cSH: Standart hata.



Şekil 3.14. Lizozimin biyofilm oluşumuna etkisi

Lizozimin biyofilm oluşumundaki olumsuz etkisinin hücre büyümesinden bağımsız olarak gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla *G. kaustophilus*'un büyüme ortamında (TSB) biyofilm oluşumunu engelleyen en düşük lizozim konsantrasyonu (TSB+%0.02) ilave edilerek büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlara göre biyofilm oluşumunun gözlenmediği bu konsantrasyonda kontrole yakın oranda hücre büyümesi gerçekleşmiştir.



Şekil 3.15. Lizozimin *Geobacillus kaustophilus* hücre büyümesine etkisi

3.10.2. SDS'nin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

SDS'nin biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 37°C'da 1 saat farklı SDS konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücreler kullanılarak deney düzenekleri hazırlanmış ve düzenekler 144 ve 168 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda kristal viole boyama yöntemi kullanılarak kuyucuklara tutunmuş hücrelerin boyanması sağlanmış ve 570 nm'de absorbanları okunarak biyofilm oluşturma miktarı belirlenmiştir. İstatistiksel analizlerden elde edilen veriler Tablo 3.15'te sayısal, Şekil 3.16'da grafiksel olarak ifade edilmiştir. Farklı SDS konsantrasyonlarına bağlı olarak biyofilm oluşumunda meydana gelen değişimin derecelendirilmesi ise Tablo 3.16'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol grubu hücrelerde güçlü tutunma gözlenirken, SDS uygulamasının yapıldığı hücrelerde SDS konsantrasyonunun artışına bağlı olarak biyofilm oluşumunda azalma meydana gelmiştir. Bu azalma kontrol grubuyla karşılaştırıldığında %0.1 SDS konsantrasyonunun uygulandığı hücrelerde en az iki kat, %0.2 SDS ve %0.3 SDS konsantrasyonunun uygulandığı hücrelerde ise en az üç kat olarak bulunmuştur. %0.3 değerinin üzerinde SDS konsantrasyonu uygulanan hücrelerde ise biyofilm oluşumuna rastlanmamıştır.

Tablo 3.15. Farklı SDS konsantrasyonlarına bağlı olarak biyofilm oluşumunun istatistiksel değişimi

HÜCRE TUTUNMA MİKTARI (570 nm) (Ort±SH) ^{c, b}				
<i>İnkübasyon Zamanı (Saat)</i> <i>SDS (%)</i>	<i>96</i>	<i>120</i>	<i>144</i>	<i>168</i>
<i>TSB</i>	0.6915±0.0601 a	0.6042±0.0736 a	0.6807±0.0683 a	0.8168±0.0849 a
<i>TSB+%0.1</i>	0.1185±0.0217 b	0.3147±0.0390 b	0.2209±0.0450 b	0.3083±0.0509 b
<i>TSB+%0.2</i>	0.1254±0.0238 b	0.2320±0.0456 b	0.1916±0.0334 b	0.2123±0.0345 b
<i>TSB+%0.3</i>	0.1208±0.0259 b	0.1672±0.0315 c	0.2419±0.0481 b	0.1745±0.0286 b
<i>TSB+%0.4</i>	0.0940±0.0194 b	0.0509±0.0142 c	0.0389±0.0315 b	0.0719±0.0182 c
<i>TSB+%0.5</i>	0.0408±0.0140 b	0.0603±0.0962 b	0.0199±0.0030 b	0.0182±0.0213 c
<i>TSB+%1</i>	0.0408±0.0140 b	0.0628±0.0101 b	0.0199±0.0030 b	0.0150±0.0214 c
<i>TSB+%2</i>	0.0367±0.1073 b	0.0136±0.0157 b	0.0182±0.0024 b	0.0339±0.0057 c

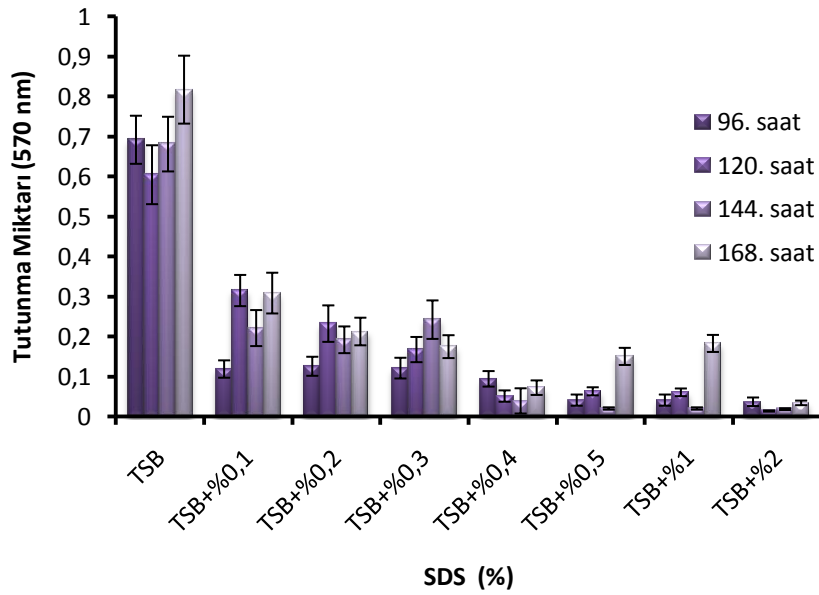
^aVeriler kültür başlatılmasından 96, 120, 144 ve 168 saat sonra toplanmıştır. Her deneme en az 64 kuyucukta yapılmış ve denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

^bHer bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler, istatistiksel analizler Post Hoc çoklu karşılaştırılmalı (LSD) teste göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir.

^cSH: Standart hata.

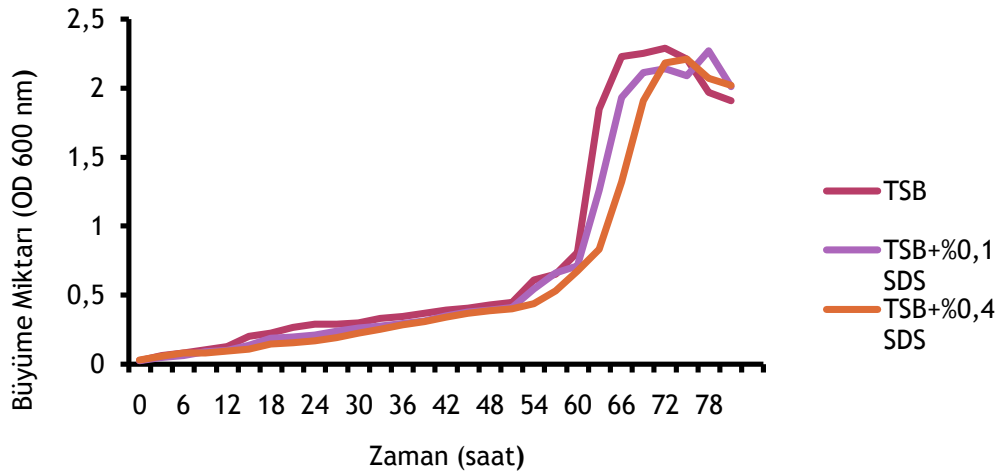
Tablo 3.16. Farklı SDS konsantrasyonlarına bağlı olarak biyofilm oluşumunda meydana gelen değişimin derecelendirilmesi

İnkübasyon Süresi (saat) \ SDS (%)	96	120	144	168
TSB	++	++	++	++
TSB+%0.1	-	++	+	++
TSB+%0.2	+	++	+	+
TSB+%0.3	+	+	++	+
TSB+%0.4	-	-	-	-
TSB+%0.5	-	-	-	-
TSB+%1	-	-	-	-
TSB+%2	-	-	-	-



Şekil 3.16. SDS'nin biyofilm oluşumuna etkisi

SDS'nin biyofilm oluşumundaki olumsuz etkisinin hücre yüzeyini çevreleyen proteinlerin denatürasyonu yoluyla ve hücre büyümesinden bağımsız olarak gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla *G. kaustophilus*'un büyüme ortamına (TSB) farklı konsantrasyonlarda SDS (TSB, TSB+%0.1, TSB+%0.4) ilave edilerek büyüme eğrisi oluşturulmuştur. bu sonuçlara göre her üç ortamda da hücre büyümesi gerçekleşmiştir.



şekil.17. SDS'nin *Geobacillus kaustophilus* hücre büyümesine etkisi

3.11. *Geobacillus kaustophilus* Sporlarının Polistiren Yüzeye Tutunması

Geobacillus kaustophilus vejetatif hücrelerinin yanında, oluşturdukları spor yapılarının da çeşitli yüzeylere tutundukları bilinmektedir. Bu amaçla, hücreler sporlanma için gerekli şartların sağılandığı bir ortamda 5 gün boyunca büyütölmüş ve spor süspansiyonu yoğunluğu 10^6 CFU/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan spor süspansiyonu kullanarak deney düzenekleri hazırlanmış ve 55°C'da farklı sürelerde (2, 4, 6 saat) inkübasyonun ardından tutunmuş sporlar kuyucuklardan toplanmıştır. Uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan sporlar nutrient agar üzerinde 55°C'da 48 saat büyütölmüş ve oluşan kolonilerin sayımı yapılmıştır. Sayım deneyleri iki kez tekrarlanmış ve sonuçlar Tablo 17'de gösterilmiştir. Bu sonuçlar *Geobacillus kaustophilus* sporlarının da vejetatif hücreler gibi polistiren yüzeye

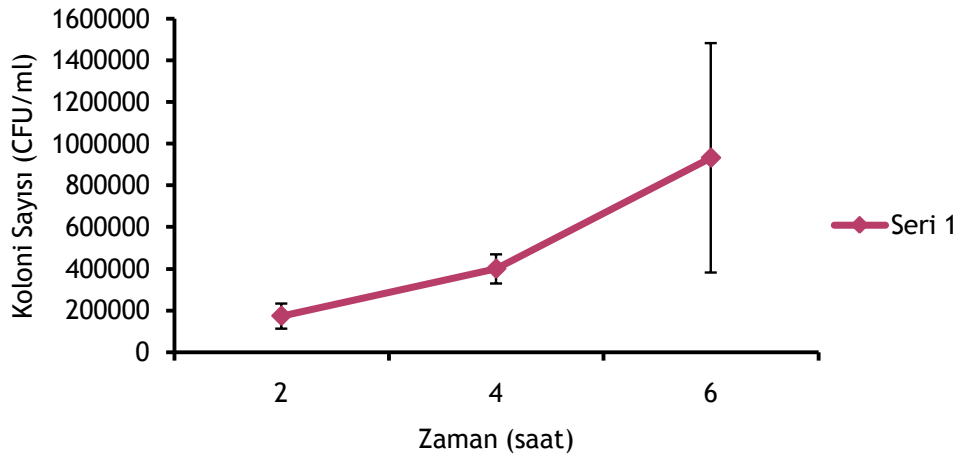
tutunduğunu göstermiştir. Ayrıca inkübasyon süresi arttıkça sporların tutunma miktarları da yaklaşık iki kat artış göstermiştir.

Tablo 3.17. *Geobacillus kaustophilus* sporlarının polistiren yüzeye tutunması

a.

İnkübasyon Süresi (saat) \ Hücre Sayısı (CFU/ml)	2	4	6
I. Sayım	1.1×10^5	4.7×10^5	1.5×10^6
II. Sayım	1.8×10^5	4×10^5	9×10^5
III. Sayım	2.3×10^5	3.3×10^5	4×10^5
Ortalama	1.7×10^5	4×10^5	9×10^5

b.



3.12. Denatüre Edici Ajanların *Geobacillus kaustophilus* Sporlarının Polistiren Yüzeye Tutunmasına Etkisi

Vejetatif hücrelerde olduğu gibi spor yapılarının tutunmasında da yüzey etkileşimleri önem taşımaktadır. SDS ve lizozim gibi denatüre edici ajanların yüzey etkileşimlerini olumsuz yönde etkileyerek sporların çeşitli yüzeylere tutunmasını engellediği/azalttığı düşünülmektedir. Bu amaçla, 10^6 CFU/ml spor içeren süspansiyonlarına farklı konsantrasyonlarda SDS veya lizozim çözeltileri ile 37°C'da

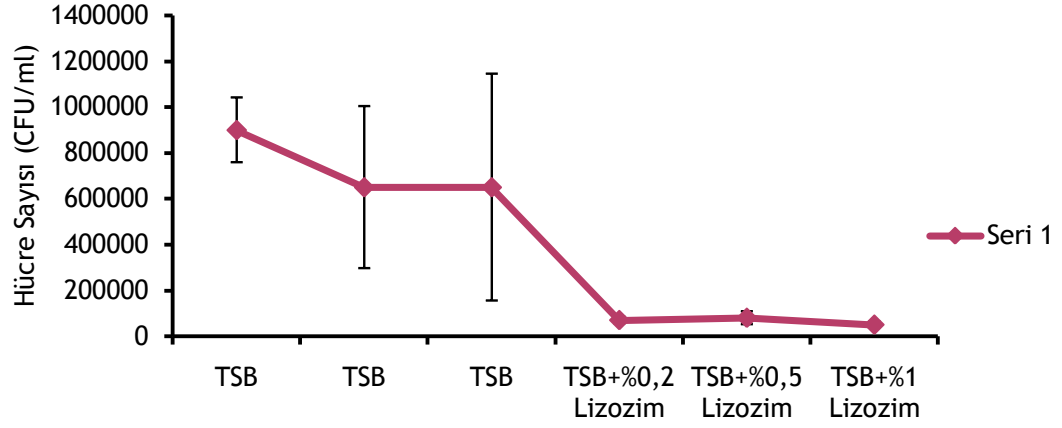
1 saat muamele edilmiş ve inkübasyon sürelerinin ardından spor pelletleri daha önce belirtildiği gibi santrifüj yöntemiyle toplanmıştır. Toplanan bu sporlar kullanılarak deney düzenekleri kurulmuş ve sporlar 55°C'da 2 saat inkübe edildikten sonra uygun seyreltmelerin ardından nutrient agar üzerinde koloni sayımları gerçekleştirilmiştir. Farklı lizozim konsantrasyonlarının uygulandığı sporların nutrient agar üzerindeki sayım sonuçları Tablo 3.18'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında lizozim ile muamele edilen sporların yüzeye tutunmasında ~10 kat azalma gözlenmiştir. Farklı SDS konsantrasyonlarının spor tutunmasına etkisine bakıldığında (Tablo 3.19) ise SDS konsantrasyonu arttıkça tutunmada azalma meydana geldiği görülmüştür. %0,5'lik SDS konsantrasyonunda bu azalma ~20 kat , %1 ve %2 SDS konsantrasyonlarında ise ~100 kat olarak gözlenmiştir.

Tablo 3.18. *Geobacillus kaustophilus* sporlarının polistiren yüzeye tutunmasına lizozim uygulamasının etkisi

a.

Lizozim (%)	0.2	0.5	1
Hücre Sayısı(CFU/ml)			
Kontrol I. Sayım	1×10^6	4×10^5	3×10^5
Kontrol II. Sayım	8×10^5	9×10^5	1.1×10^6
Kontrol Ortalama	9×10^5	6.5×10^5	7×10^5
Lizozim Muamele I. Sayım	6×10^4	1×10^5	4×10^4
Lizozim Muamele II. Sayım	8×10^4	6×10^4	6×10^4
Lizozim Muamele Ortalama	7×10^4	8×10^4	5×10^4

b.

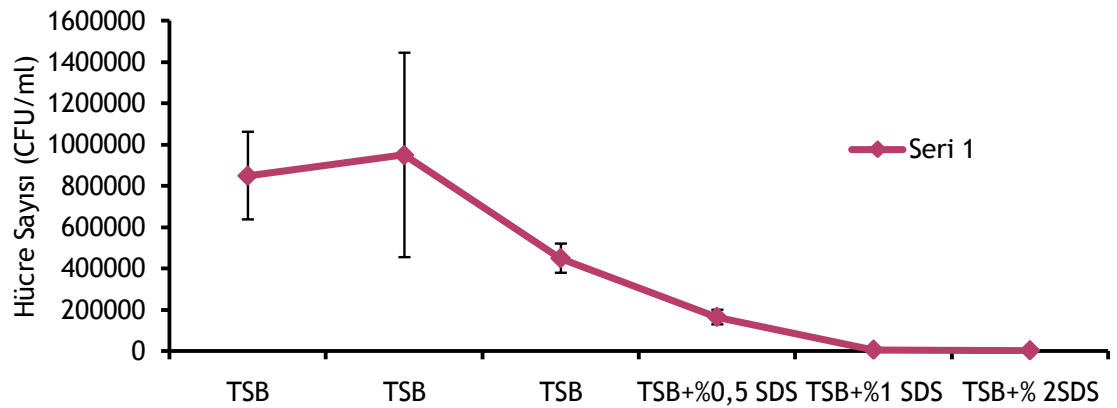


Tablo 3.19. *Geobacillus kaustophilus* sporlarının polistiren yüzeye tutunmasına SDS uygulamasının etkisi

a.

SDS (%)	0.5	1	2
Hücre Sayısı(CFU/ml)			
Kontrol I. Sayım	1×10^6	6×10^5	4×10^5
Kontrol II. Sayım	7×10^5	1.3×10^6	5×10^5
Kontrol Ortalama	8.5×10^5	9.5×10^5	4.5×10^5
SDS Muamele I. Sayım	1.4×10^4	5×10^3	3×10^3
SDS Muamele II. Sayım	1.9×10^4	7×10^3	3×10^3
SDS Muamele Ortalama	3.3×10^4	6×10^3	3×10^3

b.



4. TARTIŞMA

Termofilik, spor oluşturan bacilluslar pek çok endüstriyel sistemin potansiyel kontaminantları olup oluşturmuş oldukları biyofilm yapılarından dolayı pek çok işletmede önemli sorunlar meydana getirmektedirler. Hücreler oluşturmuş oldukları polisakkarit temelli bu biyofilm yapıları sayesinde çeşitli çevresel stres koşullarına, dezenfeksiyon gibi işlemlere karşı planktonik mikroorganizmalara göre daha dirençli hale gelmekte ve yüksek sıcaklık, osmotik basınç, denatüre edici ajanlar gibi yaşamlarını tehdit eden pek çok maddenin varlığında yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Vu ve ark., 2009).

Mikroorganizmalarca oluşturulan biyofilm yapıları incelendiğinde farklı mikroorganizmalarda, hatta aynı türün farklı soyları arasında bile farklılıkların olduğu gözlenmiştir (Sutherland, 2001). Biyofilm oluşumu için mikroorganizmaların öncelikle bir yüzeye tutunması gerektiğinden ve yüzey ile etkileşimde hücre çeper yapısı büyük önem taşıdığından biyofilm oluşumunda gözlenen bu farklılıkların mikroorganizmaların hücre çeper yapılarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Termofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda yaşamaya uyum sağlaması ve bu uyumun bir sonucu olarak hücre çeperlerinin mezofilik mikroorganizmalara göre farklılıklar göstermesi termofilik mikroorganizmalarca oluşturulan biyofilm yapılarını daha da dikkat çekici kılmaktadır.

Bu tez çalışması termofilik bir bakteri olan *Geobacillus kaustophilus*'un vejetatif ve spor yapılarının 96 kuyucuklu polistiren doku kültür plateleri üzerinde tutunmasına farklı besin konsantrasyonlarının, farklı sıcaklıkların ve hücre duvar yüzeyini denatüre edici ajanların etkisinin çalışılmasını kapsamaktadır. Daha önce çelik yapılar üzerinde yapılmış olan biyofilm çalışmaları son zamanlarda hem sterilizasyon kolaylığı sağlaması hem de daha kolay çalışmaya imkan vermesi nedeniyle polistiren yapılı plateler üzerinde çalışılmaktadır. Bu amaçla bu tez çalışmasında da polistiren yapılı 96 kuyucuklu doku kültür plateleri tercih edilmiştir. Ayrıca bu plateler hidrofobik yüzey özellikleri nedeniyle biyofilm oluşumuna olumlu yönde etki etmelerinden dolayı da çalışmalarda tercih edilmektedir.

Tez çalışmasında ilk olarak biyofilm oluşumu için kullanılacak hücre süspansiyon yoğunluğuna karar verilmiştir ve literatürde biyofilm çalışmalarında genel olarak kullanılan 10^6 CFU/ml hücre yoğunluğu burada da esas alınmıştır. Buna göre bu hücre yoğunluğuna karşılık gelecek optik densidite değeri (OD_{600}) 0,1 olacak şekilde hazırlanmış ve tutunma yüzeyi olarak kullanılan 96 kuyucuklu polistiren doku kültür platelerinin her bir kuyucugunda 20 μ l olacak şekilde kullanılmıştır.

Biyofilm oluşumu, birbirini izleyen çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçlerin bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Farklı mikroorganizmaların metabolik farklılıklarına bağlı olarak biyofilm oluşturabilmeleri için gerekli süre ve biyofilm oluşturma yetenekleri farklılıklar göstermektedir. Elhariry ve arkadaşlarının 2008 yılında *Bacillus* türleri (*Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus*) ile yaptığı çalışmada, bu mezofilik bakterilerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda orta dereceli biyofilm oluşturdıkları belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında ise *Geobacillus kaustophilus* vejetatif hücreleri 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168. saatlik sürelerde inkübe edilmiş ve en iyi tutunma 144 ve 168. saatlerde gözlenirken 24 ve 48. saatlerde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Biyofilm oluşumunun mikroorganizmaların metabolik olayları ile doğrudan ilişkili olduğu ve bu nedenle mikroorganizmaların biyofilm oluşturmaları için gerekli en uygun sıcaklığın en iyi büyüyebildikleri sıcaklık olduğu düşünülmektedir (Wang ve ark., 2007). Bu amaçla çalışmamızda farklı sıcaklıkların biyofilm oluşumuna etkisi incelenmiş ve biyofilm oluşumu için en uygun sıcaklığın *Geobacillus kaustophilus*'un en iyi büyüyebildiği sıcaklık olan 55°C olduğu belirlenmiştir. Ayrıca farklı inkübasyon sıcaklıklarında biyofilm oluşumunda önemli değişimler gözlenmiştir. 55°C'nin altındaki sıcaklıklarda biyofilm oluşumu önemli derecede azalırken *Geobacillus kaustophilus*'ta biyofilm oluşumunun yüksek sıcaklıklarda daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. *Geobacillus kaustophilus*'un sıcaklığa bağlı olarak büyüme aralığı 37-74°C olmakla birlikte biyofilm oluşumu 50°C'nin altında ve 70°C'nin üstünde gözlenmemiştir. Bu sonucun hücreler tarafından yüksek sıcaklıklarda üretilen ısı şoku proteinleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. 50°C'nin altında ve 70°C'nin üstünde ise biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda biyofilm oluşumunun inhibe olmasının nedeninin tutunmada

görevli yüzey proteinlerinin denatürasyonu ile ilgili olduğu, düşük sıcaklıklarda biyofilm oluşumunun inhibisyonunun ise hücre yüzey hidrofobisitesinin azalması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Elhariry ve ark., 2008).

Besin miktarının mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunda çok önemli etkisinin olduğu bilinmektedir. Glukoz birçok yiyecek ve içecek içinde bulunan temel gıda maddesi olup biyofilm oluşum miktarında artış meydana getirdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Elhariry ve arkadaşları *Bacillus* türleriyle yaptıkları çalışmada tutunma ortamına eklenen glukozun biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilediğini ve biyofilm oluşumu için en uygun glukoz konsantrasyonunun farklı suşlarda değişim gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise glukozun biyofilm oluşumunu farklı inkübasyon sürelerinde farklı şekilde etkilediği gözlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 168. saate kadar glukozun farklı oranlarının biyofilm oluşumuna olumsuz etki ettiği tespit edilmiştir. 168. saatlik inkübasyonda ise glukozun biyofilm oluşumunu arttırdığı ve en iyi tutunmanın %5'lik glukoz varlığında gerçekleştiği ancak glukoz konsantrasyonu %7 olduğunda bu inkübasyon süresinde ~%50 oranında bir inhibisyon gözlenmiştir. Glukozun biyofilm oluşumunun ilk aşamalarını olumsuz etkilemesinin ortamın azalan su aktivitesinden kaynaklandığı düşünülürken ilerleyen aşamalarındaki olumlu etkisi ise glukozun biyofilm oluşumunun sekonder kolonizasyon aşamasında rol alması ile ilişkilendirilmektedir. Biyofilm oluşumunda sekonder kolonizasyon basamağı EPS varlığında gerçekleştiğinden ve EPS'nin polisakkarit ağırlıklı polimerler içerdiğinden ortamdaki glukoz varlığının biyofilm oluşturma yeteneğini bu evrede arttırdığı düşünülmektedir (Lim ve ark., 2003). Ayrıca farklı glukoz konsantrasyonları ile hücre büyüme miktarı arasındaki ilişkiyi belirleyebilmek amacıyla hücreler TSB'ye farklı glukoz konsantrasyonlarının eklenmesiyle oluşturulan ortamlarda 81 saat çalkalamasız olarak büyütülmüştür. Elde edilen büyüme grafiklerinde TSB, TSB'ye %1 ve %5 glukoz konsantrasyonlarının eklendiği ortamlarda hücre büyüme miktarında önemli bir değişim gözlenmezken hücrelerin biyofilm oluşturma miktarında değişimlerin gözlenmesi hücrelerin büyüme miktarı ile biyofilm oluşturma miktarında doğrudan bir ilişkinin olmadığını göstermektedir. %7 glukoz varlığında ise hem hücre büyümesi hem de biyofilm oluşumu çarpıcı bir biçimde azalmaktadır.

NaCl hücreler için önemli olan diğer bir besinsel ihtiyaç olup NaCl'nin bulunmadığı ortamlarda bakteriyal büyümenin gerçekleşmediği bilinmektedir. NaCl bakteriyal büyümenin yanında biyofilm oluşumu üzerinde de olumlu etki yaratmaktadır (Lim ve ark., 2003, Elhariry ve ark., 2008). Bu tez çalışmasında da biyofilm oluşum ortamına eklenen NaCl biyofilm oluşumunda belirgin bir artışa neden olmuştur. En iyi tutunma %3 NaCl derişiminde meydana gelmiş ancak %3 üzerindeki tuz konsantrasyonları biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tuz varlığı biyofilm oluşumu için gerekli süreyi de kısaltmıştır. Buna göre 96. saatin sonunda kontrol grubunda biyofilm oluşumu gözlenmezken, %1 ve %3 NaCl varlığında biyofilm oluşumu gerçekleşmiştir. NaCl bu olumlu etkiyi katyonik yüzeylerde başlangıç tutunmasına etki etme yoluyla gerçekleştirmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada NaCl'nin iyonlaşması sonucu oluşan Cl⁻ iyonlarının yüzey yapısında bulunan katyonlarla etkileşime geçerek biyofilm oluşumunu desteklediği belirtilmiştir (Sutherland ve ark., 2001). Bununla birlikte %3'ün üzerindeki tuz konsantrasyonunun biyofilm oluşumundaki olumsuz etkisinin yüksek miktardaki tuzun hücreler üzerinde yarattığı osmotik şok etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Lim ve arkadaşlarına (2003) göre ortamdaki fazla tuz varlığı nedeniyle hücrenin su aktivitesi azalmakta ve metabolik işlevler aksamaya uğramaktadır. Ayrıca NaCl'nin biyofilm oluşumu üzerindeki olumlu etkisinin hücre büyümesinden bağımsız olarak gerçekleştiğini belirleyebilmek amacıyla büyüme ortamına farklı NaCl konsantrasyonları eklenen hücreler 81 saat çalkalamasız olarak büyütülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlara %1 ve %3 NaCl konsantrasyonlarının eklendiği ortamlarda hücre büyüme miktarında önemli bir değişim gözlenmezken hücrelerin biyofilm oluşturma miktarında değişimlerin gözlenmesi hücrelerin büyüme miktarı ile biyofilm oluşturma miktarında doğrudan bir ilişkinin olmadığını göstermektedir. %5 NaCl varlığında ise osmotik basıncın artışına bağlı olarak hem hücre büyümesi hem de biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Glukozun veya NaCl'nin *Geobacillus kaustophilus* biyofilm oluşturma yeteneğini arttırması üzerine bu iki besin maddesinin biyofilm oluşumu üzerine ortak etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda, en iyi biyofilm oluşumunun %3 glukoz ve %1.5 NaCl derişimine sahip olan deney ortamında gerçekleştiği, konsantrasyonlar

arttırıldığında ise biyofilm oluşumunun inhibe olduğu gözlenmiştir. En iyi biyofilm oluşumunun gerçekleştiği %5 glukoz konsantrasyonu ve %3 NaCl konsantrasyonunun birarada kullanılmasının biyofilm oluşumunu inhibe etmesinin ise yüksek osmotik basınç ve azalan su aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar Rode ve arkadaşlarının 2006 yılında farklı glukoz ve tuz konsantrasyonlarını birarada kullanarak yaptığı biyofilm çalışmaları ile uyum göstermektedir. Bu çalışmada *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*'in farklı suşlarının farklı glukoz ve tuz konsantrasyonlarından olumlu etkilendiği gösterilmiştir.

Biyofilm yapısının en önemli bileşenlerinin biyofilm yapısına katılan hücrelerin sentezlemiş olduğu polimerler olduğu bilinmektedir. Polimer sentezi ancak canlı hücreler tarafından gerçekleştirildiğinden biyofilm oluşumunda hücre canlılığı son derece önemlidir. Bu amaçla bu tez çalışmasında hücre canlılığının biyofilm oluşumu ve tutunma üzerine etkisini gözlemlemek amacıyla canlılar üzerinde olumsuz etkiler yarattığı bilinen ısı şoku ve UV uygulamaları kullanılmıştır. Hücrelerin 100°C'da 20 dk ısı şokuna maruz bırakılmasının ardından tutunma gerçekleştirmediği gözlenmiştir. Bu durum cansız hücrelerin tutunma gerçekleştiremediği sonucunu ortaya koymaktadır. Hücrelerin dönüşümsüz tutunmasında gerekli olan EPS, cansız hücrelerde sentezlenememektedir ve cansız hücreler hidrostatik etkileşimler yoluyla yüzeylere dönüşümlü olarak tutunsa bile devamında dönüşümsüz tutunma gerçekleştiremediklerinden tutunma ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedirler. Ayrıca cansız hücreler quorum sensing mekanizması için gerekli feromonları üretemediklerinden biyofilm oluşumunu gerçekleştirememektedirler. Aynı şekilde, UV ile 15 dk muamele edilen hücrelerde de tutunmanın gerçekleşmediği gözlenmiştir. Bu durum ısı şoku uygulamasıyla paralellik gösterecek şekilde hücrenin polisakkarit, yüzey proteinleri ve feromon sentezleyememesi ile yakından ilişkilidir.

Biyofilm oluşumunda hücre yüzey polisakkaritleri ve proteinleri büyük önem taşımaktadır. Hücre yüzeylerinde meydana getirilecek değişiklikler hücrelerin yüzeylere tutunmasında önemli değişimlere neden olabilmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında hücre yüzey polisakkaritlerine etki ettiği bilinen lizozim ve hücre yüzey

proteinlerine etki ettiği bilinen SDS gibi ajanların *Geobacillus kaustophilus*'un polistiren yüzeye tutunmasındaki etkisi araştırılmıştır. Lizozim ile muamele edilen hücrelerde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Lizozim hücre duvarındaki N-asetil muramik asit ile N-asetil glukozamin arasındaki β -1,4 glikozitik bağlarını yıkarak peptidoglikan sentezini inhibe etmektedir. Gram(+) mikroorganizmalarda peptidoglikan tabakası bulunmaktadır bu yapıdaki polisakkaritler tutunma yüzeyi ile etkileşimde önemli bir rol oynamaktadır Yaptığımız çalışmalarda kullanılan tüm lizozim konsantrasyonları, kalın peptidoglikan tabakasına sahip Gram(+) bir bakteri olan *Geobacillus kaustophilus*'ta biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Ayrıca lizozimin biyofilm oluşumundaki olumsuz etkisinin hücre yüzeyini çevreleyen polisakkaritler arasındaki bağları kırma yoluyla ve hücre büyümesinden bağımsız olarak gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla *G. kaustophilus*'un büyüme ortamına biyofilm oluşumunu engelleyen en düşük lizozim konsantrasyonu (TSB+%0.02) ilave edilerek 81 saat çalkalamasız olarak büyütülmüştür. Elde ettiğimiz büyüme eğrisi grafiklerine göre biyofilm oluşumunun gözlenmediği bu konsantrasyonda kontrole yakın oranda hücre büyümesinin gerçekleşmesi, büyüme miktarı ile biyofilm oluşturma miktarı arasında doğrudan bir ilişkinin olmadığını göstermiştir.

Bir diğer hücre duvarını tahrip edici ajan olan SDS de lizozime benzer şekilde biyofilm oluşumunda azalmalar meydana getirmiştir. Lizozimin etkisiyle karşılaştırıldığında, SDS'nin tutunma üzerindeki inhibisyon etkisinin daha az olduğu belirlenmiştir. SDS, lizozimin tersine hücre yüzey polisakkaritleri üzerinde etki göstermezken hücre yüzey proteinlerinin denatürasyonu ile ilişkilidir ve SDS uygulamasıyla birlikte biyofilm oluşumunda azalmanın meydana gelmesi hücre yüzey proteinlerinin biyofilm oluşumunda rolünün olduğunu göstermektedir. Ayrıca hücreler SDS varlığında ve SDS'den yoksun ortamda büyüme miktarı arasındaki ilişkiyi belirleyebilmek amacıyla TSB ve TSB'ya farklı SDS konsantrasyonlarının ilave edilmesiyle hazırlanan ortamlarda 81 saat çalkalamasız olarak büyütülmüştür. Büyüme grafiklerinden elde edilen sonuçlarda SDS ilave edilen ortamlardaki hücre büyüme miktarında kontrole göre önemli bir değişim gözlenmezken hücrelerin biyofilm oluşum miktarlarında önemli değişimlerin gözlenmesi hücrelerin büyüme miktarı ile biyofilm oluşturma miktarında doğrudan bir ilişkinin olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte lizozim uygulamasının biyofilm oluşumunu üzerindeki inhibisyon etkisinin SDS uygulaması ile karşılaştırıldığında daha güçlü

olması, hücre yüzey polisakkaritlerinin tutunmadaki etkisinin hücre yüzey proteinlerine oranla daha fazla olduğu sonucunu göstermektedir.

Vejetatif hücrelerin yanında spor yapıları da çeşitli yüzeylere tutunma göstermektedirler. Vejetatif yapıların aksine sporların yüzeylere tutunmasında spor kılıf proteinlerinin rolü büyüktür (Parkar ve ark., 2001). Kılıf proteinleri spor yapılarına hidrofobisite özelliği kazandırmaktadır ve böylece sporlar hidrofobik yüzeylere vejetatif hücrelere göre daha güçlü tutunma gerçekleştirebilmektedirler (Elhariry ve ark., 2008). Bu tez çalışmasında *Geobacillus kaustophilus* sporlarının 24 kuyucuklu plateler üzerinde tutunma miktarı çalışılmış ve vejetatif hücreler ile karşılaştırıldığında spor yapılarının daha fazla tutunma gösterdiği bulunmuştur. *Geobacillus kaustophilus* vejetatif hücreleri 24 saat sonunda 9×10^5 CFU/ml hücre yoğunluğuna ulaşırken spor yapıları aynı yoğunluğa 6 saatte ulaşmışlardır. Bu durum kılıf yapısının varlığından dolayı hidrofobik bir yüzey özelliğine sahip olan sporların hidrofobik yüzeyler ile vejetatif hücrelere göre daha güçlü ilişki kurabildiğini göstermektedir.

Spor yapıları da vejetatif hücreler gibi yüzey denatüre edici ajanlar ile muameleden etkilenmektedirler. Ancak vejetatif hücreler ile spor yapılarının yüzeyleri farklılıklar göstermektedir. Vejetatif hücrelerde hücre duvarının yapısı polisakkarit ağırlıklı olmakla birlikte spor yapılarının dış yüzeyleri protein bir kılıf ile örtülüdür. Ayrıca *Geobacillus* spor yapılarının kılıf yapısının üzerinde ekzospore yapılarına sahip oldukları bilinmektedir. Bu tez çalışmasında da SDS ve lizozimin *Geobacillus kaustophilus* spor yapılarının tutunmasına olan etkisinin araştırılması sonucu hem lizozim hem de SDS uygulamasının sporların tutunmasında azalma meydana getirdiği; ancak bu azalmanın SDS ile muamele sonucu daha fazla olduğu gözlenmiştir. Yüksek SDS derişimleri spor yüzey protein yapılarında defektlere neden olmakta ve spor yapılarının hidrofobisitesinde meydana gelen azalmadan dolayı tutunma miktarında önemli azalmaya neden olduğu düşünülmektedir (Parkar ve ark., 2001).

5. SONUÇLAR

1. *Geobacillus kaustophilus* polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşturmuş ve en iyi tutunmayı 168. saatte (7. gün) gerçekleştirmiştir.
2. *Geobacillus kaustophilus* biyofilm oluşumu için optimum sıcaklık derecesinin 55°C olduğu tespit edilmiştir.
3. *Geobacillus kaustophilus*'un en iyi biyofilm oluşturduğu glukoz konsantrasyonu %5, en tuz konsantrasyonu ise %3 olarak belirlenmiştir. Glukoz ve NaCl'nin birlikte en etkin olduğu konsantrasyonlar ise sırasıyla %3 ve %1.5'tur. %5 glukoz ve %3 NaCl oranında ise biyofilm oluşumu inhibe olmuştur.
4. Isı şoku ve UV uygulanan *Geobacillus kaustophilus* hücrelerinde tutunma gözlenmemiştir.
5. Hücre yüzey polisakkaritlerine etki ettiği bilinen lizozim ile muamele sonucu biyofilm oluşumu gözlenmezken hücre yüzey proteinlerine etki ettiği bilinen SDS ile muamele sonucunda biyofilm oluşumunda azalma gözlenmiştir.
6. Vejetatif hücrelerle karşılaştırıldığında *Geobacillus kaustophilus* spor yapıları polistiren yüzeylere daha güçlü tutunma göstermiştir.
7. Spor yapıları lizozim muamelesine direnç gösterirken SDS muamelesi sonucu polistiren yüzeye tutunmada önemli azalmalar meydana gelmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Ankolekar, C., Labbe, R.G., 2010.** Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 982–984.
2. **Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., Gohar, M., 2006.** Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*, 72: 937-941.
3. **Bose, S., Khodke, M., Basak, S., Mallick, S.K., 2009.** Detection of Biofilm Producing *Staphylococci*: Need Of The Hour. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 3: 1915-1920.
4. **Branda, S.S., Frances, C., Kearns, D.B., Losick, R., Kolter, R., 2006.** A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59 (4): 1229–1238.
5. **Burgess, S.A., Lindsay, D., Flint, S.H., 2010.** Thermophilic *Bacilli* and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 215-225.
6. **Challan, B.S., Gal, L., Margiewes, S., Garmyn, D., Piveteau, P., Guzzo, J., 2006.** Assessment of the roles of LuxS, S-ribosyl homocysteine, and autoinducer 2 in cell attachment during biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied Environmental Microbiology*, 72:2644-2650.
7. **Chen, L., Coolbear, T., Daniel, R.M., 2004.** Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal*, 14: 495–504.
8. **Chen, S.Q., Tang, Q.Y., Zhang, X.D., Zhao, G.H., Hu, X.S., Liao, X.J., Chen, F., Wu, J.H., Xiang H., 2006.** Isolation and characterization of thermo-

acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. *Food Microbiology*, 23: 439–445.

9. **Christensen, B. E., 1989.** The Role of Extracellular Polysaccharides in Biofilms. *Journal Biotechnology*, 10: 181-202.
10. **Christopher, M.W., Bonnie, L.B., 2005.** Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 319–46.
11. **Cooksey, K.E., 1992.** Extracellular Polymers in Biofilms. *Biofilms-Science and Technology*, 137-147.
12. **Costerton, J.W., Stewart, P.S., 2001.** Battling biofilms. *Scientific American*, 285(1): 74-81.
13. **Davey, M.E., Otoole, G.A., 2000.** Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4): 847-867.
14. **Donlan, R.M., 2002.** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Disease*, 8(9), 881-890.
15. **Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review*, 15: 167-193.
16. **Douglas, L.J., 2003.** *Candida* Biofilms and Their Role in Infection. *Trends in Microbiology*, 11:30-36.
17. **Elhariry, H.M., 2008.** Biofilm Formation by Endospore *Bacilli* on Plastic Surface under Some Food Related and Environmental Stres Conditions. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3(2): 69-78.

18. **Ellar, D.J., 1966.** Fine structure of sporulation in *Bacillus cereus* grown in a chemically defined medium. *Journal of Bacteriology*, 92: 1748–1759.
19. **Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W, Stoodley, P., 2004.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *National Review Microbiology*, 2(2): 95-108.
20. **Hardie, K.R., Heurlier, K., 2008.** Establishing bacterial communities by ‘word of mouth’: LuxS and autoinducer 2 in biofilm development. *National Review Microbiology*, 6: 635-643.
21. **Kalogridou-Vassiliadou, D., 1992.** Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. *Journal of Dairy Science*, 75: 2681–2686.
22. **Labbate, M., Qec, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2004.** Quorum Sensing-controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal Bacteriology*, 186(3): 692-688.
23. **Lemon, K.P., Higgins, D.E., Kolter, R., 2007.** Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189: 4418-4424.
24. **Lim, Y., Jana, M., Luong, T., Lee, C.Y., 2003.** Control of Glucose and NaCl Induced Biofilm Formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 186(3): 722–729.
25. **Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., Flemming, H.C, 1999.** The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Journal Biotechnology*, 26(1): 3-16.

26. **Morikava, M., 2006.** Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(1):1-8.
27. **Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltoraus, A.B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunya, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., Ivanov, M.V., 2001.** Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2):433-446.
28. **O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter R., 2000.** Biofilm formation as microbial development. *Annual Review Microbiology*, 54: 49–79.
29. **Ophir, T., Gutnick, D.L., 1994.** A Role for Exopolysaccharide in The Protection of Microorganisms from Desiccation. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 740 -745.
30. **Parkar, S.G., Flint, S.H., Brooks, J.D., 2003.** Physiology of biofilms of thermophilic bacilli potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30:553–560.
31. **Parkar, S.G., Flint, S.H., Palmer, J.S., Brooks, J.D., 2001.** Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 901–908.
32. **Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Ehrlich, G.D., 2007.** The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion in Otolaryngology Head Neck Surgery*, 15(5): 347-351.

33. **Priest F.G., 1993.** Systematics and ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, pp.3-33. Edited by A.L. Sonenshein, J.A. Hoch&R. Losick. *American Society for Microbiology*, Washington, DC.
34. **Roberts, A.P., Pratten, J., Wilson, M., Mullany, P., 1999.** Transfer of A Conjugative Transposon, Tn5397 in A Model Oral Boil. *FEMS Microbiology Letters*, 177: 63-66.
35. **Rode, M.T., Langsrud, S., Holck, A., Moretro, T., 2006.** Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 116: 372-383.
36. **Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Ruckert, A., Morgan, H.W., 2003.** A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 45–61.
37. **Schachter, B., 2003.** Slimmy business: the biotechnology of biofilms. *Nature biotechnology*, 21: 361-365.
38. **Schelderman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P., Heyndrickx, M., 2005.** Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1480–1494.
39. **Scott, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M.R., Flint, S.H., 2007.** The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, 60: 109–117.
40. **Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J., Bremer, P.J., 2008.** Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 731–737.

41. **Simoës, M., Simoës L.C., Vieira, M.J., 2010.** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 573–583.
42. **Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006.** Biofilms: Implications in Bioremediation. *Trends in Microbiology*, 14(9): 389-397.
43. **Sutherland, I.W., 2001.** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147: 3-9.
44. **Takami, H., Takaki, Y., Chee, G., Nishi, S., Shimamura, S., Suzuki, H., Matsui, S., Uchiyama, I., 2004.** Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Nucleic Acids Research*, 32(21): 6292-6303.
45. **Todhanakasem, T., Young, G.M., 2008.** Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *Journal of Bacteriology*, 190: 6030-6034.
46. **Van der Veen S., Abee, T., 2010.** Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal Food Microbiology*, 144(3): 421-431.
47. **Van Loosdrecht, M., Lyklema, C.J., Norde, W., Zehnder, A.J., 1990.** Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiology Review*, 54(1):75-87.
48. **Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., Kolter, R., 2008.** Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Development*, 22: 945-953.
49. **Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2009.** Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules*, 14: 2535-2554.

50. **Wang, C., Li, M., Dong, D., Wang, J., Ren, J., Otto, M., Gao, Q., 2007.** Role of Clp P in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes and Infection*, 9: 1376-1383.
51. **Zeigler, D.R., 2001.** *Bacillus* Genetic Stock Centre Catalog of Strains 7th Edition , Volume 3 .

ÖZGEÇMİŞ

Tuba Korkmaz 13 Ağustos 1987’de Kocaeli’de doğdu. 2005 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitime başladı. Lisans eğitimini 2009 yılında tamamlayarak 2010 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Yüksek lisans eğitime hala devam etmektedir.