T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAKTERİYAL BİYOFİLM OLUŞUMU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİCLE ARAR

DENİZLİ, TEMMUZ - 2015

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAKTERİYAL BİYOFİLM OLUŞUMU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİCLE ARAR

DENİZLİ, TEMMUZ - 2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

Dicle ARAR tarafından hazırlanan "**Bakteriyal Biyofilm Oluşumu**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 30.07.2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Danışman Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN Pamukkale Üniversitesi	.....
Üye Yrd. Doç. Dr. Yusuf ÖZCAN Pamukkale Üniversitesi	.....
Üye Yrd. Doç. Dr. Gülümser ACAR DOĞANLI Pamukkale Üniversitesi	.....

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/08/2015 tarih ve .29/10..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Orhan KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2013FBE026 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

DİCLE ARAR

ÖZET

BAKTERİYAL BİYOFİLM OLUŞUMU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
DİCLE ARAR
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI:PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

DENİZLİ, TEMMUZ - 2015

Biyofilm birlikte yaşayan ve birbirleriyle haberleşen bakterilerin oluşturduğu bir organizasyondur. Biyofilm bakterileri, antibiyotik, dezenfektan, ağır metal gibi olumsuz koşullara dirençlidirler ve böylelikle hastalık oluşturma riskleri de daha fazladır.

Çalışmamızda APİ kitine göre Metisiline Duyarlı *S. aureus* olduğu tespit edilen MSSA10 ve MSSA20 suşlarının biyofilm oluşum şartları araştırılmıştır. Ayrıca oluşan biyofilmin antibiyotik penetrasyonu inhibisyon etkisi ve bakteriyel EPS'nin antibiyofilm aktivitesi incelenmiştir. Saflaştırılan EPS'nin XRD, TGA, SEM ve SAXS analizleri yapılarak suşların oluşturduğu biyofilm ve EPS yapısı hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

Bakteriyal biyofilm oluşumunda en iyi şartların tespitinde pH (6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0), sıcaklık (37 °C ve 42 °C), karbon kaynakları (fruktoz, glikoz, mannitol ve sukroz) ve tuz konsantrasyonları (0.2-8 mg/L) araştırılmıştır. Her iki bakteri için de besiortamının alkali (pH=8) ve sıcaklığın 37 °C olması biyofilm oluşumunu önemli derecede hızlandırmıştır. MSSA 10 için karbon kaynağı ve tuz ilavesi biyofilm üretimini olumlu yönde etkilerken, MSSA 20'nin biyofilm oluşturmasını olumsuz etkilemiştir. En iyi şartlarda üretilen biyofilmin patojen bakterilere antibiyotik penetrasyonunu engellediği ve biyofilm konsantrasyonu arttıkça inhibisyon yüzdesinin de arttığı tespit edilmiştir.

XRD analizine göre, EPS'nin yapısının karbonhidrat (kitosan) ve proteinden oluştuğu tespit edilirken, TGA analizi ile zayıf kristal yapıda olduğu belirlenmiştir. SAXS analizleri sonucunda EPS'nin iki tabakalı kompakt bir yapıda olduğu ve hücrelerin EPS içerisine gömülü olduğu bulunmuştur. SEM analizinde hücrelerin EPS matriksi yüzeyinde topluluklar halinde veya tek hücreler şeklinde olduğu görülmüştür. EPS matriksi yoğun tabaka halinde veya iplikler şeklindedir ve hücreleri birbirlerine bağlamışlardır.

Ayrıca sunulan bu tezde, saf EPS'nin antibiyoflm etkisi de incelenmiştir. Her iki suşun EPS'si de en iyi *E. coli* ATCC 11230 suşunun biyofilm oluşumunu engellemiştir. Genel olarak, MSSA 10'un EPS'si MSSA 20'ye kıyasla daha iyi antibiyofilm etkiye sahiptir.

ANAHTAR KELİMELER: Biyofilm, MSSA, EPS, SAXS, XRD

ABSTRACT

BACTERIAL BIOFILM FORMATION
MSC THESIS
DİCLE ARAR
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR:PROF. DR. NAZİME MERCAN DOĞAN)

DENİZLİ, JULY 2015

Biofilm is an organization formed by bacteria living together and communicating with each other. Biofilm bacteria are resistant environmental conditions such as heavy metals, antibiotics, disinfectants and so are more at risk of causing disease.

In our study, the biofilm forming conditions of MSSA10 and MSSA20 identified as Methicillin-sensitive *S. aureus* determined according to APi kits were investigated. The effect of the antibiotic penetration inhibition of biofilm and antibiofilm activity of EPS was also examined. The analysis of pure EPS was performed XRD, TGA, SEM and SAXS analyzes were performed to obtain information about the structure of the biofilm and EPS.

To determining of the best conditions of biofilm forming, pH (6.0, 7.0, 8.0, 9.0 and 10.0), temperature (37 °C and 42 °C), carbon sources (fructose, glucose, mannitol and sucrose) and salt concentrations (from 0.2-8 mg/L) were investigated. Alkaline medium (pH=8) and temperature of 37 °C increased significantly the formation of biofilm in strains. While the biofilm forming of MSSA10 increased to addition carbon source and salt, the biofilm forming of MSSA20 inhibited. It was determined that the bacterial biofilms of two strains formed under optimal conditions inhibited antibiotic penetration against pathogen bacteria and also the increasing biofilm concentration increased inhibition rate.

According to XRD analysis, it was identified that the carbonhydrate and (chitosan) and protein were found in the structure of EPS and it was a weak crystal structure with TGA analysis. As a result of SAXS analysis, the bacterial EPS is an bilayer and the compact structure, and it was found that the cells embedded in EPS. SEM investigations of EPS show that MSSA10 and 20 cells are found both single and dense clusters within the polymeric carbohydrate matrix. The cells connected each other's with thin EPS fibers or filaments. EPS matrix was shown as mostly condensed lamellas and rarely rolled layers.

In present thesis, the antibiofilm effect of pure EPS was also investigated against pathogen bacteria. EPSs of both strains prevented biofilm formation of *E. coli* ATCC 11230. In general, the EPS of MSSA10 was more effect than EPS of MSSA20.

KEYWORDS: Biofilm, MSSA, EPS, SAXS, XRD

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **v**
TABLO LİSTESİ ..... **vi**
SEMBOL LİSTESİ ..... **vii**
ÖNSÖZ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1 Biyofilmin Tanımı 3
2.2 Biyofilmin Tarihçesi 4
2.3 Biyofilmin Yapısı 6
2.4 Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri 7
2.4.1 Savunma 7
2.4.2 Adhezyon ve Kolonizasyon 8
2.4.3 Yaşanabilir Çevre Geliştirmek 8
2.4.4 Kommunite Oluşturmak 8
2.5 Biyofilm Oluşum Basamakları 9
2.5.1 Tutunma 9
2.5.2 Yapışma 10
2.5.3 Toplanma 10
2.5.4 Olgun Biyofilm 10
2.5.5 Kopma veya Ayrılma 10
2.6 Biyofilm Oluşturma Avantajları 11
2.7 Biyofilm Antimikrobiyallere Karşı Direnci 11
2.8 Ekzopolisakkarit (EPS)'nin Yapısı ve Özellikleri 12
2.9 EPS'nin Önemi 14
2.10 Küçük Açı X-Işını Saçılma (SAXS) Yöntemi 14
2.10.1 Bir SAXS Eğrisinin Analizi 15
2.11 X-ışını Kırınımı (XRD) Yöntemi 17
2.12 Termogravimetrik Analiz (TGA) Yöntemi 17
3. YÖNTEM **19**
3.1 Çalışmada Kullanılan Bakteriler: 19
3.2 MRSA İzolatlarının Tiplendirilmesi 20
3.3 Biyofilm Oluşturan Bakterilerin Seçimi 20
3.4 Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi 20
3.5 Biyofilm Oluşumunun Kalitatif Tayini 21
3.6 Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Tayini 21
3.7 Biyofilm Oluşumuna Etki Eden Optimal Şartların Belirlenmesi 22
3.8 Biyofilmin Antibiyotik Penetrasyonu Üzerine Etkisi 22
3.9 EPS'nin Antibiyofilm Etkisi 23
3.10 Bakteriyal EPS'nin Karakterizasyonu 23
3.10.1 EPS Saflaştırma 23
3.10.2 Toplam Şeker Tayini 24
3.10.3 Toplam Protein Tayini 25

3.10.4 Üronik Asit Miktarı Belirleme 25
3.11 Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) Görüntüleme 25
3.12 SAXS Yöntemi ile Yapılan Analizler 26
3.13 X-Işınları Kırınımı (XRD) 26
3.14 Termal Analizler (TGA) 27
4. BULGULAR 28
4.1 MRSA bakterilerinin tiplendirilmesi 28
4.2 Biyofilm Oluşturan Bakterilerin Seçimi 29
4.3 MRSA'ların Antibiyotik Dirençlilik Profilleri 31
4.4 Biyofilm Oluşumunun Kalitatif Tayini 33
4.5 Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Tayini ve Biyofilm Oluşumuna Optimal Şartların Belirlenmesi 35
4.5.1 Biyofilm Oluşumuna pH'nın Etkisi 35
4.5.2 Biyofilm Oluşumuna Sıcaklık ve Tuzun Etkisi 37
4.5.3 Biyofilm oluşumuna karbon kaynaklarının etkisi 37
4.6 Biyofilmin Antibiyotik Penetrasyonu Üzerine Etkisi 48
4.7 EPS'nin Antibiyofilm Etkisi 52
4.8 EPS'nin Yapısı 53
4.9 Taramalı (Scanning) Elektron Mikroskop ile Görüntüleme 54
4.10 SAXS Yöntemi ile Yapılan Analizler 55
4.11 X-Işınları Kırınımı (XRD) 58
4.12 Termal Analizler (TGA) 60
5. TARTIŞMA 62
5.1 Biyofilm Oluşturan Bakterilerin Seçimi ve kalitatif tayinleri 63
5.2 Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Tayini ve Biyofilm Oluşumunda Optimal Şartların Belirlenmesi 63
5.3 Biyofilmin antibiyotik penetrasyonu üzerine etkisi 65
5.4 EPS yapısı ve antibiyofilm etkisi 66
5.5 EPS karakterizasyonu 67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 69
7. KAYNAKLAR 71
8. EKLER 80
EK A: Araştırmada kullanılan besi ortamları ve kimyasal maddeler 80
9. ÖZGEÇMİŞ 82

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: SAXS eğrisinin analizi 16
Şekil 2: Biyofilmin antibiyotik penetrasyonu üzerine etkisinin deneysel şematik görünümü 23
Şekil 3: MRSA 17'nin APİ KİT pozitif aglütinasyonu (A) ve MSSA 16'nın negatif aglütinasyonu (B). Pozitif kısma R1 reaktifi negatif kısmı ise R2 reaktifi damlatılmıştır. 29
Şekil 4: Besiyeri yüzeyinde siyah koloni (B) biyofilm pozitif, renk değişimi gözlenmeyen (A) biyofilm negatif 31
Şekil 5: Tüp dilüsyon yöntemine göre biyofilm oluşumunun belirlenmesi. Biyofilm pozitif MSSA 18 (A) ve biyofilm negatif MRSA 13 (B) 33
Şekil 6: MSSA 20 biyofilminin farklı konsantrasyonlarında *B. subtilus* NRRL-B-209 suşunda chloramphenicol antibiyotiğinin penetrasyon etkisinin azalması 52
Şekil 7: Biyofilm matriksinin ve hücrelerin SEM görünümü A: MSSA 20, (B): MSSA 10 55
Şekil 8: Farklı çözeltilerdeki EPS 'nin SAXS grafik desenleri 56
Şekil 9: 24 °C'de iki farklı çözeltide aynı pH değerine sahip EPS SAXS uyum grafiği gösterilmektedir. 56
Şekil 10: (a) EPS'nin oluşturduğu biofilmin yayvan-basık elipsoid (prolate) çekirdek modelin şematik olarak gösterimi, R_{min}; minör ve R_{max}; majör yarıçap. (b) Yapının oluşturduğu membran yapı modeli. 58
Şekil 11: MSSA 20 ve MSSA 10 EPS (supernatant-sup ve pellet-pel) ürünlerinin XRD desenleri. 59
Şekil 12: MSSA 20 ve MSSA 10 EPS (supernatant-sup ve pellet-pel) ürünlerinin TGA eğrileri. 61

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Çalışmada kullanılan bakteriler 19
Tablo 2: API identifikasyon kiti sonuçları 28
Tablo 3: Bakterilerin Kongo Red metoduna göre tarama sonuçları..... 30
Tablo 4: MRSA izolatlarının antibiyotik dirençlilik profilleri (inhibisyon zon çapı: mm)..... 32
Tablo 5: Tüp dilüsyon yöntemi ile biyofilm oluşumu 34
Tablo 6: MSSA 10 suşunun biyofilm oluşumuna pH'nın etkisi 35
Tablo 7: MSSA 20 suşunun biyofilm oluşumuna pH'nın etkisi 36
Tablo 8: MSSA 10'nun biyofilm oluşumuna farklı sıcaklık ve tuzun etkisi 38
Tablo 9: MSSA 20'nin biyofilm oluşumuna farklı sıcaklık ve tuzun etkisi 39
Tablo 10: MSSA 10 biyofilm oluşumuna früktozun etkisi 40
Tablo 11: MSSA 10 biyofilm oluşumuna glukozun etkisi..... 41
Tablo 12: MSSA 10 biyofilm oluşumuna mannitolün etkisi 42
Tablo 13: MSSA 10 biyofilm oluşumuna sukrozun etkisi..... 43
Tablo 14: MSSA 20 biyofilm oluşumuna früktozun etkisi 44
Tablo 15: MSSA 20 biyofilm oluşumuna glukozun etkisi..... 45
Tablo 16: MSSA 20 biyofilm oluşumuna mannitolün etkisi 46
Tablo 17: MSSA 20 biyofilm oluşumuna sukrozun etkisi..... 47
Tablo 18: Patojen bakterilerin antibiyotik dirençlilik profilleri (inhibisyon zon çapı:mm)..... 50
Tablo 19: MSSA 10 biyofilminin antibiyotik penetrasyonu üzerine inhibisyon etkisi (%) 51
Tablo 20: MSSA 20 biyofilminin antibiyotik penetrasyonu üzerine etkisi (%) 51
Tablo 21: MSSA 10 EPS'sinin antibiyofilm etkisi 52
Tablo 22: MSSA 20 EPS'sinin antibiyofilm etkisi 53
Tablo 23: Kuru EPS şeker, üronik asit ve protein içeriği 54
Tablo 24: Sulu ve serum albümin çözeltileri (A) MSSA 20 parçacık EPS a bölgesi için bir yapısal bilgi ile karakterize edilmiştir. 57
Tablo 25: Sulu ve serum albümin çözeltileri (A) MSSA 20 parçacık EPS b bölgesi için bir yapısal bilgi ile karakterize edilmiştir. 57
Tablo 26: MSSA 20 ve MSSA 10 EPS (supernatant-sup ve pellet-pel) ürünlerinin farklı sıcaklık evrelerine göre ağırlık kayıpları. 60

SEMBOL LİSTESİ

mm : Milimetre
Da : Dalton
UV : Ultraviyole
nm : Nanometre
mg : Miligram
g : Gram
µg : Mikrogram
dk : Dakika
Ar : Argon
N : Azot
rpm : Dakikadaki devir sayısı
µl : Mikrolitre
mcg : Mikrogram
TSB : Triptic soy broth
ml : Mililitre
L : Litre
µm : Mikrolitre
M : Molarite
mM : Mikromolar
s : Saniye
TSA : Triptic soy agar
EPS : Ekstrapolisakkarit
QS : Quarum sensing
MRSA : Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*
MSSA : Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus*
SAXS : Küçük açılı X-ışını saçılması
TGA : Termo-Gravimetrik Analiz
XRD : X ışınları Kırınımı Analizi
SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu
Å : Angstrom
q : Saçıcı Vektör
I : Şiddet
PBS : Fosfat tamponu
NaCl : Sodyumklorür
dH_2O : Distile su
H_2SO_4 : Sülfirik asit
N : Normalite

ÖNSÖZ

2013-2015 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'ın danışmanlığı altında yürütülen bu çalışma, yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışmamın başından sonuna kadar, öncesinde ve sonrasında maddi ve manevi destek ve yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, kendisiyle çalıştığım için her zaman şanslı hissettiğim, tecrübe ve eşssiz bilgilerinden yararlandığım, titiz ve disiplinli çalışmasını örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN'a,

XRD ve TGA analizlerini yapan ve tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Prof. Dr. Ömer BOZKAYA'ya

SAXS analizlerini yapan ve tez yazım aşamasında bana her zaman destek veren Yrd. Doç. Dr. Yusuf ÖZCAN'a

İyi günümde, kötü günümde bana destek olan, bilgisi ve deneyimiyle bana her zaman yol gösteren, değerli hocam Yard. Doç. Dr. Gülümser ACAR DOĞANLI'ya

Laboratuar çalışmalarım sırasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, iyi günümde, kötü günümde yanımda olan, pratik buluşlarıyla işleri her zaman kolaylaştıran ve beni her zaman motive eden çok değerli dostum ve tezyoldaşım Tuğba ŞENSOY CANDOĞAN'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasında pratik buluşlarıyla işleri her zaman kolaylaştıran ve beni her zaman motive eden, ne kadar geç çıkarsam çıkayım beni her zaman bekleyen, beni benden daha çok düşünen Kübra SOLMAZ'a

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi alışverişi yaptığım şarkılarıyla motive olduğumuz canım arkadaşım N. Nur Bozbeyoğlu'na

En stresli anlarımda bile beni her zaman alttan alan ve polyana davranışlarıyla sakinleştiğim canım arkadaşım Özlem Çetin'e,

Bana tecrübeleriyle destek veren, her konuda yanımda olan Dr. Ayşe UĞUR'a

Kimyada yüksek lisans yapmış olmasına rağmen fikirlerini ve yardımlarını benden eksik etmeyen arkadaşım Erkan AKSOY'a

Ayrıca eğitimim süresince maddi ve manevi yardımlarını eksik etmeyerek beni bugünlere özenle getiren çok değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Biyofilm, bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde yaşayan mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri ekstrasellüler polisakkaritler (EPS), proteinler, çevreden absorblanan organik ve inorganik maddelerden oluşan bir topluluktur (Prigent-Combaret ve diğ. 1999). Biyofilmin temel birimi olan mikrokolonilerde küf, maya, alg, protozoon, virüs ve bakteriler saf kültürler halinde bulunabildiği gibi karışık mikroorganizma toplulukları şeklinde de bulunabilir. Biyofilm, hücre dışı polimerik maddeler (EPS) salgılayıp cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok mikroorganizmanın bir araya gelmesiyle oluşan, "mikroplar şehri" olarak tanımlanmıştır (Watnick ve Kolter 2000; Lindsay ve Von Holy 2006; Kumar ve diğ. 2011). Biyofilmin üç boyutlu yapısının oluşumuna 'Quarum sensing" (QS) sinyal molekülleri, otoindükleyiciler veya EPS'nin salgılanmasına neden olan işlemler yol açar (Lawrence ve diğ. 1991; Hammer ve Bassler 2003). Planktonik hücreler ile karşılaştırıldığında fenotipik özellikleri, üreme hızları, antimikrobiyallere, antibiyotiklere ve konağın immün sistemine karşı direnç oranları, gen transkripsiyonları ve diğer hücrelerle etkileşimleri farklıdır (Sihorkar ve Vyas 2001; Kikuchi ve diğ. 2005; Allesen-Holm ve diğ. 2006).

Biyofilmler çeşitli ekolojik ortamlarda koruyucu ve fonksiyonel olarak rol oynarlar. Örneğin, endüstriyel alanlarda, farklı bakteri türlerinin oluşturduğu biyofilmler, insan ve fabrika atıklarının biyoremediasyonunda kullanılmaktadır (Vu ve diğ. 2009). Ayrıca, insan bağırsak epiteline tutunan bakterilerin oluşturduğu biyofilmler gıda kaynaklı patojenlere karşı koruyucu görevi görmektedir. İyi yönlerinin yanı sıra önemli ekonomik problemlere de yol açmaktadırlar. Örneğin, endüstriyel metal yüzeylerde sülfür indirgeyen ve oksitleyen bakteri türlerinin oluşturduğu biyofilm yapısı korozyona sebep olmaktadır. Ayrıca bazı biyofilmler gıdaların bozulmasına, patojenik bakterilerin gıdaların yüzey ile etkileşip kontaminasyonuna neden olurlar. Bu durum, gıdaların raf ömrünün kısalmasına, gıda kaynaklı hastalıklara ve bunların sonucunda ekonomik kayıpların artmasına neden olmaktadır (De Beer ve diğ. 1994).

İnsan ve hayvanlarda fırsatçı patojen olan *Staphylococ* türleri, deri, ter bezi kanalları ve membranlarda doğal olarak bulunmaktadır. Micrococcaceae familyası içinde 0.5-1.5 mm çapında düzensiz kümeler, tetrad, ikişerli kok ya da tek tek kok şeklinde görülen Gram (+) bakterilerdir (Schierholz ve Beuth 2001).

Staphylococcus aureus akut veya kronik infeksiyonlara neden olmaktadır. *S. aureus* suşlarının patojenitesi; aderans özellikleri, çeşitli toksinler, enzimler, yapısal ve ekstrasellüler faktörler gibi özelliklerine bağlıdır. Slime faktör üretmesi ve biyofilm oluşumu da patojenite faktörlerindendir. *S. aureus* vücut bölgelerine uygulanan tıbbi aletle ilişkili infeksiyonlardan en sık izole edilen mikroorganizmalardandır (Lowy 1998; Vancraeynest ve diğ. 2004). *S. aureus* bakterileri antibiyotiklerden korunarak, sepsis ve kronik infeksiyonlara da neden olmaktadır (Amorena ve diğ. 1999).

Her geçen gün gelişen biyosit ve dezenfektan dirençliliği nedeniyle kontrol edilmesi zorlaşan biyofilm bakterileri doğaya yayılarak insan ve çevre sağlığı açısından önemli sorunlara neden olmaktadır. Hiç kuşkusuz biyofilmlerle mücadelede, biyofilm oluşumu ile ilgili tüm kültürel şartlarının anlaşılmasının önemi büyüktür.

Bu yüksek lisans tezinin ana amacı, bazı patojen bakterilerin biyofilm oluşturma şartlarını araştırmaktır. Bu amaçla, Denizli Devlet Hastanesi'nden temin edilen hasta örneklerinden izole edilen ve PAÜ Bakteriyoloji Laboratuarı kültür stoklarında mevcut olan Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve Metisiline Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) suşları ile indikatör patojen bakteriler kullanılmıştır. Çalışmamızda patojen bakterilerin biyofilm oluşum mekanizmasını etkileyen kültür şartları belirlenmiştir. Ayrıca biyofilm matriksinin temelini oluşturan EPS ve biyofilm yapısının SAXS, XRD, SEM ve termal analizleri yapılarak, biyofilm yapısı hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır. Buna ilaveten, bakteri biyofilminin antibiyotik penetrasyonunu önleme özelliği ve EPS'nin antibiyofilm etkisi de incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Biyofilmin Tanımı

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak bakterilerin uyumlu ve yapısal bütünlük içerisinde yaşadığı kompleks bir organizasyondur (Çiftçi ve diğ. 2005; Kumar ve diğ. 2011). Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli olan yaşamsal işlevlerini yerine getirirler (Vu ve diğ. 2009).

Biyofilm canlı dokularda, diş ünitelerinde, medikal aletlerde, endüstriyel veya su sistemlerinde, ısıtıcılar ve doğal akuatik sistemler gibi çok çeşitli yüzeylerde meydana gelebilmektedir (Subramani ve diğ. 2009). Biyofilmin geliştiği çevreye bağlı olarak, biyofilm oluşumunda matrikste mineral kristalleri, korozyon, kil veya çamur parçacıkları, kan bileşenleri bulunabilir (Hallam ve diğ. 2001; Donlan 2002).

Yapılan araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, birbirlerine yapışmalarını sağlayan, büyüme oranını arttıran ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks içine gömülü belirli bir koordinasyon yeteneğinde ayrıca gen transkripsiyonları ile fenotipik farklılıklar gösteren bakterilerin oluşturduğu biyolojik sistemler olarak tanımlanmıştır (Donlan 2002). İçerisinde bulunan organizmaya bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler taşıyabilir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilmler, gram pozitif bakterilerin ise katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir (Çiftçi ve diğ. 2005).

Biyofilm oluşumu; su aktivitesi, besin ihtiyacı, antimikrobiyal madde içeriği, potansiyel hidrojen (pH) değeri, asidite, oksijen değişkeni ve elektriksel değişkenlik gibi iç faktörler ile yüzey materyali, yüzey alanı, yüzey düzgünlüğü,

sıvının akış hızı, sınırlı besin maddesi gibi dış faktörlere de bağlıdır (Donlan ve Costerton 2002; Douglas 2003).

Donlan ve Casterton biyofilm tanımını,

- Hücreler irreversibl olarak substrata, ara yüzeye veya birbirlerine tutunmuşlardır,
- Hücreler kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddeden oluşan bir matriks içerisinde gömülüdürler,
- Büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıklar vardır,

gibi özelliklere sahip mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamışlardır. Bu tanım; bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan bazı mikroorganizmaların oluşturduğu her tabakaya "biyofilm" denilmemesi açısından çok önemlidir. Aslında biyofilm tabakası olmayan bu topluluklar, bulundukları yüzeyde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedirler. Bu topluluklarda gerçek biyofilm içerisindeki bakterilerde izlenen direnç ve irreversible yapışma gibi özellikler gözlenmez. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki bakteriler zamanla matriksten koparak planktonik formda olduklarında bile, ayrıldıkları topluluğun tüm rezistans karakterilerini taşımaktadırlar (Çiftçi ve diğ. 2005).

2.2 Biyofilmin Tarihçesi

Biyofilm ilk olarak 17. yüzyılda Antoni van Leeuwenhoek tarafından basit mikroskop kullanarak tanımlamıştır. Dişinin üzerindeki plaktan aldığı sürüntüyü inceleyerek mikrobiyal kümelerin varlığını bulmasına rağmen bulduğu şeyin biyofilm olduğunun farkında olmamıştır (Donlan 2002).

1970'li yılların başında Costerton, dağlardaki akarsuların içerisinde yaşayan bakterilerin %99,99'u bir yüzeye yapışarak yaşadıklarını ortaya koymuştur (Donlan 2002).

1973'de Characklis, endüstriyel su sistemlerindeki mikrobiyal toplulukları inceleyerek yüzeye kuvvetle tutunan topluluğun aynı zamanda klor gibi dezenfektanlara karşı çok dirençli olduklarını da göstermiştir (Donlan 2002).

Marshall ise 1976 yılında çok ince ekstrasellüler polimer fibrillerin bakteri yüzeyine sabitlendiğini bildirmiştir (Sakarya 2005).

Costerton ve arkadaşlarının 1978'de diş plakları ve nehirlerdeki hücre topluluklarını tanımlamak amacıyla ilk defa 'biyofilm' terimini kullanmıştır. Bu çalışmalarında mikroorganizma topluluklarının, ekolojik ortamlardan faydalandıklarını tespit etmiştir. Yeterli besine sahip ekosistemlerde bakterilerin büyük kısmının biyofilm tabakasını oluşturan matrikste üredikleri ve biyofilm bakterilerinin planktonik bakterilere göre farklılık gösterdikleri belirtilmiştir. Tespit ettikleri analizler sayesinde ekolojik ortamda biyofilmler üzerine yapılan çalışmalar halk sağlığı ile ilişkili bulunmuştur (Sakarya 2005).

Heukelekson ve Heller, suda yaşayan mikroorganizmaların önce yüzeye tutunduklarını ve tutunduktan sonra aktivite ve büyüme hızlarının arttığı belirlenmiştir (Vu ve diğ. 2009).

Zobell su içerisinde yaşayan biyofilm yapısına katılan bakterilerin su içerisinde serbest dolaşan bakteri sayısından çok daha fazla olduğunu ortaya koymuştur (Vu ve diğ. 2009).

Işık mikroskobundan daha yüksek çözünürlüğü olan ve daha büyük görüntüleri sağlayan elektron mikroskobunun kullanılmasıyla biyofilm yapısı daha da aydınlatılmıştır. Jones ve arkadaşları atık su işleme ünitesi filtreleri üzerinde tutunmuş hücreleri taramalı ve geçirimli elektron mikroskobu ile farklı morfolojideki mikroorganizma gruplarını, biyofilm yapısını, morfolojisini incelemişlerdir. Ruthenium kırmızısı spesifik polisakkarit boyası ile boyayıp, osmium tetroksitle fikse edip incelediklerinde biyofilm yapısında tutunmayı sağlayan hücreyi çevreleyen matriksin polisakkarit olduğunu kanıtlamışlardır (Sakarya 2005).

Biyofilm yapısı son 20 yılda taramalı elektron mikroskobu ve standart mikrobiyolojik kültür yöntemleriyle incelenmektedir. Son 10 yılda yapılan iki

çalışma biyofilmler hakkında bilinenlere büyük katkıda bulunmuştur. Bu çalışmalar; lazer taramalı konfokal mikroskobu kullanılarak biyofilmin ultrastrüktürel yapısının belirlenmesinde, biyofilm oluşumunda hücrelerin birbirlerine tutunmasında rol oynayan genlerin araştırılmasıdır (Davey ve O'Toole 2000).

Günümüze kadar biyofilm yapılarını görüntülemek için ışık mikroskopisi, geçirimli ve taramalı elektron mikroskopisi kullanılmıştır. Elektron mikroskobunda incelemede, biyofilm preparatı hazırlanmasında dehidrasyon ve deformasyon gibi morfolojik değişiklikler ve fiksasyon esnasında hacimde %50 ye varan küçülmeler ortaya çıkabilmektedir. Biyofilm yapısının görüntülenmesinde kullanılan en yeni teknik ise lazer taramalı konfokal mikroskopisidir. Bu teknikte, geçirimli veya taramalı elektron mikroskopisinde görülen istenmeyen morfolojik değişiklikler gözlenmemektedir (Davey ve O'Toole 2000).

2.3 Biyofilmin Yapısı

Biyofilm, bakterinin çevresinde düzensiz bir şekilde dağılan polisakkaritten oluşan bir matrikstir. Biyofilmde polisakkaridler bakteri hücre yüzeyine tutunmuş olan ince şeritler halinde ve hücrenin etrafında kompleks bir ağ oluşturmuş şeklinde gözlemlenir (Leriche ve diğ. 2000; Sutherland 2001). Matriksin içeriği olan ekzopolisakkaridler hem fiziksel hem de kimyasal özellikler açısından farklılıklar gösterir. Polisakkaridler uzun, ince moleküler zincirlerdir ve 0,5-2,0x10^6 Da'luk bir moleküler yapıya sahiptirler. Ayrıca matriksin yoğunluğu ve genişliği hücresel ve hücresel olmayan yapılar ile mikroorganizmaların türleri arasında da farklılıklar göstermektedir. Tüm biyofilmlerin büyük bölümü (%73 – 98) su içermektedir (Donlan ve Costerton 2002). Biyofilmin yapısı mikroskobik olarak incelendiğinde matriksin besin ve oksijen taşınmasını sağlayan 'su kanalları' na sahip heterojen bir yapıya sahiptir (Flemming ve Windenger 2010). Biyofilmin mercan kayalık görünümlü yoğun ve kopmleks yapısı, ortamdaki organik ve inorganik moleküllerin ekstrasellüler yapısında toplanmasıyla oluşur. Biyofilmin gelişme oranı yakın çevredeki besinlerin hücre içine alınımı, atık

maddelerin ise hücreden uzaklaştırılması ile yakından ilişkili olup, bunların dışında besin kısıtlanmasından dolayı eksprese olan Quorum-sensing moleküllerinin salınımı, ortam pH'ı, O_2 perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolarite de gelişimde çok etkilidir (Bothwell ve diğ. 2003; Sakarya 2005).

Son yıllarda bakteriler tarafından salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyen moleküller aracılığı ile biyofilm yapımının düzenlenebileceğinin gösterilmesi biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonunda önemini artırmıştır (Sakarya 2005).

2.4 Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturması gereken durumlar vardır. Biyofilm oluşturanlar planktonik bakterilerden farklılık gösterirler. Bakterilerin biyofilm oluşturma nedenleri:

2.4.1 Savunma

Bilindiği gibi biyofilm, bakterilerde stres faktörüdür ve bir takım fiziksel güçlere karşı dayanıklılığı vardır. Biyofilme sahip organizmalar, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Bu nedenle biyofilm endüstriyel alanda bu özelliği kazandıran önemli bir faktör olarak bilinmektedir. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekzopolisakkaritler (EPS) savunmada önemlidir. EPS bulunduğu bakteriyi güç alanlarından (elektrik çekimi) uzaklaştırarak inflamatuar hücrelerin fagositozundan korurlar (Donlan ve Costerton 2002). Antibiyotik etkisinden de bakteriyi korurlar (Lewis 2001). Çevreden almış olduğu sinyaller sonucunda tehlikede olduğunu algılayan bakteri mevcut genler ile biyofilm oluşturarak kendini koruma altına almaktadır.

2.4.2 Adhezyon ve Kolonizasyon

Yaşam için gerekli ortamda kalabilmenin en bilinen yolu biyofilm oluşturmaktır. Mikroorganizmalar, insan ve hayvanlarda immün sistemin gelişmesinden sorumludur. Canlı vücudu, bilindiği gibi bakterilerin yaşaması için çekici bir ortam olup, bakterinin bu bölgede biyofilm oluşturarak yaşaması için primer bir motivasyon oluşturmaktadır. Bakterinin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmesini sağlamak için bir takım stratejileri vardır. Bakteri yüzey proteinleri, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstraselüller matriks proteinlerine yapışırlar. Bu adhesin ve matriks proteinleri konakçı ile bakterinin adheransında anahtar rol oynarlar (Wolz ve diğ. 2002). Adherans sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli bir populasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar. Diğer taraftan biyofilm bakterinin adheransını arttırırken, biyofilm oluşumunun başlaması ile birlikte bakteri adhezyon ve hareketliliği gibi faktörlerin ekspresyonunda da bir baskılama olmaktadır (Svensater ve diğ. 2001; Gilmore ve diğ. 2003).

2.4.3 Yaşanabilir Çevre Geliştirmek

Karbon kaynaklarının biyofilm oluşumuna etkisi üzerine çok sayıda araştırma mevcuttur. Özellikle glukozun, *Pseudomonas*'lar, *V. cholerae, E. coli* ve *Staphylococcus'da* EPS ekspresyonunu ve biyofilm oluşumunu belirgin şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Karbon katabolitlerinin konakçıda yapışmış bakterinin gen regülasyonunu indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynaması, bakterinin konakçıda uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmalar için biyofilm gerekliliği hipotezini ciddi bir şekilde desteklemektedir (Ammendolia ve diğ. 1999; Jefferson ve diğ. 2004).

2.4.4 Kommunite Oluşturmak

Bakterilerin ortama adaptasyonundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturdukları gibi ortamdan aldıkları

uyaranlar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla da planktonik hale geçebilmektedirler. Böylece bu uyum ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri kominal yaşamlarının en önemli göstergesidir (Öztürk ve diğ. 2008).

2.5 Biyofilm Oluşum Basamakları

Biyofilm gelişimini sağlayan birçok gen, genomik ve proteomik çalışmalar sayesinde bulunmuştur. Bu genler hücre fizyolojisinde adezyon, 'quorum sensing', hücre duvar yapımı, metabolizma, stres cevabı ve plazmide bağlanmada etkilidirler. Biyofilm oluştukça çevredeki görülen değişiklikler gen ekspresyonlarında da değişiklikler olmasına sebep olarak biyofilmin oluşumunu hızlandırmaktadır. Biyofilm oluşumuna etkili genlerin bir kısmı biyofilm oluşumunu arttırırken bir kısmı da azaltmaktadır. Biyofilm oluşturan genetik materyal plazmidler aracılığı ile kolaylıkla aktarılmaktadır. Biyofilm oluşumu beş evrede gerçekleşmektedir (Vuong ve Otto 2002).

2.5.1 Tutunma

Biyofilm oluşumu bakterinin yüzeye tutunması ile başlayan dinamik bir olaydır. Tutunma sonucu bir dizi genetik işlem ile biyofilmin fenotipi ortaya çıkmaya başlar. Mikroorganizmaların bir yüzeye tutunabilmesi için yüzeyle kesin olarak temasa geçtiklerini anlaması gerekmektedir. Bakterilerin bir alıcı ve bir vericiden oluşan düzenleyici sistemleri sayesinde çevresel uyarıları fenotipik farklılıklara çevirir. Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, 'quorum-sensing' sistemi denilen haberleşme sisteminden gelen yanıta bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevresindeki bakteri populasyonunun yoğunluğunu belirler. "*Quarum sensing"* sisteminde yüzeye tutunan her bakteri, ortama "ben buradayım" mesajı veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakteri sayısı arttıkça sinyalin yğunluğu artmaktadır. Bu sinyal molekülünün yoğunluğunda ki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir

dizi işlem başlatılmış olur. Böylelikle biyofilm içerisindeki bakteriler intrasellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip habercilerle haberleşip biyofilmin gelişmesini arttırırlar (Shrout ve diğ. 2011).

2.5.2 Yapışma

Bakterilerin yüzeye yapışmaları veya kuvvetli bir şekilde tutunması gerçekleşir.

2.5.3 Toplanma

Bakteriler bu evrede mikrokoloniler halinde kümeleşirler.

2.5.4 Olgun Biyofilm

Mikrokoloniler büyüyüp olgunlaşarak kompleks mantar şeklinde yapılara veya kulelere dönüşür. Farklı yüksekliklerden oluşan kuleler mikrokoloniler arasında, besinlerin ve oksijenin ulaştırılması ve metabolik artıklarının uzaklaştırılmasını sağlayan ilkel bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (Watnick ve Kolter 1999; Danese ve diğ. 2000).

2.5.5 Kopma veya Ayrılma

Bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi EPS miktarında azalış gibi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum süresinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya hücre kümesinin kopmasının bir sonucudur (Öztürk ve diğ. 2008).

2.6 Biyofilm Oluşturma Avantajları

Bakteriler, canlı veya cansız yüzeylerde biyofilm oluşturduklarında birçok avantaja sahip olurlar. Biyofilm bakterileri planktonik bakterilerden nem, ısı, pH değişiklikleri ve UV ışığına maruziyet gibi çevresel değişimlere göre daha dayanıklıdırlar. Ayrıca biyofilm besinleri konsantre eder ve atıkların kolayca atılımını sağlar. Biyofilmdeki bakterilerin kümeleşmesi, hücreler arası etkileşimleri kolaylaştırır. Biyofilm yapısı, bakteriyi konak savunma mekanizmasına karşı dirençli hale getirir. Çünkü EPS ile çevrelenmiş hücre kümelerinin oluşturduğu biyofilm yapısı büyük olduğu için fagositoz olamayacaktır ve böylece konağın bağışıklık sistemi tarafından yakalanamayacaktır.

Klinik açıdan avantajı ise, biyofilm bakterileri antibiyotiklere karşı planktonik bakterilere kıyasla binlerce kat daha dirençli olmalarıdır (Ceri ve diğ. 1999; Wand ve diğ. 2012). Öncelikle EPS matriksin, antimikrobiyal maddeleri absorbe ettiği veya difüzyonunu engellediği düşünülürken, artık çoğu antibiyotiğin biyofilm tabakasını kolayca penetre ettiği kanıtlanmıştır. Bu olayın en olası açıklaması biyofilmlerdeki bakterilerin fenotipik değişiklikler geçirmesi kendisini korumasına ve antibiyotiklere karşı dirençli olmasında rol oynamaktadır. Birçok antibiyotik hızla bölünen bakterileri hedeflediği için, biyofilmin derin tabakalarında bulunan, azalmış metabolik ve bölünme hızları sergileyen bakterilere antibiyotikler etkili olamamaktadır. Bu sebeple, antibiyotiğin etkisi ile biyofilmlerin yüzeyine yakın olan bakterilere mikrobisidal etki gösterirken biyofilmin derinlerinde kalan bakteriler ise hayatta kalarak tekrar gelişmeleri için ortam oluştururlar (Çiftçi ve diğ. 2005).

2.7 Biyofilm Antimikrobiyallere Karşı Direnci

Doğal ve endüstriyel çevrelerde gelişen biyofilmlerin bakteriyofaj, amipler ve çeşitli kimyasal biyosidlere karşı duyarlı oldukları bilinmektedir. Tıbbi alanda ise, hareketsiz bakteriyel hücreler konak savunma mekanizmalarına karşı koyabilmekte ve planktonik formda olan bakterilere oranla, antibiyotiklere çok daha fazla direnç göstermektedirler (Amorena ve diğ. 1999).

Biyofilmlerin bu dirence multiple (çoklu) mekanizmalar aracılığıyla sahip oldukları düşünülmektedir:

1. Antimikrobiyal ajanın biyofilmin tüm tabakaları boyunca penetrasyon göstermemesi. Biyofilm matriksi içerisindeki polimerik maddelerin antibiyotik diffüzyonunu güçleştirdiği bilinmektedir. Bu durum yeterli antibiyotik konsantrasyonuna asla ulaşılamaması anlamına gelmektedir.

2. Biyofilm içerisindeki hücrelerden en azından bir kısmı besin yetersizliği yaşamakta ve bu nedenle yavaş büyüme fazına girmek zorunda kalmaktadırlar.

3. Yavaş büyüyen veya büyüme göstermeyen hücreler birçok antimikrobiyal maddeye karşı duyarlı değildirler ve birçoğu hayatta kalabilmektedirler.

4. Biyofilm içerisindeki bakteriler arasında direnç genlerinin değişimi söz konusudur (Çiftçi ve diğ. 2005).

2.8 Ekzopolisakkarit (EPS)'nin Yapısı ve Özellikleri

Mikroorganizmalar hücre içinde bulunduğu konumlarına göre; intraselüler (depo) polisakkaritler, yapısal formdaki polisakkaritler ve ekstraselüler (EPS) polisakkaritler olmak üzere 3 ayrı polisakkarit türü sentezlemektedirler (Cerning 1990; Ruas-Madiedo ve diğ. 2002). İntraselüler polisakkaritler sitozol içinde yer alır, görevi karbon ve enerji kaynağı olmaktır. Yapısal formdaki polisakkaritler peptidoglikanlar ve teikoik asitler gibi çeperde yer alırlar. Ekstraselüler polisakkaritler ise hücre içinde oluşup hücre duvarı ile birleşen kapsüle veya hücre duvarı dışında birikerek kültür ortamına bağımsız olarak salgılanırlar (Mc Groarty 1994).

İn vitro çalışmalarda EPS'lerin varlığı katı besi ortamlarında mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm oluşturmaktadırlar (Gugliandola ve diğ. 2003). Bakterinin dış yüzeyini kaplayan EPS kapsül veya slim formda olabilir. Kapsüler EPS, bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır (Costerton ve diğ. 1994).

EPS'ler suda çözünen polimerlerdir ve doğada iyonik ya da iyonik olmayan yapılarda bulunabilirler (Calazans ve diğ. 1997). EPS glikozid bağlar ile birbirine bağlanan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Bakteriyel EPS'lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaridlerin tekrarlanan birimlerinden oluşan heteropolisakkarid yapıda olmalarına rağman bazı bakteriyel EPS'ler ise tek tip şekerden oluşan homopolisakkarid yapıdadırlar. EPS'yi oluşturan homopolisakkaridlerin çoğunluğu nötürdür ama bazı bakteriyel EPS'ler ise negatif yük taşır ve yüksek kütleye sahiptirler (Kenne ve Lindberg 1983). EPS hidrofilik özellik taşımakla birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen hetorojenlerdir. EPS'deki yapısal ve düzenleyici genlerin üretimi kromozomal veya plasmid DNA kodlu olabilir. EPS üretiminin düzenlenmesi oldukça karmaşıktır. Ayrıca hem pozitif hem negatif regülatörler içerir. Bu regülatörlerden bazıları küresel regülatörlerdir. Bunlar hücre dışı enzimler gibi diğer hücre metabolizmalarının sentezini de düzenlemektedir. Ozmolarite ve dehidrasyon gibi dış uyarıların etkisiyle EPS üretimi etkilenmektedir (Shankar ve diğ. 1995).

EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Polisakkaritler, üretici suşlar tarafından katabolize edilemediklerinden enerji kaynağı olarak kullanılmazlar. Mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlıları ortamdan uzaklaştırırlar (Ophir ve Gutnick 1994). Üretici suşun azalan su aktivitesine, faj ataklarına, fagositoza, protozoa yağmalamasına, toksik bileşiklere, antibiyotiklere ve ozmotik basınca karşı korumasının yanı sıra metal iyonların hücreye alınmasında da görevlidirler. EPS'nin bir diğer önemli özelliği de hücrelerin tanınmasını, yüzey ortamına tutunmasında yapıştırıcı görevi görür. Aynı zamanda çeşitli ekosistemlerin kolonizasyonunu kolaylaştıran biyofilmlerin oluşturulmasında da rol oynar (Ruas-Madiedo ve diğ. 2002). Bütün bu özellikler EPS üreten bakteriye bulunduğu ortamda kararlı olarak kalabilme ve baskın olarak büyüme özelliği kazandırmaktadır (Stiles ve Holzapfel 1997).

2.9 EPS'nin Önemi

Son yapılan bilimsel çalışmalar da görüldüğü gibi EPS üreten bazı bakteri suşlarının insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerinden dolayı özellikle yoğurt gibi fermente süt ürünlerinde fonksiyonel starter kültür olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Degeest ve diğ. 2001). Bu bakteriler asit gelişiminden ötürü mikrobiyal bozulmalara karşı gıdaları koruduğu gibi, gıdalarda aroma, görünüş, tat ve viskozite gibi birçok yararından dolayı gıda endüstrisinde kullanımı yaygınlaşmaktadır.

Sentezlenen EPS miktarı ve karakteri, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresi gibi ortam koşullarından etkilenmekte, ortamdaki substrat miktarı ve kompozisyonuna göre de değişkenlik gösterebilmektedir (Fajardo-Lira ve diğ. 1997). EPS'lerin bileşiminde en fazla galaktoz ve glikoz bulunmakta, çoğu kez de ramnoz bu yapıda yer almaktadır (Cerning 1990).

EPS'ler genellikle monosakkarit kompozisyonu, elektrik yükü, üniteler arası bağlar (bunun sonucunda molekülün sıkılığı) ve tekrarlanan yan zincirlerin varlığına bağlı olarak farklılık göstermektedirler. Ayrıca, zincir uzunluğu ve zincir dallanmasının sıklığı EPS'nin kompakt yapısını etkilediği için reolojik özellikleri güçlü şekilde etkilemektedir (Perry ve diğ. 1997; Duboc ve Mollet 2001; Broadbent ve diğ. 2001). Ayrıca jel içinde eksopolisakkaritlerin yeri de viskoziteyi etkileyen önemli bir faktördür (Sodini ve diğ. 2004).

EPS antitümör, antiülser, bağışıklık sistemini düzenleyici veya kolestrol düşürücü aktivite göstererek insan sağlığına olumlu katkıda bulunabilmektedirler (Ruas-Madiedo ve diğ. 2002).

2.10 Küçük Açı X-Işını Saçılma (SAXS) Yöntemi

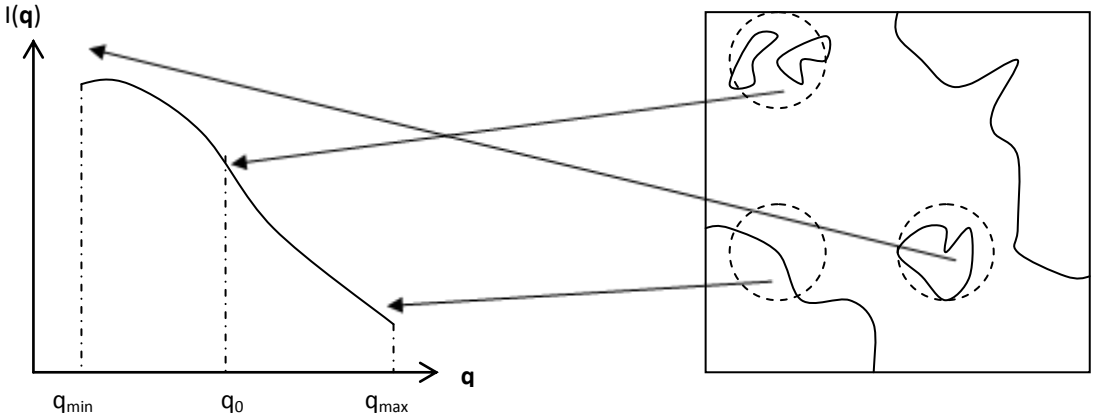
Nano boyutlu yapıların üretimi yanında bu maddelerin karakterizasyonu da çok önemlidir. Karakterizasyonda sadece yapı analizleri yapılmakla kalmayıp, maddelerin dinamik davranışlarının da analiz edilmesi gerekmektedir (Orujalipoor 2012). Bu yüzden birçok alanda nano boyutlu malzemelerin analiz edilmesine

imkân sağlayan yöntemlerden bir tanesi olan SAXS yöntemidir. Bu yöntemle toz, jel, kristalin örneklerin yanı sıra kolloid çözeltiler, polimerler, biyolojik moleküller de incelenebilir. Bir yapının analizi en derinlemesine X-ışını, nötron ve elektron kırınımı yöntemleriyle gerçekleştirilebilir. Bu yöntemlerde temel olarak aynı kırınım prensipleri geçerlidir. Kırınım, parçacıklardan belirli doğrultularda saçılan dalgaların girişimiyle gerçekleşir. İncelenecek örnek üzerine düşürülen X-ışını maddedeki elektronlarla etkileşecektir. Elektronlardan saçılan dalgaların genlikleri toplanarak saçılan ışının şiddetine ulaşılır.

Yapı analizinde kullanılan X-ışını yöntemlerinden biri olan, küçük açı X-ışını saçılma (SAXS) yöntemi ile incelenen örnekten küçük açıda saçılan X-ışını şiddetleri, saçılma açısının bir fonksiyonu olan, saçılma vektörünün büyüklüğüne göre elde edilerek bu verilerden yapı ile ilgili bilgiye ulaşılır. Küçük açı saçılmalarında da, tıpkı X-ışınları kırınımında olduğu gibi, saçılma yapıdaki elektronlar tarafından gerçekleştirilir. Bu nedenle yöntem elektron yoğunluğu farkının algılanması temeline dayanır. SAXS'ı diğer yöntemlerden farklı kılan en önemli özellik, angstromdan (Å) nanometreye (nm) kadar uzanan büyüklükte, homojen olmayan elektron yoğunluklarına duyarlı olmasıdır. X-ışınları kırınımı yöntemi, katı kristal, kristalin, film, toz v.b. formlara sahip örnekleri incelemede kullanılırken, artık sıvı, jel, yoğun gaz gibi farklı formlara sahip örnekler ile biyolojik dokularında ayrıntılı bir biçimde incelenebilmesi, X-ışını saçılma yöntemi ile mümkün hale gelmiştir.

2.10.1 Bir SAXS Eğrisinin Analizi

Tipik bir SAXS eğrisi Şekil 1'deki gibidir. İncelenen örneğin yapısı bu eğriden yola çıkılarak belirlenir. Değişik q_0 değerleri uzunluk ölçüsüne sahip hayali bir pencereden bakarak örneğin içyapısının incelenmesine olanak tanır. q_0 değeri küçüldükçe örneği incelemeye olanak tanıyan pencere büyüyeceğinden örnek içindeki saçıcıların birbirleriyle etkileşmesi hakkında da bilgi alınır. q_0 değeri büyüdükçe pencere küçülecektir. Böylece saçıcıların kendi büyüklükleri ve şekilleri hakkında bilgiye ulaşılacaktır. Daha da büyük q_0 değerleri, saçıcılar ile içinde bulundukları ortam arasındaki ara yüzey hakkında bilgi verir (Batat 2008).



Şekil 1: SAXS eğrisinin analizi

Küçük Açı Saçılması deneylerinde saçılma eğrisi 3 bölgede incelenir. Bu üç bölge sırası ile aşağıda açıklanmıştır.

Büyük q bölgesi

Bu bölgede, daha önce de bahsedildiği gibi pencere oldukça küçüktür. Bu da sadece iki ortamı birleştiren ara yüzeyi incelemeye imkân verir. Bu bölgeye "Porod bölgesi" denir. İki farklı fazdan oluşan bir sistem hacmin ifadesidir.

Sonuç olarak, en küçük q değerinde elde edilen veri I(0) değerinin bir göstergesi olup, bu değer ne kadar büyükse, örnek içindeki saçıcı elektron yoğunluğunun da o kadar büyük olduğu belirlenir.

Orta bölge

Heterojen karışımlarda parçacık boyutlarının belirlenmesi ve şekillerinin tespiti önemlidir. Eğer parçacık boyutu 1μm civarındaysa görünür ışık saçılmasıyla bütün bilgilere ulaşılabilir. Fakat daha küçük -nano- boyutta parçacıklar içeren sistemlerde küçük açı x-ışını saçılması daha ayrıntılı bilgiye ulaşmada oldukça etkindir. Küçük açı saçılması yöntemiyle boyut ve şekil analizi yapılırken yine saçıcı malzeme içindeki elektron yoğunluklarının farkından yararlanılır. Bu bölge nono maddenin boyutu, şekli ve içyapısı bilgilerine ulaşılabilir.

Küçük q bölgesi

Bu bölgede, örneklerin yapısını incelediğimiz yapay pencere oldukça büyür. Böylece saçıcıların birbirlerine göre konumları ve uzaklıklarının dağılımları da bulunabilir. Deneysel saçılma eğrisine uygun kuramsal eğri belirlenerek örnek için $S(q)$ yapı faktörü bulunur. $S(q)$ yapı faktörü, saçıcı oluşumların yapı içinde birbirlerine göre nasıl dağıldıklarının göstergesi olan matematiksel bir ifadedir.

2.11 X-ışını Kırınımı (XRD) Yöntemi

X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi ile maddenin yapısı (amorf, yarı-kristalin, kristalin), atom ya da atom düzlemleri arasındaki mesafeler (dhkl, Å) ve kristalin maddenin kristallik derecesi belirlenebilir. XRD yöntemi inorganik kristalin maddelerin yanı sıra, birçok biyolojik molekül, ilaç, protein, nükleik asit ve vitaminlerin yapısının incelenebilmesini de sağlamaktadır.

Kristal yapıyı oluşturan atomlar, değişen θ açısı ile gelen X-ışını demetini bütün yönlerde saçar. Bu saçılma sırasında belli yönlerdeki ışınlardan bazıları birbirini yok ederken (negatif veya yıkıcı girişim), bazı ışınlar birbirini kuvvetlendirerek yapıcı veya pozitif girişim oluşturur ve kırınıma (difraksiyon) neden olurlar. Kristalin maddenin X-ışınları kırınımı deseni (patern) her kristal türü için özel olup, kristallerin tanımlanmasında kullanılır.

2.12 Termogravimetrik Analiz (TGA) Yöntemi

Termal analizde bir maddenin sıcaklığın fonksiyonu olarak fiziksel özelliğinin (kütle kaybı) ölçümü yapılır. Termogravimetrik ölçümler polimerlerde, ilaç üretiminde, killerde, minerallerde, metal ve alaşımlarda kalite kontrol ve araştırma uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

TGA (termogravimetrik analiz) işleminde bir örneğin kütlesi, kontrollü atmosfer altında, örneğin sıcaklığı sürekli artarken (genellikle zamana karşı

doğrusal artış) sıcaklığın veya zamanın fonksiyonu olarak kaydedilir. Zamana karşı kütle veya kütle yüzdesi grafiği termogram veya termal bozunma eğrisi olarak adlandırılır.

TGA cihazı termobalans olarak adlandırılan hassas mikrobalans, fırın, bazen inert bazen de reaktif gaz atmosferi sağlayan temiz gaz sistemi, cihazın kontrolü, veri alma ve işleme işlemleri için bilgisayar sisteminden oluşur. 1 mg'dan 100 g'a kadar değişen örnek tutma hazneli termobalanslar mevcuttur. Genellikle 1-100 mg arası kullanılır. Balanslar kütledeki 0,1μg değişimleri kaydedebilir. Fırınlar 1000˚C sıcaklığa kadar çıkabilirler. Isıtma seçenekleri 0,1˚C/dk'dan 100 ˚C/dk aralığında değişebilir. İzolasyon ve soğutma iç bölgesinin balansla ısı alışverişinin olmamasını sağlar. Ar ve N2 gazları örneğin oksidasyonunu önlemek için kullanılan temizleme gazlarıdır.

Örnekler genellikle platin, alüminyum veya alümine kaplara konur. Platin kolay temizlenebilmesi ve inertliğinden dolayı yaygın olarak kullanılır. Kap hacimleri değişik boyutlarda olabilir. TGA sıcaklıkla değişen analitin kütlesi hesaplanabildiğinden kantitatiftir fakat dekompozisyon, oksidasyon, buharlaşma, süblimleşme ve desorpsiyon verileri hakkında sınırlıdır. TGA'nın en önemli uygulamaları çok bileşimli sistemlerin bileşimsel analiz bozunma örnekleridir.

3. YÖNTEM

3.1 Çalışmada Kullanılan Bakteriler:

Bu çalışmada kullanılan patojen bakteriler ve Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları, Pamukkale Üniversitesi Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür stoklarından temin edilmiştir. Kullanılan bakterilerin isimleri ve kodları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Çalışmada kullanılan bakteriler

PATOJEN BAKTERİLER	MRSA İZOLATLARI
Escherichia coli ATCC 25922	MRSA 1
Bacillus cereus RSKK 863	MRSA 2
Bacillus cereus F2	MRSA 3
Cowan liyofili	MRSA 4
Salmonella tphimurium ATCC 14028	MRSA 5
Listeria monocytogenes Samsun izolatı	MRSA 6
Morganella morgana	MRSA 7
Yersinia enterocolitica RSKK 1501	MRSA 8
Staphylococcus aureus ATCC 25923	MRSA 9
Proteus vulgaris RSKK 96026	MRSA 10
Listeria monocytogenes ATCC 7644	MRSA 11
Staphylococcus aureus ATCC 33862	MRSA 12
Bacillus pumilus NRRL BD 142	MRSA 13
Escherichia coli ATCC 11230	MRSA 14
Proteus vulgaris NRRL B-123	MRSA 16
Bacillus cereus I2	MRSA 17
Micrococcus flavus	MRSA 18
Enterococcus faecalis ATCC 19433	MRSA 19
Bacillus cereus NRRL B 3711	MRSA 20
Bacillus subtilis NRRL B 209	MRSA 21
Staphylococcus aureus ATCC 29213	MRSA 22
Escherichia coli 0157H7	MRSA 23
Pseudomanas fluorescens ATCC 55241	MRSA 24
Pseudomanas stutzeri P40	MRSA 25
Micrococcus luteus NRLL-B 1013	MRSA 26
Enterobacter cloacae ATCC 28355	

3.2 MRSA İzolatlarının Tiplendirilmesi

İzolatların tür düzeyinde tiplendirilmesi için 16S rRNA sekans analizi yapılmıştır. 16S rRNA analizi Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (Ankara, Türkiye) yaptırılmıştır. Ayrıca 16S rRNA analizine ek olarak MRSA'lar için çok özel olan APİ KİTİ (Slidex MRSA Detection) kullanılmıştır.

APİ KİT için Triptic Soy Broth (TSB) besiyerinde geliştirilen saf kültürler Kanlı Agar plağına inoküle edilerek 18-24 saat 37 ºC'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mikrosantrifüj tüpünde bir öze dolusu bakteri, 4 damla R3 reaktifi ile homojenize edilmiştir. 100 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 1 damla R4 reaktifi eklenmiş ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifuj edilerek süpernetant kısmı kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış her örnek için dairenin birine 1 damla duyarlılaştırılmış lateks (R1), bir diğer daireye negatif kontrol lateks (R2) eklenmiştir. Üzerlerine 50 µl numune konularak değerlendirilmiştir. Değerlendirmede; R1 ile aglütinasyon yapıp R2 ile aglütinasyon yapmayan suşlar MRSA, latekslerle aglütinasyon yapmayan suşlar MSSA, sadece R2 ile aglütinasyon yapan suşlar ise belirsiz olarak nitelendirilmiştir.

3.3 Biyofilm Oluşturan Bakterilerin Seçimi

% 8'lik Kongo Kırmızısı ilave edilmiş Brain Heart Infusion Agar (BHIA, BioLab)'a tüm bakterilerin çizgi ekimleri yapılmıştır. Besiyerinde siyah koloni oluşturan bakteriler biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir (Jain ve Agarwal 2009).

3.4 Antibiyotik Dirençlilik Profillerinin Belirlenmesi

Bakterilerin antibiyotiklere dirençlilik profili disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (CLSI). Çalışmada kullanılan antibiyotikler sırası ile şöyledir: Vancomycin (30mcg), Ofloxacin (5mcg), Tobramycin (10mcg), Chloramphenicol (30mcg), Ciprofloxacin (5mcg), Piperacillin (100mcg), Azitromycin (15mcg),

Gentamicin (30mcg), Ampicillin (10mcg), Penicillin G (1iu), Erythromycin (15mcg), Amikacin (30mcg).

3.5 Biyofilm Oluşumunun Kalitatif Tayini

Çalışmada kullanılan bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri kalitatif olarak "Standart Tüp Yöntemi" modifiye edilerek araştırılmıştır (Bhowmick ve diğ. 2011). Bakteriler 5 ml'lik TSB besiyeri içeren tüplere 10 µl ekilerek 12 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra pH 7,3 olan fosfat tamponu (PBS) ile tüpler yıkanmış ve % 0,1'lik kristal viyolet konularak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Boya solüsyonu boşaltılarak tüpler PBS solüsyonu ile tekrar yıkandıktan sonra filtre kâğıdı üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. Tüpün çeperlerinde renkli bir film tabakasının oluşumu pozitif ve tüpün çeperinin renksiz oluşu negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif sonuçlar, bu renkli tabakanın yoğunluğuna göre (+), (++) ve (+++) olarak yorumlanmıştır. Sıvı ile hava birleşim noktasında oluşan halkalar ise biyofilm oluşumunun göstergesi olarak kabul edilmemiştir.

3.6 Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Tayini

İzolatların biyofilm oluşumlarının kantitatif tayini, Jain ve Agarwal (2009) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Mikroplaka kuyularına dilüe edilmemiş TSB ile 1/100 ve 1/200 oranlarında dilüe edilmiş TSB'lerden 200 µl konulmuş ve 37 °C'de aktifleştirilen bakterilerden 30 µl ilave edilmiştir. Optimal sıcaklıkta 12, 24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saat inkübe edilen örnekler steril PBS ile 3 kez yıkanarak havada kurutulmuştur. Mikroplakalardaki kuyular, % 0,1'lik kristal viyolet ile boyanarak 15 dakika bekletilmiş ve tekrar PBS ile yıkanmıştır. Son olarak, her bir kuyuya, % 33'lük glasiyal asetik asit ilave edilmiştir. Mikroplakalar Mikroplate Okuyucusunda (Optic İvymen Sistem 2100-C) 600 nm'de okunarak biyofilm artışları aşağıdaki formülle hesaplanarak yüzde olarak belirlenmiştir:

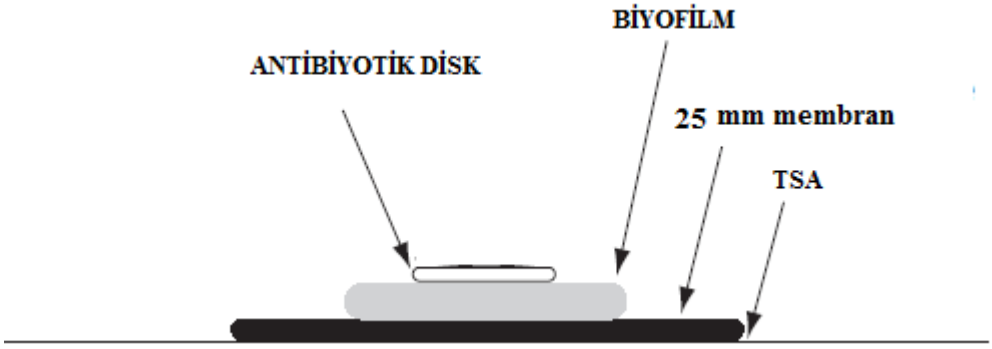
$$\% = 100 \times (OD_{son} - OD_{ilk}) / OD_{ilk}$$

3.7 Biyofilm Oluşumuna Etki Eden Optimal Şartların Belirlenmesi

Kalitatif ve kantitatif analiz sonuçlarına göre en yüksek biyofilm oluşum yeteneğine sahip iki bakteri seçilmiş ve optimizasyon çalışmaları bu bakteriler ile yapılmıştır. Biyofilm oluşumuna etki eden şartların belirlenmesi amacıyla farklı karbon kaynakları (glikoz, sükroz, mannitol ve fruktoz), farklı tuz konsantrasyonları (0,2-8 mg/L), farklı sıcaklık (37 ve 42 °C) ve farklı pH dereceleri (6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0) taranmıştır. Deneyler sonucunda bakterilerin biyofilm oluşturma kapasiteleri kantitatif olarak belirlenmiştir (Jain ve Agarwal 2009).

3.8 Biyofilmin Antibiyotik Penetrasyonu Üzerine Etkisi

Antibiyotik penetrasyonu, Anderl ve diğ. (2000) ile Singh ve diğ. (2010)'nın açıkladıkları metoda göre modifiye edilerek belirlenmiştir. Polikarbonat membran (Sartorius stedim biotech 25 mm çapında siyah renkli membran) üzerinde bakteri biyofilmi geliştirilmiştir. İndikatör patojen bakteri olarak *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* NRRL-B-209, *Cowan liyofili*, *E. cloacae* ATCC 28355, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *M. flavus* kullanılmıştır. İndikatör bakterilerin bir gecelik kültürleri geliştirilerek TSA yüzeyine 100 µl yayılmıştır. Üzerinde bakteri biyofilmi geliştirilen polikarbonat membran ve 24 µl steril ultra saf su ile ıslatılan antibiyotik diskleri üst üste yerleştirilerek plaklar 24 saat 37 ^{o}C'de inkübe edilmiştir. Deney modeli Şekil 2'de şematize edilmiştir. Kontrol olarak biyofilm içermeyen membran düzeneği ve antibiyotik diski kullanılmıştır. Test ve kontrol grubunun inhibisyon zon çapları mm cinsinden ölçülmüştür. İnhibisyon zonları, 'biyofilmin antibiyotik penetrasyonu inhibisyonu' olarak ifade edilmiştir ve sonuçlar 'inhibisyon yüzdesi' şeklinde hesaplanmıştır.



Şekil 2: Biyofilmin antibiyotik penetrasyonu üzerine etkisinin deneysel şematik görünümü

3.9 EPS'nin Antibiyofilm Etkisi

Projemizde farklı konsantrasyonlarda (50-1000 mg/L) toz EPS'nin antibiyofilm etkisi de araştırılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında, kullanılacak indikatör bakterilerin (*B. cereus* RSKK 8632, *E. coli* ATCC 11230, *E. faecalis* ATCC 19433, *M. flavus*, *P. fluorescens* ATCC 55241, *P. vulgaris* RSKK 96026, *S. aureus* ATCC 33862, *S. typhimurium*, *Y. enterecolitica* RSKK 1501) biyofilm oluşturma özellikleri Kongo Kırmızısı yöntemi (bknz.3.3) yardımıyla belirlenmiştir. Daha sonra ise, biyofilm pozitif patojen bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri üzerindeki inhibisyon etkisi, biyofilm oluşumunun kantitatif tayin yöntemi (bknz. 3.6) ile incelenmiştir. TSB'de geliştirilen bakteri kültürleri ve arzu edilen EPS konsantrasyonu, kuyucuklara son hacim 230 µl olacak şekilde ilave edilerek 48 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 630 nm'de Mikroplate okuyucuda okunmuştur.

3.10 Bakteriyal EPS'nin Karakterizasyonu

3.10.1 EPS Saflaştırma

EPS saflaştırması, etanol-metanol ile çöktürme-saflaştırma yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Hung ve diğ. 2005). Bakteri kültürleri inkübasyon

sonrasında 100 °C'de 15 dakika su banyosunda bekletildikten sonra santrifüj edilerek süpernatant ve pellet toplanmıştır. Bakteriyel EPS süpernatant ve pelletten ayrı saflaştırılmıştır. Süpernetanttan elde edilen EPS 'çözünen EPS' ve pelletten elde edilen EPS ise 'membrana bağlı EPS olarak isimlendirilmiştir.

Toplanan süpernetant içine son konsantrasyon 0,5 mg/L olacak şekilde proteinaz K ilave edilmiş ve 37oC'de 12 saat 70 rpm'de bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında soğuk etanol-metanol karışımı ilave edilerek buzdolabında çökelti oluşması için bekletilmiştir. Oluşan çökelti 0,22µm gözenek çaplı membran (millipore membran filtre HAWP04700) kullanılarak, Sartorius marka membran filtrasyon düzeneği ile toplanmıştır. Elde edilen presipitat, son konsantrasyon 30g/L olacak şekilde NaCl ilave edilerek tekrar etanol-metanol karışımı ile muamele edilmiştir. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Son presipitat 10-20 ml dH2O ile çözülerek suya karşı diyaliz edilmiştir. Saf EPS liyofilize edilerek toz halinde derin dondurucuda saklanmıştır.

Toplanan pellet üzerine son hacim 100 ml olacak şekilde steril dH2O ilave edilmiştir. 3 gr NaCl eklenip manyetik karıştırıcı da 1 saat karıştırılmıştır. Süre sonunda santrifüj edilerek süpernetant toplanıp üzerine ethanol-metanol karışımı ilave edilerek yukarıda açıklanan saflaştırma yöntemi uygulanmıştır.

3.10.2 Toplam Şeker Tayini

Elde edilen toz EPS'de ki toplam karbohidrat miktarı fenol-sülfürik asit metodu ile belirlenmiştir (Dubois ve diğ. 1956; Frengova ve diğ. 2000). Standart olarak glukoz kullanılmıştır.

Fenol-Sülfürik asit metodu: 0,5 mg toz EPS tartılıp 1 ml dH_2O içerisinde iyice çözüldükten sonra üzerine % 80'lik 500 µl Fenol ve 5 ml H_2SO_4 konulmuştur. 10 dk oda sıcaklığında ve 20 dk 30 °C'de etüvde bekletilerek 490 nm'de UV spektrofotometre (Hach Lange DR 5000) ile okunmuştur.

3.10.3 Toplam Protein Tayini

EPS'deki toplam protein miktarı modifiye Lowry (Lowry ve diğ. 1951, Hartree 2004) metoduna göre 650 nm'de UV spektrofotometrede kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Standart olarak sığır serum albumini (Sigma, P0834) kullanılmıştır.

Modifiye Lowry Metodu: 1 ml toz EPS çözeltisi 10 dakika 50 ^{o}C su banyosunda bekletildikten sonra üzerine 0,9 ml sodyum-potasyum tartarat-$NaCO_3$ reaktifi eklenmiş ve 50 ^{o}C su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda, oda sıcaklığına gelene kadar karanlık bir ortamda soğumaya bırakılan EPS çözeltisi üzerine 0,1 ml sodyum-potasyum tartarat-$CuSO_4.5H_2O$ reaktifi eklenmiştir. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda 3 ml Folin-Ciocolteu reaktifi ilave edilip karıştırıldıktan sonra 50 °C su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler oda sıcaklığına gelinceye kadar karanlık ortamda bekletilerek 650 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede okunmuştur.

3.10.4 Üronik Asit Miktarı Belirleme

Yaklaşık 0,5 mg toz EPS üzerine 0,4 ml dH_2O ilave edilmiştir. Üzerine 2M 40 µl sulfamik asit eklenerek iyice karıştırılmış daha sonra konsantre sülfürik asit ile hazırlanan 75 mM sodyum tetra borattan 2,4 ml ilave edilip, 100 ^{o}C su banyosunda 10 dakika ısıtılmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra % 0,15'lik 30 µl m-hidroksifenil eklenip 525 nm'de UV spektrofotometrede absorbansı okunmuştur. Toplam üronik asit konsantrasyonunu hesaplamada glukuronik asit ile oluşturulan standart eğri kullanılmıştır (Hung ve Santchi 2001).

3.11 Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) Görüntüleme

SEM, polimerlerin yüzey morfolojisinin belirlenmesi için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde hızlandırılmış elektronlar örneğin yüzeyine çarptırılarak örnekten yansıyan ikincil elektronlar (SE), algılayıcı (dedektör)

yardımıyla üç boyutlu görüntü elde edilmiştir. Bakterilerin biyofilm oluşumunu doğrulamak ve EPS yüzey morfolojisi hakkında bilgi edinmek için SEM analizi yapılmıştır. Altın ile kaplanan örnekler, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde (İzmir, Türkiye) QUANTA FEG 250 Taramalı Elektron Mikroskop kullanılarak incelenmiştir.

3.12 SAXS Yöntemi ile Yapılan Analizler

Ekzopolisakkaritler, (EPS) çözelti formunda laboratuvar tipi HECUS SYSTEM3 SWAXS sistemi kullanılarak incelenmiştir. Örneklerin ölçümler için hazırlanma aşamasında örneklerin sulu çözeltileri (% 0,5 g/L) kapiler tüplere enjekte edilmiştir. Örneklerin sulu çözeltileriyle doldurulan ince kapiller tüpler Small Angle X-Ray Sacettering (SAXS) kamerası bölümündeki örnek tutucu haznesine yerleştirilip sistem yazılımı (ASA3 Programı) çalıştırılmıştır. Detektör gaz ayarları ve ölçüm aralıkları belirlenerek önce hızlandırma gerilimi, ardından tüp akımı artırılmıştır. Her bir örnek için 600 s ölçüm süresi sabit tutulmuştur. SAXS analizlerinin ikinci aşamasında, incelenen örnekler su ve serum albümin çözeltileri içinde çözülüp, sıvı örnekler için kullanılan kapiler tüplere enjekte edilerek 23 °C de ölçümler alınmıştır. Su ve Serum albümin çözücüsünün yapı üzerine etkileri incelenmiştir. Ölçümler sonucunda, yapısal farklılıkların daha rahat gözlemlemek için log (I) – log (q) grafikleri çizilmiştir.

3.13 X-Işınları Kırınımı (XRD)

Çalışmamızda XRD yöntemi ile bakterilerden elde edilen EPS'nin karakterizasyonu (amorf veya kristalin yapı tayini) için kullanılmıştır. XRD yöntem kristal yapısı bilinmeyen bir maddenin atom düzlemleri (dhkl) arasındaki mesafenin ölçümünü esas almakta olup, pikler Bragg yasas olarak bilinen 2θ açılarına karşılık gelen (dhkl) değerleriyle ifade edilir ($d = \lambda / 2 \sin\theta$, λ = 1.54056 Å). XRD incelemelerinin bir kısmı İstanbul Teknik Üniversitesi Jeoloji Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında Bruker D8 model, bir kısmı ise İzmir İleri Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi Laboratuvarları'nda Philips

marka X'Pert Pro model cihazlarla CuKα ışınımlı (λ = 1.54056 Å) X-ışınları Difraktometresi'nde yapılmış olup, çekim koşulları 40 mA, 40 kV, tarama hızı 0.005° olarak uygulanmıştır.

3.14 Termal Analizler (TGA)

Termo-Gravimetrik Analiz (TGA), malzemelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin sabit ısıtma oranı ile artan sıcaklık ile değişimlerini ölçen bir yöntemdir. Genel olarak bağlı polimer malzeme çalışmaları için ayrışma, oksidasyon ya da (örneğin, nem gibi) uçucu kaybı, kütle kaybı veya kazancı sergileyen malzemelerin seçilen özelliklerini belirlemek için kullanılmaktadır. Bu çalışmada, TGA incelemeleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde Perkin Elmer SII-Elmas TG-DTA termal analiz sistemi üzerinde, azot atmosferinde 30-1000 ºC sıcaklık aralığında 10 ºC dk-1 ısıtma hızı uygulanarak bir yürütülmüştür.

4. BULGULAR

4.1 MRSA bakterilerinin tiplendirilmesi

İzolatların API identifikasyon kiti sonuçuna göre 25 bakteriden 19'u MRSA ve 6'sı MSSA olarak tanımlanmıştır. Sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. APİ KİT değerlendirilmesi olan aglütinasyon gösterimi için M16 ve M17'ye ait sonuçlar da Şekil 3'te verilmiştir.

Tablo 2: API identifikasyon kiti sonuçları

MRSA kodları	**APİ KİT sonuçları**
MRSA 1	MRSA
MRSA 2	MRSA
MRSA 3	MSSA
MRSA 4	MSSA
MRSA 5	MRSA
MRSA 6	MRSA
MRSA 7	MRSA
MRSA 8	MRSA
MRSA 9	MRSA
MRSA 10	MSSA
MRSA 11	MRSA
MRSA 12	MRSA
MRSA 13	MRSA
MRSA 14	MRSA
MRSA 16	MSSA
MRSA 17	MRSA
MRSA 18	MSSA
MRSA 19	MRSA
MRSA 20	MSSA
MRSA 21	MRSA
MRSA 22	MRSA
MRSA 23	MRSA
MRSA 24	MRSA
MRSA 25	MRSA
MRSA 26	MSSA

(A) (B)

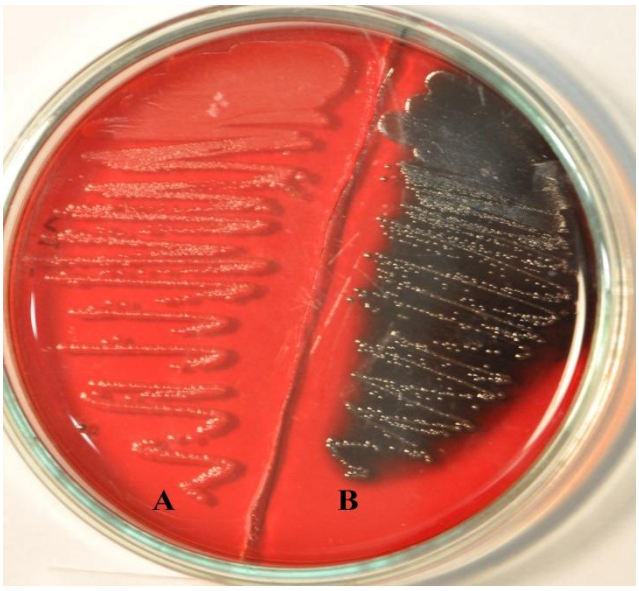
Şekil 3: MRSA 17'nin APİ KİT pozitif aglütinasyonu (A) ve MSSA 16'nın negatif aglütinasyonu (B). Pozitif kısma R1 reaktifi negatif kısmı ise R2 reaktifi damlatılmıştır.

4.2 Biyofilm Oluşturan Bakterilerin Seçimi

Biyofilm oluşturan bakterilerin seçiminde PAÜ Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür stoklarında bulunan patojen indikatör bakteriler ve MRSA suşları kullanılmıştır. Tüm bakterilerin Kongo Red içeren agarlı besiyerine çizgi ekimleri yapılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında siyah koloni oluşturan bakteriler biyofilm pozitif, renk değişimi gözlemlenmeyen koloniler ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Kongo Red ile tarama sonuçlarına göre 25 MRSA suşundan 3 tanesi biyofilm pozitifken, 24 indikatör patojen bakterinin 10 tanesi biyofilm pozitif olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 3'te ve koloni oluşumları Şekil 4'te gösterilmiştir.

Tablo 3: Bakterilerin Kongo Red metoduna göre tarama sonuçları

PATOJEN BAKTERİLER	**SONUÇLAR**	**MRSA İZOLATLARI**	**SONUÇLAR**
Escherichia coli ATCC 25922	-	MRSA 1	-
Bacillus cereus RSKK 863	-	MRSA 2	-
Bacillus cereus F2	-	MSSA 3	-
Cowan liyofili	-	MSSA 4	-
Salmonella typhimurium ATCC 14028	+	MRSA 5	-
Listeria monocytogenes Samsun izolatı	-	MRSA 6	-
Morganella morgana	-	MRSA 7	-
Yersinia enterocolitica RSKK 1501	+	MRSA 8	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	-	MRSA 9	-
Proteus vulgaris RSKK 96026	-	MSSA 10	+
Listeria monocytogenes ATCC 7644	+	MRSA 11	-
Staphylococcus aureus ATCC 33862	+	MRSA 12	-
Bacillus pumilus NRRL BD 142	-	MRSA 13	-
Escherichia coli ATCC 11230	-	MRSA 14	-
Proteus vulgaris NRRL B-123	-	MSSA 16	-
Bacillus cereus I2	-	MRSA 17	-
Micrococcus flavus	-	MSSA 18	+
Enterococcus faecalis ATCC 19433	+	MRSA 19	-
Bacillus cereus NRRL B 3711	-	MSSA 20	+
Bacillus subtilis NRRL B 209	-	MRSA 21	-
Staphylococcus aureus ATCC 29213	+	MRSA 22	-
Escherichia coli 0157H7	-	MRSA 23	-
Pseudomanas fluorescens ATCC 55241	+	MRSA 24	-
Pseudomanas stutzeri P40	+	MRSA 25	-
Micrococcus luteus NRLL-B 1013	+	MSSA 26	-
Enterobacter cloacae ATCC 28355	+		



Şekil 4: Besiyeri yüzeyinde siyah koloni (B) biyofilm pozitif, renk değişimi gözlenmeyen (A) biyofilm negatif

4.3 MRSA'ların Antibiyotik Dirençlilik Profilleri

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) bakterilerin Vancomycin (30mcg), Ofloxacin (5mcg), Tobramycin (10mcg), Chloramphenicol (30mcg), Ciprofloxacin (5mcg), Piperacillin (100mcg), Azitromycin (15mcg), Gentamicin (30mcg), Ampicillin (10mcg), Penicillin-G (1iu), Erythromycin (15mcg) ve Amikacin (30mcg) antibiyotiklerine dirençlilik profilleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir. Bakterilerin çalışmada kullanılan tüm antibiyotiklere yüksek boyutlarda dirençli oldukları bulunmuştur.

Tablo 4: MRSA izolatlarının antibiyotik dirençlilik profilleri (inhibisyon zon çapı: mm)

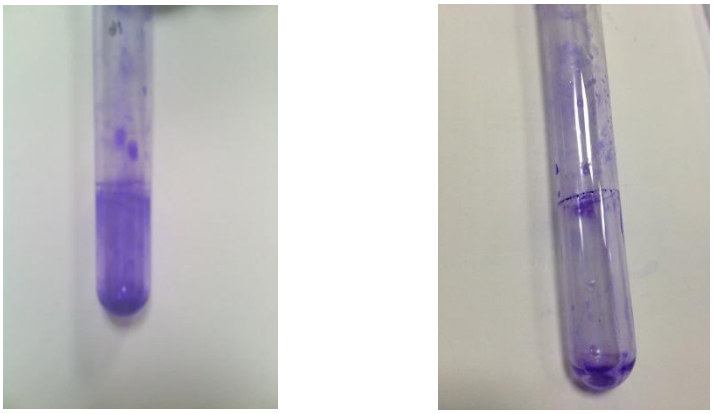
Bakteri adı	Chloramphenicol	Gentamıcın	Ampıcıllın	Erythromycın	Penicıllın	Azıthromycın	Ofloxacın	Pıperacıllın	Vancomycın	Amıkacın	Tobramycın	Cıprofloxacin
MRSA 1	11.2	2.7	2.55	5.65	-	7.55	-	3.05	7.3	2.6	1.6	-
MRSA 2	9.5	2.1	0.8	11.03	-	8.2	-	2.15	5.9	2.65	1.9	-
MSSA 3	9.8	2.3	1.075	3.35	-	2.3	-	1	5.3	3.2	1.5	-
MSSA 4	11.2	2.58	1.75	2.6	-	3.35	-	1.9	5.4	3.75	2	-
MRSA 5	10.6	2.05	1.1	2.5	-	3.5	-	1.825	6.3	3.05	2	-
MRSA 6	9.85	1.1	0.75	3.05	-	3.65	-	1.1	6.7	2.05	1.9	-
MRSA 7	9.9	3.25	0.65	4.0	-	3.3	-	1.45	6.5	2.75	2	-
MRSA 8	9.35	1.85	-	10.65	-	8.65	-	2	6.6	2.2	1.7	-
MRSA 9	10.7	2.55	0.65	6.85	-	10.45	-	1.1	6.3	2.7	2.2	-
MSSA 10	3.3	-	-	-	-	-	-	-	8.1	-	-	-
MRSA 11	10.3	5	-	-	-	-	-	-	8	9.78	2.7	-
MRSA 12	9.8	2.6	2.25	12.6	-	-	2	3.355	4.7	2.9	1.5	-
MRSA 13	9.6	2.3	1.65	4.8	-	4.65	-	1.3	5.85	2.45	2	-
MRSA 14	14.5	14.5	8.6	-	5.75	-	12.6	8.1	9.4	13.4	5.6	14
MSSA 16	10.6	-	6.95	11.2	1.55	10	10.1	6.85	6.1	9.4	4.3	-
MRSA 17	10	2.95	1.65	12.68	-	-	-	2.1	5.65	3.4	1.65	-
MSSA 18	9.4	3.95	10.25	8.9	-	5.425	-	11.25	6	-	3.5	7
MRSA 19	10.3	2.63	0.75	12.25	-	9.1	1.05	1	5.6	3.45	1.4	-
MSSA 20	4	-	-	-	-	-	-	-	5	-	1.2	-
MRSA 21	9.6	2.6	1.375	14.85	-	12	-	1.1	5.9	3.15	1.45	-
MRSA 22	9.9	2.5	2	-	-	13.5	-	3.275	6.45	2.75	1.6	-
MRSA 23	11	2.5	1.8	13.55	-	11.88	2	1.8	5.9	3.25	1.5	-
MRSA 24	8	2.2	1.9	14.65	-	13.95	-	1.8	4.6	2.68	1.9	-
MRSA 25	10.2	1.83	2.05	15.5	-	13.45	-	2.85	6.2	3.28	1.3	-
MSSA 26	7.5	1.9	2.2	10.55	-	8.1	-	2.2	4.5	3.3	1.5	-

- : İnhibisyon yok

4.4 Biyofilm Oluşumunun Kalitatif Tayini

Biyofilm oluşumunun kalitatif tayini olarak tüp dilusyon yöntemi kullanılmıştır. Deney 5 günlük taramalar halinde yapılıp kristal viyole ile boyama sonrasında, tüpün iç çeperinde biyofilm oluşturan bakterilerin sıvantı oluşturduğu görülmektedir (Şekil 5A). Tüp üzerinde hava ile temasından dolayı halka oluşumu biyofilm varlığını göstermemektedir (Şekil 5B). Tüp dilüsyon yöntemi ile değerlendirme az sıvantı (+), sıvantı oluşturan (++), yoğun sıvantı oluşturan (+++) olarak değerlendirilmiştir. Tarama sonuçları Tablo 5'te verilmiştir.

Bu metot, biyofilm oluşturan bakterilerin seçimi için yapılan kongo red yöntemi ile kıyaslandığında, her iki yöntemin birbirini doğrular nitelikte olduğu tespit edilmiştir. Tüp dilusyon yönteminin zaman alıcı olması nedeniyle günümüzde kongo red ile biyofilm taraması daha hızlı gerçekleştirilmektedir.



(A) **(B)**

Şekil 5: Tüp dilüsyon yöntemine göre biyofilm oluşumunun belirlenmesi. Biyofilm pozitif MSSA 18 (A) ve biyofilm negatif MRSA 13 (B).

Tablo 5: Tüp dilüsyon yöntemi ile biyofilm oluşumu

Bakteri ismi	**24.saat**	**48.saat**	**72.saat**	**96.saat**	**120.saat**
MRSA 1	+	+	++	++	+
MRSA 2	+	+	++	+	+
MSSA 3	+	++	++	++	++
MSSA 4	++	++	-	+	+
MRSA 5	++	+++	++	++	++
MRSA 6	+++	++	+	-	+
MRSA 7	-	+	+	+	-
MRSA 8	+++	++	+++	+	+
MRSA 9	+++	++	+++	+	-
MSSA 10	+++	+++	+++	+	-
MRSA 11	++	+	++	+	+++
MRSA 12	+++	++	+	++	+++
MRSA 13	+	+	+	+++	+++
MRSA 14	+	++	+	+	++
MSSA 16	+++	+++	+++	+++	+++
MRSA 17	+	++	-	++	+++
MSSA 18	+	++	++	++	+
MRSA 19	+	+	-	+	++
MSSA 20	+	++	+	++	++
MRSA 21	+	+	-	++	++
MRSA 22	+	++	+	-	++
MRSA 23	+	+	+	+	++
MRSA 24	++	-	-	+	+
MRSA 25	+++	+	++	++	++
MSSA 26	+++	-	+	-	++

4.5 Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Tayini ve Biyofilm Oluşumuna Optimal Şartların Belirlenmesi

4.5.1 Biyofilm Oluşumuna pH'nın Etkisi

Biyofilm oluşumu üzerine etki eden fiziksel, kimyasal ve çevresel faktörlerin belirlenmesi, biyofilmin olumsuz etkilerinin bertaraf edilmesi açısından önemlidir. Bu amaçla optimizasyon çalışmalarında MSSA 10 ve MSSA 20 kodlu izolatlar seçilmiş ve çalışmanın ilk basamağında farklı pH'ların etkisini araştırmak amacıyla bu çalışmada pH'sı 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0'a ayarlanan TSB, 1/100 ve 1/200 dilue edilmiş TSB kullanılmıştır ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. Mikroplakalar günlük aralıklarla okunarak değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşumu üzerine başlangıç pH'nın etkisi Tablo 6 ve Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 6: MSSA 10 suşunun biyofilm oluşumuna pH'nın etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	pH				
		6	7	8	9	10
TSB	12	-	-	247,05	-	-
	24	-	-	43,97	-	-
	48	-	-	281,23	-	-
	72	-	-	100,56	-	-
	96	30,79	-	159,66	-	20,28
	120	28,75	-	287,67	-	18,73
	144	26,34	-	285,99	-	16,25
1/100	12	46,26	15,9	-	-	-
	24	69,65	34,27	42,12	54,07	-
	48	24,37	24,38	45,42	28,96	-
	72	55,72	1,06	153,11	2,57	-
	96	166,66	51,76	47,25	51,5	-
	120	69,65	23,67	256,41	23,17	-
	144	24,87	23,67	165,2	4,72	-
1/200	12	48,77	73,25	-	0,56	-
	24	73,77	37,03	102	0,56	12,26
	48	30,73	65,02	78,66	41,35	56,6
	72	40,98	28,39	228,66	10,9	82,07
	96	85,45	62,55	96,66	10,9	58,25
	120	7.78	11,52	320	12,21	22,64
	144	7,78	68,31	258,66	12,21	22,64

- : Biyofilm oluşumu yok

Tablo 7: MSSA 20 suşunun biyofilm oluşumuna pH'nın etkisi

Besi yeri	İnkübasyon süresi (saat)	pH				
		6	7	8	9	10
TSB	12	-	-	185,43	-	-
	24	-	-	228,57	-	-
	48	-	-	253,78	-	-
	72	-	-	147,61	-	-
	96	-	-	70,3	-	-
	120	-	-	77,59	-	-
	144	-	37,29	131,93	-	-
1/100	12	44,52	5,3	25,27	37,33	-
	24	65,67	26,5	19,89	37,33	-
	48	48,75	33,88	21,61	37,33	-
	72	107,96	40,63	81,31	80,25	-
	96	104,97	21,02	27,47	49,14	-
	120	104,97	21,02	173,26	22,96	-
	144	59,2	21,02	203,29	22,96	-
1/200	12	64,54	79,21	28	-	-
	24	50,2	42,59	62,66	-	-
	48	37,9	76,74	37,33	59,96	-
	72	29,71	91,56	148	46,24	-
	96	28.48	15,63	53,33	51,87	-
	120	28,48	12,55	187,33	159,39	-
	144	56,35	66,46	248,66	24,43	-

Sonuçlara göre MSSA 10'da biyofilm üretimi maksimum pH 8'de tespit edilirken, pH 9 ve 10'da biyofilm oluşumunun hemen hemen inhibe olduğu görülmüştür (Tablo 6). En iyi üretim pH 8'de gerçekleşmiştir. MSSA 20'nin sonuçlarına göre pH 8'de en iyi biyofilm üretimi bulunmuştur. Aynı zamanda pH 10'da biyofilm oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 7). Maksiumum biyofilm üretimi pH 8'de tespit edilmiştir.

Bundan sonraki çalışmalarda besiyerinin başlangıç pH'sı 8'e ayarlanmıştır.

4.5.2 Biyofilm Oluşumuna Sıcaklık ve Tuzun Etkisi

Çalışmamızda seçilen bakteriler insanlarda hastalık oluşumundan sorumlu patojen bakterilerdir. Bu tür bakterilerin optimal gelişim sıcaklıkları insan vücut sıcaklığı olan 37 °C'dir. Ayrıca insan patojeni bakteriler insanlarda yüksek ateş gibi klinik durumlara sebep olmaktadırlar. Bu nedenle çalışmamızın bu aşamasında 37 °C ve 42 °C'ler dikkate alınmıştır. Farklı tuz konsantrasyonun etkisini belirlemek için ise 0,2-8,0 mg/L aralığı çalışılmıştır. Sıcaklık ve tuzun etkisi ile ilgili sonuçlar Tablo 8 ve Tablo 9' da görülmektedir.

Tablolarda da görüldüğü gibi MSSA 10 suşu için en iyi sıcaklık 42 °C'dir. Tuz konsantrasyonlarda en iyi biyofilm etkisi 1 mg/L (% 372.45) 144. saat 1/100 dilüe TSB' de gözlenmiştir. Genel olarak MSSA 10 suşunda sıcaklık, tuz ve besin stresi biyofilm oluşumunu arttırdığı gözlemlenmiştir.

MSSA 20 suşunun biyofilmi tuzsuz 1/100 dilue edilmiş TSB ortamında 42 °C'de 144.saatte (%83.64) maksimum oluşum göstermiştir.

4.5.3 Biyofilm oluşumuna karbon kaynaklarının etkisi

Biyofilm oluşumu üzerine karbon kaynaklarının etkisini gözlemlemek amacıyla bakteriler 37 °C ve 42 °C'de ve farklı tuz içeren besiyerlerinde geliştirilmiştir. Tek karbon kaynağı olarak besiyerlerine fruktoz, glikoz, mannitol veya sukroz ilave edilmiştir. Sonuçlar MSSA 10 suşu için Tablo 10, Tablo 11, Tablo 12,Tablo 13'te verilmiştir. MSSA 20 için ise Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16, Tablo 17'de verilmiştir.

Tablo 8: MSSA 10'nun biyofilm oluşumuna farklı sıcaklık ve tuzun etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	37 ºC									42 ºC								
		Tuz konsantrasyonu (mg/L)									Tuz konsantrasyonu (mg/L)								
		TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	2,0	4,0	8,0	TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	2,0	4,0	8,0
TSB	12	139,61	33,59	74	-	-	-	-	67,82	14,73	6,65	9,82	-	24,56	2,69	-	4,59	2,53	64,5
	24	34,45	68,3	56,2	39,14	28,68	3,48	31,22	21,23	41,99	107,6	62,28	-	6,65	8,76	-	6,26	16,64	45,32
	48	34,45	18,85	48,5	28,36	35,66	5,38	31,22	77,65	44,76	106	32,8	-	6,65	8,97	-	23,46	44,21	35,86
	72	59,9	48,17	48,5	20,91	56,88	1,42	22,5	27,89	59,38	105,84	20,12	17,11	36,87	10,14	11,25	39,93	200,95	22,18
	96	21,07	181,45	56	65,13	85,9	84,15	88,11	30,74	97,3	94,29	34,07	15,05	56,7-	11,25	35,46	56,73	124,89	11,9
	120	164,34	151,18	64,5	55,46	155,78	44,37	113,15	75,27	144,21	113,47	55,3	44,69	40,88	69,88	49,92	61,96	52,29	73,21
	144	271,94	110,93	80,03	58,47	94,61	54,67	186,05	41,67	321,55	102,21	115,21	66,24	111,09	45,16	102,37	25,67	83,2	100
1/100	12	47,86	61,22	19,25	29,94	60,96	50	166,31	54,27	62,29	38,77	146,25	93,9	261,76	94,11	47,59	43,31	73,79	61,76
	24	159,35	199,46	233,68	129,14	85,82	111,49	129,67	115,77	108,82	73,79	121,65	180,48	157,75	60,96	65,24	63,63	77,27	119,51
	48	30,74	78,07	12,03	55,34	26,73	42,24	104,54	58,02	12,56	61,76	79,67	109,94	84,54	103,47	87,16	57,75	163,1	73,52
	72	96,25	159,89	37,7	100	18,71	87,7	146,79	95,72	92,24	50,26	111,22	103,2	93,1	48,93	102,4	73,79	101,87	40,9
	96	79,41	322,72	63,9	115,5	36,36	125,66	233,95	136,09	195,72	58,02	137,43	110,53	132,62	8,55	52,67	2,13	108,55	6,14
	120	259,62	201,87	52,67	105,88	203,47	178,34	173,52	185,02	268,18	31,81	126,73	123,52	107,75	68,44	104,54	47,05	121,12	44,91
	144	100,26	231,81	115,5	108,82	91,97	102,13	293,85	114,7	214,7	320,58	230,48	163,36	121,65	171,39	372,45	71,65	266,04	86,36
1/200	12	136,42	69,14	57,3	155,45	35,49	24,36	45,24	12,06	59,39	75,4	113,92	22,04	227,37	287,47	49,88	107,88	46,86	50,11
	24	180,97	149,65	93,73	144,31	48,02	119,02	65,42	76,56	93,5	65,66	180,51	67,51	82,59	67,05	52,2	88,63	32,01	155,68
	48	154,75	163,8	13,68	104,17	141,53	59,39	161,02	302,55	117,63	54,75	90,48	30,94	39,67	48,72	43,15	61,02	57,3	53,13
	72	109,04	141,53	35,26	72,15	13,92	71,46	70,3	78,88	60,78	51,97	129,23	34,57	35,26	43,85	56,84	47,09	80,74	48,25
	96	80,04	263,57	67,28	79,11	83,75	220,64	128,77	166,35	103,71	90,02	99,76	35,26	106,72	32,94	67,05	15,08	82,13	17,86
	120	209,28	148,72	139,67	27,61	185,38	100,46	95,59	67,74	135,73	84,45	116,7	27,61	61,48	64,26	79,11	49,18	103,71	62,64
	144	161,02	157,77	96,51	116	75,87	43,15	124,59	108,58	79,35	130,16	151,74	103,71	80,27	32,48	134,8	99,07	198,83	48,25

Tablo 9: MSSA 20'nin biyofilm oluşumuna farklı sıcaklık ve tuzun etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	37 ºC							42 ºC						
		Tuz konsantrasyonları (mg/L)							Tuz konsantrasyonu (mg/L)						
		TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	2,0	TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	2,0
TSB	12	-	10,77	-	-	-	-	-	16,95	13,31	25,35	-	15,37	9,66	26,3
	24	22,34	13,45	-	-	-	-	6,97	60,06	50,55	26,94	38,82	29,79	56,25	35,02
	48	33,16	39,61	-	16,48	2,06	17,9	4,43	47,06	33,59	33,91	29,47	66,87	23,93	51,34
	72	57,21	33,71	58,95	21,39	24,88	11,09	1,9	38,98	33,75	33,01	34,38	55,54	29,47	30,58
	96	47,54	39,46	32,64	23,61	19,96	12,83	21,23	20,28	33,32	33,32	32,48	45,43	29,47	15,53
	120	20,12	39,5	32,64	24,51	19,49	7,29	10,77	20,28	33,5	33,5	30,28	40,23	29,47	15,53
	144	15,86	39,5	30	24,51	19,49	7,29	10,77	19,96	34,64	34,64	30,28	42,34	29,47	15,53
1/100	12	-	14,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	6,95	-	-	-	-	-	19,6	9,35	-	-	-	-	-
	48	-	8,55	-	-	-	-	-	19,6	25,13	-	-	-	-	-
	72	-	16,04	-	-	-	-	-	29,89	15,5	-	-	-	-	-
	96	-	11,22	-	-	-	-	-	40,69	9,89	-	-	-	-	-
	120	-	15,77	-	-	-	-	-	63,82	6,41	-	-	-	-	-
	144	-	20,05	0,8	-	-	-	-	83,64	7,75	11,22	-	11,49	-	3,47
1/200	12	-	17,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	4,17	17,45	-	-	-	-	-	16	16,47	-	-	-	-	-
	48	7,85	21,57	-	-	-	-	-	15,4	15,98	-	-	-	-	-
	72	7,85	12,62	-	-	-	-	-	15,4	23,04	-	-	-	-	-
	96	8,35	10,44	-	-	-	-	-	14,87	25,05	-	-	-	-	-
	120	8,9	23,62	-	-	-	-	-	10,72	15,33	-	-	-	-	-
	144	9,65	27,14	-	-	-	-	-	8,58	17,19	-	-	-	-	-

Tablo 10: MSSA 10 biyofilm oluşumuna früktozun etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	37 °C									42 °C								
		Tuz konsantrasyonu (mg/L)									Tuz konsantrasyonu (mg/L)								
		TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8	TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8
TSB	12	32,07	21,5	18,11	40	157,73	150,37	149,81	60,75	116,98	29,43	11,13	23,96	43,01	109,05	109,81	72,64	49,05	131,88
	24	76,6	83,2	26,22	12,26	155,47	91,5	92,64	92,45	193,2	79,81	72,45	32,07	95,28	55,28	64,71	51,5	40,75	50,18
	48	81,5	31,13	37,16	77,35	191,69	190,94	132,83	161,13	131,13	68,3	10,18	12,45	13,58	131,58	180,18	109,81	126,22	121,13
	72	86,02	33,77	69,43	31,88	127,16	79,05	93,36	116,03	99,24	80,18	13,58	251,5	136,41	114,9	110,94	106,41	98,67	113,39
	96	109,62	35,66	87,92	39,43	185,84	215,66	129,81	126,41	136,41	78,67	5,84	26,41	10,75	112,64	105,84	155,84	129,24	146,03
	120	198,11	181,13	153,01	140,75	309,24	509,24	93,96	155,66	155,28	84,71	97,54	121,5	102,83	367,73	189,05	375,47	213,77	329,24
	144	124,33	62,07	340	130,94	365,09	123,39	177,16	149,24	290	108,49	52,45	77,54	109,43	164,15	126,79	112,64	127,54	105,28
1/100	12	54,44	24,78	3,81	8,89	113,98	140,67	77,54	116,65	122,66	65,46	21,82	-	119,49	55,72	282,83	26,05	80,93	18
	24	89,61	46,18	65,46	30,72	175,42	144,91	110,38	111,01	124,78	69,91	74,57	67,16	63,77	163,34	291,73	48,09	230,5	57,41
	48	76,35	46,18	58,68	18,43	269,27	120,55	76,05	120,76	82,41	44,06	18,85	33,6	53,17	113,55	156,99	96,39	89,61	91,1
	72	75,63	41,1	54,66	30,08	46,61	81,14	100,84	75,84	79,19	47,11	27,54	25,42	19,7	67,37	79,44	61,44	88,55	82,83
	96	188,34	177,96	38,55	53,17	91,1	159,74	103,17	162,5	162,07	58,47	14,19	38,47	24,15	112,28	109,74	104,23	110,16	84,32
	120	190,25	234,32	171,82	122,66	73,51	136,22	77,75	140,46	139,4	64,19	86,86	57,41	73,09	80,93	95,33	88,77	73,3	66,73
	144	142,16	60,59	99,78	158,26	63,98	82,62	332,41	156,77	59,95	168,85	77,54	38,55	56,99	48,94	122,24	25,21	40,25	19,91
1/200	12	95,59	40,82	9,22	1,04	101,46	78,82	163,1	121,99	54,92	279,87	103,56	83,64	15,72	135,42	102,3	46,54	161,42	87,63
	24	115,51	105,45	23,48	63,73	289,3	104,4	224,73	153,03	132,07	247,58	75,68	53,03	68,76	94,12	247,16	50,52	197,27	65,19
	48	89,55	47,58	183,85	60,62	181,97	447,37	130,81	165,82	94,33	492,03	69,85	29,35	17,19	112,57	198,74	85,95	171,9	124,94
	72	90,14	61,29	109,49	41,09	156,81	117,19	68,55	92,87	70,85	226,2	69,39	80,71	23,89	80,92	90,14	89,3	53,03	106,7
	96	302,51	158,07	102,57	67,92	115,93	284,48	120,33	160,37	103,14	32,91	134,17	5,66	28,51	78,82	88,25	86,16	86,37	81,76
	120	114,25	140,25	159,95	65,61	331,02	258,49	96,64	114,67	260,79	269,39	151,57	38,99	72,74	99,16	138,36	70,02	74,42	71,27
	144	156,81	138,99	72,74	77,35	127,04	164,77	86,37	73,58	68,55	231,23	74,21	53,66	64,57	190,35	154,5	41,71	101,67	155,97

Tablo 11: MSSA 10 biyofilm oluşumuna glukozun etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	37 ºC									42 ºC								
		Tuz konsantrasyonu (mg/L)									Tuz konsantrasyonu (mg/L)								
		TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8	TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8
TSB	12	35,47	129,62	166,98	78,3	210,56	113,2	196,79	74,71	169,81	23,39	100,56	90,75	106,79	109,62	55,47	55,84	114,71	84,71
	24	49,62	96,03	100,37	168,11	133,2	105,84	93,39	222,64	171,32	73,96	79,81	60,56	103,77	46,41	72,07	44,15	45,66	61,88
	48	13,39	119,81	132,07	120,56	99,43	130,37	70	160,75	76,6	38,3	95,66	123,01	112,07	113,39	111,5	98,86	123,77	144,9
	72	55,09	112,2	116,22	144,9	90,75	115,66	100	128,11	73,39	82,64	108,49	105,84	140,56	67,92	56,98	67,73	37,35	128,11
	96	71,69	115,47	129,62	140,18	95	47	148,86	106,41	102,83	87,35	123,77	128,49	129,24	73,77	82,07	44,71	68,86	85,28
	120	270,56	129,43	350,18	364,9	216,6	212,07	203,39	345,47	322,07	251,88	284,71	333,77	314,52	320,56	271,13	262,64	309,81	466,22
	144	195,66	124,15	474,71	226,6	346,41	194,9	309,43	172,64	203,77	96,79	153,77	116,79	166,22	136,98	147,35	102,07	188,67	173,39
1/100	12	21,27	34,32	204,66	17,16	51,27	37,92	129,02	20,76	24,36	64,83	65,25	37,71	143,46	24,57	55,72	12,5	184,32	26,69
	24	47,03	107,62	117,37	115,25	135,59	70,97	53,6	152,75	154,66	22,88	105,93	63,98	312,92	48,72	93,64	31,14	110,59	155,29
	48	15,46	138,98	87,07	163,98	107,83	138,77	149,57	106,99	116,1	16,94	138,55	107,41	85,38	88,55	94,27	81,77	101,69	96,18
	72	15,46	83,68	59,74	163,55	35,16	89,83	84,53	281,77	36,86	29,32	105,08	86,65	125,84	86,22	119,27	78,6	92,79	252,75
	96	18	222,66	97,45	150	85,38	142,16	89,83	112,92	86,22	29,32	73,72	192,16	156,56	51,48	64,61	48,51	69,7	90,04
	120	58,68	56,77	258,05	124,36	422,24	112,71	171,18	88,13	375,21	54,02	84,74	97,66	148,72	337,71	121,61	95,55	144,27	170,12
	144	69,91	84,32	89,83	134,74	99,15	109,74	132,62	84,53	378,17	3,81	147,45	37,92	81,77	53,81	67,37	58,05	178,38	61,86
1/200	12	16,56	10,48	106,28	40,67	48,84	28,51	214,67	5,87	79,24	38,15	203,14	43,39	52,2	28,93	76,93	32,91	172,53	20,57
	24	65,61	59,53	89,72	118,86	43,39	57,23	33,54	130,39	138,15	66,66	155,97	59,53	272,53	64,36	52,2	33,96	51,57	32,07
	48	76,72	132,28	120,33	89,93	87,42	134,8	89,3	163,94	102,93	58,49	113,62	80,71	107,12	71,69	135,22	91,4	145,28	86,79
	72	37,1	64,98	73,16	122,43	39,41	84,69	52,62	43,6	74	53,45	59,53	95,59	80,08	112,99	84,48	77,98	49,47	101,67
	96	16,98	201,88	110,69	116,14	100	158,9	67,71	114,04	51,98	18,44	69,6	140,04	94,96	93,08	70,44	41,71	75,26	100,41
	120	125,15	51,36	114,67	282,8	89,51	92,24	68,34	64,98	346,96	66,66	48,84	114,46	119,91	205,66	155,34	132,7	96,85	58,28
	144	55,76	114,88	125,78	109,64	101,88	135,22	114,46	74,63	78,61	31,02	117,81	77,35	89,3	68,76	75,68	72,32	133,96	194,12

Tablo 12: MSSA 10 biyofilm oluşumuna mannitolün etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	37 °C									42 °C								
		Tuz konsantrasyonu (mg/L)									Tuz konsantrasyonu (mg/L)								
		TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8	TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8
TSB	12	49,1	224,1	379,46	297,99	114,95	208,48	115,17	184,82	112,27	120,31	139,95	117,18	125,89	237,05	136,16	165,17	185,93	73,88
	24	75,66	205,8	162,94	202,9	302,67	416,74	202,9	240,84	279,68	64,06	147,54	191,74	165,62	140,84	180,58	299,55	193,3	220,53
	48	42,41	139,5	158,92	121,87	260,04	766,29	184,59	217,63	158,03	124,33	239,06	172,54	127,9	398,66	470,98	273,66	381,69	271,65
	72	36,83	179,01	205,13	261,83	177,45	182,58	130,35	187,05	123,88	111,38	133,03	118,75	108,7	215,4	181,02	151,33	124,1	160,93
	96	183,7	254,01	267,85	329,24	128,34	168,3	162,5	74,77	152,45	96,87	148,66	251,11	143,3	289,73	274,55	215,84	202	196,65
	120	254,68	415,62	354,01	375	366,96	205,35	204,24	142,18	276,78	146,87	171,87	586,38	308,03	368,97	217,85	350,66	210,04	276,11
	144	170,75	294,19	283,92	144,19	439,5	334,15	394,64	312,27	413,61	150,89	347,54	377,9	279,46	583,03	250,44	264,5	204,68	307,81
1/100	12	123,59	40,65	257,47	54,67	87,85	130,84	86,91	102,57	84,34	68,92	53,03	39,95	98,83	189,25	81,54	43,22	84,57	50
	24	92,75	94,39	102,8	94,15	467,28	234,11	153,97	161,21	165,18	54,9	74,76	75,7	68,45	191,35	156,54	232,24	115,88	188,08
	48	14,48	117,28	129,43	83,17	237,38	625,23	152,1	165,65	192,52	217,75	146,72	172,89	102,8	199,29	194,85	201,63	174,06	164,25
	72	58,64	119,85	112,61	233,64	109,81	227,57	84,11	132,71	67,75	50,46	135,28	77,1	96,26	173,59	160,04	170,32	129,9	135,74
	96	94,62	251,16	89,25	257,71	71,96	244,15	133,64	75	131,07	50,46	28,99	24,53	15,11	30,48	52,91	41,01	26,39	21,93
	120	102,8	149,53	338,08	403,03	75,7	101,86	91,35	61,21	85,28	98,83	76,63	409,11	123,59	150,23	168,69	209,81	130,37	136,21
	144	59,57	122,89	345,09	33,64	259,11	265,88	253,73	267,52	278,27	49,53	102,8	77,33	82,47	183,87	91,12	66,58	82,47	97,66
1/200	12	-	-	218,58	-	3,59	89,21	-	24,78	34,94	-	-	-	14,37	-	13,25	-	9,66	-
	24	44,23	-	119,85	13,01	72,73	119,45	16,35	88,35	14,86	-	26,64	-	34,37	49,44	110,4	50,06	123,04	124,9
	48	44,23	33,45	71,96	13,01	66,91	265,3	45,22	105,08	24,9	26,64	46,84	14,25	50,68	47,7	95,04	24,03	28,99	15,73
	72	24,28	2,23	37,8	32,34	38,04	60,71	46,22	146,22	32,09	26,64	0,12	14,25	81,53	31,1	13,01	5,7	2,35	28
	96	24,28	73,23	22,05	53,28	33,08	33,45	39,52	124,41	49,41	26,64	28,99	24,53	15,11	30,48	52,91	41,01	26,39	21,93
	120	15,98	20,19	25,65	49,07	116,78	20,32	4,08	98,47	88,55	14,69	77,32	12,76	101,48	15,86	14,74	12,01	26,39	1,73
	144	15,98	5,7	25,65	49,07	135,43	118,95	102,85	52,16	106,44	14,69	15,48	2,6	2,6	26,88	100,12	6,93	4,46	14,74

Tablo 13: MSSA 10 biyofilm oluşumuna sukrozun etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	37 ºC									42 ºC								
		Tuz konsantrasyonu (mg/L)									Tuz konsantrasyonu (mg/L)								
		TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8	TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8
TSB	12	8,97	87,43	116,87	119,38	61,57	57,63	54,21	61,04	67,5	4,66	85,27	68,58	43,8	62,29	65,88	48,11	72,71	85,27
	24	26,75	129,44	189,58	214,18	107,36	113,64	76,66	111,49	122,62	18,31	357,63	119,21	87,97	86,17	190,66	73,96	168,4	63,01
	48	15,08	200,71	169,12	165,35	113,46	187,25	90,66	159,24	122,08	65,52	246,14	191,38	328,18	128,18	231,59	174,86	170,91	166,42
	72	58,16	150	120,1	154,03	104,48	215,61	194,61	69,78	80,78	107,36	104,48	79,17	95,33	84,02	152,78	73,07	130,16	94,43
	96	113,28	84,91	99,33	56,91	105,02	170,73	94,25	74,86	186,53	28,18	185,99	160,68	183,66	151,7	186,35	73,24	125,85	101,43
	120	141,83	175,58	182,4	146,49	190,12	176,84	158,16	128,54	245,96	168,4	191,74	187,97	264,81	126,03	190,48	124,23	127,28	265,17
	144	206,1	284,73	308,07	349,19	207,36	282,22	126,57	267,68	254,21	166,96	210,95	176,3	245,78	128,18	228,54	161,04	163,01	322,62
1/100	12	50,82	210,23	151,15	146,2	100	104,29	158,74	126,4	135,64	43,56	235,64	146,86	165,34	118,15	188,11	102,64	156,1	192,4
	24	122,11	220,46	208,25	295,7	143,23	194,71	122,44	198	139,27	172,27	181,84	433	187,78	180,52	225,08	145,54	152,47	190
	48	53,46	194,05	403,63	193,72	252,47	305,28	227,06	306,6	227,72	117,16	198,01	153,46	283,49	165,01	191,41	167,98	240,26	204,62
	72	96,36	268,64	185,14	243,56	105,61	520,13	146,53	248,84	118,81	105,94	192,07	172,6	173,26	228,38	211,22	236,96	268,31	232,01
	96	114,19	123,76	194,05	256,43	244,22	152,47	216,83	98,34	165,01	48,18	258,41	194,38	219,47	228,71	343,89	155,77	281,84	193,06
	120	343,56	105,94	191,74	194,71	174,91	164,68	151,81	154,78	151,14	169,96	191,41	239,6	223,43	196,03	234,32	243,89	167,32	305,28
	144	265,67	422,44	490,42	418,48	386,79	383,82	477,22	318,81	425,08	220,79	133,66	131,53	170,62	124,09	191,08	169,96	190,42	79,43
1/200	12	39,95	82,24	54,67	90,65	68,69	242,05	38,55	71,96	61,91	64,95	143,45	121,02	117,52	79,43	99,06	32,71	58,87	100,23
	24	50	185,74	102,57	132	58,17	98,83	68,45	47,89	89,48	98,59	165,65	123,83	469,85	119,85	110,51	142,75	76,4	70,32
	48	84,81	215,65	173,83	116,58	177,33	134,81	161,68	153,73	94,39	80,37	119,62	94,85	101,86	77,57	99,29	85,28	151,63	11,44
	72	67,28	132	141,82	152,33	128,5	509,34	91,58	188,31	106,3	55,14	97,89	120,09	84,11	150,23	97,19	204,2	353,27	146,49
	96	60,51	73,13	270,09	71,02	129,2	87,85	137,14	124,06	117,52	36,21	104,67	116,12	118,69	125,7	173,59	103,5	154,2	150
	120	161,44	50,23	91,35	109,81	64,71	73,83	54,43	74,76	67,05	145,79	86,21	72,66	104,43	91,35	97,89	64,95	101,16	72,42
	144	107,94	243,92	307,71	261,91	260,51	264,25	240,42	176,63	327,8	78,03	132,47	60,51	114,01	70,32	74,06	139,48	79,43	96,72

Tablo 14: MSSA 20 biyofilm oluşumuna früktozun etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	37 ºC									42 ºC								
		Tuz konsantrasyonu (mg/L)									Tuz konsantrasyonu (mg/L)								
		TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8	TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8
TSB	12	-	-	41,69	-	23,96	40	4,52	104,15	4,33	52,26	33,58	83,96	22,83	54,9	22,07	48,3	17,16	41,13
	24	3,2	-	40,94	11,85	37,92	7,92	13,58	-	15,09	90	41,69	76,98	23,39	43,96	29,05	21,69	17,16	24,71
	48	45,28	15,47	40,94	13,77	48,86	7,92	50,94	-	26,98	49,81	20,75	74,15	60,18	22,83	13,77	2,07	20,37	24,71
	72	8,49	70,37	41,69	14,71	51,5	12,83	18,3	3,77	14,9	60,56	46,22	49,62	5,84	46,41	8,86	18,11	20,37	3,39
	96	39,43	23,2	49,22	14,33	46,41	24,9	13,2	25,28	6,41	46,98	17,35	63,96	17,16	39,81	25,66	25,84	24,15	12,07
	120	39,43	23,2	49,22	14,33	77,16	24,9	3,96	25,28	8,3	15,84	3,39	32,26	15,84	44,52	22,83	37,92	20,75	16,98
	144	30,18	14,52	9,43	14,33	62,07	29,24	41,13	97,16	66,03	31,88	3,39	50,18	22,26	72,07	36,03	40,94	19,24	23,58
1/100	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	6,35	-	-	-	-	-	17,37	-	-	-	-	-	-
1/200	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,04	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,04	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,04	-	-	-
	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,04	-	-	-
	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,58	-	-	-	-	11,25	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,58	-	-	-	-	11,25	-	-	-

Tablo 15: MSSA 20 biyofilm oluşumuna glukozun etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	37 ˚C									42 ˚C								
		Tuz konsantrasyonu (mg/L)									Tuz konsantrasyonu (mg/L)								
		TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8	TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8
TSB	12	48	-	36,72	52,87	27,87	60,84	26,1	-	30,75	76,1	25,22	73	65,92	77,87	58,62	71,68	29,2	44,69
	24	27,21	-	44,24	34,29	33,62	10,17	25,88	9,95	14,82	150,66	60,61	55,53	38,49	35,39	44,24	43,36	42,25	76,1
	48	62,16	-	80,93	34,29	32,3	24,33	36,06	12,38	75,22	64,61	22,34	36,5	20,57	48,45	39,15	26,76	5,08	44,02
	72	120,79	11,72	52,43	25,66	38,27	24,33	34,95	12,38	24,33	94,02	64,6	48,45	21,9	40,7	13,93	49,33	7,07	26,32
	96	61,28	32,96	44,02	27,21	41,81	56,19	28,31	13,71	13,71	67,47	64,6	65,92	71,23	44,02	76,76	37,38	36,5	20,35
	120	41,37	9,7	30,3	11,94	31,63	48,89	29,64	2,21	12,83	55,53	44,24	45,13	44,24	81,19	53,76	44,24	43,36	36,9
	144	42,69	89,82	103,09	71,68	119,69	92,69	91,81	64,15	58,18	42,03	48,67	98,67	69,91	104,86	109,07	58,18	56,19	64,6
1/100	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/200	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 16: MSSA 20 biyofilm oluşumuna mannitolün etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	37 ºC									42 ºC								
		Tuz konsantrasyonu (mg/L)									Tuz konsantrasyonu (mg/L)								
		TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8	TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8
TSB	12	36,38	-	45,53	11,83	31,25	32,58	3,12	9,59	20,08	58,03	38,39	79,46	61,6	77,23	84,59	67,63	50	83,48
	24	36,38	36,6	56,69	35,71	59,15	40,84	29,24	13,16	17,41	103,79	38,39	62,05	43,3	177,9	93,97	206,69	92,41	176,33
	48	63,16	36,6	83,7	8,03	63,61	34,37	75,44	107,36	29,01	55,13	12,94	20,53	38,61	81,47	47,54	52,45	30,35	40,17
	72	108,48	2,23	51,56	38,61	46,42	50,66	26,78	15,17	39,28	32,36	49,77	49,33	12,94	47,99	38,61	28,79	11,6	31,69
	96	61,38	0,22	5,58	36,16	42,81	7,14	14,73	15,17	18,75	12,94	24,33	38,61	7,14	43,08	37,5	4,24	9,59	25,89
	120	7,14	0,22	5,58	36,16	20,31	7,14	3,12	15,17	10,04	12,94	24,33	71,65	13,39	15,84	20,98	4,24	13,83	10,04
	144	7,36	0,22	5,58	36,16	24,33	7,14	3,12	15,17	10,04	12,94	24,33	71,65	13,39	144,41	41,96	55,13	13,83	102,45
1/100	12	-	-	-	-	-	9,57	-	-	-	-	-	-	11,21	27,33	-	-	-	-
	24	-	-	6,54	-	-	18,69	-	-	-	-	-	-	11,21	27,33	24,29	-	-	-
	48	-	-	27,8	-	-	16,35	-	-	-	-	51,63	-	64,48	1,16	24,29	-		-
	72	-	-	27,8	-	-	9,34	-	-	-	-	51,63	-	64,48	1,16	3,73	-	-	-
	96	-	-	25,64	-	-	2,8	-	-	-	-	46,84	-	42,26	42,28	3,73	-	-	-
	120	-	-	25,64	-	-	2,8	-	-	-	-	42,28	-	38,9	42,28	23,83	-	-	-
	144	4,9	-	20	-	-	2,8	-	-	-	-	42,28	-	38,9	42,28	60,51	78,97	14,71	58,41
1/200	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 17: MSSA 20 biyofilm oluşumuna sukrozun etkisi

Besiyeri	İnkübasyon süresi (saat)	37 ºC									42 ºC								
		Tuz konsantrasyonu (mg/L)									Tuz konsantrasyonu (mg/L)								
		TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8	TUZSUZ	0,2	0,4	0,6	0,8	1	2	4	8
TSB	12	-	-	-	9,69	2,51	15,61	-	-	-	79,71	47,57	45,78	46,49	50,62	60,5	59,42	39,31	31,05
	24	14,9	8,79	35,36	12,38	19,56	19,92	0,89	-	22,62	76,12	134,82	122,8	76,3	129,98	52,42	71,45	56,91	66,24
	48	14,9	2,69	9,51	2,69	7,36	11,84	0,89	-	22,62	76,66	23,15	19,74	7,18	20,1	38,21	15,79	19,21	10,77
	72	62,11	2,69	10,41	4,84	9,69	11,84	8,97	-	1,07	19,92	23,15	24,05	7,18	13,1	6,64	8,79	19,21	21,54
	96	38,24	2,69	9,33	4,84	4,12	11,84	8,97	-	1,07	98,02	12,74	46,67	15,79	46,31	15,79	33,57	11,31	60,86
	120	4,84	8,25	20,1	26,21	18,49	7,36	3,23	-	1,07	25,49	59,78	113,64	68,74	54,21	60,86	47,57	41,61	110,05
	144	5,92	69,47	50,98	56,55	46,14	44,88	37,7	58,16	31,95	32,85	68,04	93,53	63,73	71,27	86,35	101,79	82,94	118,67
1/100	12	-	26,73	5,28	28,38	25,74	51,81	9,9	38,28	-	-	44,55	32,01	44,55	36,3	52,8	42,57	43,23	23,1
	24	-	33	26,07	31,35	27,72	33,99	9,9	17,49	7,59	-	102,64	18,81	57,75	8,25	36,3	42,57	93,13	1,67
	48	-	117,49	25,74	26,73	7,59	43,56	10,65	29,37	2,97	-	0,99	21,12	30,69	23,1	102,97	4,95	30,36	1,67
	72	-	22,77	30,36	37,62	15,51	22,11	11,22	29,37	4,95	-	8,91	8,58	14,85	19,08	21,78	11,55	3,96	1,67
	96	-	22,77	30,36	37,62	6,93	22,11	11,22	29,37	4,95	-	18,81	5,28	22,44	15,51	26,73	11,55	7,92	1,67
	120	-	14,19	42,9	27,72	35,97	19,14	11,22	2,64	112,54	-	39,27	21,78	23,76	26,4	43,89	12,54	33,66	1,67
	144	-	54,78	47,85	49,83	56,1	90,75	44,22	44,55	23,76	-	96,36	99,66	75,9	111,22	64,68	25,74	76,56	113,2
1/200	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,17	2,33	7,94	15,18	11,91	-	8,41	-
	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,17	11,21	12,14	7,71	11,91	-	4,2	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,26	11,21	83,87	7,71	111,44	-	82,24	-
	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,17	11,21	83,87	7,71	3,27	-	82,24	-
	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,17	6,77	4,9	20,79	3,27	-	82,24	-
	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,78	6,77	4,9	20,79	18,45	-	14,71	-
	144	-	19,39	13,31	13,55	10,04	8,64	4,9	-	-	-	28,97	12,61	32,41	13,78	59,34	-	26,4	-

Sonuçlara göre her iki bakteri de maksimum biyofilm oluşumuna tek karbon kaynağı olarak mannitol içeren ortamda ulaşmıştır. En düşük biyofilm yüzdesi MSSA10 glukozlu ortamda ulaşırken, MSSA20'de früktozda tespit edilmiştir. MSSA10 suşunun biyofilm oluşumuna karbon kaynakları etkisi yüksekten düşüğe doğru mannitol > sükroz > fruktoz > glikoz olarak sıralanırken, MSSA20'de bu sıralama mannitol > glikoz > sükroz > früktoz şeklindedir.

MSSA10 suşu mannitol varlığında 1 mg/ml tuzlu ortamda ve 37 °C'de en iyi biyofilm yüzdesine ulaşmıştır (% 766,29). MSSA 20 suşu ise 42 °C'de mannitol karbon kaynağı ile 2 mg/ml tuz yoğunluğunda dilue edilmemiş TSB ortamında (% 206,69) biyofilm üretmiştir.

4.6 Biyofilmin Antibiyotik Penetrasyonu Üzerine Etkisi

Biyofilmin antibiyotik penetrasyonunu inhibisyon etkisini belirlemek için, ilk aşamada tüm patojen bakterilerin seçilen bazı antibiyotiklere dirençlilik profilleri çıkarılmıştır (Tablo 18). Çalışmanın ikinci aşamasında ise bakteriler üzerine en etkili olan antibiyotikler seçilmiştir. MSSA10 ve MSSA20 biyofilmlerin, seçilen bu antibiyotiklerin penetrasyonunu inhibe edip etmediklerini anlamak için Anderl. ve diğ. (2000)'nin önerdiği deney modeli kullanılmıştır. Inhibisyon zon çapları mm cinsinden ölçülmüş ve sonuçlar inhibisyon yüzdesi olarak verilmiştir (Tablo 19 ve 20). Sonuçlardan da görüldüğü gibi biyofilmin antibiyotiklerin geçişini önlediği görülmüştür. Biyofilm oluşumu için kullanılan bakteri hücre konsantrasyonu arttıkça antibiyotik penetrasyonu inhibisyon yüzdesi de artmıştır. Genel olarak MSSA 10 biyofilminin Gentamisin, Tobramisin ve Vankomisin antibiyotiklerin penetrasyonunu inhibe ettiği görülürken (Tablo 19), MSSA20 biyofilmi kloramfenikol, tobramisin, ampisilin ve siproflaksin antibiyotiklerinin penetrasyonunu önlemiştir (Tablo 20). Örneğin Gentamisin antibiyotiğinin L. monocytogenes ATCC 7644'ya etkisine bakıldığında, 5 µl MSSA 10 suşundan elde edilen biyofilminin dahi %100 antibiyotik penetrasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Tablo 20). MSSA 20 biyofilminin antibiyotiklere penetrasyonunu engelleme sıralaması chloramphenicol > ampicillin > ciprofloxacin > tobramycin > vancomycin >

gentamicin > ofloxacin > piperacilin > erythromycin eklinde sıralanmıştır. Diğer antibiyotiklere farklı derecelerde inhibisyon etkisinin olması, biyofilm matriksinin antibiyotik seçiciliğini göstermektedir.

Tablo 18: Patojen bakterilerin antibiyotik dirençlilik profilleri (inhibisyon zon çapı:mm)

Bakteri adı	Chloramphenicol	Gentamıcın	Ampıcıllın	Erythromycın	Penicıllın	Azıthromycın	Ofloxacın	Pıperacıllın	Vancomycın	Amıkacın	Tobramycın	Cıprofloxacin
S. aureus ATCC 33862	14	9,1	18,6	13,1	5	10	11,4	25,4	10,3	2	4	12,9
L. monocytogenes Samsun izolatı	25,9	18,7	30,9	22,7	16,7	14,2	9,5	27,3	13	14,5	13,2	15,1
S. aureus ATCC 25923	15,6	17,1	32,7	18,6	26,3	16	19	31,4	9	13,1	12	19
B. pumilus NRRL-BD-142	10,2	12,7	-	17,3	-	13,2	16,6	5.8	9,4	12	8,8	20,3
E. faecalis ATCC 19433	16	4,9	16,1	14,1	5,4	6,9	10,2	19,3	7,3	-	2,8	16
E. cloacae ATCC 28355	13,4	16,5	13,6	-	-	8,8	25,1	22,7	-	14,8	10,7	27,6
S. typhimurium Gazi üniversitesi	-	8,9	-	5,8	-	9,3	-	4,7	-	9,1	6,7	3,3
B. cereus NRRL-B-3711	9,5	17,5	13,7	14,5	7,1	15,3	24	17,1	10	12,4	12	25,1
B. subtilis NRRL-B-209	26,9	26,2	33,3	32	24,8	24	40	33,6	19,1	24	23,4	38
M. flavus	32,8	20,4	30,4	15,3	21,2	28,9	10,8	29,1	17,3	19,6	10,4	19,5
M. luteus NRRL-B-1013	14,8	6	20,9	10,6	-	6	12,2	22,4	8,5	-	-	14
P. stutzeri P40	10	16	8,3	9,4	-	12,8	23,4	21,9	-	14	12,9	28,6
P. fluorescens ATCC 55241	20	16,2	-	-	-	8,7	17,3	14,4	-	10,5	10	30
P. vulgaris RSKK 96026	18	17,2	-	-	-	6,6	24	21,9	-	19,9	14	25,6
E. coli ATCC 25922	18,6	9,2	10	5,4	-	12	20	18,8	-	10,6	8,2	21,6
Y. enterecolitica RSKK 1501	8,2	12,6	-	-	-	5,6	11	23,2	-	12,6	9,8	13,2
B. cereus RSKK 863	15	14,7	20,5	18	12	14,4	17,8	18	10,6	13,4	9	21,8
B. cereus I2	19,2	13,4	5,6	19,6	-	14,2	16,6	12,6	10,6	12,4	10,4	18
L. monocytogenes ATCC 7644	24,4	22	26,6	25,8	15,4	20,5	18,8	28,1	16,1	19,3	20	21,8
L. monocytogenes Klinik İzolat	24,1	17,6	24,6	27,4	10,8	18,4	17,4	26,2	13,2	11	11,5	14,4
M. morgani	10,5	15,4	-	-	-	8	13,8	23,7	-	12	11,1	13,2
E. coli ATCC 11230	12,4	10	11	-	-	9,9	14,3	16,5	-	8	7,9	22,4
P. vulgaris NRRL-B-123	-	19,4	-	3,3	-	8,6	21,4	25	-	17,8	13,3	21,4
Cowan liyofili	16	15,2	27,4	19,7	22,6	15,5	17,6	29,3	8	10,8	11,2	15,2
E. coli 0157-H7	8,6	14,2	-	-	-	6,8	13,6	21,1	-	13,1	11	17
S. aureus ATCC 29213	13,7	6,1	18,4	15,6	3	8,3	11,3	3,2	7	2,5	2,7	12,5

-: inhibisyon yok

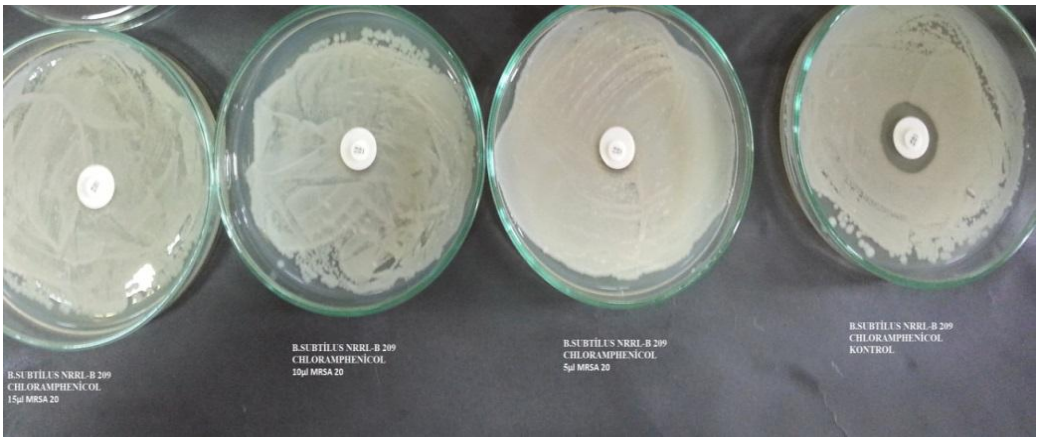
Tablo 19: MSSA 10 biyofilminin antibiyotik penetrasyonu üzerine inhibisyon etkisi (%)

BAKTERİ ADI	ANTİBİYOTİK ADI	5µl	10µl	15µl
B. subtilis NRRL-B-209	Chloramphenicol	D	15,71	19,04
	Erythromycin	D	D	66
	Vancomycin	50	D	100
	Ofloxacin	9,7	D	23,77
	Cıprofloxacin	D	19,24	31,2
	Ampicillin	D	100	D
Cowan liyofili	Chloramphenicol	D	17,13	D
	Vancomycin	29,29	D	D
	Piperacillin	D	9,26	27,65
E. cloacea ATCC 28355	Chloramphenicol	31,85	D	46,67
	Ciprofloxacin	D	D	D
S. aureus ATCC 25923	Vancomycin	D	D	D
	Chloramphenicol	43,58	67,18	D
	Ciprofloxacin	15,58	D	100
	Ampicillin	6,14	10,82	19,59
L. monocytogenes ATCC 7644	Vancomycin	25,37	100	100
	Chloramphenicol	26,92	55,13	D
	Gentamicin	100	100	100
	Piperacilin	D	D	D
	Tobramycin	100	100	100
M. flavus	Vancomycin	43,89	D	D
	Chloramphenicol	8,11	27,57	D

D: Denenmedi

Tablo 20: MSSA 20 biyofilminin antibiyotik penetrasyonu üzerine etkisi (%)

BAKTERİ ADI	ANTİBİYOTİK ADI	5µl	10µl	15µl
B. subtilis NRRL-B-209	Chloramphenicol	100	100	100
	Erythromycin	D	4,41	D
	Vancomycin	D	25,21	D
	Ofloxacin	18,86	D	D
	Cıprofloxacin	D	12,42	D
	Ampicillin	100	100	100
Cowan liyofili	Chloramphenicol	100	100	100
	Vancomycin	10,23	67,33	76,7
	Piperacillin	18,59	18,59	30,78
E. cloacea ATCC 28355	Chloramphenicol	23,92	28,74	28,74
	Ciprofloxacin	100	100	100
S. aureus ATCC 25923	Vancomycin	40,89	48,89	55,56
	Chloramphenicol	61,45	61,45	62,61
	Ciprofloxacin	D	D	D
	Ampicillin	D	5,87	D
L. monocytogenes ATCC 7644	Vancomycin	9,5	23,08	43,21
	Chloramphenicol	100	100	100
	Gentamicin	40,75	D	D
	Piperacilin	D	2,15	18,9
	Tobramycin	100	100	100
M. flavus	Vancomycin	41,54	41,54	D
	Chloramphenicol	82,9	84,77	86,63



Şekil 6: MSSA 20 biyofilminin farklı konsantrasyonlarında *B. subtilus* NRRL-B-209 suşunda chloramphenicol antibiyotiğinin penetrasyon etkisinin azalması

4.7 EPS'nin Antibiyofilm Etkisi

Bu çalışmamızda MSSA 10 ve MSSA 20 bakterilerinden elde edilen toz EPS'nin biyofilm pozitif patojen bakteriler üzerine etkisi araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki EPS'nin antibiyofilm etki sonuçları MSSA 10 için Tablo 21 ve MSSA 20 için ise Tablo 22' te verilmiştir.

Tablo 21: MSSA 10 EPS'sinin antibiyofilm etkisi

EPS konsantrasyonu (mg/ml)	*B. cereus* RSKK 8632	*E. coli* ATCC 11230	*E. faecalis* ATCC 19433	*M. flavus*	*P. fluorescens* ATCC 55241	*P. vulgaris* RSKK 96026	*S. aureus* ATCC 33862	*S. typhimurium*	*Y. enterecolitica* RSKK 1501
100	38,71	64,09	41,16	18,32	42,22	43,76	27,07	57,35	45,24
150	40,09	63,13	36,08	33,58	48,33	47,44	36,46	46,86	38,32
200	38,56	62,79	30,65	35,31	45,98	46,86	39,81	34,46	41,29
250	35,51	69,36	31,40	39,95	55,08	38,45	31,37	38,07	59,33
300	34,98	64,98	31,06	39,71	54,94	54,41	26,43	35,93	52,90
350	34,84	71,82	30,65	38,00	48,40	30,68	27,35	43,73	51,55
400	40,16	66,35	48,16	33,03	47,33	38,57	35,83	53,05	59,83
450	33,87	70,73	32,05	27,40	43,57	47,80	30,73	54,90	48,21
500	36,77	62,72	30,47	17,76	47,05	43,02	25,96	52,09	42,51
700	46,61	75,44	40,28	18,83	39,02	40,56	21,91	30,36	37,33
1000	47,74	74,30	44,31	13,96	41,13	43,03	21,91	57,00	38,43

Tablo 22: MSSA 20 EPS'sinin antibiyofilm etkisi

EPS konsantrasyon (mg/ml)	*B. cereus* RSKK 8632	*E. coli* ATCC 11230	*E. faecalis* ATCC 19433	*M. flavus*	*P. fluorescens* ATCC 55241	*P. vulgaris* RSKK 96026	*S. aureus* ATCC 33862	*S. typhimurium*	*Y. enterecolitica* RSKK 1501
100	22,26	61,49	16,04	40,52	28,14	51,76	25,80	21,20	44,00
150	33,06	60,33	37,65	64,65	29,99	51,94	25,71	37,35	36,29
200	49,03	60,33	36,95	55,61	49,73	50,00	32,80	33,73	48,83
250	62,74	55,88	29,42	43,68	29,07	48,69	32,45	28,67	53,28
300	57,90	66,42	28,73	43,74	30,56	40,53	34,69	34,08	42,52
450	49,68	69,08	37,30	43,74	32,20	54,06	27,55	40,48	45,12
500	52,74	68,81	44,31	46,27	40,28	51,62	33,44	47,95	52,16
650	45,32	68,88	44,08	39,12	37,65	51,31	36,15	35,18	55,50
700	42,48	63,13	43,63	31,07	42,86	49,09	33,06	35,66	56,24
750	45,00	68,67	48,98	38,96	33,88	57,50	30,89	36,51	55,07
800	47,42	57,18	45,88	43,84	33,48	45,24	38,69	42,89	55,84
850	44,23	58,77	61,30	56,47	37,72	35,67	40,13	35,18	60,69
1000	46,84	65,80	45,21	45,05	43,57	58,47	34,87	31,20	48,33

Sonuçlara göre MSSA 10 suşundan elde edilen EPS'nin antibiyofilm etkisi en yüksek *E.coli* ATCC 11230 suşuna %75 gösterirken, en düşük *M. flavus* ve *S. aureus* ATCC 33862 suşlarında göstermiştir. Fakat o suşlarda dahil % 39 etki gösterdiği için EPS'nin patojen bakteri biyofilmini engelleyebildiği belirlenmiştir.

MSSA 20 suşunun EPS'si en iyi antibiyofilm etkisini *E. coli* ATCC 11230 suşunda (% 69,08) ve *M. flavus* suşunda (% 64,65) göstermiştir.

Sonuçlara göre biyofilm oluşumu pozitif olan patojen bakteriler üzerine EPS'nin antibiyofilm etkisinin varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen EPS'lerin farklı patojenlere etkisi ise tür farklılığını kanıtlamış bulunmaktadır.

4.8 EPS'nin Yapısı

MSSA 10 ve MSSA 20 bakterilerine ait saf EPS'nin şeker, üronik asit ve protein analiz sonuçları Tablo 23'te verilmiştir.

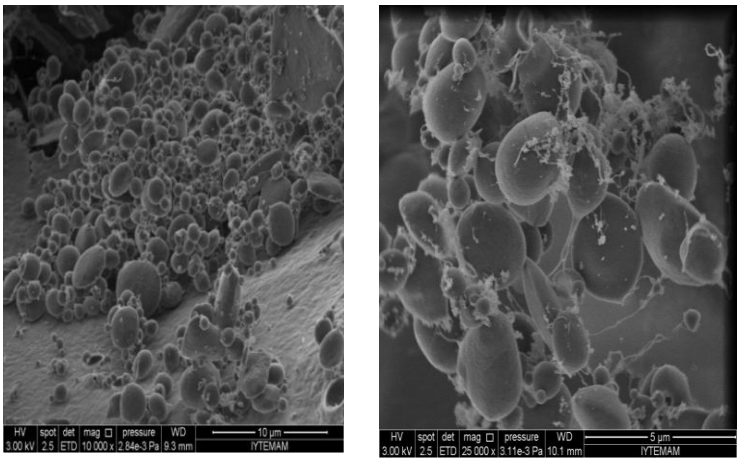
Tablo 23: Kuru EPS şeker, üronik asit ve protein içeriği

	MSSA 10 pellet	MSSA 10 supernetant	MSSA 20 pellet	MSSA 20 supernetant
Toplam şeker (% mg)	41,2	30	22,78	23
Toplam üronik asit (% mg)	4,64	2,32	4,056	3,45
Toplam protein (% mg)	16,38	9,89	15,372	18,492

Bakterilerin pellet ve süpernetant içeriklerinde farklılıklar gözlenmiştir. MSSA10 suşundan saflaştırılan membrana bağlı EPS'deki üronik asit %14,64 iken çözünen EPS'deki bu oran oldukça düşüktür (%2,32). Bakterinin protein ve şeker yüzdeleri birbirine yakınken membrana bağlı EPS'deki protein miktarı %16,38'dir. MSSA20 suşunun membrana bağlı ve çözünen EPS içerikleri birbirinden çok farklılık göstermemiştir. Ancak genel olarak MSSA10 suşunun EPS'sinin daha zengin bir yüzdeye sahip olduğu görülmüştür.

4.9 Taramalı (Scanning) Elektron Mikroskop ile Görüntüleme

Biyofilm bakteri topluluğundan oluşur ve bu biyofilm yapısının ana matriksi EPS'dir. Saf EPS'nin morfolojik görünümü hakkında bilgi edinmek amacıyla SEM analizi de yapılmıştır (Şekil 7). Şekil 7A'da MSSA 20 süpernetantından saflaştırılan EPS yüzeyinde bakterilerin yoğun topluluklar halinde kümeleştiği görülmektedir. Şekil 7B de ise MSSA 10 suşunun EPS yüzeyi ve hücrelerin birbirleriyle bağlantılarının EPS iplikleri ile gerçekleştiği görülmektedir.



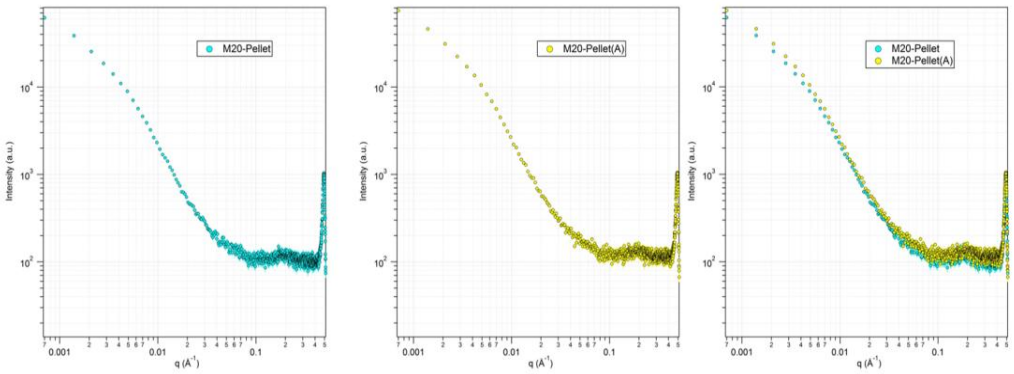
A **B**

Şekil 7: Biyofilm matriksinin ve hücrelerin SEM görünümü A: MSSA 20, (B): MSSA 10

4.10 SAXS Yöntemi ile Yapılan Analizler

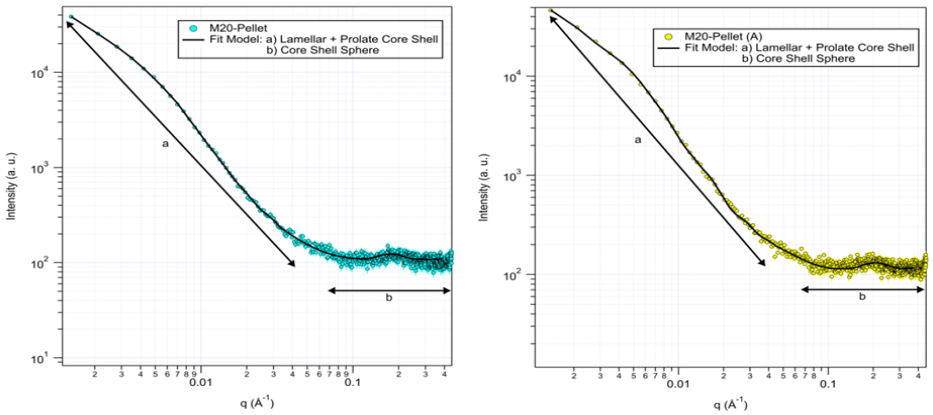
MSSA 20'den ekstrakte edilen EPS'nin karakterizasyonu küçük açı X-ışını saçılması (SAXS) tarafından detaylı olarak çalışılmıştır. Bu yöntem çözelti veya kristal halindeki polimerlerin kendi düzenlenmesinden oluşan nanoparçacıkları araştırmak için güçlü bir yöntemdir (Hamley 1998; Hamley ve Castelletto 2004).

EPS'nin yapısı boyut, şekil ve iki katmanlı kalınlığı da dahil olmak üzere SAXS kullanılarak karakterize edilir. EPS'nin yapısını SAXS yöntemi ile karakterize edebilmek için EPS'yi hem su hemde serum albümin çözeltisi kullandık. Şekil 8'de serum albümin (M20-pellet(A)), sulu çözeltideki (M20-pellet) ve heriki durumdaki MSSA 20 EPS'sinin SAXS eğrileri gösterilmektedir.



Şekil 8: Farklı çözeltilerdeki EPS 'nin SAXS grafik desenleri

SAXS eğri verileri IGOR PRO Programı (Batat 2008) kullanılarak, yapılan hesaplamalar sonunda uyum model fonksiyonlarından faydalanarak uyum grafikleri elde edilmiştir (Şekil 9). Uyum grafikleri elde edildikten sonra sonuçler gösterir ki; EPS'lerin oluşturduğu ince kabuklu film yapısı yayvan-basık elipsoid (prolate) çekirdek modeline (Şekil 9'un a bölgesinden) ve içyapıdaki EPS'lerin ise yapısının çekirdek küre modeli (Şekil 9'un b bölgesinden) uyduğu yapılan çalışmada bulunmuştur. Ayrıca elipsoid yapılarında tabakalar (lamellar) şeklinde olduğu bulunmuştur. Elde edilen tüm sonuçların morfolojisini şematik olarak resimlemek istersek şekil 10'da görüldüğü gibidir.



Şekil 9: 24 °C'de iki farklı çözeltide aynı pH değerine sahip EPS SAXS uyum grafiği gösterilmektedir.

Bu koşullarda, SAXS veriler iki durum içindeki EPS oluşumunu göstermektedir. Büyük q= 0.1-0.4 $Å^{-1}$ aralığı nano ölçekli yapısal bilgiye ulaşmamızı sağlar. Sulu çözünen EPS'ye serum albumin ilave edildikten sonra

EPS'de hidrodinamik R_H yarıçap değeri 29.1±0.5'den 26.7±0.5 Å'a azaldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, çözücüye serum albumin ilave edilmesiyle EPS yapısının daha kararlı hal aldığı görülmektedir. Aynı koşullarda EPS'nin sulu çözeltide oluşturduğu biofilmin yayvan-basık elipsoid (prolate) modelinde uyumluluğu hesaplanmış olup, yapılan hesaplamarda çekirdek yarıçapı 1644.1±4.4 Å, kabuk kalınlığı 121.9±2.4 Å ve iki tabaka arası kalınlık 12.6±0.7 Å olarak uyum modelinden hesaplanmıştır. EPS içerisine bir çözücü olarak, serum albumin eklenince yayvan-basık elipsoid (prolate) çekirdek yarıçapı 1623,6 ± 5.2 Å, kabuk kalınlığı 101.1±2.1 Å ve iki tabaka arası kalınlık 6.8 ± 0.6 Å'dur. Tüm sonuçlar Tablo 24-25'de verilmiştir.

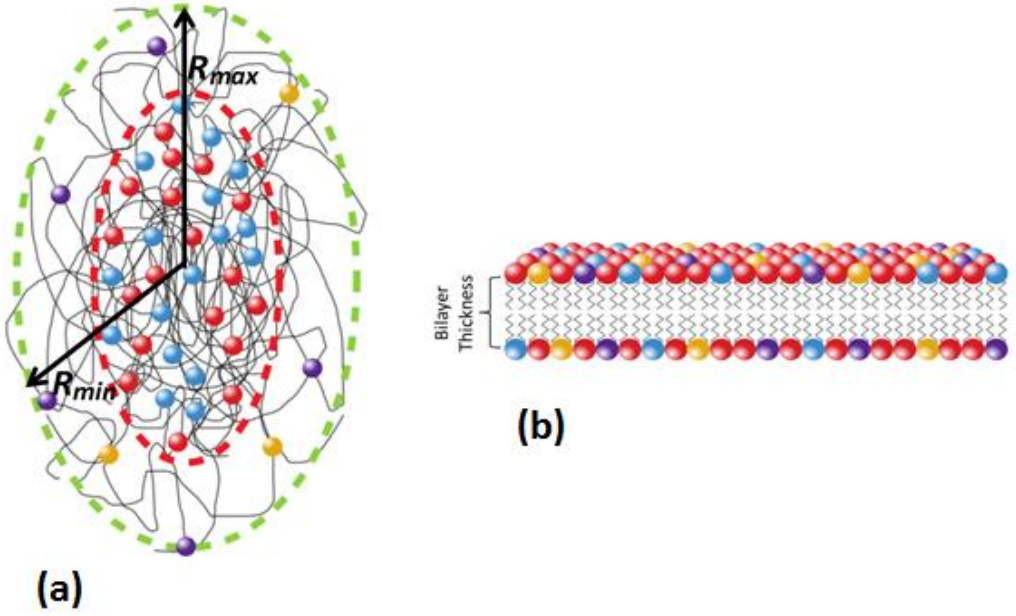
Tablo 24: Sulu ve serum albümin çözeltileri (A) MSSA 20 parçacık EPS a bölgesi için bir yapısal bilgi ile karakterize edilmiştir.

Bölge a	**EPS**	**EPS (A)**
İkili tabaka kalınlığı (Å)	12.6	6.8
Büyük çekirdek yarıçapı (Å) R	1644.1	1623.6
Küçük çekirdek yarıçapı (Å) r	312.8	290.2
Büyük kabuk kalınlığı (Å)	121.9	101.1
Küçük kabuk kalınlığı (Å)	235.9	221.1
SLD çekirdek ($Å^{-2}$)	2.0×10^{-6}	1.8×10^{-6}
SLD kabuk ($Å^{-2}$)	1.4×10^{-6}	1.6×10^{-6}
SLD çözücü ($Å^{-2}$)	4.4×10^{-6}	4.1×10^{-6}

Tablo 25: Sulu ve serum albümin çözeltileri (A) MSSA 20 parçacık EPS b bölgesi için bir yapısal bilgi ile karakterize edilmiştir.

Bölge b	**EPS**	**EPS (A)**
Çekirdek yarıçapı (Å)	17.1	15.8
Kabuk kalınlığı (Å)	12.0	10.9
Çekirdek SLD ($Å^{-2}$)	2.5×10^{-5}	2.5×10^{-5}
Kabuk SLD ($Å^{-2}$)	1.3×10^{-5}	1.3×10^{-5}
Çözücü SLD ($Å^{-2}$)	9.5×10^{-6}	9.4×10^{-6}

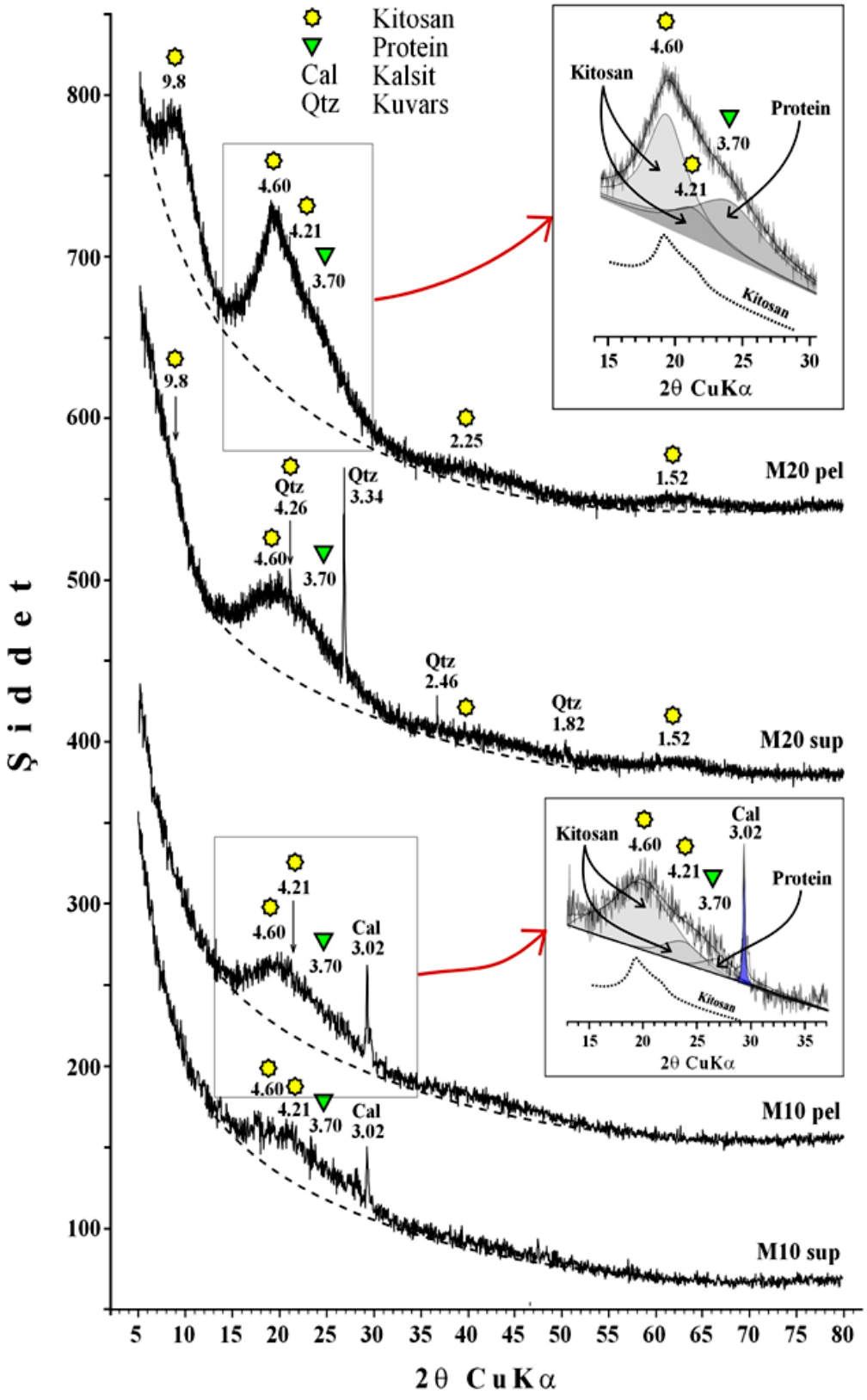
Yapılan hesaplamalar sonucunda Şekil 10'da yayvan-basık elipsoid (prolate) çekirdek model şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 10: (a) EPS'nin oluşturduğu biofilmin yayvan-basık elipsoid (prolate) çekirdek modelin şematik olarak gösterimi, R_{min}; minör ve R_{max}; majör yarıçap. (b) Yapının oluşturduğu membran yapı modeli.

4.11 X-Işınları Kırınımı (XRD)

MSSA 10 ve MSSA 20 tarafından üretilen EPS maddesinin XRD desenleri bütünüyle amorf bir yapıdan ziyade zayıf kristalin bir karaktere sahip olduğu Şekil 11'de gösterilmektedir.



Şekil 11: MSSA 20 ve MSSA 10 EPS (supernatant-sup ve pellet-pel) ürünlerinin XRD desenleri.

Kitosan ve protein piklerinin çözümlemeleri WINFIT programı (Krumm, 1996) ile yapılmıştır. Kitosanın XRD patern örneği Muzzarelli ve diğ. (2004)'den düzenlenmiştir.

MSSA 10 ve MSSA 20 bakterilerinin ürettiği EPS'lere ait XRD desenlerindeki piklerin çözümlenmesi bunların başlıca kitosan (9.80, 4.60, 4.21, 2.25, 1.52 Å), daha az da protein (3.70 Å) içerdiğini göstermiştir.

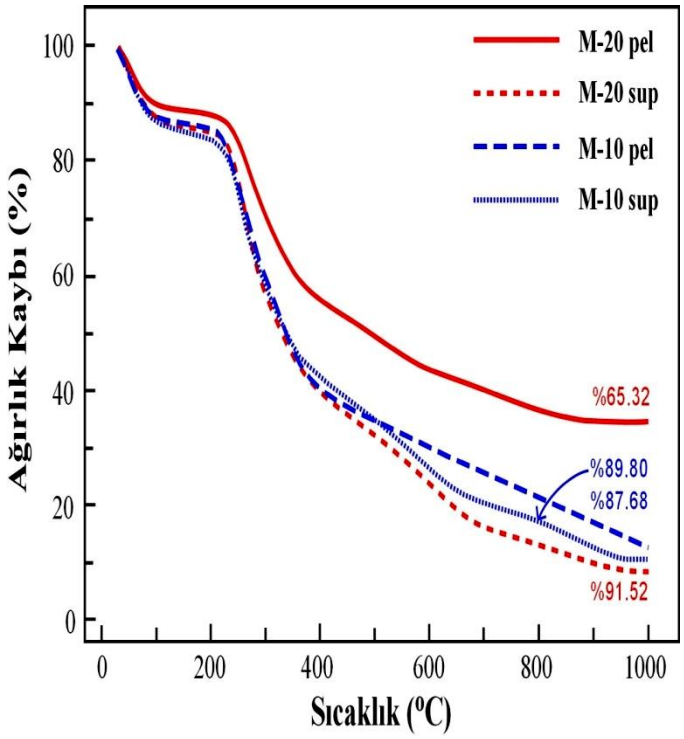
MSSA 10 tarafından üretilen EPS maddesi MSSA 20 tarafından üretilenlere göre daha düşük ve sınırlı pik yüksekliği ve alanı sunmakta olup, EPS üretkenliği açısından daha düşük kapasiteye sahip olduğu biçimde değerlendirilebilir. MSSA 10 ve MSSA 20 örnekleri arasındaki diğer bir farklılık ise MSSA 10 örneğinde kalsit, MSSA 20 örneğinde ise kuvars kristallerinin gözlenmesidir (Şekil 6). Her iki örnekte de pellet örnekleri supernatant örneklerine göre daha belirgin kitosan pikleri içermesiyle karakteristiktir.

4.12 Termal Analizler (TGA)

MSSA 10 ve MSSA 20 örneklerinin TGA eğrilerine göre, kitosan içeriği yüksek olan MSSA 20 pellet örneği hariç diğer üç örnek (MSSA 20 suppernetant, MSSA 10 pellet ve MSSA 10 suppernetant) benzer dağılım göstermektedir (Tablo 26, Şekil 12).

Tablo 26: MSSA 20 ve MSSA 10 EPS (supernatant-sup ve pellet-pel) ürünlerinin farklı sıcaklık evrelerine göre ağırlık kayıpları.

Örnek	Ağırlık Kaybı (%)			
	30-180 °C	180-400 °C	400-1000 °C	Toplam
MSSA 10 çözünmüş EPS	19.12	37.19	33.49	89.80
MSSA 10 membrana bağlı EPS	16.60	42.31	28.77	87.68
MSSA 20 çözünmüş EPS	16.03	40.95	34.54	91.52
MSSA 20 membrana bağlı EPS	13.74	28.13	23.45	65.32



Şekil 12: MSSA 20 ve MSSA 10 EPS (supernatant-sup ve pellet-pel) ürünlerinin TGA eğrileri.

Örneklerin TGA eğrilerine göre 30-400 ºC arasında iki aşamalı bir ağırlık kaybı sergilemektedir. Bunlardan birincisi 30-180 ºC arasında su moleküllerinin (veya nem içeriğinin) ve karboksil grubunun önemli oranda kaybına karşılık gelmektedir. İkincisi ise 180-400 ºC arasında EPS'nin (kitosan) pirolizine karşılık gelen belirgin bir yıkılmayla karakteristiktir. 400 ºC den yüksek sıcaklıkları temsil eden üçüncü aşama ise kalıntı malzemenin ve kristalin fazların (kuvars ve kalsit) yıkılmasıdır. Toplam ağırlık kayıpları açısından MSSA 20 pel örneği düşük (~ % 60), diğer üç örnek ise benzer biçimde yüksek (~ % 90) ağırlık kaybı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Gram-pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus* insanlarda doğal rezervuardır. Sağlıklı yetişkinlerin %30-50'sinde kolonizedir ve %10-20 dirençli kolonizasyon göstermektedirler. Metisilin duyarlı (MSSA) ve metisilin dirençli (MRSA) izolatlarının her ikisi de dirençli kolonizasyon gösterebilmektedir. Kolonize kişiler sonradan oluşacak infeksiyonlar için yüksek risk taşımaktadır (Lowy 1998).

S. aureus doğal dokularda ve medikal alet, implant gibi yabancı materyallerde biyofilm oluşumuna neden olarak en sık görülen ve tedavisi güç infeksiyonlara yol açmaktadır (Otto 2008). Biyofilmin özellikle kronik ve yabancı cisim enfeksiyonlarının oluşumunda önemli bir epidemiyolojik yeri olması, tedavi ve immün sisteme direnç oluşturması nedeniyle günümüzde enfeksiyonların tedavilerinde kullanılan yöntemlerin yetersiz, muhtemelen antibiyotiklere artan direnç nedeniyle belki de birkaç on yıl sonra tamamen geçersiz olacak antibiyotik tedavileri, bilim insanlarının önüne mikroorganizmaların hala çözülmesi gereken çok önemli gizemlerinin olduğunu göstermektedir. Biyofilmin yapısının ve oluş mekanizmalarının daha iyi anlaşılması muhtemelen mikroorganizmaların potansiyel tedavi hedeflerini de ortaya koyacaktır (Sakarya 2005).

Enfeksiyonlarda biyofilm oluşumu en az üç basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamağı mikroorganizmanın normal doku ve yabancı materyal yüzeyine bağlanmasıdır (O'Toole ve diğ. 2000). İkinci aşamada yüzeylerde hücre proliferasyonu ve ekzopolisakkarit madde sentezidir. Hücre dışı matriks çoğalması ve üretimi bulaşıcı bakteriyel biyofilmin büyümesini sağlar. Son aşamada içerisinde beslenme ve atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan kanalların bulunduğu üç boyutlu bir yapı oluşturmaktır (Rohde ve diğ. 2006). Çok tabakalı bir biyofilm oluşumu için bakteri hücreleri arasında yapışmada rol oynayan ekzopolisakkaritler hem fiziksel hem de kimyasal özellikler açısından farklılıklar göstermektedir (Donlan 2002). Esasta, biyofilm 3 boyutlu çekim gücü oluşturup, bulunduğu bakteriyi çevreleyerek bakterinin aderansını ve korunmasını sağlamaktadır.

5.1 Biyofilm Oluşturan Bakterilerin Seçimi ve kalitatif tayinleri

Çalışmamızda ilk olarak PAÜ Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür stoklarında bulunan patojen bakteriler, MRSA ve MSSA suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini tespit etmek amaçlı Kongo Red ve Tüp Dilisyon yöntemleri kullanılmıştır.

Kongo Red yöntemi sonucunda 25 MRSA suşundan 3 tanesi biyofilm oluştururken 24 indikatör patojen bakteriden 10 tanesi biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Tüp dilüsyon yönteminde de aynı MRSA suşlarının biyofilm oluşturduğu belirlendikten sonra çalışmamız için MSSA 10 ve MSSA 20 suşları seçilmiştir.

Benzer bir çalışmada Jain ve Agarwal, farklı hastalardan izole edilen toplam 139 *Staphylococcus aureus* örneklerinden Kongo red yöntemi ile 87 tanesi biyofilm oluştururken 9 tanesi biyofilm oluşturmadığı bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada Kongo red yönteminin mikroplate yöntemi ile % 90,63 uyum sağladığını ve biyofilm taramasında geçerli bir yöntem olduğunu rapor etmişlerdir (Jain ve Agarwal 2009).

S. aureus ve *S. epidermidis* suşları ile yapılan bir başka çalışmada ise toplam 16 *S. aureus* suşundan 6 tanesi biyofilm pozitif olarak belirlenmiştir (Olivera ve diğ., 2006).

5.2 Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Tayini ve Biyofilm Oluşumunda Optimal Şartların Belirlenmesi

Biyofilm oluşturma yeteneklerini olumlu veya olumsuz yönde etkileyecek şartların belirlenmesi için mikroplaka yöntemi ile çeşitli koşulların etkisi araştırılmıştır. Optimal şartların belirlenmesinde inkübasyon süresi, pH, sıcaklık, farklı karbon kaynakları ve tuz konsantrasyonu çalışılmıştır.

Optimal şartların belirlenmesinin ilk aşaması en iyi pH değerinin tespitidir. Her iki bakteride pH 8'de en yüksek değerde biyofilm oluşumu gerçekleştirirken pH 10 gibi yüksek alkali ortamda biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Nilsson ve ark.'larının çalışmasında *Listeria monocytogenes* suşunda biyofilm üretimi yüksek asidik (pH 4.7) ve alkalin (pH 8.5)'de 48 saatlik inkübasyon sonucunda biyofilm üretimi önemli derecede arttırılmıştır (Nilsson ve diğ. 2011).

Bir diğer çalışmada ise B grubu *Streptococci* suşu çalışılmıştır. Bu çalışmada pH 7'de en fazla biyofilm üretilmiştir. Bu sebeple pH değeri biyofilm üretimi için önemli bir faktör olmakla beraber bakteri türleri arasında da farklılık gösterebilmektedir (Kaur ve diğ. 2009)

Çalışmamızda optimal şartların belirlenmesinde ikinci basamak olarak pH 8'de sıcaklık (37 °C ve 42 °C) ve tuz konsantrasyonlarında karbon kaynaklarının (glikoz, fruktoz, sükroz ve mannitol) etkisi çalışılmıştır. MSSA 10 suşu için geliştirilen ortamın ek karbon kaynaklı, yüksek tuz konsantrasyonunda (1 mg/L) bulunan ve vücut sıcaklığında (37 °C) olması biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilemiştir. MSSA 10 için en etkili karbon kaynağı mannitol iken en az etkili olan ise glikozdur. MSSA 20 suşun da NaCl ve karbon kaynağı ilave edilmesi kontrole göre kıyaslandığında biyofilm üretimini olumsuz etkilemiştir. MSSA 10 için gelişme ortamına karbonhidrat ilavesi biyofilm oranını arttırken MSSA 20 suşunda karbon kaynakların biyofilm oluşumunu inhibe etmesi dikkati çekmiştir. Bu da bakteriyel çeşitlilikten ve yapısal farklılıktan kaynaklanmaktadır.

Bizim çalışmamızda olduğu gibi Hu ve ark.'larının *Riemerella anatipestifer* CH3 suşunun biyofilm üretimini glikoz güçlü bir şekilde inhibe ettiği gözlenmişitr (Hu ve diğ. 2010).

Masako ve ark'larının yaptığı çalışmada *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının biyofilm oluşumuna farnesol ve xylitol karbon kaynaklarının biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Farnesol fibrin liflerinin oluşumunu inhibe ederken xylitol ise glikokaliksin oluşumunu inhibe ederek biyofilm oluşumunu engellemiştir (Masako ve diğ. 2005).

Briandent ve ark.'ları *L. monocytogenes* bakterisi üzerine yaptıkları çalışmada farklı sıcaklıkların biyofilm gelişimi üzerine çok fazla etkisinin olmadığını, fakat pH 2'deki çalışmalarında çok asidik ortam olması nedeniyle bakterinin strese girdiğini ve en iyi sıcaklığın 15 ile 20 °C olduğunu tespit etmişlerdir (Briandent ve diğ. 1999).

Çalışmamızda ek olarak sıcaklık değişimi biyofilm oluşumunu fazlasıyla etkilememiştir. Biyofilm oluşumu üzerine NaCl konsantrasyonlarının etkisi incelendiğinde ise MSSA 10 suşu için tuz stres faktörü oluşturup biyofilm oluşumunu tetiklerken MSSA 20 için NaCl dezenfektan etkisi göstermiştir.

Benzer bir araştırmada *Salmonella enterica* suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri NaCl konsantrasyonunda yüksek düzeyde sınırlanmıştır (Lianou ve Koutsoumanis 2012).

Pan ve ark.'ları *L. monocytogenes* suşlarında çalışmamızdaki MSSA 20 suşu gibi 37°C'de en düşük tuz konsantrasyonunda biyofilm oluşumu gerçekleştirmiştir. Çalışmada glikoz konsantrasyonu arttıkça biyofilm oluşumunun inhibe olduğu da tespit edilmiştir (Pan ve diğ. 2010).

5.3 Biyofilmin antibiyotik penetrasyonu üzerine etkisi

Çalışmamızdaki her iki bakteri de insan sağlığı açısından tehlikeli bakteriler olduğu için patojen bakterilerin antibiyotiklere karşı davranışını etkilemesi araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda her iki suşun biyofilmleri antibiyotiklerin diğer patojen bakterileri de etkilemesini engellemiştir. Her iki suşta da %100 penetrasyonu engelleme görülmüştür. Aynı zamanda biyofilm konsantrasyonun artışı penetrasyonu inhibe etmesini de arttırmıştır.

Raza ve ark'ları *Salmonella enterica serovar Typhi* suşunda planktonik ve biyofilm oluşturmuş halinin ciprofloxacin antibiyotiğine penetrasyonu kıyaslandığında serbest hücrelerin 16 saat içinde tamamen öldüğünü, biyofilm varlığında ise antibiyotiği ancak 3 günde hücrelere ulaşarak ölümü yavaşlattığını biyofilmin koruyucu bir tabaka oluşturduğunu ortaya koymuşlardır (Raza ve diğ.

2011). Fakat biz çalışmamızda oluşan biyofilmin diğer bakterileri de kendi koruması altına aldığını ve antibiyotiklere karşı koruyucu bir bariyer oluşturduğunu göstermiş bulunmaktayız.

Benzer bir çalışmada Singh ve ark.'ları biyofilm oluşturan bakteri üzerine antibiyotik penetrasyon etkisi araştırılmış ve %100 inhibe ettiği bulunmuştur (Singh ve ark. 2010).

5.4 EPS yapısı ve antibiyofilm etkisi

Çalışmamızın bir başka adımında, MSSA 10 ve MSSA 20'nin biyofilm matrisinin oluşumundan sorumlu hücre dışı polisakkarit olan EPS saflaştırılıp kompozisyonu ve karakterizasyonu analiz edildi. Biyokimyasal analizlere göre, 1 g EPS örneğinde MRSA 10 EPS'si için %71,2 karbonhidrat, %16,98 üronik asit, %26,27 protein bulunurken MRSA 20 için %45,78 karbonhidrat, %7,5 üronik asit, %33,86 protein bulunmuştur. Değerlerden de görüldüğü üzere EPS içeriğinin en büyük kısmını karbonhidrat ve protein oluştururken üronik asit miktarı azdır. Her iki suşa ait EPS içeriğinin farklı olması bakteriyel çeşitliliğinin bir göstergesidir. Bir grup termofilik bakteriden saflaştırılan EPS'de en fazla karbonhidrat bulunurken, protein miktarı ve üronik asit miktarı (%3) hemen hemen aynıdır (Nicolaus ve diğ. 2002). Diğer taraftan *Pseudomonas fluorescens* Biovar II'den elde edilen EPS'nin üronik asit içeriği yüksektir (Hung ve diğ., 2005).

Saflaştırılan EPS'lerin antibiyofilm aktiviteleri de incelenmiştir. Bu amaçla biyofilm oluşturma özelliğine sahip patojen bakteriler indikatör olarak kullanılmıştır. Genel olarak iki EPS'nin antibiyofilm aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu etki yüzdesi türe göre farklılık göstermiştir. En güçlü antibiyofilm etki *E. coli* ATCC 11230 suşu üzerinedir.

Kanmani ve ark.'ları *Streptococcus phocae* PI80 suşundan saflaştırılan EPS nin gram pozitif ve gram negatif patojen bakteriler üzerine %67 oranında antibiyofilm etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar bu etkinin hücre yüzey etkileşiminin zayıflamasından kaynaklandığını, EPS'nin bakterisidal

bir etkisi olmadığını ileri sürmüşlerdir (Kanmani ve diğ. 2011). *Oceanobacillus iheyensis* bakterisinden saflaştırılan EPS de %62,3 oranında *S. aureus* üzerine antibiyofilm etki göstermiştir. Ayrıca konsantrasyon artışına bağlı olarak antibiyofilm etkide bir artış olmamıştır (Kavita ve diğ. 2014). Benzer sonuç bizim çalışmamızda da gözlenmiştir. Diğer bir değişle, belli bir konsantrasyondan sonra etkinin değişmediği görülmüştür. Bilindiği gibi etken maddeler genelde yüksek konsantrasyonlarda mikrobisid, düşük konsantrasyonlarda mikrobistatik etkiye sahiptirler. Deney sonuçlarına göre yoğunluğun artması ile mikrobisidal etki arasındaki bu ilişkinin devamlı olmadığı söylenebilir.

5.5 EPS karakterizasyonu

Saflaştırılan EPS'lerin karakterizasyonu için XRD, TGA ve SAXS analizleri, görüntülemek için de SEM analizi yapılmıştır.

Son yıllarda SAXS analizi; yüzey yapı karakterizasyonu için çok başarılı ve kullanışlı bir yöntemdir. Bu nedenle çalışmamızda *Staphylococ* biyofilm matriks yüzeyinin yapısının açığa çıkması için SAXS analizi yaplmıştır.

SAXS veri sonuçlarına göre su ile çözünen ve serum albümin ilaveli olan değerler birbirleri ile tutarlı görülmektedir. EPS yapısının çözücüsü üzerine serum albümin ekleyerek daha kompakt hale geldiği görülmüştür. MRSA 20'nin EPS parçasının birikme davranışı kıyaslandığında EPS'nin net bir çekirdek-kabuk yapısından oluşan iki tabakalı kompakt bir görünüşe sahip olduğu tespit edilmiştir. SAXS analiz verilerine göre EPS matriksi hücreler etrafında yoğunlaşmış katman şeklindedir.

Ayrıca, SEM fotomikrografları her iki suşun da biyofilm oluşturduğunu kanıtlamıştır. Hücreler EPS lifleri ile hem birbirlerine ve hem de matriks yüzeyine sıkı bir şekilde bağlanmışlardır. MSSA20 suşunun SEM ve SAXS analizleri, biyofilm ve EPS matriksi içerisinde bakteri hücrelerinin gömülü olarak bulunduğunu ve her hücrenin birbiri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

XRD ve TGA verileri EPS'nin yapısında yoğun olarak polisakkarit (örneğin kitosan) ve protein maddelerin bulunduğunu göstermektedir. EPS maddesi 30 ve 1000 °C arasında yaklaşık % 65 ağırlığını kaybetmesi zayıf kristal halde bulunduğunu ifade eder. Ayrıca bu çalışma MSSA suşlarında ilk kez kitosan varlığını göstermiştir. Bu sayede bir bilimsel araştırmada MSSA 20 suşu kitosan üreticisi olarak kullanılabilir.

Sonuç olarak bu çalışmada biyofilm oluşumu besin düzeyleri, pH, karbon kaynakları, tuz konsantrasyonları ve sıcaklığa göre farklılık göstermiştir. Buna ek olarak XRD ve TGA sonuçlarına göre EPS içeriğini polisakkarit ve protein olan iki temel ana maddeden oluşan zayıf kristal yapıda olduğu belirlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının konusu olan MSSA'larda biyofilm üretme kapasiteleri ve biyofilm oluşumunu olumlu veya olumsuz etkileyen şartların belirlenmesi hedeflenmiştir. Bakterilerin hangi şartlarda biyofilm oluşturup oluşturmadığının anlaşılmasına katkı sağlayacak olan bu tür çalışmalar hiç kuşkusuz tıp, hastane, çevre ve ekolojik sistemlere olabilecek bakteriyel kontaminasyonların engellenmesinde, bu tür oluşumlarla mücadelede önemli katkılar sağlayacak niteliktedir.

Çalışmada kullanılan iki farklı MSSA suşunun (MSSA 10 ve MSSA 20) optimal şartlarının birbirinden farklı olması özellikle tuz konsantrasyonun artması bir bakteriyi olumlu yönde etkilerken diğer bakteriyi olumsuz yönde etkilemesi bakteriler arasındaki metabolik ve fizyolojik farklılığın bir kanıtıdır. Bu veri bile, bakteriyel biyofilm oluşumu ve direnç mekanizmasının anlaşılmasının güçlüğünü ortaya koymada çok basit bir kanıt olarak değelendirmek mümkündür. Dünyada çok sayıda farklı mikroorganizmaların varlığı düşünülecek olursa, her organizmanın şartlarının tek tek ortaya konmasının zahmetli ve pratik olmayacağı da bir gerçektir. Bu nedenle biyofilm yapısının ve biyofilm matriksinin yapısının çok iyi karakterize edilerek özellikle uzaysal düzenlenmesinin açıklığa kavuşturulması gerekmektedir. Çünkü bilindiği gibi bakteriler, stress şartlarında EPS üreterek kendilerini her türlü olumsuz şartlardan korumaya programlanmışlardır. Eğer ki bu düzenlenmenin şartları ortaya konacak olursa, yüzey modifikasyonu engellenerek bakterilerin yüzeylere tutunmasının önüne geçeilebilecek yeni stratejiler geliştirilebilir.

Bu amaçla çalışmamızın bir diğer aşamasında, bakteriyel biyofilm ve EPS matriksinin ince yapısı ileri yöntemler kullanlarak karakterizasyonu yapılmıştır. Bu bakteri grubunda EPS'nin ilk kez SAXS analizi ile yapısı ortaya konulmuştur. Ayrıca yapılan XRD ve TGA analizleri sayesinde EPS içeriğinde ilk kez kitosan bileşenine rastlanmıştır. Ayrıca EPS'nin kristal yapıda olması da dikkat çekmiştir. Yapılan SEM görüntülemesinde ise EPS ile bakterilerin birbirleri ile olan bağlılığı gösterilerek EPS'nin biyofilm yapısının önemli bir parçası olduğu gösterilmiştir.

Araştırmamızın bir diğer kısmında ise MSSA biyofilminin diğer patojen bakteriler ile ilişkisi için antibiyotik penetrasyon inhibisyonu araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre biyofilm hem üretici bakteriyi hem de diğer patojen bakterileri antibiyotiklere karşı koruma altına almaktadır. Biyofilm yapısının antibiyotiklere karşı direnç sağlamadaki etkinliği, antibiyotiklerin bakterilere geçişinin inhibisyonu ile gösterilmiştir. Bu da biyofilm oluşturan bakterilerle antibiyotik tedavilerinin başarısızlığının bir başka kanıtıdır. Bu nedenle yeni ve etkili stratejiler geliştirilmesi gerekmektedir.

Biyofilm kaynaklı hastalıkların önlenebilmesi için; biyofilmlerin antibiyotiklere karşı dirençlilikleri araştırılmalı ve biyofilm ile yakın ilişkisi olduğu bilinen EPS'nin ince yapısının ve uzaysal düzenlenmesinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu tez çalışması, bu alanda yapılan çalışmalara ilk teşkil edecek önemli bulgular taşımaktadır. Bilindiği gibi, patojenitenin ilk adımı tutunmadır. Bakteriler canlı veya cansız yüzeylere tutunarak kolonize olurlar ve virulans özelliklerini açığa çıkarırlar. Tutunmada en etkili yapı da bakteriyel EPS'dir. Özellikle tutunmanın bloke edilebileceği yeni uzaysal düzenlenmeler ortaya konmalıdır.

7. KAYNAKLAR

Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L. and Klausen, M., 'A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms', *Mol. Biol.*, 59 (4), 1114-1128, (2006).

Ammendolia, M. G., Di Rosa, R., Montanaro, L., Arciola, C. R. and Baldassarri, L., 'Slime production and expression of the slime-associated antigen by *Staphylococcal* clinical isolates', *J. Clin. Microbiol.*, 37 (10), 3235-3238, (1999).

Amorena, B., Gracia, E., Monzon, M., Leiva, J., Oteiza, C., Perez, M., Alabart, J. L. and Hernandez-Yago, J., 'Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biyofilms developed in vitro', *J. Antimicrob. Chemoth.*, 44, 43–55 (1999).

Anderl, J. N., Franklin, M. J. and Stewart, P. S., 'Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsielle pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin', *Antimicrob. Agents Ch.*, 44 (7), 1818-1824, (2000).

Batat, P., 'Bazı hidrojellerin ve polimer kaplı nanomanyetik parçacıkların yapılarının SAXS yöntemi ile incelenmesi', Yüksek Lisans, *Fen Bilimleri Enstitüsü,* Ankara, (2008).

Bhowmick, P. P., Devegowda, D., Ruwandeepika, H. A. D., Fuchs, T. M., Srikumar, S., Karunasagar, I. and Karunasagar, I., 'gcpA (stm 1987) is critical for cellulose production and biofilm formation on polystyrene surface by *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in both high and low nutrient medium', *Microb. Pathogenesis*, 50, 114-122, (2011).

Bothwell M. R, Smith A. L. and Phillips T., 'Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm', *Otolaryng. Head Neck.*, 129, 599-560, (2003).

Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C. and Bellon-Fontaıne, M., '*Listeria monocytogenes* scott A: cell surface charge, hydrophobicitiy, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions', *Appl. Envıron. Mıcrob.*, 65 (12), 5328-5333, (1999).

Broadbent, J. R., Mcmahon, D. J., Oberg, C. J. and Welker, D. L., 'Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve functionality of low fat cheese', *Int. Dairy J.*, 11, 433-439, (2001).

Calazans, G. M. T., Lopes, C. E., Lima, R. M. O. C. and de Franc, F. P., 'Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains', *Biotechnol. Lett.*, 19 (1), 19-21, (1997).

Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck. D. and Buret, A., 'The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms', *J. Clin. Microbiol.*, 6 (37), 1771- 1776, (1999).

Cerning, J., 'Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria', *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 113- 130, (1990).

Clinical and Laboratory Standards Institute Antibiyotik Duyarlılık Testleri için uygulama standartları; Onbeşinci Bilgi Eki, M100-S15; CLSI: Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara (2005).

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. and James, G., 'Biofilms, the customized microniche', *J. Bacteriol.*, 176 (8), 2137-2142, (1994).

Çiftçi, İ. H., Çetinkaya, Z ., Aktepe, O. C., Arslan, F. ve Altındiş, M., "Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Antibiyotiklere Duryarlılıkları", *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 35, 98 – 102, (2005).

Danese, P. N., Pratt, L. A. and Kolter, R., 'Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture', *J. Bacteriol.*, 182 (12), 3593-3596, (2000).

Davey, M. E. and O'toole, G. A., 'Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics', *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 64 (4), 847-867, (2000).

De Beer, D., Srinivasan, R. and Stewart, P. S., 'Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection', *Appl. Environ. Microb.*, 60 (12), 4339-4344, (1994).

Degeest, B., Vaningelgem, F., Laws, A. P. and De Vuyst, L., 'UDP-N Acetylglucosamine 4-Epimerase Activity indicates the presence of N-Acetylgalactosamine in exopolysaccharides of *Streptococcus thermophilus* strains', *Appl. Environ. Microb.*, 67 (9), 3976-3984, (2001).

Donlan, R. M., 'Biofilms: Microbial life on Surfaces', *Emerg. Infect. Dis.*, 8 (9), 881-890, (2002).

Donlan, R. M. and Casterton, J. W., 'Biofilms: Survival mechanisms of clinically revelant microorganisms', *Clin. Microbiol. Rev.*, 15 (2), 167 – 193, (2002).

Douglas, L. J., '*Candida* biofilms and their role in infection. Trends', *Microbiol.,* 11, 30-36, (2003).

Duboc, P. and Mollet, B., 'Applications of exopolysaccharides in the dairy industry', *Int. Dairy J*., 11, 759- 768, (2001).

Dubois, M., Gilles, G. A., Hamilton, J. K., Peters, P. A., and Smith, F., 'Colorimetric method for determination of sugars and related substances', *Anal. Chem.,* 28, 350-356, (1956).

Fajardo-Lira, C., Garibay, M. G., Rodarte, C. V., Farres, A. And Marshall, V. M., 'Influence water activity on the fermentation of yoghurt made with exacellular polysaccharide-producing or non-producing starter', *Int. Dairy J.*, 7, 279-281, (1997).

Flemming, H. C. ve Wingender, J., 'The biofilm matrix', *Nat Rev Microbiol*., 8, 623-633, (2010).

Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M. and Simov, Z. I., 'Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures', *Can. J. Microbiol.,* 46, 1123-1127, (2000).

Gilmore, K. S., Srinivas, P., Akins, D. R., Hatter, K. L. and Gilmore, M. S., 'Growth, development and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm', *Infect Immun.,* 71 (8), 4759-4766, (2003).

Gugliandola, C., Maugeri, T. L., Cacamo, D. and Stackebrandt, E., '*Bacillus aeolius* sp. Nov a Novel Thermophilic, Holophilic Marine *Bacillus Species* from Eolian Islands (Italy)', *Syst. Appl. Microbiol*, 26, 172-176, (2003).

Hallam, N. B., West, J. R., Forster, C. F. and Simms, J., 'The potential for biofilm growth in water distribution systems', *Water Res.*, 35 (17), 4063-4071, (2001).

Hammer, B. K. and Bassler, B. L., 'Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae', Mol. Microbiol*., 50 (1), 101-114, (2003).

Hartree, E.F., 'Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response, Agricultural Research Council', *Un. Repro. Phys. Biochem.,* 307, (2004).

Hu, Q., Han, X., Zhou, X., Ding, S., Ding, C. and Yu, S., 'Characterization of biofilm formation by *Riemerella anatipestifer', Vet. Microbiol.*, 144, 429-436, (2010).

Hung, C. C. and Santschi, P. H., 'Spectrophotometric determination of total uronic acids in seawater using cation-exchange separation and pre-concentration by lyophilization', *Anal. Chim. Acta.,* 427, 111–117, (2001).

Hung, C.C., Santschi, P.H. and Gillow, J.B., 'Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II', *Carbohyd. Polym*., 6, 141–147, (2005).

Jain, A. and Agarwal, A., 'Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal *Staphylococci*', J. *Microb. Meth.,* 76, 88-92, (2009).

Jefferson, K. K., Pier, D. B., Goldmann, D. A. and Pier, G. B., 'The teicoplanin-associated locus regülatör (TcaR) and the intercellular adhesin locus regülatör (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus', J. Bacteriol.*, 186, 2449-2456, (2004).

Kanmani, P., Kumar- Satish, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V. and Arul, V., 'Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro' *Bioresource. Technol*., 102, 4827-4833, (2011).

Kaur, H., Kumar, P., Ray, P., Kaur, J. and Chakraborti, A., 'Biofilm formation in clinical isolates of group B *streptococci* from north India', *Microb Pathogenesis*, 46, 321-327, (2009).

Kavita, K., Singh K. V., Mishra, A. and Jha, B., 'Characterisation and anti-biofilm activivty of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis', Carbohyd. Polym.*, 101, 29-35, (2014).

Kenne, L., and Lindberg, B., in Aspinall, G.O., ed., The Polysaccharides, vol. 2, Academic Press, New York, 287-363, 1983.

Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A. and Naito, S., 'Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells', *Microbiol. Immunol*., 49, 875-884, (2005).

Kumar, M. A., Anandapandian, K. T. K. and Parthiban, K., 'Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium', *Braz. Arch. Biol. Technol*., 54 (2), 259-265 (2011).

Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D. and Costerton, J. W., 'Optical sectioning of microbial biofilms', *J. Bacteriol*., 173 (20), 6558-6567, (1991).

Leriche, V., Sibille, P. and Carpenter, B., 'Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms', *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (5), 1851-1856, (2000).

Lewis, K., 'Riddle of biofilm resistance minirewiew', *Antimicrob. Agents Ch..*, 45, 999-1007, (2001).

Lianou, A. and Koutsoumanis, K. P., 'Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions', *Int. J. Food Microbiol*., 160, 171-178, (2012).

Lindsay, D. and von Holy, A., 'Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know', *J. Hosp. Infect*., 64, 313-325, (2006).

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 'Protein measurement with the Folin Phenol Reagent', *J. Biol. Chem*., 193, 265-275, (1951).

Lowy, F. D., '*Staphylococcus aureus* infections', *N. Engl. J. Med.*, 339, 520-532, (1998).

Masako, K., Hideyuki, I., Shigeyuki, O. and Zenro, I., 'A novel method to controş the balance of skin microflora Part1 : Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics', *J. Dermatol. Sci*., 38, 197-205, (2005).

Mc Groarty, J. A., 'Cel surface appandages of *Lactobacilli'*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 124, 405-410, (1994).

Nicolaus, B., Lama, L., Panıco, A., Schıano, V., Romano, I. and Gambacorta, A., 'Production and characterization of exopolysaccharides excreted by thermophilic bacteria from shallow, marine hydrothermal vents of flegrean ares (Italy)', *System. Appl. Microbiol*., 25, 319-325, (2002).

Nilsson, R. E., Ross, T. and Bowman, J. P., 'Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions', *Int. J. Food Microbiol.*, 150, 14-24, (2011).

Olivera, M., Bexiga, R., Nunes, S. F., Carneiro, C., Cavaco, L. M., Bernardo, F. and Vilela, C. L., 'Biofilm forming abilitiy profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates', *Vet. Microbiol.*, 118, 133-140, (2006).

Ophir, T., and Gutnick, D. L., ‘A Role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation’, *Appl. Environ. Microbiol*., 60 (2), 740-745, (1994).

Orujalipoor, I., ‘Sikloheksen Orta Zincirli Polistiren veya Polikaprolakton Polimerlerinin Karakterizasyonu ve Sıcaklığa Bağlı Yapısal Davranışlarının İncelenmesi’, Yüksek Lisans, *Fen Bilimleri Enstitüsü,* Ankara, (2012)

Otto, M., **‘***Staphylococcal* biofilms’, *Curr. Top. Microbiol. Immunol*., 322, 207–228, (2008).

O’Toole G., Kaplan H. B. and Kolter R., ‘Biofilm formation as microbial development’, *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 49-79, (2000).

Öztürk, B. Ş., Sakarya, S., Öncü, S. ve Ertuğrul, B. M., ‘Biyofilmler ve yabacı cisim infeksiyonları’, *Klimik Dergisi*, 21 (3), 79 – 86, (2008).

Pan, Y., Breidt, F. and Gorski, L., ‘Synergistic effect of sodium chloride, glucose and temperature on biofilm formation by Listeria monocytogenes serotype 1/2a and 4b strains’ *Appl. Environ. Mıcrob.*, 76, 1433-1441, (2010).

Perry, D. B., Mcmahon, D. J. and Oberg, C. J., ‘Effect of exopolysaccharide- producing cultures on moisture retention in low fat Mozzarella cheese’, *J. Dairy Sci*., 80, 799-805, (1997).

Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C. and Lejeune, P., ‘Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*’, *J Bacteriol*., 181 (19), 5993-6002, (1999).

Raza, A., Sarwar, Y., Ali, A., Jamil, A., Haque, A. and Haque, A., ‘Effect of biofilm formation on the excretion of *Salmonella enterica* serovar typhi in feces’, *Int. J. Infect. Dis.*, 6, 1313- 1319, (2011).

Rohde H., Mack D., Christner M., Burdelski C., Frankea G. and Knobloch J. K. M., ‘Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches’, *Rev. Med. Microbiol.*, 17, 45–54, (2006).

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P., ‘An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria’, *Int. Dairy J*., 12, 163- 171, (2002).

Sakarya, S., ‘Biyofilm Yapısı ve İnfeksiyon Hastalıklarının Virülans ve Tedavisindeki Rolü’, *Klinik Dergisi*, 18 (1), 3-8, (2005).

Schierholz, J. M. and Beuth, J., 'Implant infections: a haven for opportunistic bacteria', *J. Hosp. Infect*., 49, 87-93, (2001).

Shankar, S., Ye, R. W., Schlictman, D. and Chakrabarty, AM., 'Exopolysaccharide Alginate Synthesis in Pseudomonas aeruginosa: Enzymology and Regulation of Gene Expression', *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol*., 70, 221–255, (1995).

Shrout, J. D., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. and Parsek, M. R., 'The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation', *MRS. Bulletin*., 36, 367-373, (2011).

Sihorkar, V. and Vyas, S. P., 'Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies', *Pharm. Res*., 18 (9), 1247-1254, (2001).

Singh, R., Ray, P., Das, A. and Sharma, M., 'Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms', *J. Antimicrob. Chemoth.*, 65, 1955-1958, (2010).

Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S. and Corrieu, G., 'The relative effect of milk base, starter and process on yoghurt texture: A review', *Critical Rev. in Food Sci. and Nutrit*., 44, 113- 137, (2004).

Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H., 'Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy', *Int. J. Food Microbiol.*, 36, 1-29, (1997).

Subramani, K., Jung, R. E., Molenberg, A. and Hammerle, C. H., 'Biofilm on dental implants: a review of the literature', *Int. J. Oral Max. Impl.*, 24, 616-626, (2009).

Sutherland, W. I., 'Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework', *Microbiol.*, 147, 3-9, (2001).

Svensater, G., Welin, J., Wilkins, J. C., Beighton, D. and Hamilton, I. R., 'Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans', FEMS Microbiol. Lett.*, 205, 139-146, (2001).

Vancraeynest, D., Hermans, K. and Haesebrouck, F., 'Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biyofilm formation and MSCRAMMs', *Vet. Microbiol.*, 103, 241–247, (2004).

Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. and Ivanova, E. P., 'Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation'. *Molecules*., 14, 2535-2554, (2009).

Vuong, C. and Otto, M., '*Staphylococcus epidermidis* infections', *Microb. Infect*., 4, 481–489, (2002).

Wand, M. E., Bock, L.J., Turton, J. F. and Nugent, P. G., '*Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation', *J. Med. Microbiol*., 61, 470-477, (2012).

Watnick, P. I. and Kolter, R., 'Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm', *Mol. Microbiol.*, 34 (3), 586-595, (1999).

Watnick, P. and Kolter, R., 'Biyofilm city of microbes. Minireview', *J. Bacteriol.*, 182 (10), 2675-2679, (2000).

Wolz, C., Goerke, C., Landmann, R., Zimmerli, W. and Fluckiger, U., 'Transcription of clumping factor a in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection', *Infect. Immun.*, 70 (6), 2758-2762, (2002).

EKLER

8. EKLER

EK A: Araştırmada kullanılan besi ortamları ve kimyasal maddeler

Triptic Soy Broth(TSB) (Merck, Fluka)

- Tripton 17,0 g
- Soya unu peptonu 3,0 g
- D(+) glukoz 2,5 g
- Sodyum klorür 5,0 g
- Di-Potasyum hidrojen fosfat 2,5 g
- Distile su 1000 ml

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri 7,0±0,2'ye 6 N HCl ve 6 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121 ^{o}C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Triptic Soy Agar (TSA) (Merck)

- Tripton 17,0 g
- Soya unu peptonu 3,0 g
- D(+) glukoz 2,5 g
- Sodyum klorür 5,0 g
- Di-Potasyum hidrojen fosfat 2,5 g
- Agar 15,0 g
- Distile su 1000 ml

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri 7,0±0,2'ye 6 N HCl ve 6 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121 ^{o}C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. İzole edilen suşlar, TSA içeren tüplerde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck)

- Peptone 27,5 g
- D(+) Glukoz 2,0 g
- Sodyum klorür 5,0 g
- Di-Sodyum hidrojen fosfat 2,5 g

  Maddeler 1 litre su içerisine ilave edilmiştir. Besiyeri 121 ^{o}C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Fosfat Buffer (PBS)

- Potasyum hidrojen fosfat 26,22 g
- Sodyum karbonat 7,78 g

  Maddeler 1 litre su içerisine ilave edilmiştir. Solüsyonun pH'sı 6 N NaOH ile 7,3'e ayarlanmıştır.

EPS saflaştırma ve içerik tayininde kullanılan kimyasallar

- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Proteinaz K (Sigma-Aldrich)
- Trikloraasetik asit (TCA) (Merck)
- Fenol (Merck)
- H_2SO_4 (Merck)
- Sodyum-potasyum tartarat-$NaCO_3$ reaktifi: 100 ml saf suda 0,2 g sodyum-potasyum tartarat ile 10 g $NaCO_3$ çözülür.
- Sodyum-potasyum tartarat-$CuSO_4.5H_2O$ reaktifi: 0,2 g sodyum-potasyum tartarat ile 0,1 g $CuSO_4.5H_2O$ 9 ml saf suda çözülür. Üzerine 1 ml 1 N NaOH ilave edilir.
- Folin-Ciocolteu reaktifi: 1 ml'si 15 ml saf su ile seyreltilir (çalışma esnasında günlük hazırlanır).
- Sulfomik asit (Sigma-Aldrich)
- Sodyum tetraborat (Sigma-Aldrich)
- m-hidroksifenil (Sigma-Aldrich)

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Dicle ARAR
Doğum Yeri ve Tarihi	:Soma/MANİSA 28.09.1988
Lisans Üniversite	:Pamukkale Üniversitesi
Elektronik posta	:dicle-0@hotmail.com
İletişim Adresi	:Cumhuriyet mah. Sunda ün cad. Kardelen apt. No:31 Daire:6

Projelerde Yaptığı Görevler:

Denizli Tekstil Bölgesinden İzole Edilen Bacillus ve Paenibacillus Cinsi Bakteriler ile Reaktif Boyar Maddelerin Giderimi, PAÜBAP, Proje No: 2012KRM015, Yardımcı Araştırmacı, 2012-Devam Ediyor.

Bazı Propolis Örneklerinin Antibiofilm İndirgeme Özelliklerinin Araştırılması, PAÜBAP, Proje No: 2013BSP025, Yardımcı Araştırmacı, 2013-Devam Ediyor.

ESERLER

A. <u>Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:</u>

A1. Mercan Dogan, N., Bozbeyoglu, N., **Arar, D.,** Ardag Akdogan, H., Canpolat Topuz, M. and Beyatlı, Y., 'Investigation of reactive dye turquise blue HFG removal with Lysinibacillus fusiformis B26 and detection of metabolites', Fresenius Environmental Bulletin, 22 (9) 2567-2575, (2013).

A2. Arar, D., Doğanlı, G., Sensoy, T., Bozbeyoğlu, N. And Doğan, N., "Investigation of Decolorization of Reactive Violet 5R and Remazol Brillant

Orange 3R by Bacillus sp. DT16.", Journal of Applied Biological Sciences, 8 (1) 68-72, (2014).

A3. Dogan, N., Doganlı, G., Ülger, G., Habesoglu, D., Güzel, S., Yasar, Y., **Arar, D.,** Şensoy, T. and Bozbeyoğlu, N., 'Antibiofilm Effect of Two Propolis Samples from Turkey', Journal of Applied Biological Sciences, 8 (2) 27-31, (2014).

A4. Aydemir, C., Solak, S., Doganlı, G., Sensoy, T., **Arar, D.,** Bozbeyoglu, N., Dogan, N., Lönnecke, P., Hey-Hawkins, E., Sekerci, M. and Karakus, M., "Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Dithiophosphonates", Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 190:1–10, (2015).

A5. Dogan, N.M., Sensoy, T., Doganlı, G.A., **Arar, D.,** Bozbeyoglu, N.N., Akdogan, H.A. and Canpolat, M., 'Immobılızatıon of *Lycınıbacıllus fusıformıs* B26 Cells in Dıfferent Matrıces for Use in Turquoıse Blue HFG Decolourızatıon', Archives of Environmental Protection, (Accepted), (2014)

A6. Doganli, G.A., Dogan, N.M., **Arar, D.,** Bozbeyoglu, N.N., 'Biosorption and Decolourization of Turquoise Blue HFG by *Lysinibacillus sphaericus* LS-22 in aqueous solution' Pamukkale University Journal of Engineering Sciences, (Accepted), (2015)

A7. Arar, D., Mercan Doğan, N., Özcan, Y., Acar Doğanlı, G., Bozkaya, Ö. and Orujalipoore, I., 'Formation and Characterization of Biofilm Matrix from Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus M20', Biofuling, (Submitted, 2015).

B. <u>Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler :</u>

B1. Doğan, N.M., Bozbeyoglu, N., Acar Doğanlı, G., **Arar, D.,** Sensoy, T., 'Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus* sp. R1', ICOEST-2013, sayfa 545-546, 18-21 Haziran, Ürgüp/Nevşehir.

B2. Arar, D., Dogan, N., Doganlı, G., 'Biofilm Condition Formations Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (Mrsa) Strains', 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, p: 143, June 02-06, 2014, International University of Sarajevo, Sarajevo, BOSNIA and HERZEGOVINA.

B3. Dogan, N., Doganlı, G., Ülger, G., Habeşoğlu, D., Güzel, S., Yaşar, Y., **Arar, D.,** Şensoy, T., Bozbeyoglu, N., 'Antibiofilm Effect of Two Propolis Samples from Turkey', 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, p: 158, June 02-06, 2014, International University of Sarajevo, Sarajevo, BOSNIA and HERZEGOVINA.

B4. Arar, D., Doganli, G., Sensoy, T., Bozbeyoglu, N., Dogan, N., 'Investigation of Decolorization of Reactive Violet 5R and Remazol Brillant Orange 3R by *Bacillus* sp. DT16', 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, p: 174, June 02-06, 2014, International University of Sarajevo, Sarajevo, BOSNIA and HERZEGOVINA.

B5. Doğan, M. N., **Arar, D.,** Özcan, Y., Bozkaya, Ö., Orujalipoor, I., 'Characterization of Extracellular Polymeric Substances from Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)', Nanoscience & Nanotechnology For Next Generation Congress, August 20-22, 2014, Fırat Univesity, Elazığ.

C. <u>Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:</u>

C1. Bozbeyoğlu, N., **Arar, D.,** Doğan, N., Akdoğan, H., Canpolat, M., Şensoy, T., 'Termofilik *Lysisibacillus fusiformis* B26 ile Boyar Madde Turkuaz Mavisi HFG'nin Dekolorizasyonu ve Biyodegredasyonu', 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. Bildiri Kitabı, sayfa 1187, 3-7 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir.

C2. Arar, D., Bozbeyoğlu, N., Doğan, N., Akdoğan, H., Canpolat, M., Doğanlı, G., 'Termotolerant *Bacillus licheniformis* B22 ile Turkuaz Mavisi HFG Reaktif Boyar Maddenin Dekolorizasyonu ve Biyodegredasyonu', 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. Bildiri Kitabı, sayfa 1172-1173, 3-7 Eylül 2012, Ege Üniversitesi, İzmir.

C3. Arar, D., Şensoy, T., Erdem, C., Demir, O.H., Mengeş, S., Mercan Doğan, N., Akdoğan, H., Bozbeyoğlu, N., Acar Doğanlı, G., 'Denizli tekstil atık suyundan izole edilen *Bacillus* sp. DT13 ile boyar madde reaktif red 123'ün biyotransformasyonu' 13. Ulusal Spektroskopi Kongresi, sayfa 132, 15-18 Mayıs 2013, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur.

C4. Şensoy, T., **Arar, D.,** Mengeş, S., Demir, O.H., Erdem, C., Bozbeyoğlu, N., Yıldız, M., Mercan Doğan, N., Ardağ Akdoğan, H., Canpolat, M., 'Tekstil (Denizli) atık suyundan izole edilen *Bacillus* sp. DT12 ile reaktif red 123'ün biyotransformasyonu üzerine bir çalışma', 13. Ulusal Spektroskopi Kongresi, sayfa 130, 15-18 Mayıs 2013, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur.