

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

**BALIK PATOJENİ *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*,
Aeromonas hydrophila SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA
YETENEKLERİNİN ELEKTRON MİKROSKOBİ TEKNİĞİ İLE
İNCELENMESİ**

Burcu KARAOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

ISPARTA - 2020



© 2020 [Burcu KARAOĞLU]

ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmada;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

18/05/2020

Burcu KARAOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Balık Patojenleri.....	3
2.1.1. <i>Staphylococcus warneri</i>	3
2.1.2. <i>Aeromonas sobria</i>	3
2.1.3. <i>Aeromonas hydrophila</i>	4
2.2. Biyofilm	5
2.3. Adezyon	6
2.4. Farklı Yüzeylerde Biyofilm Oluşumu.....	7
2.5. Balık Hastalıkları Enfeksiyonlarında Biyofilm.....	8
2.6. Bakteriyel Balık Patojenlerinde Adezyon ve Biyofilm Oluşumu	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Kullanılan Suşlar	11
3.2. Patojenlerin Biyofilm Testi	11
3.2.1. Mikrowell yöntemi.....	11
3.2.2. Kongo red yöntemi.....	12
3.3. Örneklerin Farklı Yüzeyler Üzerinde Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Taramalı Elektron Mikroskopik Yöntemle Hazırlanması	12
3.4. Balık Patojenlerinin Ahşap, Metal, Fiberglas, Çelik Üzerinde Biyofilm Oluşturması.....	13
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	14
4.1. Balık Patojenleri <i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Aeromonas sobria</i> , <i>A. hydrophila</i> suşlarının Koloni Morfolojileri	14
4.2. Biyofilm Testi Sonuçlar	15
4.2.1. Mikroplak yöntemi sonuçları	15
4.2.2. Congo red agar yöntemi sonuçları	17
4.3. Balık Patojenlerinin Ahşap, Çelik, Fiberglas, Cam Üzerinde Biyofilm Oluşturması Sonuçları	18
4.4. Balık Patojenlerinin Ahşap, Çelik, Fiberglas, Cam Üzerinde Biyofilm Oluşumunun Elektron Mikroskop Bulguları	19
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	28
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ	40

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BALIK PATOJENİ *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila* SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA YETENEKLERİNİN ELEKTRON MİKROSKOBİ TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ

Burcu KARAOĞLU

**Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Bu çalışmada, balık patojeni *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* suşlarının biyofilm oluşturma yetenekleri elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Hasta balıklardan izole edilen *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* suşlarının biyofilm varlığı elektron mikroskobu ile gözlenmiştir. Biyofilm üreten suşların cam, ahşap, çelik ve fiberglas üzerindeki biyofilm oluşumları SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile de tespit edilmiştir. Ayrıca suşların biyofilm oluşum ve zamana bağlı olarak göstermiş olduğu gelişimleri 24. saatte ki inkübasyon periyodunda incelenmiştir. Adezyon testinde plaklarda oluşan bir saatlik tutunma incelendiğinde tüm patojen bakterilerin adezyon oluşturduğu bulunmuştur. Adezyon gücü *A. hydrophila*'da diğer patojenlere nispeten çok daha güçlü olduğu saptanmıştır.

Mikroplaklarla yapılan biyofilm testinde tüm bakteriyel balık patojenleri biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Mikroplak yönteminde en güçlü biyofilm oluşumu *A. hydrophila*'da bulunmuştur. *A. sobria*, *S. warneri* ve *A. hydrophila* suşları Congo Red Agarda kuru kristalize siyah koloni üreterek biyofilm (slime) üretimi pozitif bulunmuştur.

Sonuç olarak; *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* nin değişik materyallerin yüzeylerinde biyofilm oluşturmaları SEM elektron mikroskobu ile de tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila*, Elektron mikroskop, Farklı yüzeyler

2020, 40 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION ABILITIES OF FISH PATHOGEN *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria* AND *Aeromonas hydrophila* STRAINS BY ELECTRON MICROSCOPY TECHNIQUE

Burcu KARAOĞLU

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY

In this study, the biofilm formation ability of *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila* strains of fish pathogen was investigated by electron microscopy. The presence of *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila* strains isolated and identified from sick fish were observed by biofilm formation by electron microscopy. Biofilm formation of biofilm producing strains on glass, wood, steel and fiberglass was also determined by SEM. Biofilm formation and development of the strains were also examined during the incubation period at 24 hour. In the adhesion test, one-hour adhesion of the plaques was examined and it was found that all pathogenic bacteria caused adhesion. Adhesion strength was found to be much stronger in *A. hydrophila* than other pathogens.

It were showed biofilm in microplates method from all the bacterial fish pathogens. The most powerful biofilm formation in the microplate method was found in *A. hydrophila*. *A. sobria*, *S. warneri* and *A. hydrophila* strains were found to be positive for biofilm production by producing dry crystallized black colony on Congo Red Agar.

As a result; *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* 's biofilm on the surfaces of different materials were detected by SEM electron microscopy.

Key Words: Biofilm, *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, Electron microscope, Different surfaces

2020, 40 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim sırasında bilimsel katkılarıyla bana destek olan, insani ve ahlaki değerleri ile de idol edindiğim, bilgilerine, öngörüsüne, yerinde tespitlerine, deneyimlerine, değerli görüşlerine her zaman saygı duyduğum, deneyimlerimden yararlanırken gösterdiği hoşgörü ve özveriden dolayı Saygıdeğer Danışman Hocam Prof. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a sonsuz teşekkür ve hürmetlerimi takdim ederim.

Tez araştırma çalışmalarım sırasında ve öğrenimim süresince bilgi ve görüşleri ile beni aydınlatan, bana yol göstererek destek olan tüm Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi'nin değerli öğretim üyelerine ve idari personeline çok teşekkür ederim.

Hayatım ve eğitimimin boyunca beni yalnız bırakmayan her türlü desteği ile yanımda olan bu tezi yazmam ve yüksek lisansımı bitirmem için hiç vazgeçmeden üzerimden baskısını eksik etmeyen attığım her adımda yanımda olup benimle beraber çabalayan benim daha güçlü ve özgüvenli bir insan olmama vesile olan kendi ayaklarım üzerinde durmamı her daim destekleyen değerli annem Sabriye KARAOĞLU'na yapabileceğime olan inancıyla beni yüreklendiren ne olursa olsun vazgeçmemem gerektiğini söyleyen babam Recep KARAOĞLU'na yanımda olup her daim destek veren ailemin diğer ferdi ağabeyim Bulut KARAOĞLU'na sevgi ve hürmetlerimi takdim ederim.

Burcu KARAOĞLU
ISPARTA, 2020

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) <i>E. tarda</i> ve flegella görüntüsü	9
Şekil 2.2. (A, B) Kokkoid hücrelerin biyofilmi ve (C) spiral bacterinin biyofilmi	9
Şekil 2.3. (A, B) Hücre uzantıları aracılığıyla türler arası kontak (C) Kalın bir EPS katmanına gömülü tek bir kok.....	10
Şekil 2.4. (A) Yüzey üzerinde rastgele yer alan bakteri (B) Ekstraselüler polimerik substantlarla bir bakterinin diğerlerine tutunması (C) Mikrogranüller	10
Şekil 4.1. <i>Staphylococcus warneri</i> koloni morfolojisi	14
Şekil 4.2. <i>Aeromonas sobria</i> koloni morfolojisi	14
Şekil 4.3. <i>Aeromonas hydrophila</i> koloni morfolojisi	15
Şekil 4.4. <i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Aeromonas sobria</i> , <i>A. hydrophila</i> biyofilim oluşumu	16
Şekil 4.5. Çalışılan patojen bakterilerde 2. saat sonucunda biyofilim oluşumu	16
Şekil 4.6. Çalışılan patojen bakterilerde 4. ve 6. saat sonucunda biyofilim oluşumu	17
Şekil 4.7. Çalışılan patojen bakterilerde 24. ve 48. saat sonucunda biyofilim oluşumu	17
Şekil 4.8. Çalışılan patojen bakterilerde biyofilim oluşumu ve siyah koloni	18
Şekil 4.9. <i>S. warneri</i> 'nin cam, fiberglas, çelik, ahşap gibi farklı materyallerde biyofilim oluşturmaları	18
Şekil 4.10. Çeliğe en güçlü tutunmayla <i>S. warneri</i> 'de biyofilim oluşumu	19
Şekil 4.11. <i>A. sobria</i> 'nın cam, fiberglas, çelik, ahşap gibi farklı materyallerde biyofilim oluşturmaları	19
Şekil 4.12. <i>S. warneri</i> 'nin ahşap yüzeyde biyofilim oluşumlarının SEM görüntüleri	20
Şekil 4.13. <i>S. warneri</i> 'nin çelik yüzeyde biyofilim oluşumlarının SEM görüntüleri	20
Şekil 4.14. <i>S. warneri</i> 'nin fiberglas yüzey üzerinde biyofilim oluşumu SEM görüntüleri	21
Şekil 4.15. <i>S. warneri</i> cam yüzey üzerinde biyofilim oluşumu SEM görüntüleri	21
Şekil 4.16. <i>S. warneri</i> 'nin plastik yüzeyde biyofilim oluşumu SEM görüntüleri	21
Şekil 4.17. <i>A. hydrophila</i> ahşap yüzeyde biyofilim oluşumlarının SEM görüntüleri	22
Şekil 4.18. <i>A. hydrophila</i> çelik yüzeyde biyofilim oluşumu SEM görüntüleri	23
Şekil 4.19. <i>A. hydrophila</i> cam yüzeyde biyofilim oluşumlarının SEM görüntüleri ...	23
Şekil 4.20. <i>A. hydrophila</i> fiberglas yüzeyde biyofilim oluşumlarının SEM görüntüleri	24
Şekil 4.21. <i>A. hydrophila</i> plastik yüzeyde biyofilim oluşumlarının SEM görüntüleri	24
Şekil 4.22. <i>A. sobria</i> ahşap yüzeyde biyofilim oluşumlarının SEM görüntüleri	25
Şekil 4.23. <i>A. sobria</i> çelik yüzeyde biyofilim oluşumu SEM görüntüleri	25
Şekil 4.24. <i>A. sobria</i> plastik yüzeyde biyofilim oluşumlarının SEM görüntüleri	26
Şekil 4.25. <i>A. sobria</i> cam yüzeyde biyofilim oluşumlarının SEM görüntüleri	26
Şekil 4.26. <i>A. sobria</i> fiberglas yüzeyde biyofilim oluşumlarının SEM görüntüleri....	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Biyofilmin kimyasal kompozisyonu	5
Çizelge 2.2. Bakteriyel balık patojenleri ile ilgili biyofilm, adezyon ve EPS oluşumu.....	8
Çizelge 4.1. Farklı yüzeylerde SEM mikroskobu ile biyofilm oluşumu.....	27



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BHI	Brain Heart Infusion
CRA	Congo Red Agar
EPS	Extracelüler Polimerik Substant (Extracellular polymeric substance)
PBS	Phosphate Buffered Saline
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth



1. GİRİŞ

Biyofilmler, mikroorganizmaların canlı ya da cansız yüzeylere tutunarak, kendi ürettikleri polimerik madde içerisinde korunaklı bir şekilde kalabilmesini sağlayan yapılardır. Bu yapılar mikroorganizmalar için bir nevi kalkan görevi görmektedir. Biyofilm yapısı içerisindeki mikroorganizmalar, konak hücre cevabı, antimikrobiyal tedavi ve olumsuz çevre koşulları gibi etkilerden korunabilmektedir (Costerton vd., 1999).

Biyofilm; canlı dokular, endüstriyel ya da içme suyu boruları ya da suda ya da suyun yakınında yaşayan sistemlerde yer alabilirler. Bakteriler bir yüzeye yapışıp ve biyofilm oluşturduktan sonra o yüzeyden kuru durulama ile uzaklaştırılamazlar. Daha etkin yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Uygun dezenfektan uygulaması ve temizlik planlaması yapılması gerekmektedir.

İletişim, tüm canlılarda olduğu gibi bakterilerde de çok etkindir. Burada ki en önemli virülens faktörü son zamanlarda üzerinde çalışmaların artırıldığı ve incelendiği biyofilmdir. İletişimin gücüyle mikroorganizma yok olmakta, klinik biyofilm oluşturmayla balık üzerinde ölümcül olmaktadır. Balık patojenlerinin biyofilm oluşturmalarını tespit etmek ve buna neden olan olabilecek mekanizmayı anlamak, bu patojenlerle mücadele de başarılı olmak için önemlidir. Bu nedenle balık yetiştiriciliğinde biyofilmle mücadele de hastalıklar oluşmadan etkin koruma yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Biyofilm oluşumu, enfeksiyonların en önemli kaynaklarından. Yetiştiricilik sistemlerinde balık havuzları, kafesleri, tankları, su boruları ve kullanılan tüm sistemlere inkübatörlerin yüzeylerine dışarıdan ya da çevresel faktörler nedeniyle patojenik mikroorganizmaların yapışması ve bunun sonucunda yüzeyde biyofilm oluşturmaları balık sağlığına tehdit oluşturmaktadır.

İnsan sağlığı açısından önemli ve tüketilmesi tavsiye edilen yararlı bir besin maddesi olan balıklar, yetiştiricilik ortamında çevresel faktörlerinde etkisiyle patojenlere maruz kalmaktadır. Bu patojenlerin oluşturduğu hastalıkların tedavisinden ziyade patojenlerin bu yüzeylere yapışmasının önlenmesi önemlidir. Bu nedenle

hastalıkları oluşturan patojenlerin hastalık oluşturma mekanizmalarında önemli bir rol oynayan biyofilm oluşumunun araştırılması son zamanlarda dikkat çeken çalışmalar arasındadır.

S. warneri, *A. sobria*, *A. hydrophila* içinde bulunduğu şartları değerlendirmeyi bilen ve uyum sağlayabilen önemli balık patojeni bakterileri arasında yer almaktadırlar. Bu çalışma ile *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* patojenlerinin biyofilm oluşumu ilk defa elektron mikroskobu ile incelenecektir. Bu çalışmalar biyofilm oluşumu için veri oluşturma ve örnek teşkil etmesi açısından özgün bir değer taşımaktadır. Ayrıca bu patojenlerde farklı zamanlarda biyofilm oluşumu tespit edilerek, patojenin enfeksiyon oluşturma engellemeneye önlemler almada yardımcı olması açısından yapılan ilk çalışmaları oluşturmaktadır.

Balık yetiştiriciliğinde kullanılan yetiştiricilik materyallerin balık patojenlerinin adezyon ve biyofilm oluşturma yetenekleri çeşitli yüzeyler kullanılarak tespit edilecek ve böylece malzemelerde risk analizi yapılmış olacaktır.

Bu tez çalışmasının hedefi hasta balıklardan izole edilen *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* suşlarının biyofilm varlığının tespit edilip elektron mikroskobu ile araştırmak ve bu suşlarının çeşitli yüzeyler üzerindeki adezyon ve biyofilm yeteneklerini incelemektir. Bu amaçla *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* suşlarının biyofilm tespitleri mikropak metodu ile belirlenmiştir. Biyofilm üreten suşların cam, ahşap, çelik ve fiberglas yüzeylerdeki tutunma ve biyofilm oluşumları da SEM ile tespit edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Balık Patojenleri

2.1.1. *Staphylococcus warneri*

S. warneri balığın cilt altında lokalize olan, nadiren insanlarda enfeksiyon oluşturan oportunist bir balık patojenidir (Gil vd., 2000). *S. warneri* katalaz pozitif, oksidaz-negatif ve koagülaz negatiftir. İnsanlarda ve hayvanlarda cilt florasının bir parçası olarak bulunan ortak bir komensal organizmadır. Diğer koagülaz negatif stafilokoklarda olduğu gibi, bağışıklık sistemi bozulmuş hastalarda zaman zaman enfeksiyona neden olur.

S. warneri, bir matriste korunan kompleks polisakkaritlerden oluşan biyofilmi oluşturur. Bu biyofilmler antimikrobiyal ajanların girişine karşı fiziksel bir bariyer oluşturur ve elde edilen hasta balıklar arasında kronik enfeksiyonlara neden olduğu düşünülmektedir.

Croxatto vd. (2007) ve Musharrafieh vd. (2014)'de *S. warneri*'nin biyofilm oluşumuna etkisini araştırmışlardır. *S. warneri* varlığında veya yokluğunda gökkuşağı alabalığı pulları üzerinde biyofilmler oluşturmasını incelemişlerdir. Sonuçta, *S. warneri*'nin varlığında, biyofilmler oluşturabildiğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında komensal *S. warneri* patojenin büyümesi ve biyofilm oluşturması için bir katalizör görevi görerek enfeksiyon başarısını artırdığını bildirmişlerdir.

2.1.2. *Aeromonas sobria*

Aeromonas türleri, gıda, içme suyu, kanalizasyon, çevresel su ve insan klinik örnekleri gibi birçok kaynaktan izole edilebilen Gram negatif, fakültatif anaerobik bakterilerdir. Bazı fenotipler d-glikozu asit ve gazda fermente ederler ve hücre dışı hemolizin gösterirler (Shiina vd., 2004).

A. sobria'da biyofilm oluşumu ele alındığında; Rahman vd. (2007)'de kalıcı *Aeromonas* klonlarının tüm izolatlarının güçlü biyofilm oluşum yeteneği sergilediğini

göstermiştir. C-di-GMP birçok bakteride biyofilm oluşumunu düzenler. Suda yaşayan yabani otlara (duckweed) ve serbest yaşayan hayvan (amoeba) yüzeylerine yapışmayı ve biyofilm oluşumunu düzenlemiştir. Sularda genel olarak bulunan hareketli *Aeromonas* türleri (*A. hydrophila*, *A. sobria*) balıklarda veya soğuk kanlı hayvanlarda septisemik, çeşitli hayvan türlerinde ve insanlarda enterik, septisemik veya lokal enfeksiyonlar oluştururlar.

2.1.3. *Aeromonas hydrophila*

Dünyada geniş dağılım gösteren *A. hydrophila* Gram-negatif bir bakteridir ve aynı zamanda deniz ve tatlı su balık hastalıklarına neden olan bir patojendir. Hareketli *Aeromonas* türleri genellikle fırsatçı patojen ya da sekonder patojen olarak kabul edilmesine rağmen, *A. hydrophila* primer patojen olarak görülmüştür (Timur ve Timur, 2003; Bastardo vd., 2012; Gong vd., 2015).

Aeromonas enfeksiyonları genellikle çevre koşullarındaki kötüleşmesi gibi durumlarda ortaya çıkan bir enfeksiyondur. Birçok kültür ve doğadaki tatlısu balıkları *A. hydrophila*'nın neden olduğu enfeksiyona duyarlıdır (Timur ve Timur, 2003; Bastardo vd., 2012). *A. hydrophila*, *Aeromonas* türleri arasında en tanınmış türüdür. Sucul yerlerde bulunan çubuk şekilli, sporsuz, oksidaz pozitif, glukoz fermentasyon ve fakültatif anaerobiktir (Hazen vd., 1978). *A. hydrophila* güçlü bir bakteri olduğu için öldürmek ya da yok etmek zordur (Mathewson ve Dupont, 1992).

A. hydrophila yapısı nedeniyle birçok organizma için çok toksiktir. Bu nedenle balık veya insan vücuduna nüfuz ettiğinde, kan yoluyla ilk mevcut organa bulaşır. Hem insan hem balık sağlığı açısından istenmeyen bir durum meydana gelir.

A. hydrophila, multifaktöriyel virülensine bağlı olarak, homeotermik ve poikilothermik olan birçok konakta hastalıklara neden olur. Bu virülens belirleyicilerinin çoğunun üretimi, yüksek hücre yoğunluğu ile ilişkilidir; bu durum, yoğunluğu algılama ile düzenlenebilir bir fenomendir. Çevreyi algılama sistemi, çeşitli patojen bakterilerde olduğu gibi *A. hydrophila*'da da çeşitli virülens faktörlerinin ekspresyonunu düzenler (Chu vd., 2011).

2.2. Biyofilm

Biyofilm, bir yüzeye yapışıp, belirli yapısal bütünlük içerisinde toplu olarak yaşayan, iletişim ya da bilgi aktarımına izin veren, değişik gen transkripsiyonu, büyüme neticesine bağlı olarak farklı fenotipik özellik gösterebilen karmaşık bir organizasyondur (Donlan ve Costerton, 2002). Biyofilmin kimyasal kompozisyonu Çizelge 2.1’de verilmiştir (Jamal vd., 2015).

Çizelge 2.1. Biyofilmin kimyasal kompozisyonu

Bileşen	% İçerik
Mikrobiyal hücre	%2-5
DNA ve RNA	< %1-2
Polisakkaritler	%1-2
Proteinler	< %1-2
Su	%97

Biyofilm morfolojisi, çeşitli parametrelerle incelenmiştir: (i) biyofilmin bulunduğu alt tabakaya normal yönde substrattan maksimum uzaklığı tanımlayan ortalama kalınlık, böylece biyofilm içerisindeki tüm gözenekleri ve boşlukları hariç tutmak (ii) pürüzlülük, kalınlık dağılımından hesaplanan ve biyofilmin heterojenliğini tanımlayan bir miktar (iii) alt katman kapsamı, biyofilmin kapladığı yüzey alanı yüzdesi (iv) besin maddelerine maruz kalan biyofilm alanının fraksiyonunu yansıtan yüzey-hacim oranı ve (v) biyofilmin toplam biyokütlenin bir kestirimini sağlayan biyofilmin biyo hacmi veya toplam hacmi olarak ifade edilmiştir (Chang vd., 2015).

Biyofilm oluşumu;

Bakteri hücreleri doğada kendiliğinden bulunabildikleri gibi canlı ya da cansız bir yüzeye yapıştıktan sonra çoğalarak mikroorganizma toplulukları oluştururlar (Costerton, 1999). Bu topluluklar tek bir mikroorganizma türünden oluşabilir ya da farklı türde mikroorganizmaları içerebilir.

1) **Tutunma:** Planktonik yapıda mikroorganizmanın yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlandığı biyofilm oluşumunun ilk aşamasıdır. Bakteri, flagella hareketi sonucu kısa zamanda yüzeye tutunur (Lejeune, 2003).

2) **Geri Dönüşümsüz Bağlanma:** Yüzeye tutunmuş bakterinin hücre membranındaki proteinlerinin uyarımı gerçekleşir ve bakteri hücreleri arasında iletişim mekanizmaları devreye girer. Bakteri hücresi, ekstraselüler polimerik maddeler sentezlemeye başlar (Lindsay, 2006).

3) **Kolonizasyon ve Mikrokoloni Oluşumu:** Yüzeye tutunmuş bakteri hücreleri bölünüp çoğalarak mikrokoloniler oluşturur (Costerton, 1999). Farklı türden mikroorganizma topluluklarını içeren mikrokoloniler arasındaki kanallarla suyun ve besin maddelerinin taşınmasını sağlamaktadır. Yeni oluşan mikrokolonilerle bakteri popülasyonu gittikçe artar. Bu aşama aynı zamanda biyofilm fenotipinin meydana gelmeye başladığı evre olup, mikroorganizmanın güçlü bir yapı kazanmasıyla sonuçlanabilmektedir (Omar ve Donabedian, 2017).

4) **Kopma:** Biyofilm oluşumu ve olgunlaşması sonrasında biyofilmde yer alan bakteri hücrelerinde genetik düzenlemeler sonucunda flageller sentezlenir. Hareketlenen bakteri hücresi biyofilmin üst tabakasından koparak ayrılır. Kopan planktonik hücreler yeni odaklara göç eder ve göç ettikleri yerlere yerleşerek orada tutunma sağlarlar. Buda biyofilmin yayılmasına ve bazen yerel enfeksiyonların sistemik hâle geçişine neden olabilmektedir (Marcinkiewicz ve Vlassova, 2013).

2.3. Adezyon

Adezyon farklı türdeki moleküllerin birbirini çekmesi, bir maddenin başka türde canlı ya da cansız bir maddeye yapışması olarak tanımlanabilir. Kısaca yapışma da denilebilir.

Gerke vd. (2008)'de yaptıkları bir çalışmada *Staphylococcus epidermis* bakterisinin hücre içi polisakkarit ürettiğini bu şekilde yüzeye tutunup mikrokoloni oluşturup olgun biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır. Cai vd. (2013), *Flavobacterium columnare*'nin; biyofilm üreterek hareketsiz yüzeylere bağlanmayı ve kolonileşmeyi

gerçekleştirdiği bildirmiştir. He vd. (2012), *E. tarda*'da biyofilm oluşumu için fliC'nin gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Xu vd. (2013)'de *E. tarda*'nın fliC12, fliA and flhDC flagella filament yapısının bakterilerin hareketliliğinde, biyofilm oluşumunda, adezyon ve patojenitede etkili rol oynadığını bildirmişlerdir. Sundell ve Wiklund, (2011)'de *F. psychrophilum* biyofilm hücrelerinin, oksitetrasikline ve Flumekuin' in en düşük inhibisyon konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında bu maddelere karşı hızlı bir şekilde direnç geliştirebileceğini belirtmişlerdir. Yıldız ve Visick, (2009)'da kongo kırmızı plakalarında yetiştirilen *V. parahaemolyticus*'un biyofilm matriks üretimi ile koloni morfolojisi arasındaki korelasyon varlığı gösterilmiştir. O'Toole ve Kolter, (1998)'de *Pseudomonas fluorescens* WCS365 suşunda biyofilmi çalışmışlardır.

2.4. Farklı Yüzeylerde Biyofilm Oluşumu

Biyofilmler, yaygın olarak katı-bağlı yapılar olarak değerlendirilmesine karşın, prensipte hava-sıvı, sıvı-sıvı, katı-sıvı veya hava-katı ara yüzleri de dahil olmak üzere herhangi bir arayüz ile ilişkilendirilebilir (Chang vd., 2015).

Adezyon ve biyofilm paslanmaz çelik, gıda yüzeyi, cam, kauçuk, ahşap ve polipropilen (protez cihazları, kateterler, implant, yapay organlar gibi) yüzeylere belirli koşullar içinde yapışır ve yüzey ile etkileşime girerek hücresel büyümeyi başlatır.

Altuğ vd. (2007), deniz ortamında kullanılan materyallerden olan ahşap, paslanmaz çelik, cam gibi yüzeylerde oluşan bakteriyel biyofilm tabakasında bulunan bakteri düzeylerini araştırmışlardır. Lynch vd. (2002)'de *A. hydrophila* AH-1N biyofilmleri paslanmaz çelik akış modeli ile büyütülmüş, büyüme hızları ve gelişim özellikleri incelenmiştir. İlk 8 saat boyunca tutunduklarını belirlemiştir. Boari vd. (2009)'da *A. hydrophila* ve *Staphylococcus aureus* tarafından paslanmaz çelik üzerinde biyofilm oluşumunun süt ve farklı kültür koşulları kullanılarak belirlenmiştir. Ryu ve Beuchat, (2005)'de *E. coli* O157: H7 suşlarında paslanmaz çelik kupalarda biyofilm oluşumunu saptamışlardır.

2.5. Balık Hastalıkları Enfeksiyonlarında Biyofilm

Yasuda vd. (1994)'de, biyofilm içerisinde gelişen *E. coli* hücrelerinin fagositoza dirençteki artışın, biyofilm bakterilerinin polimorfonükleer lökositlerdeki oksijen ile öldürülemeyen, dirençli türler ortaya çıktığı hipotezini öne sürmüşlerdir. Enfeksiyonlardaki biyofilmlerden ayrılan bakterilerin immün sistemi aşarak enfeksiyon oluşturmaya daha uygun olduğunu ifade etmişlerdir.

Shiau ve Wu, (1998)'de, *Staphylococcus epidermidis* tarafından üretilen ekstrasellüler slime faktörünün makrofaj fagositik aktivitesine engel olduğunu saptamıştır (Ataol, 2011).

2.6. Bakteriyel Balık Patojenlerinde Adezyon ve Biyofilm Oluşumu

Bakteriyel balık patojenleri ile ilgili biyofilm, adezyon ve EPS oluşumu ile ilgili çok sayıda çalışma mevcut olup Çizelge 2.2'de verilmiştir.

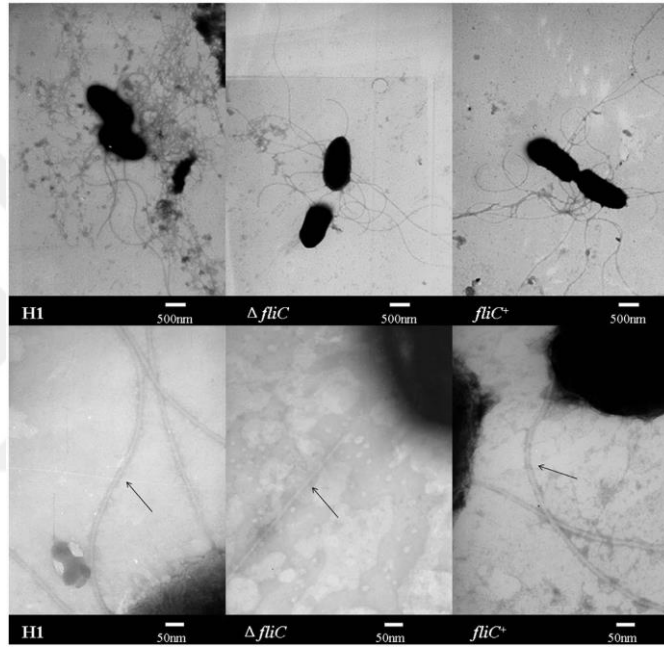
Çizelge 2.2. Bakteriyel balık patojenleri ile ilgili biyofilm, adezyon ve EPS oluşumu

Bakteri	Biyofilm	Adezyon	EPS	Referans
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+			Jahid vd., 2013
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	+			Romero vd., 2010
<i>Flavobacterium columnare</i>	+			Cai vd., 2013
<i>Vibrio cholerae</i>	+			Tischler ve Camilli, 2004
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	+	+		Högfors-Rönnholm vd., 2015
<i>Yersinia ruckeri</i>		+		Coquet vd., 2002
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+			Lynch vd., 2002
<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	+		Snoussi vd., 2008
<i>Vibrio cholerae</i>	+			Yıldız ve Visick, 2009
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+			Yıldız ve Visick, 2009
<i>Vibrio fischeri</i>	+			Yıldız ve Visick, 2009
<i>Vibrio vulnificus</i>	+			Yıldız ve Visick, 2009
<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	+		Badreddine vd., 2013
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+		+	Millezi vd., 2013
<i>Edwardsiella tarda</i>	+			He vd., 2012
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+		Xu vd., 2013
<i>Mycobacterium marinum</i>	+			Bardouniotis vd., 2003
<i>Mycobacterium marinum</i>	+	+		Alavi vd., 2007
<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	+		Abdallah vd., 2009

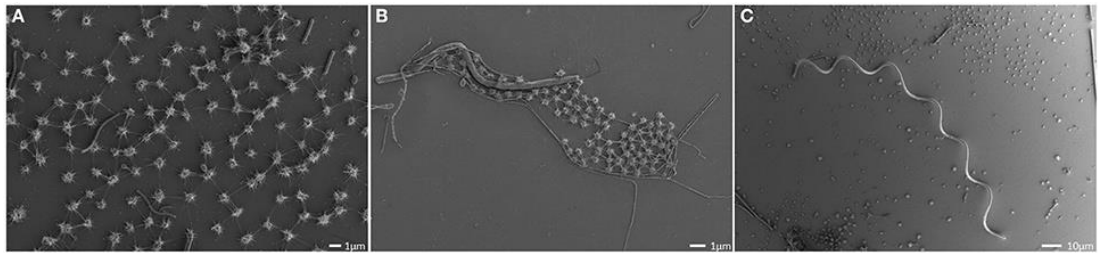
Çizelge 2.2. Bakteriyel balık patojenleri ile ilgili biyofilm, adezyon ve EPS oluşumu (Devam)

<i>Staphylococcus aureus</i>	+			Boari vd., 2009
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+			Boari vd., 2009
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+		+	Sebastião vd., 2013
<i>Flavobacterium columnare</i>	+		+	Sebastião vd., 2013
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	+	+		Abdallah vd., 2009

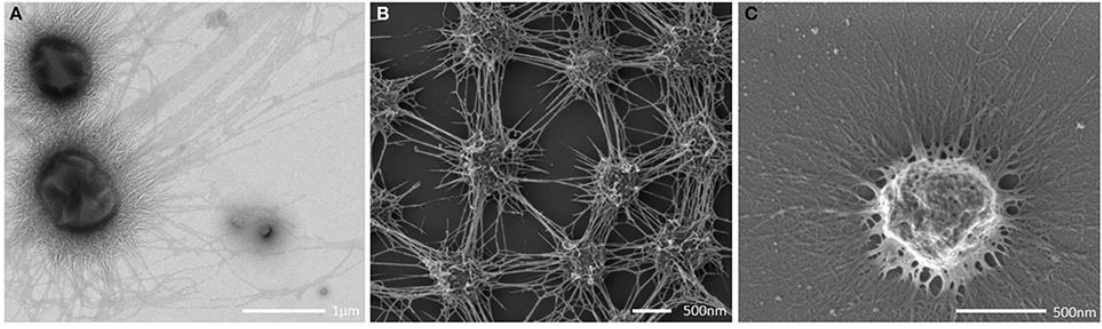
Bakteriyel balık patojenlerinde biyofilm çalışmaları mevcut olup söz konusu çalışmalardan alınmış resimler Şekil 2.1, Şekil 2.2, Şekil 2.3, Şekil 2.4’de verilmiştir.



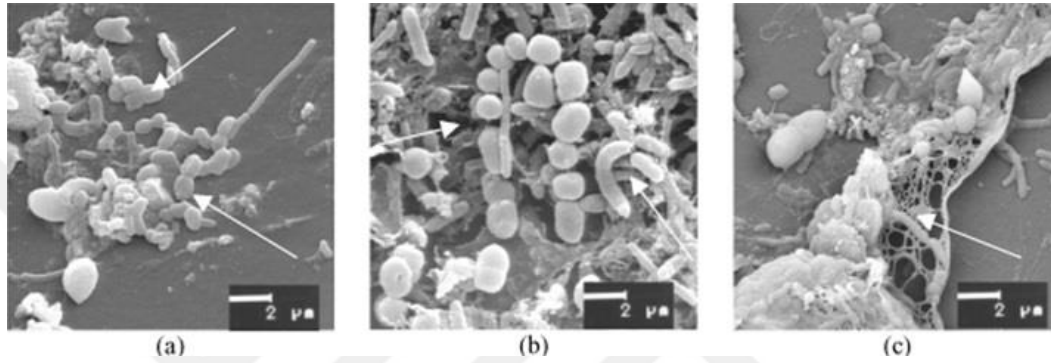
Şekil 2.1. SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) *E. tarda* ve flegella görüntüsü (He vd., 2012)



Şekil 2.2. (A, B) Kokkoid hücrelerin biyofilmi ve (C) spiral bacterinin biyofilmi (Perras vd., 2014)



Şekil 2.3. (A, B) Hücre uzantıları aracılığıyla türler arası kontak (C) Kalın bir EPS katmanına gömülü tek bir kok (Perras vd., 2014)



Şekil 2.4. (A) Yüzey üzerinde rastgele yer alan bakteri (B) Ekstraselüler polimerik substantlarla bir bakterinin diğerlerine tutunması (C) Mikrogranüller

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Suşlar

Yapmış olduğumuz araştırmada ISUBÜ Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarından temin edilen bakteriyel balık patojenlerinden *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* suşları kullanılmıştır. Suşlar kullanılıncaya kadar -80°C’de ve %20 gliserin içerisinde muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen bakteriler kullanım için -80°C’den alınarak 25°C’de bekletildikten sonra patojenler TSA besiyerine ekilmiştir ve gerektiğinde kullanılmak üzere maksimum 7 gün süreyle +4°C’de saklanmıştır. Ekimleri yapılan *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* 25°C’de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

3.2. Patojenlerin Biyofilm Testi

3.2.1. Mikrowell yöntemi

O’Toole ve Kolter (1998)’de tanımladığı yönteme göre *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* suşları Luria-Bertani brothta (LB) 25°C’de 24 saat süreyle üretilmiştir. Bakteri kültürü 1/100’ oranında steril PBS de sulandırılmış olup. Sulandırılmış olan her bakteri kültürü için mikropalak üzerinde toplam 24 çukura 100’er µl ilave edilmiş olup 30°C’de 24 saat inkübe edilmesi sağlanmıştır. İnkübasyon sağlandıktan sonra çukurlar distile su ile yıkanmış ve biyofilmle ilişkili hücre kalıntıları %1’lik kristal viole ile 15 dk süreyle boyanmıştır. Boya fazlası hafif akan su altında dikkatli bir şekil yıkanmış ve bakterilerin mikropalalara tutunmuş olduğu biyofilm yapısı görüntülenmiştir. Biyofilm oluşumunu kantitatif olarak belirlemek için plaklara 2x200 µl %95 etanol saf su ile 4 ml’ ye tamamlanarak ilave edilmiştir. Plakların 490 nm’de ELİSA okuyucusunda (BioTek) optik yoğunlukları ölçülmüştür (Ye vd., 2008). Her bakteri için 24 saatin sonucunda OD değerleri ortalamaları alınmıştır. Çalışmada Luria-Bertani broth negatif kontrol, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşu ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.2. Kongo red yöntemi

Freeman vd. (1989)'da tarafından bildirilen yönteme göre hazırlanmıştır. Kongo kırmızısı konsantre solusyon olarak hazırlanıp, 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Kongo kırmızılı besiyeri, 55°C'ye kadar soğutulmuş, steril edilen kongo red ilave edilip güzelce karıştırıldıktan sonra steril petrilere dökülmüştür. Bakteri suşları, Kongo kırmızısı agar (CRA)'a ekildikten sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon neticesinde, kristalize siyah koloniler oluşturan suşlar biyofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan suşlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir (Demir ve İnanç, 2015).

3.3. Örneklerin Farklı Yüzeyler Üzerinde Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Taramalı Elektron Mikroskopik Yöntemle Hazırlanması

Yapılan çalışmada kullanılan yüzeyler özellikle su ürünleri yetiştiriciliğinde en çok tercih edilen yüzeylerle çalışılmaya karar verilmiş olup bunlar; fiberglas, paslanmaz çelik, cam ve ahşap yüzeyler olarak çalışılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla 1 cm² kesilen farklı yüzeyler çalışma başlamadan öncesinde 10 dakika %70 etanol ile temizlenmiştir. Daha sonra steril distile su ile yıkanmış 2 saat 60°C'de kurutulup sonrasında ısıya dayanıklı cam kaplar içine yerleştirilmiş, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir (İset, 2016).

Tüm deneyler için bakteriler 16-18 saat süre ile 25°C'de triptik soy broth (TSB) içinde üretilmiş ve optik yoğunlukları 10⁸ bakteri/mL olarak ayarlanmıştır. Homojenizasyon sonrası içinde farklı yüzey parçaları yerleştirilen 24 kuyulu doku kültür plaklarına, her kuyuya 2 mL olacak şekilde eşit dağıtılmıştır. Doku kültür plakları 25°C'deki inkübatöre yerleştirilmiş 24 saat sonra plaklardan çıkarılarak 10 mL steril distile su ile üç kere yıkandıktan sonra taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir.

Bu amaçla örnekler %2.5'luk glutaraldehit (0.1 M fosfat tamponu ile hazırlanmış, pH 7.4) içinde 24 saat 4°C fikzasyon edilerek, daha sonrasında 0.1 M PBS ile iki kez yıkandıktan sonra %1'lik Osmium tetroxide, OsO₄ içinde 1 saat daha fikzasyona alınmış ve sonra distile su ile yıkanmıştır. Örnekler absolüt alkolle 30 dk muamele edilmiş ve havada kurutulmuştur. Aliminyum stablar üzerine alınarak Süleyman

Demirel Üniversitesi Mükemmeliyet Merkezi bünyesinde bulunan SEM mikroskobu ile incelemeye alınmıştır.

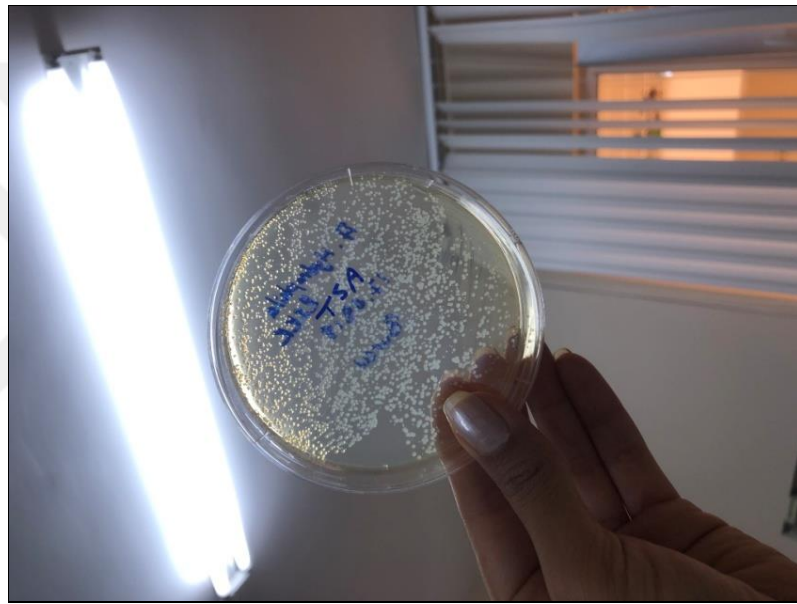
3.4. Balık Patojenlerinin Ahşap, Metal, Fiberglas, Çelik Üzerinde Biyofilm Oluşturması

Christensen vd. (1985)'de tarafından bildirilen yönteme göre, suşların saf kültürlerinden tek bir koloni alınarak, içinde 5 ml %0.25 glukoz içeren TSB besiyerine inoküle edilmiş, daha sonra ahşap, metal, fiberglas, plastik parçalarında her tüpe ayrı ayrı olacak şekilde steril edildikten sonra konularak 25°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüpler boşaltılmış, %1'lik safranin solüsyonu ile oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir. Boya dökülerek, tüpler steril PBS ile iki defa yıkanarak ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün tüpün iç yüzeyinde renkli bir film tabakasının oluşumu ve yoğunluğuna göre değerlendirilmesi yapılmıştır. (Demir ve İnanç, 2015).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Balık Patojenleri *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila* suşlarının Koloni Morfolojileri

Araştırmada 1 adet *S. warneri*, *A. sobria* ve *A. hydrophila* suşu kullanılmıştır. Bu suşların üretilmesi ve gençleştirilmesinde Tryptic Soy Agar (TSA) kullanılmıştır. *S. warneri* (Şekil 4.1), *A. sobria* (Şekil 4.2), *A. hydrophila* (Şekil 4.3) bakterilerinin TSA besiyerinde krem renkli ve yuvarlak koloniler oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 4.1. *Staphylococcus warneri* koloni morfolojisi



Şekil 4.2. *Aeromonas sobria* koloni morfolojisi

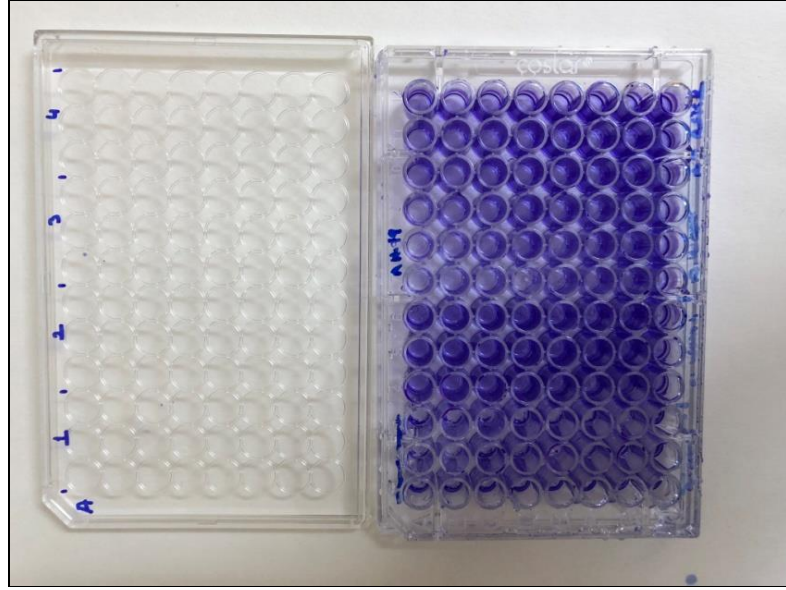


Şekil 4.3. *Aeromonas hydrophila* koloni morfolojisi

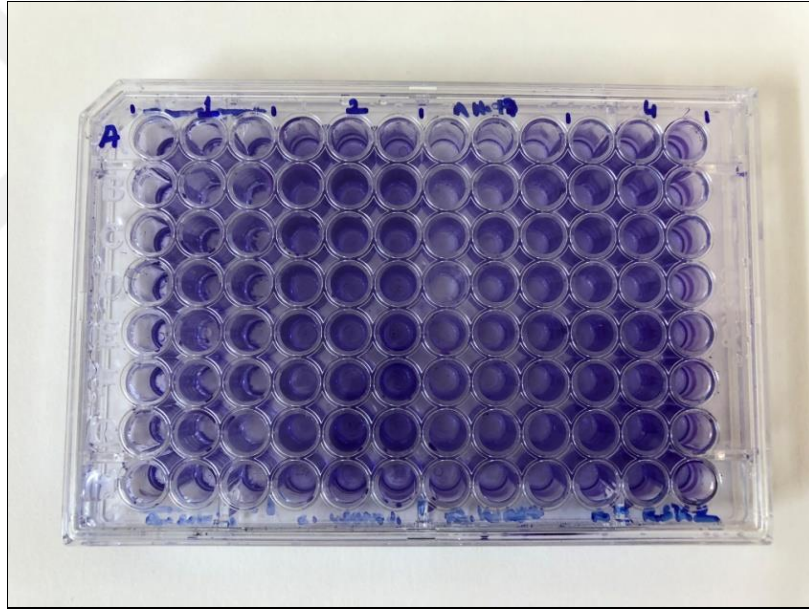
4.2. Biyofilmler Testi Sonuçları

4.2.1. Mikroplak yöntemi sonuçları

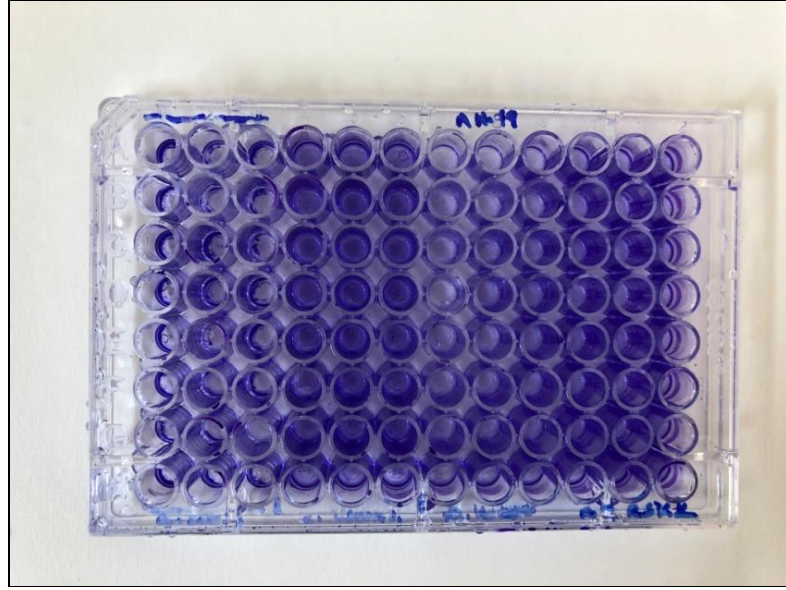
Mikroplaklarda yapılan biyofilm testinde, plaklarda oluşan tutunma 630 nm’de ELİSA okuyucusunda sırasıyla negatif kontrol için 0.048 nm, *S. Warneri* 0.121 nm, *A. sobria* 0.158 nm ve *A. hydrophila* için 0.172 nm olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre çalışılan tüm bakteriyel balık patojenleri biyofilm oluşturmaktadır. Mikroplak yönteminde en güçlü biyofilm oluşumu *A. hydrophila* da bulunmuştur. *S. warneri*’de, *A. sobria*’da, *A. Hydrophila*’nın biyofilm oluşumu Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.



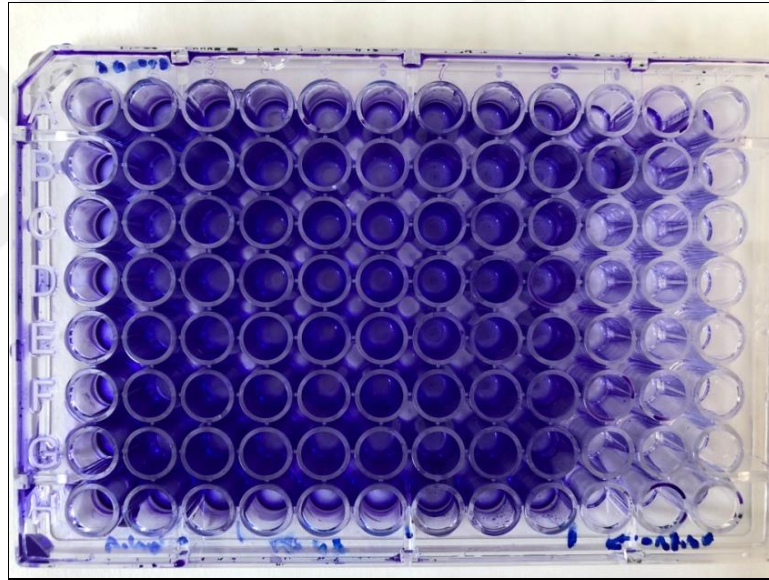
Şekil 4.4. *Staphylococcus warneri*, *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila* biyofilim oluşumu



Şekil 4.5. Çalışılan patojen bakterilerde 2. saat sonucunda biyofilm oluşumu



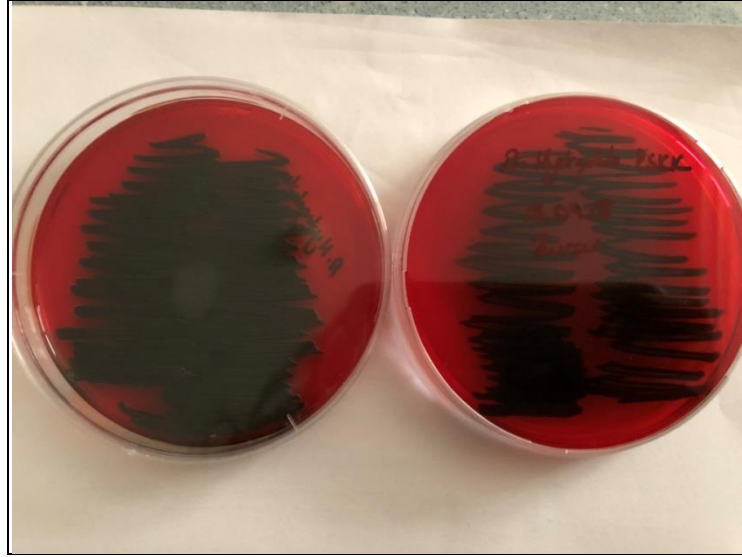
Şekil 4.6. Çalışılan patojen bakterilerde 4. ve 6. saat sonucunda biyofilm oluşumu



Şekil 4.7. Çalışılan patojen bakterilerde 24. ve 48. saat sonucunda biyofilm oluşumu

4.2.2. Congo red agar yöntemi sonuçları

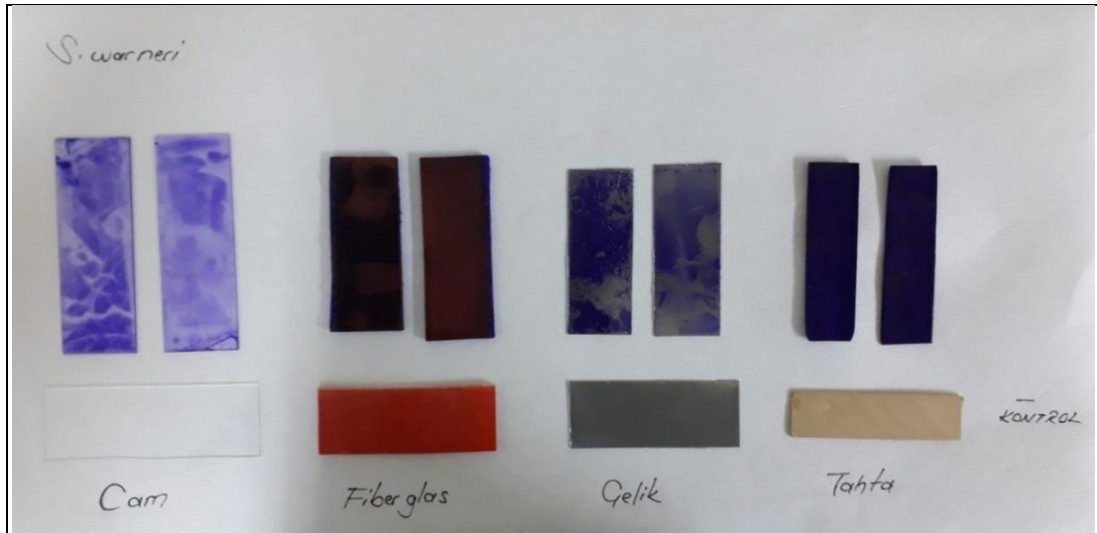
Çalışmada kullanılan patojen bakteriler krem renkte iken Kongo red agar yöntemiyle yapılan biyofilm testinde koloni rengi farklı renge dönüşmüştür (Şekil 4.8). Kolonin siyah renge dönüşmesi biyofilm oluşturduğunu, pembe renge dönüşmesi ise biyofilm oluşturmadığını göstermiştir (Şekil 4.8). Koloni rengiyle biyofilm oluşumunun tespit edilmesi prensibe dayanan bu yöntemde (CRA testi) *A. sobria*, *S. warneri* ve *A. hydrophila* suşları kongo red agarda kuru kristalize siyah koloni üreterek biyofilm üretimi pozitif bulunmuştur (Şekil 4.8).



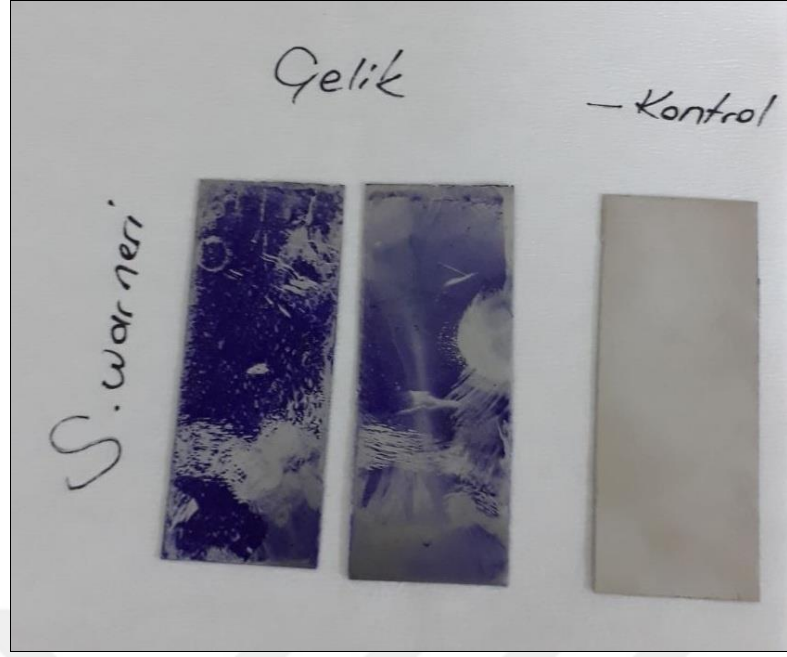
Şekil 4.8. Çalışılan patojen bakterilerde biyofilm oluşumu ve siyah koloni

4.3. Balık Patojenlerinin Ahşap, Çelik, Fiberglas, Cam Üzerinde Biyofilm Oluşturması Sonuçları

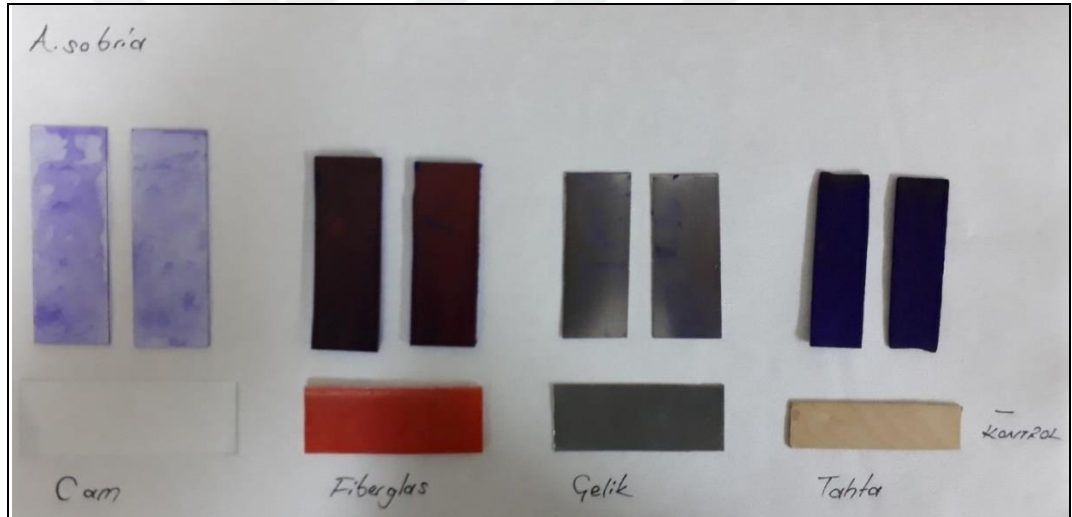
Bakteriyel balık patojenlerinin farklı materyallerdeki biyofilm oluşturması gözle analiz edildiğinde; boya yoğunluğu baz alındığında en güçlü *A. hydrophila* 'da tespit edilirken bu suşu sırasıyla *A. sobria* ve *S. warneri* suşları takip etmiştir. *A. hydrophila* tüm materyallere özellikle de çelik ve cama güçlü yapışma göstermiştir. *A. sobria*'nın cama yapıştığı ancak fiberglas ve çeliğe daha az tutunduğu tespit edilmiştir. Sonuçta patojenlerin tamamının yetiştiricilik tesislerinde birçok alanda kullanılan bu materyallere tutundukları kanıtlanmıştır.



Şekil 4.9. *S. warneri*'nin cam, fiberglas, çelik, ahşap gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturması



Şekil 4.10. Çeliğe en güçlü tutunmayla *S. warneri*'de biyofilm oluşumu

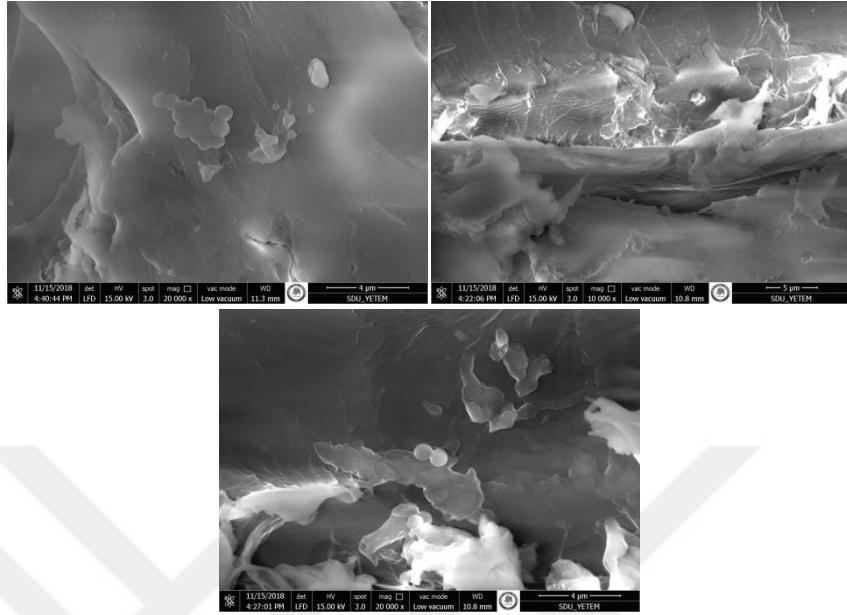


Şekil 4.11. *A. sobria*'nın cam, fiberglas, çelik, ahşap gibi farklı materyallerde biyofilm oluşturması

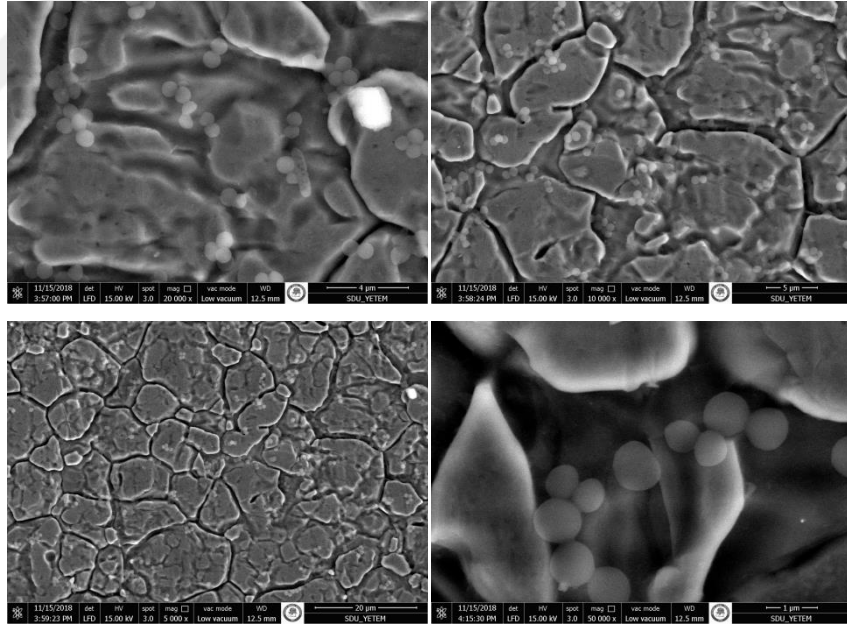
4.4. Balık Patojenlerinin Ahşap, Çelik, Fiberglas, Cam Üzerinde Biyofilm Oluşumunun Elektron Mikroskop Bulguları

S. warneri'nin ahşap, çelik, cam, fiberglas, plastik materyali üzerinde ki biyofilm oluşumu SEM mikroskopunda incelendiğinde; ahşap, çelik ve plastik yüzeyde biyofilm oluşumu gözlemlenirken cam ve fiberglas yüzeyde biyofilm oluşumu yaptığımız çalışma sonucundan tespit edilmemiştir (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14,

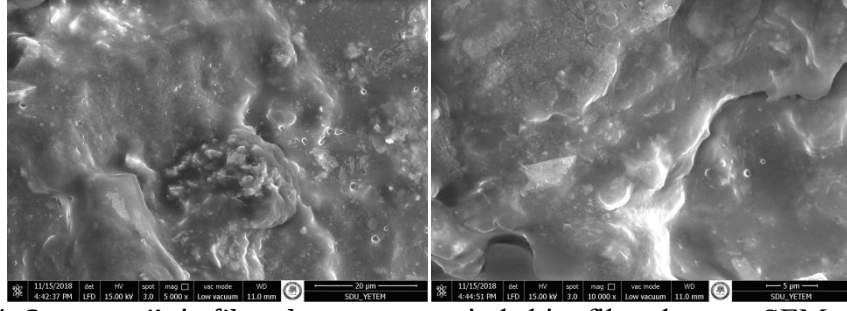
Şekil 4.15, Şekil 4.16). Çelik ve plastik yüzeyde biyofilm *S. warneri* bakterileri sayılarının çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir.



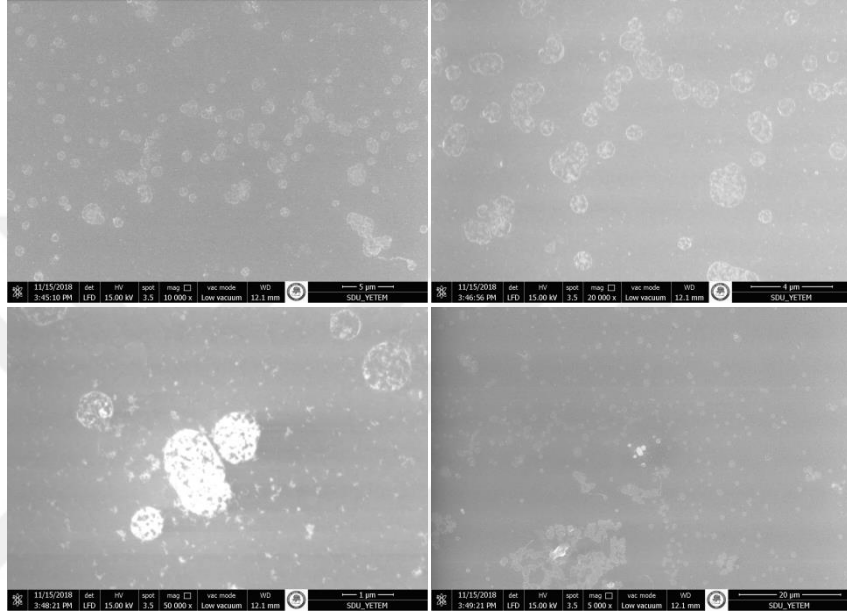
Şekil 4.12. *S. warneri*'nin ahşap yüzeyde biyofilm oluşumlarının SEM görüntüleri



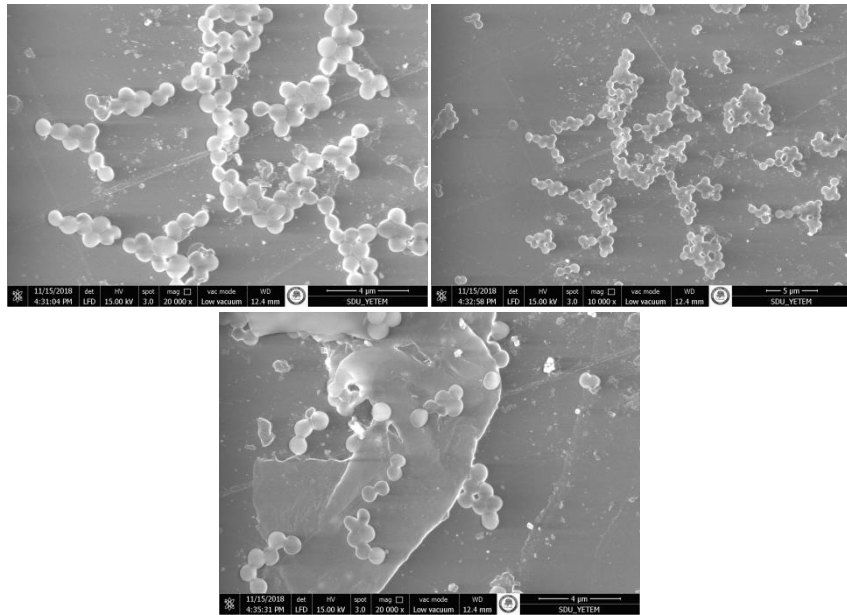
Şekil 4.13. *S. warneri*'nin çelik yüzeyde biyofilm oluşumlarının SEM görüntüleri



Şekil 4.14. *S. warneri*'nin fiberglas yüzey üzerinde biyofilm oluşumu SEM görüntüleri

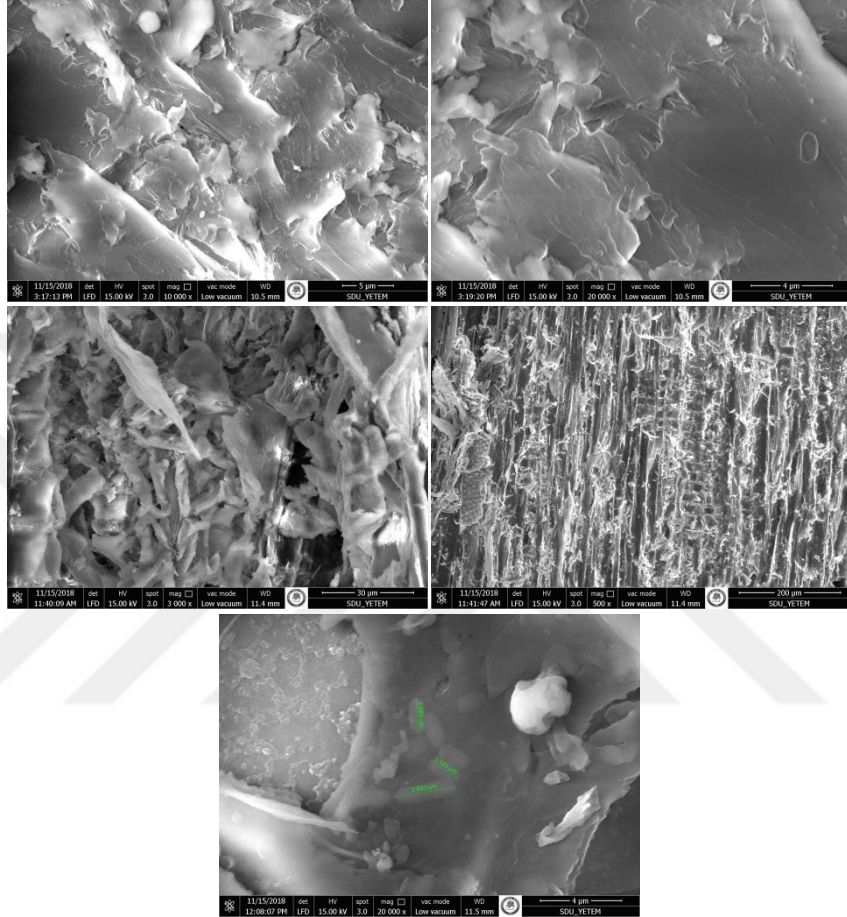


Şekil 4.15. *S. warneri* cam yüzey üzerinde biyofilm oluşumu SEM görüntüleri

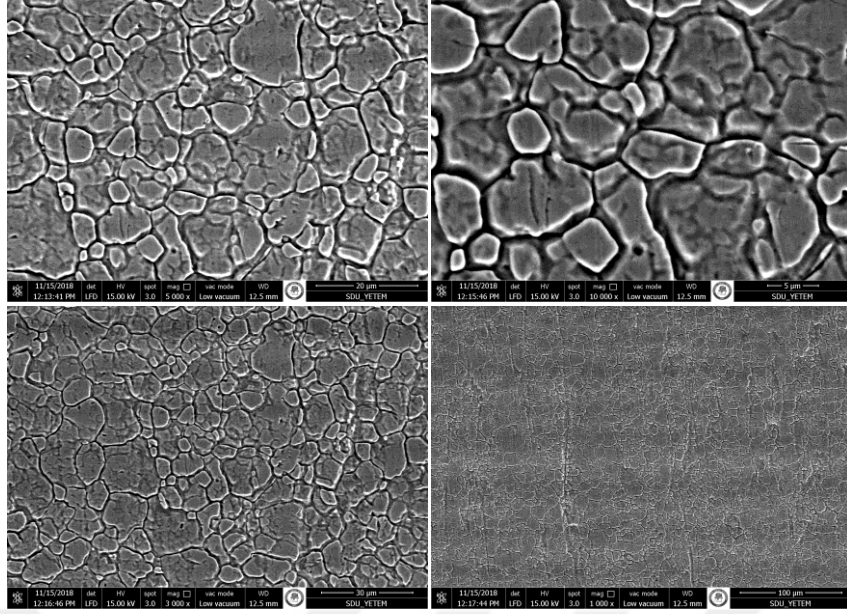


Şekil 4.16. *S. warneri*'nin plastik yüzeyde biyofilm oluşumu SEM görüntüleri

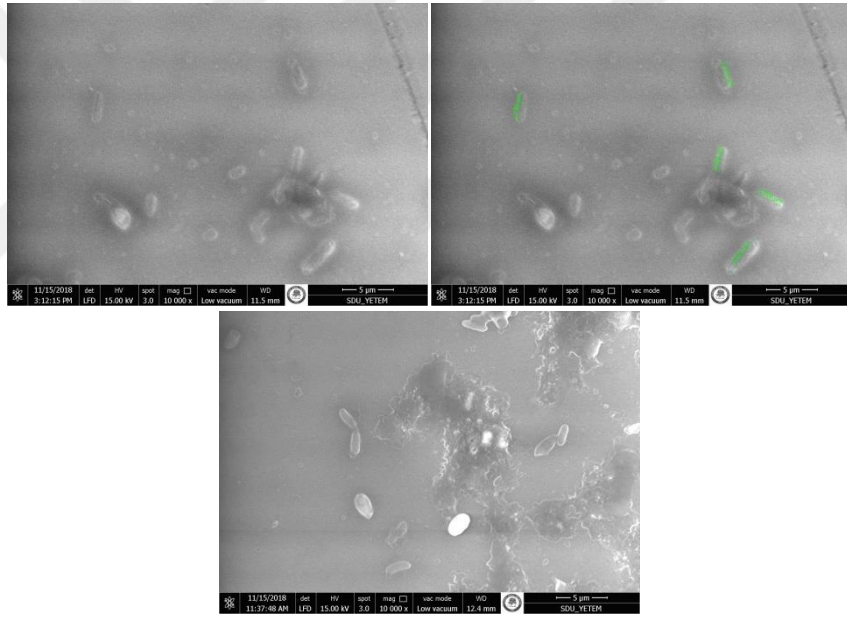
A. hydrophila elik, ahşap, cam, fiberglass, plastik materyalleri yüzeyinde ki biyofim oluşumu SEM mikroskobunda incelendiğinde; cam, ahşap, fiberglass ve plastik yüzeyde biyofilm oluşumu tespit edilirken elik yüzeyde biyofilm oluşumu tespit edilmemiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21).



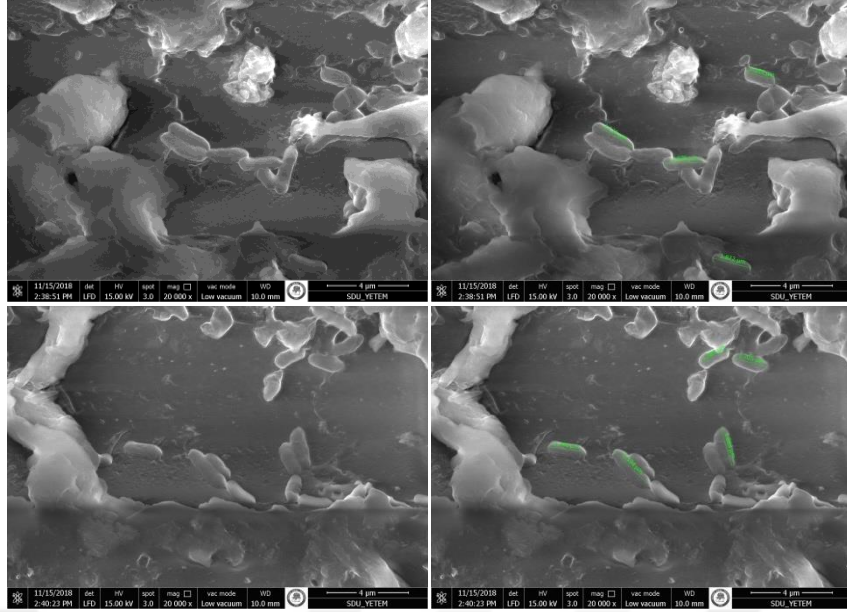
Şekil 4.17. *A. hydrophila* ahşap yüzeyde biyofilm oluşumlarının SEM görüntüleri



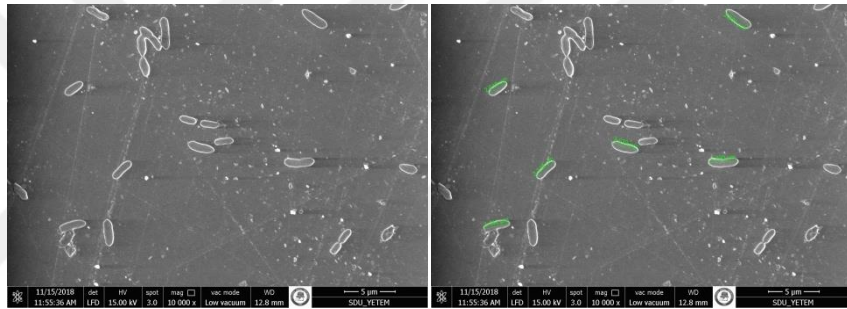
Şekil 4.18. *A. hydrophila* çelik yüzeyde biyofilm oluşumu SEM görüntüleri



Şekil 4.19. *A. hydrophila* cam yüzeyde biyofilm oluşumlarının SEM görüntüleri

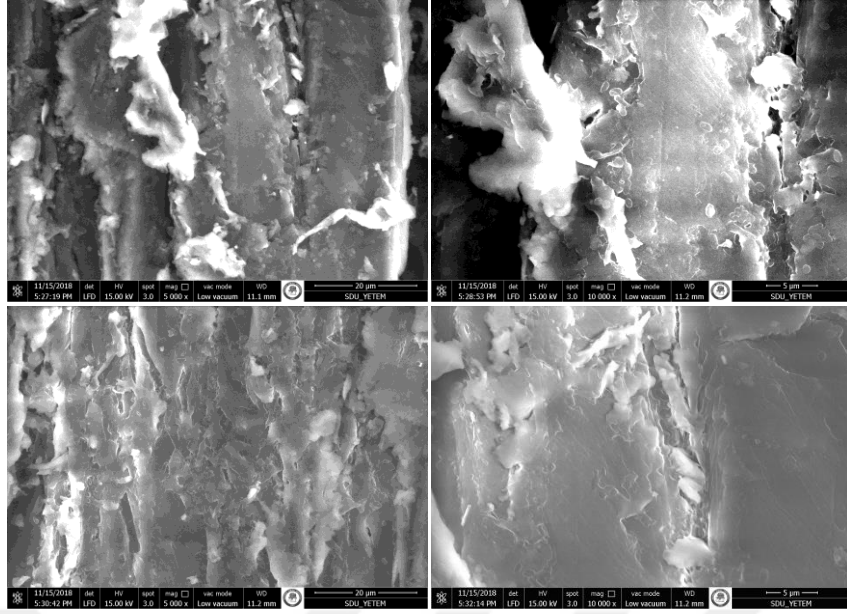


Şekil 4.20. *A. hydrophila* fiberglass yüzeyde biyofilm oluşumlarının SEM görüntüleri

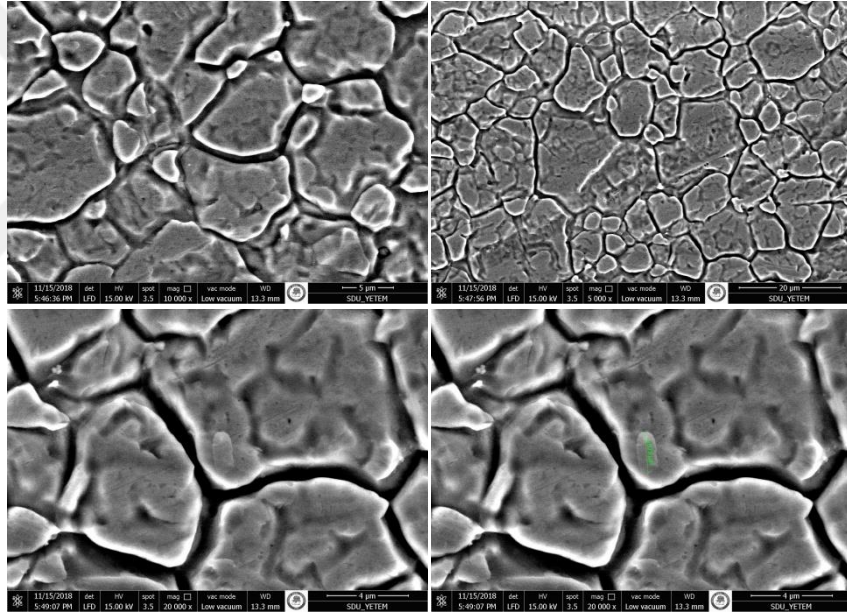


Şekil 4.21. *A. hydrophila* plastik yüzeyde biyofilm oluşumlarının SEM görüntüleri

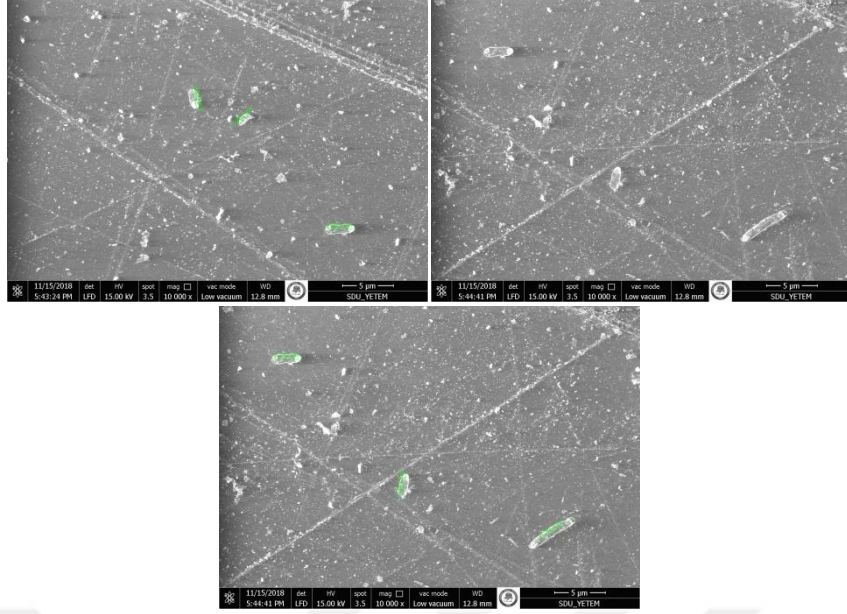
A. sobria çelik, ahşap, cam, fiberglass, plastik yüzeyinde ki biyofilm oluşumu SEM mikroskopunda incelendiğinde; cam, ahşap, fiberglass ve plastik yüzeyde biyofilm oluşumu tespit edilirken, çelik yüzeyde biyofilm oluşumu tespit edilmemiştir (Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26).



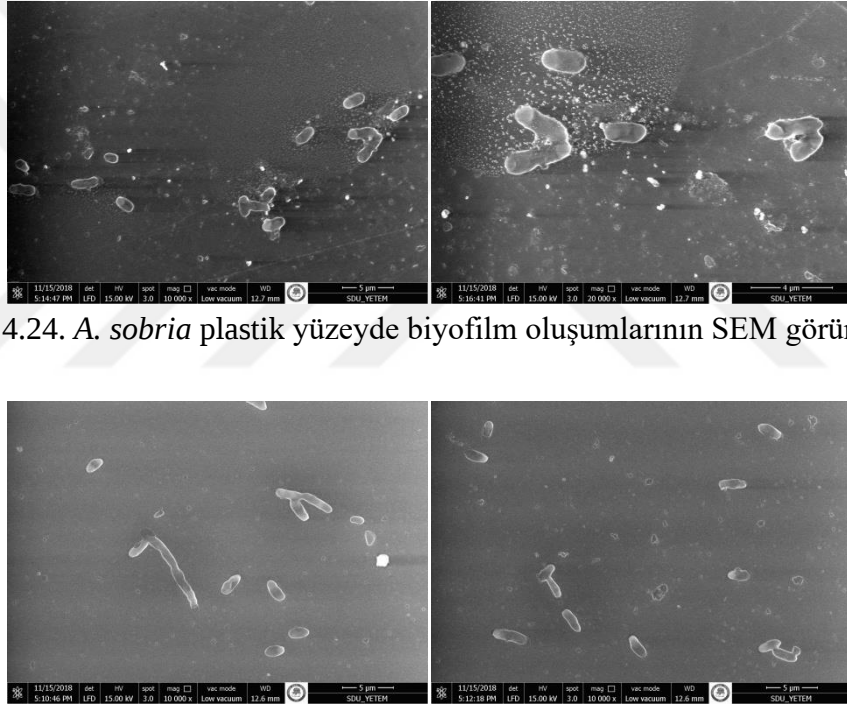
Şekil 4.22. *A. sobria* ahşap yüzeyde biyofilm oluşumlarının SEM görüntüleri



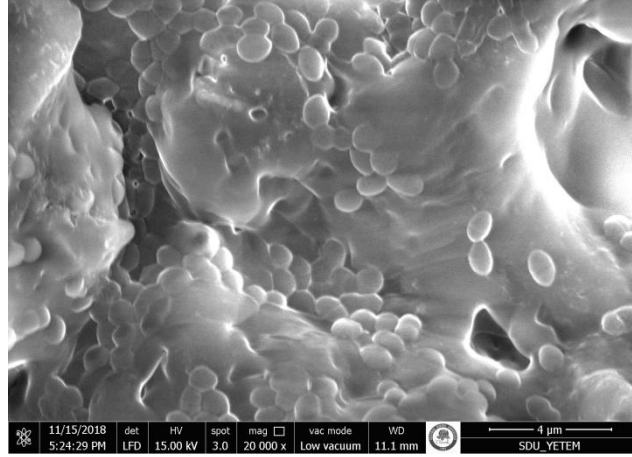
Şekil 4.23. *A. sobria* çelik yüzeyde biyofilm oluşumu SEM görüntüleri



Şekil 4.24. *A. sobria* plastik yüzeyde biyofilm oluşumlarının SEM görüntüleri



Şekil 4.25. *A. sobria* cam yüzeyde biyofilm oluşumlarının SEM görüntüleri



Şekil 4.26. *A. sobria* fiberglass yüzeyde biyofilm oluşumlarının SEM görüntüleri

Farklı yüzeylerde SEM ile biyofilm oluşumunun tespiti Çizelge 2.3’de verilmiştir. Çizelge 2.3’te görüleceği gibi *A. hydrophila* ve *A. sobria* patojen bakterilerinin her ikisinin de ahşap, cam, fiberglass ve plastik yüzeyde biyofilm oluşumu gözlenirken, çelik yüzeyde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. *S. warneri* de ise ahşap, çelik, plastik yüzeylerde biyofilm oluşumu gözlenirken cam ve fiberglass yüzeylerde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Çizelge 4.1. Farklı yüzeylerde SEM mikroskobu ile biyofilm oluşumu

	Ahşap	Cam	Çelik	Fiberglass	Plastik
<i>A. hydrophila</i>	+	+	-	+	+
<i>A. sobria</i>	+	+	-	+	+
<i>S. warneri</i>	+	-	+	-	+

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mikroorganizmaların yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturma yetenekleri, su ürünleri yetiştiriciliği üzerinde önemli etkilere neden olmaktadır. Eğer mikroorganizmalar gıda temas yüzeylerinden tamamen uzaklaştırılmaz ise biyofilm oluşturabilir ve biyotransfer özelliklerinde de artış gözlenebilir. Biyofilm oluşum ve gelişimi spesifik bakteri suşu, materyal yüzey özellikleri ve çeşitli çevresel etkenlerden etkilenebilmektedir. (Srey vd., 2013).

Gavin vd., 2003’de hareketli *Aeromonas* türlerinde biyofilm oluşumunu incelemiş ve *A. veronii biovar sobria*’da *A. hydrophila* göre daha yüksek oranda biyofilm oluşumu tespit etmişlerdir. Yapılan bu araştırmada mikropalak yönteminde en güçlü biyofilm oluşumu *A. hydrophila*’da tespit edilmiştir. *A. sobria* ve *A. hydrophila* suşları Kongo Red Agarda kuru kristalize siyah koloni üreterek biyofilm üretimi pozitif bulunmuştur. SEM de yapılan incelemelerde her iki patojeninde ahşap, cam, plastik ve fiberglasta biyofilm oluştururken çelik üzerinde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Hareketli *Aeromonas* türleri ile yapılan biyofilm araştırmada Congo Red Agar testi ve mikropalak yöntemiyle yapılan biyofilm oluşumu kuvvetli pozitif tespit edilmiştir (Ormancı, 2010; Jahid vd., 2013). Bu çalışmada da iki *Aeromonas* türünde Congo Red Agar testi, mikropalak yöntemi ve SEM incelemelerinde biyofilm oluşumu tespit edilmiştir.

Biyofilm oluşumunun tespitinde kullanılan güvenilir metotlardan biriside Congo red agar yöntemidir (Freeman vd., 1989; Aslan, 2015). Araştırmamız da congo red agar testinde balık patojenlerinin *A. hydrophila*, *A. sobria* ve *S. warneri* suşlarının siyah pigment oluşturmalarıyla biyofilm oluşturdıkları gözlenmiştir.

Musharrafieh vd., 2014’de, *S. warneri*’nin varlığında, *V. anguillarum*’un biyofilm oluşturabildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte *S. warneri* patojenin *V. anguillarum*’un büyümesi ve biyofilm oluşturmaları için olumlu etki yaparak enfeksiyon başarısını fazlalaştırdığını bildirmişlerdir. Černohorská ve Votava (2004)’te yaptıkları çalışmada *S. warneri* nin biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu suşun biyofilm oluşturduğu araştırmamızda da tespit edilmiştir.

Lee vd., 2003’de akuatik organizmalar, tekne, kaya, alg, ağların düğüm kısımlarında oluşan biyofilmlerden *S. warneri* izole ettiklerini açıklamışlardır. Bu çalışmada olduğu gibi *S. warneri*’nin biyofilm oluşumu birçok çalışmada rapor edilmesiyle desteklenmiştir.

Biyofilm oluşumunda bakteri bir yüzeye tutunur, farklı yüzeylerde bakteri adezyonunun arkasındaki mekanizmaları araştırmak enfeksiyonları önlemek için önem arz eder (Klemm vd., 2010).

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarında yüzey yapılarının karakteristiği etkili olmaktadır (Williams ve Fletcher, 1996). Veenstra vd., 1996’da “slime” olarak adlandırılan biyofilm bakterilerin birçok yüzeye tutunmasını sağladığını bildirmişlerdir. Lynch vd., (2002)’de *A. hydrophila* AH-1N biyofilmleri paslanmaz çelik akış modeli ile büyütmüşler, büyüme hızları ve gelişim özelliklerini incelemişlerdir. Bakterinin ilk 8 saat boyunca tutunduklarını belirlemişlerdir. Alınan numuneler bakterilerin paslanmaz çelik yüzeyine genel olarak tutunabildiklerini ve biyofilm oluşumu göstermişlerdir. 24 saat sonra, yüzey boyunca rastgele oluşturulmuş mikrokoloniler görülmüş ve derinliğin arttığı gözlemlenmiştir. Çelik yüzeyinin üzerinde yüksekliği 5 ila 14 mm arasında değişen yüzeye dağılmış halde olan olgun biyofilmlerin karakteristiği olan daha büyük biyofilm yapıları 48 saat sonra gözlediklerini bildirmişlerdir. Araştırmamız da *A. hydrophila* ve *A. sobria*’nın çeliğe yapışarak biyofilm oluşturduğu tespit edilirken SEM incelemelerinde bu iki patojenin çelikte biyofilm oluşturmaları gözlenmiştir. Cai ve Arias, (2017) yayın balıklarında enfeksiyona neden olan bakteriyel patojenlerin yüzeye adezyonunu ve kolonize oluşturmalarında kalsiyumun rolünü incelemişlerdir. *F. columnare*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *E. tarda* ve *E. piscicida* patojenlerinin polistiren plaklara yapışarak biyofilm oluşturmalarını araştırmışlardır. Kalsiyumun *F. columnare* ve *A. hydrophila*’da biyofilm oluşumunu oldukça arttırdığı bildirilmiştir. Test edilen *Edwardsiella* türlerinde ise biyofilm oluşumunu düşük olarak belirlenmiş ve kalsiyumun herhangi bir etkisinin olmadığını rapor edilmiştir. Çalışmalarında substratlarda biyofilm oluşumunu doğrulamak için taramalı elektron mikroskopunu (SEM) kullanmışlardır. *F. columnare*’nin PVC yüzeyde ve ağlarda biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır. Bambuda *F. columnare*’nin adezyon oluşturmada ve hücre gelişimini engellediğini bildirmişlerdir. *A. hydrophila* ve *E. ictaluri* suşlarının

test edilen tüm materyallerde biyofilm oluşturduğunu belirlemişler ve substratlar arasında önemli farklılıklar olduğunu bulmuşlardır. *E. ictaluri* suşunun mikrotiter polistiren plakaları üzerinde biyofilm oluşturmadığını górdükleri halde, test edilen tüm materyallerde kolonileşme ve çoğalma kabiliyetine sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuçlarına göre, bakteriyel patojenlerinin balık çiftliklerindeki materyallerde yüzeyleri kolonize olma potansiyeline sahip olduğunu ve biyofilm patojen rezervuarı olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu tez kapsamında da bakteriyel balık patojenlerinin yetiştiricilikte oldukça fazla kullanılan ahşap, elik, fiberglas, cam ve plastik gibi yüzeylerde kolonileşmesinin oldukça fazla olduğu ve biyofilm oluşumunun çok güçlü kendini gösterdiği belirlenmiştir.

Vidal vd., 2020’de yaptıkları araştırmada salmonid çiftliklerinde ciddi bir tehdide yol açan *Flavobacterium psychrophilum* 'un paslanmaz elik, polistiren, poliüretan ve polikarbonat üzerinde biyofilm oluşturma kapasitesini tarama elektron mikroskobu ve konfokal lazer tarama mikroskopisi, epifloresans ve qPCR yöntemlerini kullanmışlardır. *F. psychrophilum* paslanmaz elik, polistiren ve polikarbonat üzerinde 72 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra çok katmanlı kısa basil kümelerinden oluşan biyofilmler oluşturduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, paslanmaz elik üzerinde oluşturulan biyofilmler, diğer yüzeylerden daha yüksek hücre yoğunluğu sergilemiştir. *F. psychrophilum*'un kontrolünü daha verimli yönetmek için uygun biyofilm oluşumlarının dikkate alınması ve yönetilmesi gerektiği bildirilmiştir.

Altuğ vd. (2007), deniz ortamında kullanılan materyallerden olan ahşap, galvaniz, sa, paslanmaz elik, pamuk halat, cam ve alüminyum materyalleri üzerinde oluşan bakteriyel biyofilm tabakasında bulunan bakteri düzeylerini araştırmışlardır. Bunun sonucu olarak da laboratuvar ortamında kurulan cam düzenek iini deniz suyu ile doldurulmuş ve içerisine eşit boyutlarda farklı materyaller yerleştirilmiştir. Deniz suyunda başlangıçtaki bakteri düzeyini membran filtrasyon metoduyla tespit etmişler ve 48 saat arayla ölçümleri sürdürmüşlerdir. 12. günün sonunda biyofilm tabakasını gözlemlemişlerdir. Denemeler 29 gün boyunca 48 saatte bir tekrarlanarak bakterilerin tutunma oranlarını karşılaştırmışlardır. En yüksek bakteri yoğunluğu pamuk halatta gözlenirken bunu ahşap, alüminyum, sa, cam, paslanmaz elik ve galvanizin takip ettiğini belirtmişlerdir. Kullanılan yüzeylerde tespit edilen bakteri düzeyinin deniz

suyundakinden yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar araştırma sonuçlarımızla benzerdir.

Biyofilm enfeksiyon oluşum sürecinde bakteriye ciddi bir güç kazandırmaktadır. Biyofilm oluşturan bakteriler yüzeye kuvvetli bir şekilde bağlanır ve antimikrobiyal tedaviye yüksek derecede direnç gösterirler. Bu nedenle bakteriye güç katan ve oldukça tehlikeli olan biyofilmlerin hasta balık enfeksiyonlarında antimikrobiyal ilaç direncindeki rolünü araştırmalı ve biyofilm kontaminasyonu hasta balık enfeksiyonu arasındaki bağlantı tespit edilmelidir. Bu nedenle antibiyofilm yaklaşımları hastalıklardan korunmada dikkat çekmektedir.

Balık patojenlerinin güçlü biyofilm oluşturduğu ahşap, metal, fiberglas, cam ve plastik üzerinde görülmüştür. Yetiştiricilik ünitelerinde çokça kullanılan bu materyalde bu denli güçlü biyofilm oluşumunun varlığı balık sağlığı üzerinde ciddi bir tehdit unsurudur. Costerton vd., 1999'da belirttiği gibi birçok çalışmada biyofilm oluşturma kabiliyetinde olan bakterilerin antibiyotiklere karşı daha dirençli oldukları bildirilmektedir.

Characklis vd. (1990), yüzey pürüzlülüğü arttıkça mikrobiyal yükün arttığını göstermişlerdir. Howell ve Behrends (2006), mikrobiyal tutunma ile yüzey pürüzlülüğü arasındaki pozitif ilişkiyi rapor etmişlerdir. Bunun nedenini yüzey geriliminin azalması ve pürüzlü yüzeylerde yüzey alanının daha fazla olmasıyla açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda da fiberglas ve ahşap gibi pürüzlü yüzeyler diğer yüzeylerden daha yüksek oranda biyofilm göstermişlerdir. Bulgularımıza göre çalışılan her yüzey SEM ile farklı derecelerde pürüzlülük içermiş ve yapmış olduğumuz çalışma sonucunda sıralaması ahşap > fiberglas > plastik > çelik > cam olarak belirlenmiştir. Özellikle ahşap büyük porları ve derin yarıkları ile en pürüzlü yüzey olarak gözlenmiştir. Fiberglasın ise daha küçük por ve çatlaklara sahip olduğu tarafımızca görülmüştür. Çelik yüzeylerde birçok eğik ve uzun çizgili daha dar yarıklar görülmüştür. Plastik ve cam yüzeyler pürüzsüz olması nedeniyle yarık izlenmemiştir. Ancak çalışmamızda kullanılan yüzey tiplerinin biyofilm oluşumuna elverişliliği dikkate alındığında sıralama ahşap > plastik > cam > fiberglas > çelik olarak sıralanmaktadır. Yani, ahşap çalışmamızdaki en pürüzlü yüzey olması nedeniyle en yüksek biyofilm oluşumuna sahip yüzey olarak gözlenmiştir. Bu nedenle su ürünleri

yetiştiricilik ve işleme tesislerinde en uygun yüzeyin çelik yüzey olduğu yapılan araştırma sonucunda da bir kez daha netlik kazanmıştır. Balık çiftliklerinde tekrarlayan epizootikler kaçınılmazdır. Yetiştiricilik tesislerinde aynı bakteriyel patojenin neden olduğu salgınlara tekrar görülmesi bakteri için kalıcı veya geçici sığınak olan biyofilmlerden kaynaklanmaktadır.

Bazı patojenlerin dezenfeksiyon işlemlerine rağmen ortadan kaldırılması zordur. Bu çalışma ile bakteriyel balık patojenlerinin su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan malzemeler üzerinde biyofilm oluşumu saptanmıştır. Sonuçlarımız, bazı balık patojeni bakteri suşları kullanılsa bile, invitro laboratuvar koşullarında bakterilerdeki adezyon ve biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Balık çiftliklerinde biyogüvenlik uygulamaları için sadece su değil, aynı zamanda yüzeylerde dezenfektanların kullanılması önem arz etmektedir.

Sonuç olarak *S. warneri*, *A. sobria*, *A. hydrophila* patojenlerinin farklı yüzeyler üzerine adezyonu ve biyofilm oluşturmaları çok çeşitli etkenlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu bakteriler tarafından biyofilm oluşumu yüzey çeşidi, bakterinin adezyon süresi gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Araştırmada kullandığımız patojenlerin çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Bunun için yetiştiricilik sistemlerinde günlük havuz temizliklerinin yapılması ve su sirkülayonlarına da dikkat edilmelidir. Yapılacak temizlik işlemleri işleme tesislerinde (işleme fabrikaları) günde en az iki kez, yetiştiricilikte ise yavru havuzlarında her havuz değişiminde, büyütme havuzlarında ise haftada bir olacak şekilde uygulanmalıdır. Ayrıca su ürünleri alanında kullanılan yüzeyler sürekli kullanım nedeniyle zaman içerisinde aşınma gibi sebeplerle aşınmaya sebep olacağından biyofilm oluşumuna zemin hazırlayabilirler. Bu nedenle kullanılan yüzeylerin belirli aralıklarla (aşınma gözlemlendiği zaman ya da belirlenen periyotlarda mesela 6 ayda 1 kere) yenilenmesi ya da değiştirilmesi biyofilm ile mücadelede büyük önem taşımaktadır. Çelik yüzeylerin kullanımı biyofilm oluşumunu engellemek için daha uygun olabilir.

Araştırmamızda patojenlerin yetiştiricilik ortamlarında kullanılan materyallere tutunarak biyofilm oluşturdıkları tespit edilmiştir. Bu sebeple balık yetiştiriciliğinde biyofilme mücadele de etkin koruma yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bakterilerdeki en önemli virülens faktörlerinden birisi olan biyofilmin,

su ürünleri yetiştiriciliğinde özellikle hastalıktan korunmada biyofilm oluşumunun önlenmesi için gerekli tedbirlerin alınması önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR

- Altuğ, G., Çardak, M., Çiftçi, P.S. & Gürün, S. (2007). Farklı Materyallerde Oluşan Bakteriyel Biyofilm Tabakasından İzole Edilen Aerobik Heterotrofik Bakteri Düzeyleri. *Ulusal Su Günleri*, 16-18 Mayıs, Antalya, Türkiye, 561-566.
- Aslan, H. (2015). *Candida Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal Duyarlılığa Etkisi*. (Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
- Ataol, Ö. (2011). *Gıda Örneklerinden İzole Edilen Staphylococcus'larda Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Dirençliliğinin Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Cai, W. & Arias, C.R. (2017). Biofilm Formation on Aquaculture Substrates by Selected Bacterial Fish Pathogens. *Journal of Aquatic Animal Health*, 29, 95–104.
- Cai, W., De La Fuente, L. & Arias, C.R. (2013). Biofilm Formation by the Fish Pathogen *Flavobacterium Columnare*: Development and Parameters Affecting Surface Attachment. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18), 5633-5642.
- Černohorská, L. & Votava M. (2004). Determination of Minimal Regrowth Concentration (MRC) in Clinical Isolates of Various Biofilm-Forming Bacteria. *Folia Microbiology*, 49(1), 75–78.
- Chang, Y.W., Fragkopoulos, A.A., Marquez, S.M., Kim, H.D. Angelini, T.E. & Fernández-Nieves, A. (2015). Biofilm Formation in Geometries with Different Surface Curvature and Oxygen Availability. *New Journal of Physics*, 17, 17-33.
- Chang, Y.W., Fragkopoulos, A.A., Marquez, S.M., Kim, H.D. Angelini, T.E. & Fernández-Nieves, A. (2015). Biofilm Formation in Geometries with Different Surface Curvature and Oxygen Availability. *New Journal of Physics*, 17, 17-33.
- Characklis, William, G. & Kevin, C. (1990). *Biofilms*. Marshall, 1990, New York, Wiley.
- Characklis, William, G. & Kevin, C. (1990). *Biofilms*. Marshall, 1990, New York, Wiley.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.A., Baddour, L.M., Barrett, F.F. & Melton, D.M. vd. (1985). Adherence of Coagulase Negative Staphylococci to Plastic Tissue Cultures: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-06.

- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Demir, C. & İnanç, B.B. (2015). Investigate Nasal Colonize Staphylococcus Species Biofilm Produced (Nazal Kolonize Stafilokok Türlerinde Biyofilm Üretiminin Araştırılması). *Journal of Clinical Analytical Mmedicine*, 6(4), 414-418.
- Donabedian H. (2003). Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect.*, 46(4), 207-214. <https://doi.org/10.1053/jinf.2002.1120>
- Dong, J. (2019). Thymol Protects Channel Catfish from *Aeromonas hydrophila* Infection by Inhibiting Aerolysin Expression and Biofilm Formation. *Microorganisms*.
- Donlan, R.M. & Costerton, W.J. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 8(9), 881-890.
- Filik, F. (2019). *Bazı Bakteriyel Balık Patojenlerinde Biyofilm Oluşumuna Farklı Maddelerin İn Vitro Etkisinin Tespiti*. (Yüksek Lisans Tezi, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi)
- Fleming, D. & Rumbaugh, K.P. (2017). Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms*. 25(2), E15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R. & Keane, C.T. (1989). New Method For Detecting Slime Production by Coagulase Negative Staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(1), 872 - 874.
- Fritz, B. (2019). Shotgun sequencing of clinical biofilm following scanning electron microscopy identifies bacterial community compositio. *Journals investing in science*77-2019. <https://academic.oup.com/femspd/article/77/1/ftz013/5371122>
- Gavin, R., Merino, S., Altarriba, M., Canals, R., Shaw, J.G. & Toma's, J.M. (2003). Lateral Flagella are Required for Increased Cell Adherence, Invasion and Biofilm Formation by *Aeromonas* spp. *Fems Microbiology, Letters*, 224, 77–83.
- Gavin, R., Rabaan, A.A., Merino, S., Tomas, J.M., Gryllos, I. & Shaw, J.G. (2002). Lateral Flagella of *Aeromonas* Species are Essential for Epithelial Cell Adherence and Biofilm Formation. *Molecular Microbiology*, 43, 383-397.
- Gil, P., Vivas, J., Gallardo, C.S. & Rodri'guez L.A. (2000). First Isolation of *Staphylococcus warneri*, from Diseased Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northwest Spain. *Journal of Fish Diseases*, 23, 295– 298.

- He, Y., Xu, T., Fossheim, L.E. & Zhang, X.H. (2012). FliC, A Flagellin Protein, Is Essential for the Growth and Virulence of Fish Pathogen *Edwardsiella tarda*. *Public Library of Science*, 7(9), 45-70.
- Howell, D. & Behrends, B. (2006). A Review of Surface Roughness in Antifouling Coatings Illustrating the Importance of Cut off Length. *Biofouling*, 22(6), 401-410.
- İset, Ş. (2016). *Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen Salmonella ve Listeria monocytogenes Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması ve Elektron Mikroskopik Tekniklerle Değerlendirilmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Jahid, I.K., Lee, N.Y., Kim, A. & Ha, S.D. (2013). Influence of Glucose Concentrations on Biofilm Formation, Motility, Exoprotease Production, and Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Protection*, 76(2), 239247.
- José M. Vidala. (2009). "Formation of biofilms of the salmon pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in different surfaces using the CDC biofilm reactor". *Aquaculture*, 514. <https://www.sciencedirect.com/journal/aquaculture>
- Jones, H.C., Roth, I.L. & Saunders, W.M. (1969). 3rd. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol.* 99(1), 316-25.
- Klemm, P., Vejborg, R.M. & Hancock, V. (2010). Prevention of Bacterial Adhesion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(2), 451-459.
- Lee, Y.K., Kwon, K.K., Cho, K.H., Kim, H.W., Park, J.H. & Lee, H.K. (2003). Culture ve Identification of Bacteria from Marine Biofilms. *The Journal of Microbiology*, 41(3), 183-188.
- Lejeune, P. (2003). Contamination of abiotic surfaces: What a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol.* 11(4), 179-184. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00047-7)
- Lindsay, D. & von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect.* 64(4), 313-25. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028>
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E. & Williams, P. (2002). The Regulation of Biofilm Development by Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology*, 4(1), 18-28.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E., Williams, P., 2002. The Regulation of Biofilm Development by Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Microbiology*, 4(1), 18-28.

- Marcinkiewicz, J., Strus, M. & Pasich, E. (2013). Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm associated chronic infections. *Pol Arch Med Wewn.*, 123(6), 309-313.
- Mamun, M.A.A., Nasren, S., Abhiman, P.B., Rathore, S.S., Sowndarya, N.S., Ramesh, K.S. & Shankar, K.M. (2019). Investigation of production, formation and characterization of biofilm cells of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of fish. *J. Exp. Zool. India*. 2019a, 22(2), 1115-1123.
- Martin J.L. (2002). The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Blackwell Science Environmental Microbiology* 4-1, 18-28.
- O’Toole, G.A. & Kolter, R. (1998). Initiation of Biofilm Formation in *Pseudomonas fluorescens* 365 Proceeds Via Multiple, Convergent Signalling Pathways: A Genetic Analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461.
- Omar, A., Wright, J., Schultz, G., Burrell, R. & Nadworny, P. (2017). Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*. 5(1), E9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5010009>
- Oliveira, M. (2006). “Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates”. *Science Direct* 118-2006 133-140. <https://www.sciencedirect.com>
- Ormanç, S. (2010). *Hayvansal ve Çevresel Kaynaklardan İzole Edilen Hareketli Aeromonas Türlerinde Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Öztürk, R.Ç. & Altınok, İ. (2014). Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(1), 275-297.
- Öztürk, Ş.B., Sakarya, S., Öncü, S. & Ertuğrul, M.B. (2008). Biyofilmler ve Yabancı Cisim Enfeksiyonları. *Klinik Dergisi*, 21(3), 79-86.
- Patel, B. (2017). “Disruption of the quorum sensing regulated pathogenic traits of the biofilm-forming fish pathogen *Aeromonas hydrophila* by tannic acid, apotent quorum quencher”. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 33-7, 580-590. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08927014.2017.1336619>
- Rahman, M., Simm, R., Kader, A., Basseres, E., Römling, U. & Möllby, R. (2007). The Role of C-Di-GMP Signaling in an *Aeromonas veronii* biovar *sobria* Strain. *FEMS Microbiology Letters*, 273, 172–179.
- Shiau, A.L. & Wu, C.L. (1998). The Inhibitory Effect of *Staphylococcus epidermidis* Slime on the Phagocytosis of Murine Peritoneal Macrophages is Independent. *Microbiology Immunology*, 42, 33-40.

- Shiina, Y., Li, K. & Iwanaga, M. (2004). An *Aeromonas veronii* biovar *sobria* Infection with Disseminated Intravascular Gas Production. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 10, 37–41.
- Srey, O., Kabir, I. & Ha, S. (2013). Biofilm Formation in Food Industries, *A Food Safety Concern Food Control*, 31, p.572-585.
- Sundell, K. & Wiklund, T. (2011). Effect of Biofilm Formation on Antimicrobial Tolerance of *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases*, 34, 373–383. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01250.x.
- Şeref, İ., (2016). *Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen Salmonella ve Listeria monocytogenes Suşlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması ve Elektron Mikroskopik Tekniklerle Değerlendirilmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi)
- Timur, G. & Timur, M. (2003). *Balık Hastalıkları*. İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yayın No: 5, 538, Dilek Ofset İstanbul.
- van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W. & Zehnder, A.J. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev.* 54(1), 75-87.
- Vlassova, N., Han, A., Zenilman, J.M., James, G. & Lazarus, G.S. (2011). New horizons for cutaneous microbiology: The role of biofilms in dermatological disease. *Br J Dermatol.*, 165(4), 751-759. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10458.x>
- Veenstra, G.J., Cremers, F.F., van Dijk H. & Fleer, A. (1996). Ultrastructural Organisation and Regulation of a Biomaterial Adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, 178(2), 537-541.
- Vestby, L.K. & Nesse, L.L. (2019). Compounds and compositions for biofilm prevention. *U.S. Patent Application No. 16/315, 799*.
- Vidal, J.M., Miranda, C.D., De la Fuente, M., Alarcón, M., Aroca, G., Sossa, K. & Urrutia, H. (2020). Formation of biofilms of the salmon pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in different surfaces using the CDC biofilm reactor. *Aquaculture*, 514, 734459.
- Young, C., Voyich, J.M. & Fischer, E.R. vd. (2004). Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) Protect *Staphylococcus epidermidis* Against Major Components of Human Innate Immune System Cell. *Microbiology*, 6, 26975.
- Williams, V. & Fletcher, M. (1996). *Pseudomonas fluorescens* Adhesion and Transport Through Porous Media are Affected by Lipopolysaccharide Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1004.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H.Z., Hoiby, N. & Song, Z.J. (2015). Strategies for Combating Bacterial Biofilm Infections. *International Journal of Oral Science*, 7(1), 1-7.

- Xu, C., Yagiz, Y., Hsu, W.Y., Simonne, A., Lu, J. & Marshall, M.R. (2014). Antioxidant, Antibacterial and Antibiofilm Properties of Polyphenols from Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) Pomace Against Selected Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62(28), 6640–6649.
- Xu, T., Su, Y., Xu, Y., He, Y., Wang, B., Dong, X. & Zhang, X.H. (2014). Mutations of Flagellar Genes Flic12, Flia and Flhdc of *Edwardsiella tarda* Attenuated Bacterial Motility, Biofilm Formation and Virulence to Fish. *Journal of Applied Microbiology*, 116(2), 236-244.
- Yasuda, H., Ajiki, Y., Aoyama, J. & Yolota, I. (1994). Interaction Between Human Polymorphonuclear Leucocytes and Bacteria Released from In Vitro Bacterial Biofilms Models. *Journal of Medical Microbiology*, 41, 359-67.
- Ye, J., Ma, Y., Liu, Q., Zhao, D.L., Wang, Q.Y. & Zhang, Y.X. (2008). Regulation of *Vibrio alginolyticus* Virulence by the Luxs Quorum-Sensing System. *Journal of Fish Diseases*, 31, 161-169.
- Yildiz, F.H. & Visick, K.L. (2009). *Vibrio* Biofilms: So Much the Same Yet So Different. *Trends in Microbiology*, 17(3), 109-118.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burcu KARAOĞLU
Doğum Yeri ve Yılı : Tekirdağ, 1992
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : burcumkaraoglu@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Şarköy Lisesi, 2009
Ön Lisans : KOU Gazanfer Bilge MYO Su Ürünleri, 2012
Lisans : SDÜ Eğırdır Su Ürünleri Fakóltesi, 2015

Mesleki Deneyim

Kemer Su Ürünleri Alabalık Yetiştiricilik	2015-2016
Penta Su Ürünleri İşleme Tesisi (Kalite Kontrol Mühendisi)	2016-2018
Kılıç Holding (Kalite Sağlama Uzmanı)	2018.....(halen)