

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KARBON KAYNAKLARININ *Salmonella* TYPHIMURIUM'DA BİYOFİLM
OLUŞUMU ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN MATEMATİKSEL
MODELLEMESİ

Hale Elçin LATİFİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2024

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARBON KAYNAKLARININ *Salmonella* TYPHIMURIUM'DA BİYOFİLM OLUŞUMU ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN MATEMATİKSEL MODELLEMESİ

Hale Elçin LATİFİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Salmonella dünya genelinde gıda kaynaklı hastalıkların büyük bir çoğunluğuna sebep olan bir patojendir. Çok-hücreli benzeri yapılar olarak adlandırılan ve genetik ve fizyolojik açılardan planktonik formlardan farklılık gösteren biyofilm yapıları, antibakteriyel tedavilere ve çeşitli eradikasyon yöntemlerine karşı büyük oranda direnç geliştirme yeteneğindedirler. Biyofilm yapıları ile başa çıkabilmek için *Salmonella* metabolizmasını ve fizyolojisini detaylı bir şekilde anlamak önem teşkil etmektedir. Bu çalışmada çoğunluğu gıda endüstrisinde yer alan yedi tane karbon kaynağı (glukoz, fukoz, ramnoz, sitrat, suksinik asit, malik asit, asetik asit), ve bu karbon kaynaklarının çeşitli konsantrasyonlarının (%0,1-%0,6) *Salmonella* biyofilm oluşumuna etkileri araştırılmıştır. Deneysel süreçlerin takibinde, Gecikmeli Lojistik Diferansiyel Denklemler kullanılarak *Salmonella* biyofilm yörüngelerinin matematiksel modelleri geliştirilmiştir. Modelin, çok fazla miktarda veri olmadan dahi *Salmonella* biyofilm oluşumunu modellemek için etkili olduğu çalışmada ortaya konulmuştur. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler, *Salmonella* karbon metabolizmasının ve *Salmonella* biyofilm yapılarının daha iyi bir şekilde anlaşılması ve biyofilm eradikasyon yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlaması açısından önem taşımaktadır.

Haziran 2024, 70 sayfa

Anahtar Kelimeler: S. Typhimurium, biyofilm, karbon kaynakları, matematiksel modelleme

ABSTRACT

Master Thesis

MATHEMATICAL MODELING OF THE EFFICACY OF CARBON SOURCES ON BIOFILM FORMATION IN *Salmonella* TYPHIMURIUM

Hale Elçin LATİFİ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Salmonella is a pathogen that causes the majority of foodborne illnesses worldwide. Biofilm structures, which are called multicellular-like structures and differ from planktonic forms in genetic and physiological aspects, are capable of developing great resistance to antibacterial treatments and various eradication methods. In order to deal with biofilm structures, it is important to understand *Salmonella* metabolism and physiology in detail. In this study, the effects of seven carbon sources (glucose, fucose, rhamnose, citrate, succinic acid, malic acid, acetic acid) and various concentrations of these carbon sources (0,1%-0,6%) on *Salmonella* biofilm formation were investigated. Following the experimental processes, mathematical models of *Salmonella* biofilm trajectories were developed using Delayed Logistic Differential Equations. It is demonstrated that the model is effective for modelling *Salmonella* biofilm formation even without a large amount of data. The data obtained in this thesis are important in terms of better understanding of *Salmonella* carbon metabolism and *Salmonella* biofilm structures and contributing to the development of biofilm eradication methods.

June 2024, 70 pages

Key Words: *S. Typhimurium*, biofilm, carbon sources, mathematical modelling

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli fikir ve önerileriyle bana yol gösteren, çalışmam süresince desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen,engin bilgileri ve tecrübelerini paylaşılarak bana çok büyük katkılar sağlayan, bilimsel ve kişisel gelişimimde çok fazla emeği olan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi, Biyoloji Bölümü), sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince bana yardımcı olan, değerli fikirleri ile tez çalışmama önemli katkılarda bulunan Sayın Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü),

Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübeleriyle destek olan Dr. Caner ÖZDEMİR'e ve çalışma arkadaşlarım Asiye Nur KARACA, Tuba Nur SÜRKAÇ ve Elif Gamze HAS'a,

Her durumda beni destekleyen, bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem Mükerrerem LATİFİ ve sevgili babam Latif LATİFİ'ye, her koşulda beni destekleyen ve yanımda olan arkadaşlarım Kağan ÖZDEMİR, Fatma Aylin SEZER ve Ezgi BIÇAK'a katkılarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması "Karbon Kaynaklarının *Salmonella Typhimurium*'da Biyofilm Oluşumu Üzerindeki Etkinliğinin Matematiksel Modellemesi (BAP, FYL-2023-2891)" adlı proje tarafından desteklenmiştir. Tez çalışmamı destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Hale Elçin LATİFİ

Ankara, Haziran 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 <i>Salmonella</i> Patojeni.....	4
2.2 Bakteriyel Biyofilmler.....	6
2.2.1 Biyofilm oluşum aşamaları.....	8
2.2.1.1 Bakterilerin yüzeye tutunması	8
2.2.1.2 Mikrokoloni oluşumu, EPS üretimi ve olgunlaşma	10
2.2.1.3 Dağılma	11
2.2.2 <i>Salmonella</i> biyofilmlerinin özellikleri.....	11
2.3 <i>Salmonella</i> Karbon Metabolizması.....	12
2.3.1 Glukoz	15
2.3.2 Fukoz	17
2.3.3 Ramnoz	18
2.3.4 Sitrik asit.....	19
2.3.5 Suksinik asit.....	20
2.3.6 Malik asit	21
2.3.7 Asetik asit.....	23
2.4 Matematiksel Modelleme	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1 Materyal	28
3.1.1 Bakteriyel suşlar ve kültür koşulları.....	28
3.1.2 Karbon kaynakları.....	28
3.1.3 Besiyeri ve çözeltiler.....	29

3.2 Yöntem	31
3.2.1 Polistiren yüzeylerde biyofilm oluşum miktarlarının belirlenmesi	31
3.2.2 Biyofilm oluşum miktarlarının matematiksel modellemesi	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	34
4.1 Glukozun <i>S. Typhimurium</i> 'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi	34
4.2 Fukozun <i>S. Typhimurium</i> 'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi	35
4.3 Ramnozun <i>S. Typhimurium</i> 'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi	37
4.4 Sitrik asitin <i>S. Typhimurium</i> 'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi	38
4.5 Suksinik asitin <i>S. Typhimurium</i> 'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi	39
4.6 Malik asitin <i>S. Typhimurium</i> 'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi	40
4.7 Asetik asitin <i>S. Typhimurium</i> 'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi	41
4.8 Matematiksel Modeller	42
4.9 Modelin doğrulanması	47
4.9.1 Glukoz	47
4.9.2 Fukoz	47
4.9.3 Ramnoz	48
4.9.4 Sitrik asit	49
4.9.5 Suksinik asit	50
4.9.6 Malik asit	51
4.9.7 Asetik asit	52
4.9.8 Matematiksel modeller	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
C	Celcius
g	Gram
α	Gecikme süresi
r	İçsel büyüme hızı
t	Zaman
K	Maksimum taşıma kapasitesi
b	Esneklik parametresi
CaCl_2	Kalsiyum klorür
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Glukoz
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$	Fukoz
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$	Ramnoz
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Sitrik asit
$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	Suksinik asit
$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	Malik asit
CH_3COOH	Asetik asit
KCl	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Potasyum di hidrojen fosfat
L	Litre
M	Molarite
mg	Miligram
MgSO_4	Magnezyum sülfat
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
NaCl	Sodyum klorür
Na_2HPO_4	Di sodyum fosfat
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk (densite)
pH	Hidrojen gücü (Power of hydrogen)
rpm	Dakikada devir sayısı (Rotation per minute)

w/v

Ağırlık / Hacim

Kısaltmalar

AHL	Asil homoserin laktonlar
c-di-GMP	Siklik-di-Guanozin mono fosfat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
eDNA	Hücre dışı (ekstraselüler) DNA
EPS	Ekzopolisakkarit
KDPGP	Entner-Doudoroff yolağı
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisakkarit
MS	Malat sentaz
NTS	Tifoidal olmayan <i>Salmonella</i>
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PBS	Fosfat tuz tamponu
PPP	Pentoz fosfat yolağı
PVC	Polivinil Klorür
QS	Quorum Sensing
SDH	Suksinat Dehidrojenaz
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Burun yıkama şişesi yüzeyinde tespit edilen aktif biyofilm oluşumunun taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü.....	7
Şekil 2.2 Biyofilm oluşumu aşamaları	8
Şekil 2.3 Glikoliz aşamaları.....	14
Şekil 2.4 Trikarboksilik asit döngüsü (TCA), glioksilat döngüsü ve döngülerdeki enzimleri kodlayan genler.....	15
Şekil 2.5 Lojistik büyüme grafiği.....	25
Şekil 4.1 Glukozun (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) <i>S. Typhimurium</i> 'da biyofilm oluşumuna etkisi.....	35
Şekil 4.2 Fukozun (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, %0,5 ve % 0,6) <i>S. Typhimurium</i> 'da biyofilm oluşumuna etkisi.....	36
Şekil 4.3 Ramnozun (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, %0,5 ve % 0,6) <i>S. Typhimurium</i> 'da biyofilm oluşumuna etkisi.....	37
Şekil 4.4 Sitrik asitin (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, %0,5 ve % 0,6) <i>S. Typhimurium</i> 'da biyofilm oluşumuna etkisi.....	38
Şekil 4.5 Suksinik asitin (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) <i>S. Typhimurium</i> 'da biyofilm oluşumuna etkisi.....	39
Şekil 4.6 Malik asitin (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) <i>S. Typhimurium</i> 'da biyofilm oluşumuna etkisi.....	40
Şekil 4.7 Asetik asitin (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) <i>S. Typhimurium</i> 'da biyofilm oluşumuna etkisi.....	41
Şekil 4.8 <i>Salmonella</i> biyofilminin glukozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	44
Şekil 4.9 <i>Salmonella</i> biyofilminin fukozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	45
Şekil 4.10 <i>Salmonella</i> biyofilminin ramnozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	45
Şekil 4.11 <i>Salmonella</i> biyofilminin sitrik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	45
Şekil 4.12 <i>Salmonella</i> biyofilminin suksinik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	46
Şekil 4.13 <i>Salmonella</i> biyofilminin malik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	46
Şekil 4.14 <i>Salmonella</i> biyofilminin asetik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	46

Şekil 4.15 Glukoz (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, %0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları.....	47
Şekil 4.16 Fukoz (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, %0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları.....	48
Şekil 4.17 Ramnoz (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, %0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları.....	49
Şekil 4.18 Sitrik asit (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, %0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları.....	50
Şekil 4.19 Suksinik asit (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, %0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları.....	51
Şekil 4.20 Malik asit (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, %0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları.....	52
Şekil 4.21 Asetik asit (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, %0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları.....	53
Şekil 4.22 <i>Salmonella</i> biyofilminin glukozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	53
Şekil 4.23 <i>Salmonella</i> biyofilminin fukozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	54
Şekil 4.24 <i>Salmonella</i> biyofilminin ramnozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	54
Şekil 4.25 <i>Salmonella</i> biyofilminin sitrik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	54
Şekil 4.26 <i>Salmonella</i> biyofilminin suksinik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	55
Şekil 4.27 <i>Salmonella</i> biyofilminin malik asitin farklı konsantrasyonları (% 0, 1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	55
Şekil 4.28 <i>Salmonella</i> biyofilminin malik asitin farklı konsantrasyonları (% 0, 1- % 0,6) altındaki yörüngesi.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan karbon kaynakları ve konsantrasyonları.....	28
Çizelge 4.1 Glukozun farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri.....	42
Çizelge 4.2 Fukozun farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri.....	42
Çizelge 4.3 Ramnozun farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri.....	42
Çizelge 4.4 Sitrik asitin farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri.....	43
Çizelge 4.5 Suksinik asitin farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri.....	43
Çizelge 4.6 Malik asitin farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri.....	43
Çizelge 4.7 Asetik asitin farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri.....	44

1. GİRİŞ

Biyofilmler; polisakkaritler, hücre dışı DNA (eDNA), proteinler ve diğer kimyasal bileşenleri içeren, kendi ürettikleri hücre dışı polimerik matriks (EPS) ile çevrili mikrobiyal komüniteler olarak tanımlanmaktadır (Flemming vd. 2016). Bakteriyel biyofilm formları, düşük besin kaynakları, yüksek basınç, sıcaklık veya çeşitli antimikrobiyallerin varlığı gibi birçok olumsuz çevresel koşula karşı planktonik formlara göre daha dirençlidir (De la Fuente-Núñez vd. 2013). Bunun sebebi, biyofilm yapısındaki hücrelerin matriks içerisinde gömülü halde bulunmaları ve bu sayede kendilerini dış etkenlere karşı koruma altına alarak daha uzun süre hayatta kalmayı başarabilmeleridir. Biyofilm oluşumu, her ne kadar bakterinin hayatta kalma şansı için önemli bir faktör olsa da dirençli yapılarından dolayı gıda, su, enerji endüstrilerinde ve özellikle sağlık alanında büyük zorluklara sebep olmaktadır. Bu durum, bakteriyel biyofilm formlarının sebep olduğu dirençli enfeksiyonlara karşı mücadeleyi büyük oranda güçleştirmektedir.

Gıda patojeni olan ve çoğunlukla kontamine olmuş yiyecek ve içeceklerden bulaştığı bilinen *Salmonella*, biyofilm oluşturma özelliğinden dolayı, başta gıda endüstrisi olmak üzere birçok alanda problemlere yol açmaktadır. *Salmonella*'nın oluşturduğu biyofilm yapıları, antibiyotikler gibi klasik tedavi ve eradikasyon yöntemlerini etkisiz kılması sebebiyle, özellikle medikal alanlarda ve gıda endüstrisinde zorluklara yol açmaktadır. Bundan dolayı, etkin antibiyofilm stratejilerinin geliştirilmesi, klinik ve endüstriyel açıdan çözümü aciliyet taşıyan bir konu olarak bilim insanlarının ve teknologların önünde durmaktadır (Cadena vd. 2019). Bu tür bakteriyel formlar ile mücadele edilebilmesi için biyofilm oluşum ve regülasyon mekanizmalarının iyi bir şekilde anlaşılması gerekmektedir. Bu alanda yapılan araştırmalarda, biyofilmlerin oluşumunda ve regülasyonunda *csgD*, *fimH*, *fimF*, *fliZ*, *rmbA* gibi genleri içeren genetik faktörlerin yanı sıra ısı, tuz konsantrasyonu, pH değişimi ve ortamdaki karbon kaynakları gibi çevresel faktörlerin de rol oynadığı belirlenmiştir (Toyofuku vd. 2016, Yin vd. 2018). Glukoz, *Salmonella* ve diğer birçok bakterinin karbon kaynağı olarak en etkin kullandıkları karbon kaynaklarından birisidir. Ortamda glukozun tükenmesi halinde bakteri, ortamda bulunan alternatif karbon kaynaklarına geçme eğilimindedir (Kenyon vd. 2005).

Salmonella, glukoza alternatif olarak, sitrat, süksinat, malat ve oksaloasetat gibi metabolitleri karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. Konuyla ilgili yapılan bir araştırmada, bu metabolitlerin biyofilm oluşumundaki etkisi incelenmiş ve kullanılan karbon kaynağına göre değişen miktarlarda biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir (Paytubi vd. 2017). Yapılan başka bir çalışmada, bağırsak lümeninde *Salmonella*'nın galaktoz, glukoz, maltoz ve mannitol taşınımı ve katabolizmasında yer alan proteinleri (enzimlerini) eksprese ettiği gözlemlenmiştir. Başka bir karbon kaynağı olan melibiyoz da *Salmonella* tarafından katabolize edilebilen bir şeker olduğu saptanmıştır. Ancak, melibiyoz katabolizmasının glukoz gibi diğer besin kaynaklarının yokluğunda gerçekleştiği tespit edilmiştir (Deatherage Kaiser vd. 2013). Kalai Chelvam ve arkadaşları (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise, fukoz ve ramnozun *Salmonella*'nın, özellikle biyofilm formları tarafından katabolize edilebildiği ve dekstrin ve pektinin *Salmonella*'nın planktonik formdan biyofilm formuna geçişini indükleyebildiği belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında öncelikle farklı karbon kaynaklarının ve onların çeşitli miktarlarının, *Salmonella* biyofilmi üzerinde yarattığı değişikliklerin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın bir diğer aşaması ise, *Salmonella*'nın kullandığı karbon kaynakları ve biyofilm arasındaki ilişkinin matematiksel olarak modellenmesi olarak tasarlanmıştır. Karbon kaynakları ve biyofilm arasındaki ilişkinin denklemler yoluyla modellenmesi, biyofilm mekanizmalarının çok daha iyi bir biçimde anlaşılmasına olanak sağlayacağı öngörüsü tez çalışmamızın hipotezini oluşturmaktadır. Biyofilm mekanizmasının karbon kaynağı parametrelerine göre gerçekleştirilmiş matematiksel modellemesi hakkında yapılan araştırmalar, literatürde yetersiz kalmaktadır. Planlanan tez çalışmasının, bu yenilikçi yönüyle literatüre ve pratik uygulamalara önemli bir katkı sağlayacağı gerçeği tez çalışmasının bilimsel ve yaygın etki potansiyelini açık bir şekilde tanımlamaktadır. Özellikle gıda endüstrisinde, birçok paketli gıdanın üretiminde kullanılan metabolitler ve şekerler, *Salmonella* bakterisinin biyofilm oluşturmasını kolaylaştırabilmektedir. Bu nedenle, *Salmonella*'nın biyofilm formuna geçişini kolaylaştırmak için kullandığı karbon kaynaklarının ve miktarlarının belirlenmesi ve aradaki bu ilişkinin matematiksel modellemesinin yapılması, paketli gıdalarda kullanılacak olan karbon kaynaklarının, *Salmonella* ve diğer kontaminantların gelişmesine izin vermeyecek şekilde belirlenmesine de olanak sağlayacaktır. Buna ek olarak, tez çalışmasında elde edilecek

modellemeler, *Salmonella* biyofilminin karbon kaynaklarına ve miktarlarına bağılı değişiminin tahmin edilebilmesini ve bu konu hakkında ileride yapılacak olan araştırmalara da hız ve zaman kazandırılmasını sağlayacaktır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 *Salmonella* Patojeni

Gastrointestinal hastalıklar, günümüzde yaygın olarak görülmekte olan ve genellikle kontamine olmuş su veya yiyeceklerden bulaştığı bilinen hastalıklardır. Bu hastalıklara sebep olan çok sayıda patojen bulunmaktadır (Fàbrega ve Vila 2013). Bu patojenler arasından en fazla önem teşkil eden cins *Salmonella* olarak kabul edilmektedir. Bu durumun sebebi, gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere dünya çapında gıda kaynaklı bulaşıcı hastalıklara sebep olan etmenlerden en sık rastlanılanı olmasıdır.

Salmonella, *Enterobacteriaceae* familyasına dahil, Gram negatif patojen özelliğine sahip, fakültatif anaerob ve kapsülsüz bir basildir. Spor oluşturmeyen bu mikroorganizmanın çapı yaklaşık olarak 0.5 – 1.5 mikron arasında değişmekle beraber, uzunluğu 2-5 mikron arasındadır (Andino ve Hanning 2015).

Salmonella cinsi, *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere iki türden oluşmaktadır ve *S. enterica* türü de kendi içerisinde *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) ve *S. enterica* subsp. *indica* (VI) olmak üzere altı farklı alt türe ayrılmaktadır (Brenner vd. 2000). Sonradan farklı bir tür olarak sınıflandırılmasına karar verilen *S. bongori*, başlangıçta *S. enterica*'nın alt türü (subsp. V) olarak kabul edilmiştir. *S. enterica*'nın alt türleri olan *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb) ve *houtenae* (IV) ve diğer tür olan *S. bongori*, çoğunlukla soğuk kanlı canlılarda ve soğuk çevrelerde bulunurken, *S. enterica* subsp. *enterica* (I) sıcak kanlı hayvanlarda bulunmaktadır. Diğer bir deyişle insanlarda ve hayvanlarda görülen *Salmonella* bakterisi kaynaklı enfeksiyonlara, *S. enterica* subsp. *enterica* (I) alt türü sebep olmaktadır (Fàbrega ve Vila 2013). Günümüze dek *S. enterica* türüne ait yaklaşık olarak 2600 civarında serovar tanımlanmış ve bu serovarların sınıflandırılması karbonhidrat, flagella ve lipopolisakkarit (LPS) yapılarındaki çeşitliliklere bakılarak gerçekleştirilmiştir (Coburn vd. 2007). Bu sınıflandırmalar Kaufman ve White şemasına göre yapılmış ve sınıflandırmaların

oluşturulmasında kapsüler (Vi), flagella (H) ve somatik (O) olmak üzere üç antijenik etken baz alınmıştır.

Gıda kökenli patojen olarak tanımlanan *Salmonella* bakterisinin, canlılar tarafından tüketilen kontamine olmuş yiyeceklerden veya sudan bulaşarak enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir. Bağırsak epiteline ulaşan bu mikroorganizma, sahip olduğu çeşitli virülans mekanizmaları sayesinde dokularda adezyon ve invazyonu sağlayarak enfeksiyona sebep olmakta ve gastrointestinal hastalıklara yol açmaktadır (Mumy 2014). *Salmonella* bakterisinin sebep olduğu enfeksiyona “salmonelloz” adı verilmektedir (Griffith vd. 2019). *Salmonella*, gıda kaynaklı hastalıkların sebebi olarak en sık gözlemlenen patojenlerden biridir ve bu durum dünya genelinde önemli bir klinik problem olarak nitelendirilmektedir. Aktarılan verilere göre, dünya çapında her yıl yaklaşık olarak 94 milyon *Salmonella* kaynaklı gastroenteritis vakası ve buna bağlı olarak da 155 000 ölüm gerçekleştiği tespit edilmiştir. Tespit edilen bu vakaların yaklaşık 80 milyonunun da gıda kaynaklı olduğu belirtilmektedir (Majowicz vd. 2010). Bu durum, *Salmonella* patojeninin gıda endüstrisinde büyük sorunlara yol açan ve çözülmesi gereken problemlerden biri olduğunu göstermektedir.

Salmonella serovarları tifoidal ve tifoidal olmayan (non-tifoidal) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Her iki grup da genetik olarak benzerlik göstermesine karşın, enfekte ettikleri konaklarda çeşitli düzeylerde bağışıklık tepkisine sebep olabilmekte ve farklı semptomlara yol açabilmektedir (Gal-Mor vd. 2014). Tifoidal olmayan *Salmonella* serovarları, insanlarda gastroenterit ve bakteriyemiye (kanda bakterilerin varlığı) sebep olurken, tifoidal gruba dahil olan *Salmonella* serovarları tifoid veya diğer bir adıyla enterik ateşe sebep olmaktadır. Tifoidal *Salmonella* patojenlerinin yol açtığı enterik ateş, genel olarak hijyenik koşulların tam olarak sağlanamadığı ve temiz su imkanlarının yetersiz olduğu ülkelerde görülmektedir. Bu iki grubu birbirinden ayıran bir diğer özellik de tifoidal *Salmonella* serovarlarında enflamasyonu düzenlemeyi sağlayan mekanizmaların bulunmasıdır. Ancak tifoidal olmayan *Salmonella* serovarlarında bu mekanizmalar bulunmamaktadır (Hiyoshi vd. 2018). Typhimurium ve Enteridis gibi *Salmonella* serovarları, tifoidal olmayan serovarlar grubuna dahildirler. Bahsi geçen bu türler, geniş çaplı bir konak hücre özgüllüğüne sahiptir. *S. Typhi*, *S. Paratyphi* ve *S.*

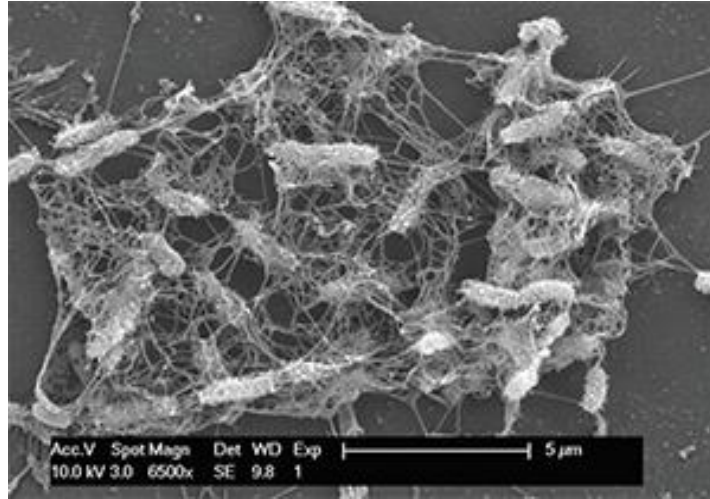
Sendai gibi *Salmonella* türleri ise tifoidal gruba dahildir. Bu patojenler ile ilişkilendirilen enterik ateş semptomları, tifoidal olmayan serovarların sebep olduğu gastroenterit semptomları ile farklılık göstermektedir. Tifoidal gruba dahil olan türlerin kuluçka süresi yaklaşık iki haftayı bulurken, non-tifoidal (NTS) serovarların kuluçka süresi 6-12 saat aralığında olabilmektedir (Gal-Mor vd. 2014).

Salmonella bakterisinin kolay üreyebilen bir bakteri cinsi olması, uygun çevresel koşullara sahip olduğunda konak hücre dışında da çoğalabilmesine olanak sağlamaktadır. *Salmonella* serovarlarının gelişebilmesi için ideal sıcaklık yaklaşık olarak 35 °C ve 37 °C arasında olmakla beraber, bazı *Salmonella* türleri en düşük 2 °C ve en yüksek 55 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda da üreyebilmektedir. Bu patojenin üremesi için ideal pH aralığı ise 6.5 ve 7.5 civarındadır. Fakat bazı *Salmonella* serovarları 4 ve 9 pH aralığında da gelişme gösterebilirler (Pui vd. 2011).

2.2 Bakteriyel Biyofilmler

Biyofilm yapıları, bakteriler ve mantarlar gibi organizmaların çeşitli çevresel koşullara karşı hayatta kalmalarını sağlayan yapılardır. Bu yapılar bakterinin kendi ürettiği polimer matriks ile çevrili mikrobiyal komüniteler olarak tanımlanmaktadır (Bremer vd. 2015). Bakterinin ürettiği bir yapı olan ve hücre dışı polimerik bileşenler (EPS) olarak adlandırılan bu matriks yapısı, çeşitli proteinler, polisakaritler, lipitler, nükleik asitler ve hücre dışı DNA gibi bileşenleri içermektedir. EPS yapısı biyofilm formlarının mekanik stabilitesini sağlayarak zorlu çevresel koşullara karşı dirençlilik oluşumunda güçlü bir rol oynamaktadır. Buna ek olarak, söz konusu yapı biyofilmde bulunan bakterilerin yüzeylere daha iyi tutunmasına olanak sağlamaktadır (Flemming ve Wingender 2010). Biyofilm oluşturma becerisine sahip mikrobiyal organizmaların, planktonik formlara kıyasla hayatta kalma olasılığı çok daha yüksektir. Bunun sebebi, biyofilm formundaki mikroorganizmaların, çeşitli çevresel koşullara (sıcaklık, pH değişimi, tuz veya şeker konsantrasyonu, yüksek basınç, düşük su aktivitesi, düşük besin kaynakları vb.) karşı daha dirençli olmasıdır. Bahsi geçen bu formların zorlu çevresel koşullarda hayatta kalma oranlarının planktonik formlara göre daha yüksek olması, bu yapıların eradike edilmesini oldukça zorlaştırmaktadır. Antibiyotikler, dezenfektanlar gibi eradikasyon yöntemleri ve

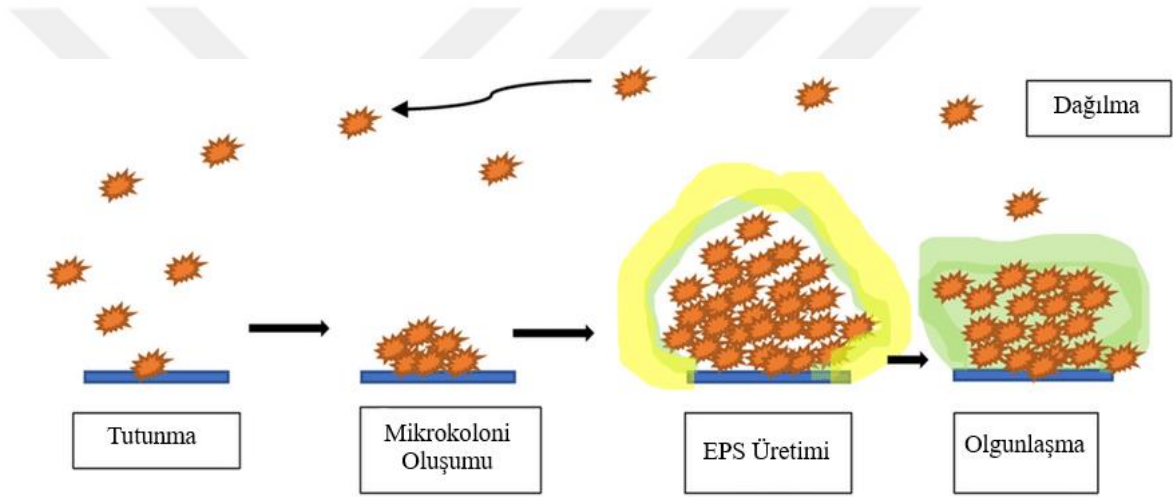
hatta bu patojenlerin enfekte ettiği konak hücrelerin oluşturduğu bağışıklık tepkisi, biyofilmlerin oluşturduğu dirence karşı yetersiz kalabilmektedir (Mah ve O'Toole 2001). Özellikle medikal alanda kullanılan çeşitli malzemelerin yüzeylerinde uzun süre yaşayabilmeleri, biyofilmlerin klinik açıdan dikkate alınması gerektiğini göstermektedir (Şekil 2.1) (www.enttoday.org 2017). Biyofilm yapıları tek bir bakteriyel türden oluşabildiği gibi, çeşitli bakteri türlerinin bir araya gelmesiyle de oluşabilen yapılardır. Çeşitli bakteriyel komünitelerin bir araya gelerek meydana getirdiği biyofilm yapılarına, doğal ortamlarda sıkça rastlanabilmektedir (Akçelik ve Akçelik 2022). Biyofilm oluşturma yetenekleri sayesinde zorlu çevresel koşullara karşı dirençlilik gösterebilen çoğu mikroorganizma, birbirleriyle iletişime geçip organizasyonu sağlayabilmek için yeter sayı algılama sistemini (Quorum Sensing) kullanmaktadırlar. Bakterilerin kendi aralarında iletişimi sağlamak için kullandıkları bu sistem sayesinde bakteriler, bulundukları ortamdan gelen herhangi bir olumsuz sinyali algılayabilir ve birbirlerine aktardıkları bilgi sayesinde organize olarak, olumsuz bir koşula karşı hızlı bir şekilde hazırlıklı duruma gelebilirler. Birçok Gram-negatif bakteri türünde en detaylı olarak tanımlanan Quorum Sensing (QS) sistemi asil-homoserin lakton (AHL) sistemleridir (Shirtliff vd. 2002, Parsek ve Greenberg 2005, Akçelik ve Akçelik 2022).



Şekil 2.1 Burun yıkama şişesi yüzeyinde tespit edilen aktif biyofilm oluşumunun taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü (www.enttoday.org 2017)

2.2.1 Biyofilm oluşum aşamaları

Biyofilm oluşumu birkaç aşamadan meydana gelen bir sũreçtir (şekil 2.2). Bakteri, tutunmaya uygun bir yũzey ile karşılaştığında, sahip olduğu birçok genetik mekanizma sayesinde biyofilm oluşum aşamalarını başlatır (Kierrek-Pearson ve Karatan 2005). Biyofilm aşamaları 5 adımdan meydana gelmektedir. İlk aşama, planktonik hũcrelerin kendilerine uygun bir yũzeeye (organik veya inorganik) tutunmalarıyla başlamaktadır. Hũcreler kendilerine uygun ortama tutunduktan sonra ikinci aşama olan kolonizasyon aşamasına geçmektedir. Daha sonra bu aşamaları, ekzopolisakkarit matriks (EPS) ũretimi, olgunlaşma ve dağılma sũreçleri takip etmektedir (Pal ve Lavanya 2022).



şekil 2.2 Biyofilm oluşumu aşamaları (Pal ve Lavanya 2022)

2.2.1.1 Bakterilerin yũzeeye tutunması

Biyofilm oluşumunda ilk aşama bakterilerin uygun bir yũzeeye tutunma aşamasıdır. Bu aşamada bakteriyel adezyona katkısı olan birçok etken bulunmaktadır. Bunlar, bakterinin motilitesi, hũcre duvarı bileşenleri, ortamdaki besin kaynakları veya bakterinin yoğunluğu gibi faktȖrler olabilir (Zheng vd. 2021). Bahsi geçen bũtũn bu faktȖrlerden etkilenen bir sũreç olmasından dolayı, bakteriyel adezyon aşaması çok etkenli bir aşama olarak kabul edilmektedir (Kreve ve Dos Reis 2021).

Bakteriler, yüzeye tutunma aşamasını gerçekleştirebilmek için uygun bir yüzey olup olmadığını çeşitli mekanizmalar sayesinde anlayabilmektedir. Bakteriler, çeşitli kimyasal sinyalleri (pH ve iyonik kuvvetler) veya biyolojik molekülleri (Quorum Sensing) tespit etmelerini sağlayan mekanizmaları sayesinde bulundukları çevreyi anlamlandırabilir ve buna göre tepki oluşturabilirler (Harapanahalli vd. 2015). Buna ek olarak, bulundukları yüzeyi mekanik olarak hissetmek ve anlamlandırabilmek için de bazı fiziksel mekanizmalara sahiplerdir. Bakterinin yüzey ile fiziksel temasını mekanik olarak algılayabilme kapasitesine “mechanosensing” adı verilmektedir (Straub vd. 2019). Bakterilerin tutunmak istedikleri yüzeyin tespiti için kullandıkları mekanosensörlerden en önemlisi bakteriyel flagellum olarak tanımlanmaktadır. Biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan adezyonda, yüzeyi algılamada flagella büyük bir role sahiptir (Belas 2013, Belas 2014).

Biyofilm oluşumunda tutunma geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz tutunma olarak gerçekleşebilir. Geri dönüşümlü tutunma (reversible attachment), yüzeye yeni tutunmuş hücrelerin kuvvetli bir şekilde tutunamaması ve yüzeyden kolayca ayrılabilmesi olgusuna verilen isimdir. Adezyon aşamasında genellikle Van der Waals kuvvetleri, hidrodinamik kuvvetler ve elektrostatik etkileşimler kurularak yüzeye tutunma gerçekleştirilmektedir. Fakat bahsi geçen bu etkileşimlerin zayıf kuvvetler olmalarından ötürü, çoğu hücre çevresel faktörlerin etkisiyle kolayca dağılır (Akçelik ve Akçelik 2022). Bazı hücreler yüzeye tutunamayıp dağılırken, bazı hücreler de zamanla yüzeye sıkıca tutunup biyofilm oluşumunu başlatabilirler. Bu sürece ise geri dönüşümsüz tutunma (irreversible attachment) adı verilmektedir (Armbruster ve Parsek 2018). Geri dönüşümsüz tutunma ise bakterinin dipol-dipol bağları ve hidrojen bağları gibi daha güçlü kuvvetlerle yüzeye tutunması ile gerçekleşen tutunmalardır (Petrova ve Sauer 2012, Luo vd. 2022). Bakteriyel hücreler, yüzeye geri dönüşümsüz bir şekilde tutunduktan sonra çoğalmaya başlar ve mikrokoloni adı verilen yapıları oluştururlar. Mikrokoloni oluşumunu takiben hücreler EPS üretimine başlar ve bu sayede matriks ile çevrili yapıları meydana getirirler. Bu süreçte, sinyalleme molekülü olan çevrimsel di-GMP (c-di-GMP), önemli bir role sahiptir. Planktonik formdan biyofilm formuna geçiş sürecinde bakterilerin davranışını düzenlemeye yarayan bir sinyalleme sistemine sahip olan c-di-GMP, matriks üretimini

desteklemesinin yanı sıra flagella aracılığıyla gerçekleşen yüzme hareketini inhibe ederek bakterinin yüzeye adezyonunu sağlamaktadır (Römling vd. 2013, Park ve Sauer 2022).

2.2.1.2 Mikrokoloni oluşumu, EPS üretimi ve olgunlaşma

Daha önce de belirtildiği gibi bakteriyel biyofilmler tek bir türden veya çeşitli türlerin bir araya gelmesiyle oluşabilir. Çeşitli tür veya cinslerden meydana gelen bu kommüniteler, koagregasyon olarak bilinen fiziksel hücre-hücre birlikteliklerini, türler arası sinyalleşmeyi ve ekstraselüler matriksin paylaşılmasını içeren çeşitli etkileşimler yoluyla oluşmaktadır. EPS içeriğinin ana bileşenleri (polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler ve lipidler) genellikle değişkenlik göstermese de EPS kompozisyonu her bakteriye özgü olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Jakubovics 2015, Kreve ve Dos Reis 2021). Genetik olarak farklılık gösteren bakterilerin belirli moleküller aracılığıyla birbirine tutunması süreci olan koagregasyon etkileşimleri, bir hücredeki adezinlerin diğer hücredeki reseptörleri tanıma kapasitesinden dolayı yüksek özgüllüğe sahip bir süreçtir (Rickard vd. 2003). Bu süreçte, bir bakterinin yüzeyinde bulunan adezinler, diğer bakteri türünün yüzeyinde bulunan glukoz, mannoz veya galaktoz gibi besin kaynaklarını içeren polisakkariti tanıyabilmektedir (Viljoen vd. 2020, Kreve ve Dos Reis 2021).

Bakteriler bulundukları yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunma aşamasını tamamladıktan sonra çoğalma ve olgunlaşma aşamasına geçmektedir. Bu aşamada bakteriler mikrokoloni oluşumu ve mikrokolonileri çevreleyecek olan EPS üretimi gerçekleşir. Bu süreçte, çevredeki besin kaynakları, mikrokoloni yapılarının şeklini etkileyebilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, glukozun karbon kaynağı olarak verildiği ortamda, *P. aeruginosa*'nın mantar şeklinde mikrokoloniler oluşturduğu gözlemlenirken, sitrik asitin olduğu ortamda ise düz ve yoğun bir şekilde kümelenmiş biyofilm yapıları oluşturduğu tespit edilmiştir (Klausen vd. 2003, Tolker-Nielsen 2015).

2.2.1.3 Dağılma

Biyofilm oluşumu süreci tamamlandıktan sonra, çeşitli çevresel koşullar nedeniyle (ortamdaki kaynakların azalması, oksijen yetersizliği vb.), dağılma aşamasına geçebilirler. Bu süreçte biyofilm yapısındaki bakteriler planktonik forma geçerek, invazyonu gerçekleştirip yeni bir biyofilm oluşumunu başlatabilecekleri daha uygun bir ortam arayışına girerler. Dağılma aşaması aktif ve pasif dağılma olmak üzere iki şekilde gerçekleşebilir. Aktif dağılma, sıcaklık değişimi, besin kaynağı ve oksijen yetersizliği, metabolit birikmesi gibi çevresel koşulların etkisiyle EPS'nin degradasyonu veya hücre hareketliliğine bağlı olarak gerçekleşir. Pasif dağılma ise sıvı parçalama kuvveti, aşınma veya insan müdahalesi gibi dış fiziksel faktörlere bağlı olarak gerçekleşebilir (Kırmusaoğlu 2016, Pal ve Lavanya 2022).

2.2.2 *Salmonella* biyofilmlerinin özellikleri

Salmonella cinsinin en önemli özelliklerinden birisi biyofilm oluşturma yeteneğidir (Coenye 2013). *Salmonella*, biyofilm oluşturma becerisi sayesinde konak hücrelere veya diğer çevrelere tutunma ve uyum sağlama kabiliyetini artırabilir. Bu konu üzerinde yapılan çalışmalarda, *Salmonella* bakterisinin biyofilm oluşturma özelliği sayesinde plastik, cam, paslanmaz çelik ve hatta çimento gibi abiyotik yüzeylerde ve bitki yüzeyleri, epitel hücreleri veya safra taşları gibi biyotik yüzeylerde tutunup, bu yüzeylerde kalıcılığını sağlayabildiği tespit edilmiştir (Steenackers vd. 2012). Buna ek olarak, bakteriler biyofilm formda iken çeşitli çevresel streslere, antibiyotiklere, dezenfektanlara ve hatta konak hücrenin immün sisteminin oluşturduğu yanıtı karşı daha dirençlidirler (Høiby vd. 2010, Jensen vd. 2010). Biyofilm formundaki bakterilerin, planktonik yapılara kıyasla, zorlayıcı koşullarda hayatta kalma yetenekleri çok daha yüksek olmasından dolayı mikrobiyal enfeksiyonların ana kaynağını teşkil etmektedirler (De la Fuente-Núñez vd. 2013). Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsünün (NIH) araştırmalarına göre, tüm mikrobiyal ve kronik enfeksiyonların yaklaşık %65-80'i biyofilmle ilişkilendirilmektedir (Jamal vd. 2018). *Salmonella* güçlü çevresel adaptasyonu yanında, yüksek biyofilm oluşturma becerisine sahip bir cins olmasından dolayı, dünya çapında ciddi bir enfeksiyon ajanı haline gelmiştir. Buna ek olarak,

Salmonella biyofilmlerine karşı bugüne kadar geliştirilen çeşitli eradikasyon yöntemlerinin yetersiz kalmasından dolayı tehlike boyutu giderek artmaktadır (Burmølle vd. 2010).

Planktonik formdan biyofilm formuna geçiş sürecindeki bu aşamalarda çevresel stres faktörleri önemli bir rol oynamaktadır. Bu çevresel faktörler ısı, tuz konsantrasyonu, ortamdaki antimikrobiyal maddeler, pH, su aktivitesi ve besin kaynakları gibi faktörler olarak sıralanabilir (Toyofuku vd. 2016).

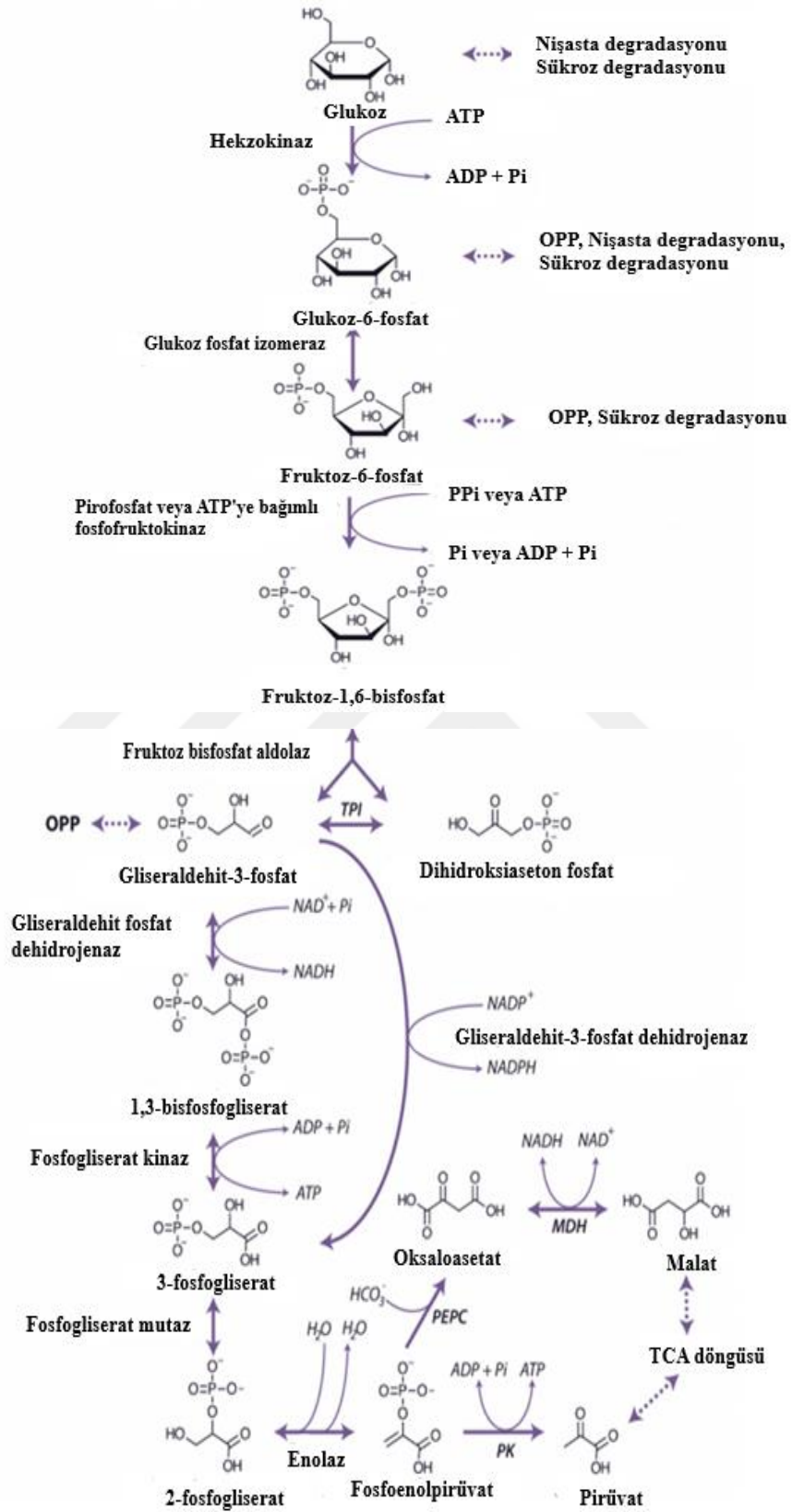
2.3 *Salmonella* Karbon Metabolizması

Salmonella biyofilmlerinin oluşumunda ve regülasyonunda *csgD*, *fimH*, *fimF*, *fliZ*, *rmbA* gibi genleri içeren genetik faktörlerin yanı sıra; ısı, tuz konsantrasyonu, pH değişimi ve ortamdaki karbon kaynakları gibi çevresel faktörlerin de rol oynadığı belirlenmiştir (Toyofuku vd. 2016, Yin vd. 2018).

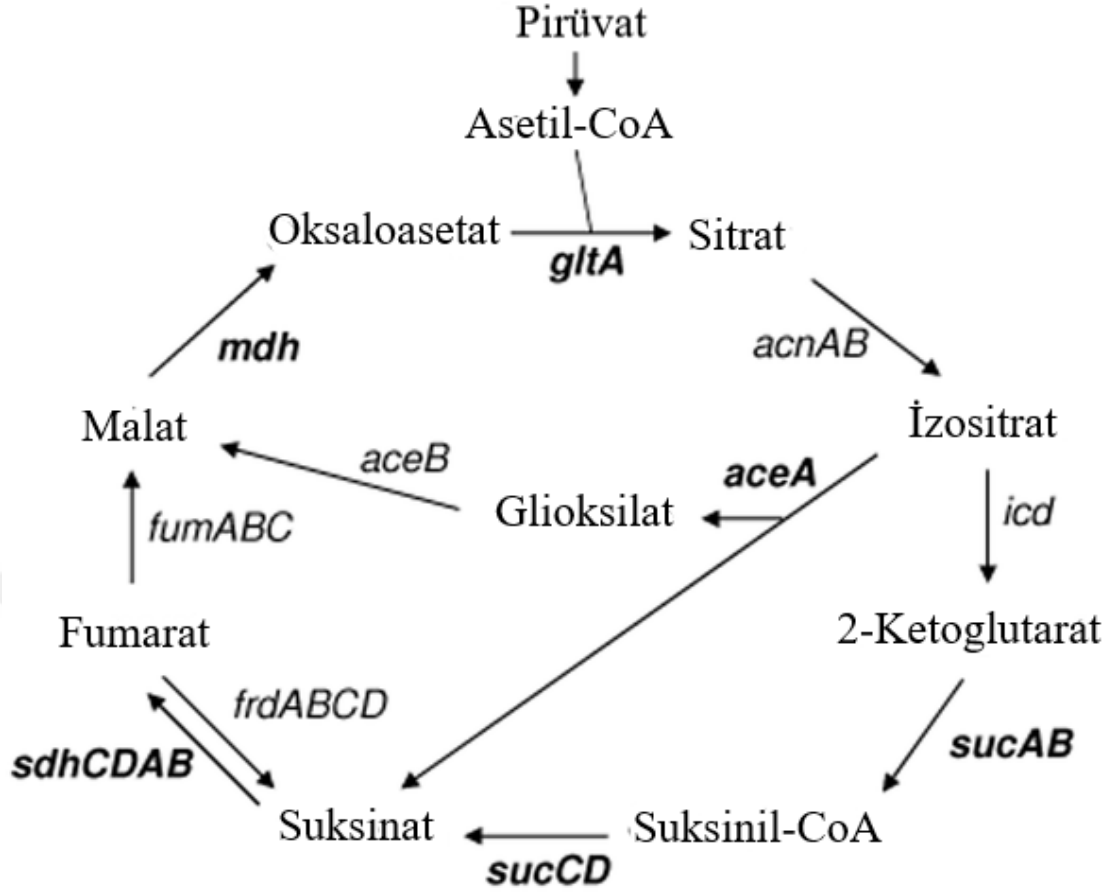
Ortamdaki farklı karbon kaynaklarının varlığı biyofilm oluşumu için gerekli olsa da yapılan bazı çalışmalarda, ortamda yüksek oranda karbon kaynağı varlığında biyofilm oluşumunun ya hiç gerçekleşmediği ya da oluşan biyofilm yapılarının en ufak bir müdahalede kolayca dağılabilen gevşek yapılar oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda, yüksek oranda karbon kaynağı varlığının aksine, düşük miktarda karbon kaynağı varlığının veya açlık durumunun biyofilm oluşumuna ve biyofilm yapısının sağlamlığına daha çok katkısı olduğu genel bir görüş olarak kabul edilmiştir. Dewanti ve Wong (1995) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, düşük karbon kaynağı içeren bir ortamda geliştirilen *E. coli* suşlarının oluşturduğu biyofilm yapılarının karbon kaynakları ve diğer besin maddelerince zengin ortamında geliştirilen suşlara kıyasla daha yüksek sayıda yapışkan (adherent) hücre içerdiği tespit edilmiştir (Dewanti ve Wong 1995, Petrova ve Sauer 2012). Fakat bazı durumlarda, ortamdaki besin kaynağının belirli bir eşik değerinin altında olması, bakterinin yüzeye tutunma sürecini dolayısıyla biyofilm oluşumunu olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Monds vd. 2001).

Salmonella kendisi için gerekli olan besin kaynaklarını (proteinler, karbonhidratlar, lipidler ve nükleik asitler) kendi depolarından (glikojen, lipidler) veya direkt olarak konak hücrenin kendisinden temin etmektedir. Buna ek olarak, konak hücrede mevcut basit karbonları (asetik asit, glukoz) veya sülfür, nitrojen gibi bileşenleri kendi sentezleyerek de bahsi geçen küçük molekül öncüllerini sentezleyebilmektedir (Buman ve Schothorst 2017).

Salmonella bakterisinin en çok kullandığı karbon kaynaklarından biri olan glukoz, glikoliz (Şekil 2.3) ve trikarboksilik asit (TCA) veya diğer bir ismiyle Krebs döngüsü (Şekil 2.4) gibi karbon metabolizması yolları ile katabolize edilmektedir. Glukozun katabolize edilmesi süresince ilk aşama glikoliz aşamasıdır. Glikoliz yoluyla ortaya çıkan pirüvatların oksidasyonu sonucu trikarboksilik asit döngüsü başlar. Dandekar ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan bir çalışmada bazı metabolik enzimlerin mutasyona uğratılması sonucunda, *Salmonella*'nın makrofaj hücrelerinde hayatta kalamadığı tespit edilmiştir. Glikoliz ve TCA döngüsü yollarına ek olarak, pentoz fosfat (PPP) ve Entner-Doudoroff (KDPGP) yollarının da *Salmonella*'da glukoz katabolizmasında yer alabildiği tespit edilmiştir (Bowden vd. 2009, Han vd. 2023).



Şekil 2.3 Glikoliz aşamaları (Ghannoum vd. 2013)



Şekil 2.4 Trikarboksilik asit döngüsü (TCA), glioksilat döngüsü ve döngülerdeki enzimleri kodlayan genler (Bowden vd. 2010)

2.3.1 Glukoz

Moleküler formülü $C_6H_{12}O_6$ olan glukoz, basit bir şeker (monosakkarit) olup, canlı metabolizmasında rol oynayan en önemli karbonhidratlardan biridir. Glukoz genellikle bitkiler ve çoğu arkeler tarafından fotosentez sürecinde üretilmektedir. Fotosentez sonucu ortaya çıkan glukoz, hücre duvarında bulunan selülozun üretiminde kullanılmaktadır. *Salmonella* bakterisinde selüloz biyofilm matriksinin ana bileşenlerinden birisidir ve bakterinin hareketini engelleyerek yüzeye tutunmasını ve dolayısıyla biyofilm yapısının olgunlaşmasını sağlar (Zogaj vd. 2001, Solano vd. 2002).

Yaşam için en kritik olan bileşiklerden biri olan glikoz, gelişme ve üreme için gereken enerjinin üretilmesinden sorumludur. Bitkilerde ve siyanobakterilerde fotosentez aracılığıyla üretilen glukoz, daha sonra enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere

depolanacak olan nişastanın üretiminde kullanılır. Buna ek olarak nişasta süktroz ve selüloz gibi sakkaritlerin üretiminde kullanılmak üzere parçalanabilir. Gıda endüstrisinde de önemli bir role sahip olan glukoz, özellikle bitkiden üretilen gıdalarda ve paketli gıdalarda doku ve aromaya katkı sağlamak için sıklıkla kullanılan bir bileşendir (Galant vd. 2015).

Glukozun doğada bu kadar kritik bir role sahip olması ve gıda endüstrisi gibi alanlarda sıklıkla kullanılan bir bileşik olması, bazı sorunları da beraberinde getirmektedir. Tüm canlıların enerji ihtiyacı için gerekli olan glukoz, *Salmonella* gibi patojen bakterilerin de en çok yöneldiği besin kaynaklarından biridir (Gutnick vd. 1969). *Salmonella*, planktonik formdan biyofilm formuna geçişte glukozu aktif olarak kullanmaktadır. Gıda endüstrisinde, gıda işleme yerlerinde biyofilm oluşumu için sıcaklık, pH, su aktivitesi ve besin kaynağı açısından uygun ortamlara sıkça rastlanmaktadır (Moraes vd. 2018, Bezek vd. 2019).

Salmonella patojeninin biyofilm oluşumunda en yaygın olarak kullandığı karbon kaynağı olan glukozun biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi hakkında yapılan çalışmalarda glukozun farklı konsantrasyonlarının biyofilm miktarı üzerinde farklı etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Glukozun farklı konsantrasyonları biyofilm oluşumunu inhibe edici veya destekleyici etkilerde bulunabilir ve bu süreçler bakterilerin türünden türüne göre de farklılık gösterebilmektedir. Roy ve arkadaşları (2021) tarafından, *S. enterica* Kentucky üzerinde yürütülen bir çalışmada optimum pH (7.0) ve sıcaklıkta (37°C) ortama farklı konsantrasyonlarda glukoz eklendiğinde biyofilm miktarının değişimi gözlenmiştir. Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, ortamda % 0,025 glukoz varlığında biyofilm miktarı artış gösterirken, glukoz miktarı % 0,4'e çıkarıldığında biyofilm miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Ngwai ve arkadaşları (2006) tarafından glukozun *S. Typhimurium* biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri araştırıldığında da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Polistiren yüzeylerde *S. Typhimurium*'un farklı suşlarının biyofilm oluşum miktarları ortamda glukoz varlığında test edilmiş ve bazı izolatlarda glukoz, biyofilmin gelişmesine katkıda bulunurken, bazı izolatlarda ise biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Polivinil klorür (PVC) yüzeylerde biyofilm oluşumu test edildiğinde glukozun, *S. Typhimurium* DT104 suşunun biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlenirken, polistiren

yüzeyde tam tersi bir etki göstererek biyofilm miktarını artırdığı sonucuna ulaşmıştır. Bu sonuçlar, glukoz metabolizmasının biyofilm üzerindeki etkilerinin, bakterinin bulunduğu yüzeye göre de değişebileceğini göstermektedir (Ngwai vd. 2006).

2.3.2 Fukoz

Fukoz, kimyasal formülü $C_6H_{12}O_5$ olan bir şeker türüdür. Bitkilerin hücre yüzeyinde ve birçok bakteriyel ekstraselüler polisakkarit (EPS) veya lipopolisakkarit (LPS) yapılarında bol miktarda bulunduğu tespit edilen fukoz, normal şartlarda elde edilmesi zor olan bir monosakkarittir (Vanhooren ve Vandamme 1999, Roca vd. 2015). *Salmonella* ve *Klebsiella* gibi patojenik bakteriler, fukozu karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. *Klebsiella pneumoniae*'da fukoz metabolizmasının bağırsak kolonizasyonunu desteklediği ve virülans faktörlerinin modülasyonunu sağlayabildiği belirtilmiştir (Hudson vd. 2022). Deatherage Kaiser ve arkadaşları (2013) yaptıkları bir çalışmada, fare bağırsağının *S. Typhimurium* ile enfeksiyonunda fukoz metabolizmasının da rol aldığını göstermişlerdir. Buna ek olarak, *Salmonella*'nın, bağırsak lümeninde glukoz, galaktoz, maltoz gibi şekerlerin kullanımında görev alan proteinleri kodlayan genlerin ve fukoz metabolizmasında yer alan *fuc* genlerinin ifadesi tanımlanmıştır. Söz konusu çalışmada, konak hücrede bulunan çeşitli substratlara, *Salmonella* patojeninin kendi protein ifadesini düzenleyerek tepki verdiği gözlenmiştir. Bağırsak mikrobiyotasında fukoz gibi besin kaynaklarından faydalanan bakterilerin, *Salmonella* enfeksiyonuna karşı bağışıklık tepkisi sonucu azalması, ortamda fukozile edilmiş glikan birikimine sebep olmaktadır. Bunun sonucunda, *Salmonella*, bulunduğu çevredeki fukoz varlığını algılayabilir, bunu besin kaynağı olarak kullanabilir ve ek olarak intestinal kolonizasyonu düzenleyebilir (Pacheco vd. 2012, Deatherage Kaiser vd. 2013).

Fukozun *Salmonella* virulansında etkisine ek olarak, *Salmonella* biyofilmi üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. *S. Typhi* üzerinde yapılan bir araştırmada, gliserol, fukoz, ramnoz, treonin gibi besin kaynaklarının biyofilm yapılarındaki kullanımı incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, *S. Typhi* CR0044 suşunun bahsi geçen karbon kaynaklarını sadece biyofilm yapıdayken katabolize edebildiğini göstermiştir (Kalai Chelvam vd. 2015). Bu bulgular ışığında, fukozun *Salmonella* biyofilmleri üzerine

yürütülecek biyokimyasal ve fizyolojik araştırmalarında detaylı olarak incelenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır.

2.3.3 Ramnoz

Kimyasal formülü $C_6H_{12}O_5$ olan ramnoz, çoğunlukla bakteri ve bitkilerde bulunan bir deoksi şekerdir. Doğada genellikle L-formunda bulunmaktadır. Bakterilerde glukoz-1-fosfattan (Glu-1-P) sentezlenen ramnoz, *S. enterica* ve *E.coli* gibi bazı Gram-negatif bakterilerde lipopolisakkarit yapıdaki somatik (O) antijeninde yaygın olarak bulunmaktadır. Buna ek olarak, *S. Typhimurium* LT2 suşunda, somatik antijenin mannoz, galaktoz, abeküoz ve ramnozdaki oluşan tekrarlı tetrasakkarit birimleri içerdiği saptanmıştır (Jiang vd. 1991, Marolda ve Valvano 1995, Giraud ve Naismith 2000).

Ramnoz birçok bakteri tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilen bir şekerdir (Tan ve Li 2018). *S. Typhimurium* gibi *Salmonella*'nın birçok serovaryetesi ramnozu metabolize edebilmekte ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Fakat *S. Typhosa* gibi bazı serovaryeteler ramnozu karbon kaynağı olarak kullanma yeteneğinde değildir (Englesberg ve Baron 1959, Akhy vd. 1984, Badia vd. 1985, Staib ve Fuchs 2015).

Ramnozun biyofilm yapılarında kullanımı ve bu yapılara olan etkisi araştırıldığında, bazı bakteri türlerinde ramnozun biyofilm oluşumunu desteklediği ortaya konmuştur. Lange ve arkadaşları (2017) tarafından Gram-negatif bakteriyel patojen olan *Flavobacterium columnare* üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, ramnozun biyofilm oluşumunu ve virölansı desteklediği tespit edilmiştir. *Streptococcus mutans* kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise, ramnoz sentezinin engellenmesiyle, biyofilm oluşumunun ve bakteri üremesinin büyük ölçüde baskılandığı saptanmıştır (Bischer vd. 2020).

S. Typhi üzerinde gerçekleştirilen bir başka araştırmada ise, ramnozun; bu bakterinin planktonik formlara kıyasla, biyofilm formlarında daha fazla tercih edildiğini göstermiştir (Kalai Chelvam vd. 2015).

2.3.4 Sitrik asit

$C_6H_8O_7$ moleküler formülüne sahip olan sitrik asit veya diğer bir adıyla sitrat, trikarboksilik asit döngüsünde yer alan bir organik bileşiktir. Trikarboksilik asit döngüsüne aynı zamanda sitrik asit döngüsü de denilmektedir. Sitrik asit genellikle limon gibi asitli meyvelerde ve sebzelerde bulunmaktadır. Sitrik asit de tıpkı malik asit veya suksinik asit gibi gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Peniston vd. 2008, Hussain vd. 2017).

Sitrik asit, trikarboksilik asit döngüsündeki konumundan dolayı, hücre metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Söz konusu bu metabolit, glikoliz ve TCA döngülerinin başlangıç ve bitiminde yer alan enzimlerin regülasyonundan sorumlu olduğu için hücrenin enerji üretiminde büyük bir rol üstlenmektedir (Neidhart 1996, Iacobazzi ve Infantino, 2014). Diğer yandan sitrat, yüksek oranlarda birikimi hücre için tehlike oluşturan demirin hücre dışına alınarak dengede tutulmasında görev almaktadır. Sitratın demir ile beraber hücre dışına taşınması *Salmonella* üremesini yavaşlatmakta ve bu şekilde bakteriyi stres koşullarına karşı daha dayanıklı hale getirmektedir (Frawley vd. 2013, Dandekar vd. 2015).

Sitratın bahsi geçen rollerinden dolayı, bu metabolitin patojenik bakteriler ve biyofilm formları tarafından kullanımı ve metabolizması hakkında bazı araştırmalar yapılmıştır. *Salmonella*'nın sitrik asiti karbon kaynağı olarak metabolize edebildiği bilinmektedir. Paytubi ve arkadaşları (2017) tarafından sitratın *Salmonella* biyofilm formları üzerindeki etkisine bakıldığında, karbon kaynağı içermeyen yüzeyde biyofilm oluşumu gözlenmemiş, ayrıca ortama karbon kaynağı olarak % 0,2 oranında sitrat eklendiğinde biyofilm miktarının kayda değer bir şekilde arttığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar, *Salmonella* biyofilm oluşumunda sitratın karbon kaynağı olarak kullanılabildiğini göstermektedir.

2.3.5 Suksinik asit

$(CH_2)_2(CO_2H)_2$ moleküler formülüne sahip olan suksinik asit veya diğer bir ismiyle suksinat trikarboksilik asit döngüsünde yer alan anahtar metabolitlerden birisidir (Tretter vd. 2016). Mitokondral matrikste üretilen ve suksinat dehidrojenaz (SDH) enzimi aracılığı ile fumarata dönüştürülen suksinat, çoğunlukla gıda endüstrisinde katkı maddesi ve asit regülatörü olarak kullanılmaktadır (Zeikus vd. 1999).

Bakteriyel fermentasyonda yüksek miktarlarda üretilen suksinatın, enflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) gibi rahatsızlıklarda bağırsak lümeninde yüksek seviyelerde bulunduğu tespit edilmiştir (Connors vd. 2018). Bir çalışmada, mikroptan arındırılmış farenin dışkısında suksinata rastlanmazken, normal farede suksinat varlığı tespit edilmiştir (Faith vd. 2014).

Memeli bağırsağında tespit edilen suksinat, olası patojen enfeksiyonunda bakterilerin enerji kaynağı olarak kullanabilecekleri bir metabolittir (Schubert ve Unden 2022). *S. Typhimurium* da bu besin kaynağını katabolize edebilen ve kolonizasyon sırasında kullanabilen patojenlerden birisidir (Spiga vd. 2017). Konak hücrenin makrofajlarında, bakteriyel enfeksiyonu takiben metabolik düzenlemeler meydana gelir. Bu düzenlemeler sırasında Krebs döngüsü ürünleri makrofajlarda birikir. Suksinat da bu düzenlemeler sonucunda biriken metabolitlerden biridir (Mitosch vd. 2023). Jiang ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada, *Salmonella* ile enfekte olan makrofajlarda yüksek bir oranda suksinat varlığına rastlanılmıştır. Bu konuyla ilgili yapılan diğer araştırmalarda ise, *Salmonella*'nın makrofaj içerisinde suksinatı karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmadığı ortaya konulmuş, bunun yerine söz konusu metabolitin, *Salmonella* virölansı ile ilişkili genlerin uyarılması için bir sinyal molekülü olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Bowden vd. 2010, Mills ve O'Neill 2014, Rosenberg vd. 2021).

S. Typhimurium'da trikarboksilik asit döngüsü ile virölansı arasındaki ilişkinin tepitini esas alan bir çalışmada, TCA döngüsünde yer alan enzimleri kodlayan genler mutasyona uğratılmış ve sonucunda hangi mutasyonların patojenin virölansını ne şekilde etkilediği

incelenmiştir. SR-11 suşunun kullanıldığı bu araştırmada, suksinil-CoA'yı suksinata dönüştüren enzim olan suksinil-CoA sentazı kodlayan *sucCD* geninin mutasyonu sonucunda, *S. Typhimurium*'un virülansının zayıfladığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, suksinatı fumarata dönüştüren suksinat dehidrojenaz enzimini kodlayan genin (*sdhCDA*) mutasyonu sonucunda da SR-11 suşunun virülansında azalma meydana gelmiştir (Mercado-Lubo vd. 2009). Bu sonuçlar, suksinat metabolitinin ve bununla ilişkili enzimlerin *Salmonella* virülansında etkin bir rol oynadığını göstermektedir.

Suksinik asit, patojen virülansında rol oynamasının yanı sıra, biyofilm yapıların oluşumunda da kullanıldığı düşünülen bir karbon kaynağıdır. *Staphylococcus aureus* biyofilmleri üzerine yapılan bir araştırmada, suksinat dehidrojenaz genlerinin ifade düzeyindeki artışların, (*sdhCAB*) biyofilm oluşumunu teşvik ettiğine dikkat çekilmiştir (Gaupp vd. 2010). *S. Typhimurium* ile yapılan başka bir çalışmada ise, ortamda % 0,2 oranında suksinat varlığında polistiren yüzeyde biyofilm oluşumuna bakılmış ve karbon kaynağı içermeyen ortamda biyofilm oluşumu gözlenmezken, suksinat varlığında biyofilm oluşumunun gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Paytubi vd. 2017). Bu sonuçlar doğrultusunda suksinatın, *Salmonella* biyofilm formları tarafından karbon kaynağı olarak kullanıldığını söylemek mümkündür.

2.3.6 Malik asit

Moleküler formülü $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ olan malik asit tüm canlılarda bulunan organik bir bileşiktir. Diğer bir ismiyle malat olarak bilinen malik asit, özellikle gıda endüstrisinde ekşi tat vermesi için meyve gibi gıdalarda katkı maddesi olarak sıkça kullanılmaktadır (Kövilein vd. 2019). Bunlara ek olarak, biyokimyada önemli bir role sahip olan malik asit, trikarboksilik asit döngüsünde yer alan bir ara üründür (Krebs 1954).

Çoğu mikroorganizma malik asitten karbon ve enerji kaynağı olarak yararlanmaktadır (Clark ve Cronan 2005). Bu mikroorganizmalardan bir tanesi de *Salmonella*'dır. *S. Typhimurium* LT2 üzerinde yapılan bir çalışmada, malik asitin bakteri tarafından enerji kaynağı olarak kullanılabildiği belirtilmiştir (Gutnick vd. 1969).

Salmonella serovaryeteleri kullanılarak yürütülen bazı araştırmalarda, malatın biyofilm yapıları üzerinde de etkisi olduğu tespit edilmiştir. Paytubi ve arkadaşları (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada, malatın *Salmonella* biyofilmi üzerindeki etkisini anlamak için M9 minimal ortamına % 0,2 oranında malat eklenmiş ve polistiren yüzeyde biyofilm oluşumuna bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *Salmonella*'nın ortamda herhangi bir karbon kaynağı bulunmadığında biyofilm oluşturmadığı, malat eklendiğinde ise biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Bu veriler, *Salmonella*'nın biyofilm oluşumunda malatı karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığını göstermektedir (Paytubi vd. 2017).

Malatın çoğunlukla gıda endüstrisinde kullanılan bir organik bileşik olması ve *Salmonella* gibi gıda patojeni olan bakterilerin dirençli yapılar oluşturmak için bu metabolitten faydalanması bu alanda halk sağlığını tehdit eden durumlara yol açabilmektedir. Bu nedenle malik asitin biyofilm üzerindeki etkilerini anlamak önem teşkil etmektedir. Malik asitin, *Salmonella* metabolizmasında önemli bir rol oynayan trikarboksilik asit döngüsünde yer alan bir metabolit olması bu döngüdeki enzimlerin ve bu enzimlerin sentezinde görev alan genlerin araştırılmasına yön vermiştir. Sarkhel ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, malat sentaz (MS) enziminin *S. Typhimurium*'un zorlu çevresel koşullarda hayatta kalmasına nasıl bir etkisi olduğu araştırılmış ve sonuç olarak malat sentaz enziminin besin yetersizliği ve oksidatif stres koşullarında *Salmonella*'nın hayatta kalması ve üremesine katkıda bulunduğu ortaya konulmuştur. Bahsi geçen bu enzim, *Salmonella*'nın konak hücrede hayatta kalması ve çoğalabilmesi için geliştirdiği metabolik yollardan biri olan ve glukoz gibi bileşiklerin sentezi için asetati kullanan glioksilat döngüsünde görev almaktadır. Glioksilat döngüsü, *Salmonella* gibi patojen bakterilerin, makrofaj içersinde hayatta kalması ve virülansı için gerekli besin kaynaklarının ve çeşitli moleküllerin sentezinde gerekli olan enerjiyi sağlayabilmek adına geliştirdiği bir metabolik yoldur (Lorenz ve Fink 2002). Glioksilat alternatif geçişi (bypass) veya glioksilat yan yolu (shunt) olarak da bilinen bu yolda, TCA döngüsünde karbondioksit üretilen adımlar atlanılmaktadır (Şekil 2.4) (Cronan ve Laporte 2005). Bu yolak, ortamda sadece etanol ve asetat gibi karbon kaynaklarının bulunması durumunda devreye girerek bakteriyel üremenin devam etmesine olanak sağlamaktadır (Kornberg 1966). Bu sayede, patojenler, besin kaynağı yetersizliği gibi zorlu koşullarda, alternatif kaynakları da kullanabilir ve hayatta kalabilirler (Kwon ve Ricke 1998).

2.3.7 Asetik asit

CH₃COOH kimyasal formülüne sahip asetik asit, sirkenin ana bileşenini oluşturan organik bir bileşiktir. Bakteriyel fermantasyon yoluyla üretilen asetik asit, diğer trikarboksilik asit döngüsü elementleri gibi gıda endüstrisinde ve temizlik ürünlerinde sıkça kullanılan bir bileşiktir. Asetik asit karbonhidrat ve yağ metabolizmasında yer almaktadır (Riitenberg ve Block, 1944). Gıda endüstrisinde ve hijyen ürünlerinde asetik asitin kullanılması, bu metabolitin bakteriyel patojenler üzerindeki etkisinin daha detaylı araştırılmasını gerektirmektedir (Merli vd. 2021).

Özellikle *Salmonella* gibi gıda kökenli patojenlerin, asetik asiti karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı bilinmektedir. Asetik asitin *Salmonella* biyofilmi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, asetik asitin (pH 3.9) *Salmonella* biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Hasegawa vd. 2011). Benzer şekilde asetik asitin antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise, asetik asitin, *P. Aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* gibi patojenlerin planktonik ve biyofilm formları üzerindeki etkisi incelenmiş ve çalışmanın sonucunda asetik asitin % 0,16- % 0,31 oranlarında denenen tüm bakterilerde planktonik üremeyi engellediği ve % 0,31 oranında ise tüm bakterilerde biyofilm oluşumunu engellediği saptanmıştır (Halstead vd. 2015). Bu sonuçlar, asetik asitin biyofilm eradikasyon yöntemi olarak kullanabileceğini işaret etmektedir.

2.4 Matematiksel Modelleme

Matematiksel modelleme, biyofilmlerin kompleks yapılarının ve dinamiklerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmak için önemli bir araçtır (Jin vd. 2020). Matematiksel modellemede kullanılan diferansiyel denklemler, birçok fiziksel fenomeni tahmin etmek ve bu fenomenler hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak adına yararlanılan matematiksel araçlar olarak nitelendirilmektedir (Brown, 2007). Lojistik diferansiyel denklemler, popülasyon modellenmesinde en çok kullanılan diferansiyel denklemlerden biridir. Bu diferansiyel denklemler, inceleme altına alınan nüfusun, çevresel taşıma kapasitesine erişene kadar logaritmik artışını açıklamaktadır. Ancak bu modeller, inceleme altına alınan popülasyonun kendi nüfusunu dengelemek için almış olabileceği kararları veya

taşıma kapasitesinin dinamik olabilecek yapısını göz önünde bulundurmadığı için, adaptif nüfusları (biyofilm gibi) modelleme çalışmaları için yetersiz kalabilir. Genel bir lojistik diferansiyel denklem yapısı N inceleme altındaki sistemin boyutu, r içsel yani dış etkilerden arındırılmış büyüme oranı ve K taşıma kapasitesi yani çevresel koşulların el verebileceği en yüksek nüfus boyutu olmak üzere aşağıdaki gibidir:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left(1 - \frac{N(t)}{K} \right)$$

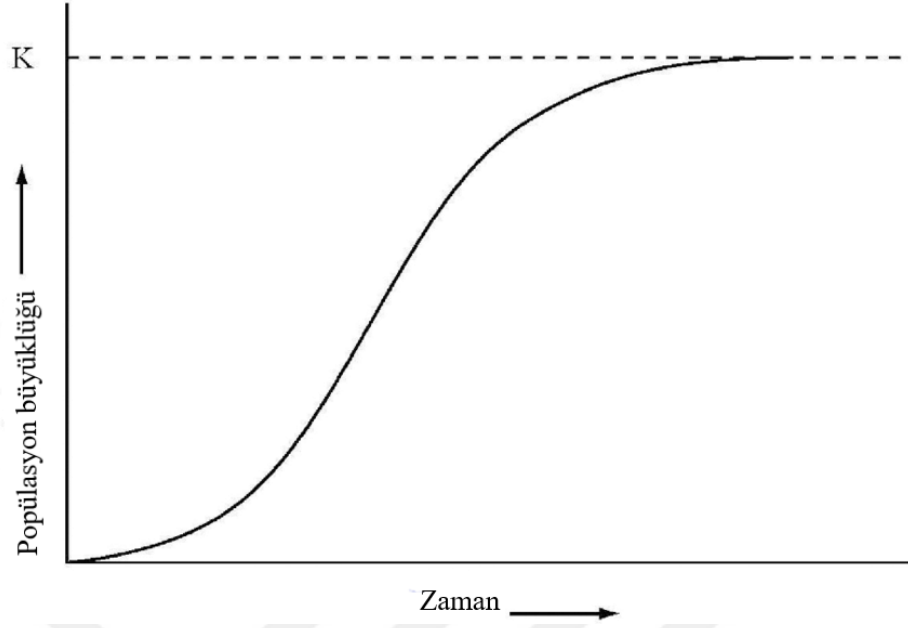
Denklem 2.1

Bu denklem, azalma oranının daha iyi anlaşılabilmesi için aşağıdaki şekilde de ifade edilebilir:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) - \frac{rN(t) \cdot N(t)}{K}$$

Denklem 2.2

Burada temelde yatan fikir inceleme altına alınan nüfustaki büyümenin t anındaki nüfus ile içsel büyüme oranının etkileşimine (yani $rN(t)$ terimine) bağlı olduğu, ancak bu artışların t anındaki nüfusun taşıma kapasitesine yaklaşması durumunda azalışa dönüşeceğini ifade etmektedir. Burada önemli bir husus, büyümenin hızının azaldığıdır; nüfusta azalma gerçekleşmemekte, taşıma kapasitesine yaklaşıldıkça sistemin bir doyma noktasına eriştiğidir (Coleman 2006). Şekil 2.5 bu durumu görsel olarak özetlemektedir.



Şekil 2.5 Lojistik büyüme grafiği (Sillitoe 2022)

Bu büyüme modeli, nüfusu modellemek için iyi bir başlangıç noktası olarak düşünülebilir; ancak gerçek bir sistemi modellemek için yeterli olmayacaktır, zira biyofilm gibi nüfus benzeri sistemlerde gerek büyümenin küçülmeye dönebilmesi gerek çevresel koşullara zaman içinde sağlanan uyumlar büyüme eğrisinin farklı topolojiler gösterebilmesine sebep olmaktadır. Bu gibi sorunlara karşı çözüm olarak Hutchinson (1948) ekolojide "döngüsel" nedensellik ilişkilerini açıklama amacı güderek, gecikmeli lojistik diferansiyel denklemleri ortaya koymuştur. Döngüsel nedensellik, bir sonucun kendini oluşturan nedenleri tekrar doğurmasını ifade eder. Süreç tamamlanana kadar belirli bir zaman geçtiği için, sonuçlar "gecikmeli" olarak meydana gelir. Hutchinson, biyolojik sistemlerin değişen çevresel koşullara kendilerini adapte etme durumlarının belirli bir gecikmenin ardından gerçekleşeceğini göz önünde bulundurarak, lojistik diferansiyel denkleme bir gecikme parametresi eklemiştir. Dolayısıyla, Hutchinson-Wright denkleminin, yani gecikmeli lojistik diferansiyel denklemlerin, adaptasyon becerisi olan ve çevresel geribildirim süreçleri içerisinde bulunan nüfusları modellemede başarılı olacağı beklenmektedir (Hutchinson 1948). Buna ek olarak, gecikmeli lojistik diferansiyel denklemlere eklenen gecikme parametresi, sürece osilasyonlar ekleyerek, sigmoid ya da döngüsel özellikler içeren sistemlerin daha iyi açıklanmasını sağlamaktadır. Gecikmeli lojistik diferansiyel denklemlerin yapısı, N, r, t, τ, K sırasıyla

popülasyon boyutu, içsel büyüme hızı, zaman, gecikme süresi ve taşıma kapasitesi olmak üzere sırasıyla aşağıdaki gibidir:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left(1 - \frac{N(t - \tau)}{K} \right)$$

Denklem 2.3

Bu eşitlik dağılma özelliği kullanılarak aşağıdaki şekilde de ifade edilebilir:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) - \frac{rN(t)N(t - \tau)}{K}$$

Denklem 2.4

Burada, $N(t)$ herhangi bir t anındaki popülasyon boyutu olup, büyümedeki artış $N(t)$ 'nin sabit bir oran olan r katı kadar gerçekleşmektedir. Büyüme, geçmiş bir anı ifade eden $t - \tau$ 'da taşıma kapasitesi K 'ya ne kadar yaklaşırsa, inceleme altına alınan nüfustaki azalma da o kadar olmaktadır. Taşıma kapasitesine geçmiş bir anda erişildiğinde $1 = \frac{N(t - \tau)}{K}$ olup, büyüme tamamen durmaktadır. Bunun ardından ise inceleme altına alınan popülasyon azalmaya başlamaktadır.

Bu çalışmada, sistemin yörüngesini daha esnek bir şekilde tarif edebileceği düşüncesiyle, denklem aşağıdaki şekilde yeniden parametrelendirilmiştir:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t) \left(b - \frac{N(t - \tau)}{K} \right) = rN(t)b - \frac{rN(t)N(t - \tau)}{K}$$

Denklem 2.5

Sözkonusu bu parametrelerin deneysel olarak elde edilmiş gözlemleri hata terimlerini (yerleştirilen eğrideki $\hat{y}_i$ noktaları ile gözlemlenen y_i noktaları arasındaki fark $d_i = y_i - \hat{y}_i$ ve bu farkın kareleri veya mutlak değerleri) minimize edecek şekilde bulunmasına model uydurma denir. Olası bütün parametre değerlerinin oluşturduğu kümeye ise parametre uzayı denir. Parametre uzayının her elemanı farklı bir yörüngeye denk

gelmektedir, ancak altta yatan denklem yapısı aynı olduğu için özdeş oldukları düşünülebilir; sadece elde edilen gözlemi açıklama durumları değişmektedir (Bertram t.y.).

Dikkat edilirse Denklem 2.2’de $rN(t)$ olan terimin Denklem 2.3’te $rN(t)b$ haline geldiği gözlemlenebilir. Bu dönüşüm, N, τ, K, r şeklindeki 4 boyutlu bir parametre uzayını N, τ, K, r, b şeklinde 5 boyutlu bir parametre uzayı haline getirmiştir. r ile b teriminin etkileşime girmesi, modelin lineer olmayan dinamikleri daha iyi ifade edebilmesini sağlamaktadır (Hutchinson 1948).



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriyel suşlar ve kültür koşulları

Yüksek lisans tez çalışmasında kullanılan doğal tip *Salmonella* Typhimurium 14028 suşu Ankara Üniversitesi Prokaryotik Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanmıştır.

Bahsi geçen *Salmonella* kültürleri Luria-Bertani (LB) Broth besi ortamında 37°C’de, 200 rpm çalkalama hızında ve 18 saat süreyle üretilmiştir.

3.1.2 Karbon kaynakları

Tez çalışması kapsamında *Salmonella* biyofilmi üzerindeki etkinliği denenecek karbon kaynakları ve besi yerindeki final konsantrasyon miktarları Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan karbon kaynakları ve konsantrasyonları

Karbon Kaynağı	Final Konsantrasyon (w/v)
Glukoz	% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6
Fukoz	% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6
Ramnoz	% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6
Sitrik Asit	% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6
Suksinik Asit	% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6
Malik Asit	% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6
Asetik Asit	% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6

3.1.3 Besiyeri ve çözeltiler

Luria Bertani (LB) Broth (Condalab, Spain)

İçerik	g/L
Sodyum Klorür	10
Trypton	10
Maya ekstraktı	5

Besiyeri içerikleri 1000 mL steril suyla tamamlandıktan sonra pH $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Bu aşamadan sonra hazırlanan besiyeri cam tüplere dağıtılmış ve sterilizasyon işlemi otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir.

M9 Minimal Ortamı

İçerik	
M9 Tuzları (5X)	200 mL
1 M MgSO ₄	2 mL
1 M CaCl ₂	100 µL
ddH ₂ O	780 mL

Besiyeri içerikleri ayrı ayrı hazırlanıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra steril 1 litrelik şişede birleştirilmiştir.

M9 Tuzları (5X)

İçerik	g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	32
KH ₂ PO ₄	7,5
NaCl	1,25
NH ₄ Cl	2,5

M9 minimal ortamı içeriğinde kullanılacak olan M9 tuzları total hacim 500 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Besiyeri içerikleri 200 mL distile suya eklendikten sonra distile su

ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

1 M MgSO₄

MgSO₄.7H₂O 2, 46 gr

10 mL distile suda çözdürülmüş ve sterilize edilmiştir.

1 M CaCl₂

CaCl₂.2H₂O 1, 47 gr

10 mL distile suda çözdürülmüş ve sterilize edilmiştir.

Fosfatla Tamponlanmış Su (PBS)

İçerik	g/L
NaCl	80
KCl	2
Na ₂ HPO ₄	14,4
KH ₂ PO ₄	2,4

Ortam içerikleri distile su ile 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra sterilizasyon işlemi 121 °C'de 15 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir.

Glasiyel Asetik Asit Solüsyonu

% 33'lük Glasiyel Asetik Asit 1000 mL

Kristal Viyole

Kristal viyole 0, 1 gr

100 mL distile su da çözdürüldü ve sterilizasyon için 0, 45 µm'lik filtreden geçirildi.

3.2 Yöntem

3.2.1 Polistiren yüzeylerde biyofilm oluşum miktarlarının belirlenmesi

S. Typhimurium 14028 suşunun karbon kaynaklarının (glikoz, fukoz, ramnoz, sitrik asit, suksinik asit, malik asit ve asetik asit) farklı konsantrasyonları (% 0,1 - % 0,6) varlığında polistiren yüzeylerdeki biyofilm oluşum miktarlarını belirlemek için; söz konusu suş öncelikle 5 mL'lik Luria-Bertani (LB) Broth besi ortamında 37°C'de, 200 rpm çalkalama hızında ve 18 saat süreyle üretilmiştir. Aktif kültürler optik densiteleri $OD_{595} = 0,2$ olacak şekilde seyreltilerek deneme konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Eş zamanlı olarak M9 ortamındaki total konsantrasyonları % 0,1 - % 0,6 olan karbon kaynakları 96 kuyuluk mikrotitre plaka kuyucuklarına 100 µL olacak şekilde aktarıldı. Her konsantrasyon için 3 paralel ve 2 tekrarlı deneme deseni oluşturuldu. Seyreltilen bakteri örneklerinden M9 ortamı içeren kuyucuklara 30 µL eklendi. Bu işlemden sonra plakalar 12, 24, 36, 48, 60 ve 72 saat süreyle 20 °C'de statik koşullar altında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonlandığında oluşan biyofilm miktarlarının belirlenmesi için bağlanmamış hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla kuyucuklar steril fizyolojik serum (% 0.85) (Merck, Almanya) ile üç kere yıkandı ve daha sonra oda sıcaklığında 5 dakika boyunca kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminden sonra, biyofilm matriksi %95 metanol eklenerek 15 dakika boyunca fikse edildi. Sabitlenen bu yapılar 130 µL kristal viyole (% 0, 1) eklenerek boyandı ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Kuyucuklar, bağlanmamış boyaları uzaklaştırmak için üç kez distile su ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra bu yapılara, 130 µL glasiyel asetik asit (% 33) ilave edildi ve plakalar 45 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Bu sürenin bitiminde, biyofilme tutunan boya miktarı OD_{595} nm'de, Elisa okuyucu (Biorad, California, ABD) ile ölçülerek oluşan biyofilm miktarları belirlendi (Stepanovic vd. 2000). Biyofilm oluşum miktarlarının belirlenmesi sonucu tasarlanan matematiksel modellemelerden sonra yapılan deneyler ile tasarlanan bu modellerin uyumunu test etmek amacıyla biyofilm denemelerinin tekrarı gerçekleştirildi.

3.2.2 Biyofilm oluşum miktarlarının matematiksel modellemesi

İncelenen türlerin gözlemler ve deneyler ile açıklanmasının yanı sıra, bu bulguların matematiksel modeller ile desteklenmesi bu türlerin farklı ortamlardaki davranışlarının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Bu doğrultuda, bu çalışmada incelenen *Salmonella* bakterisi için elde edilen deneysel verileri matematiksel olarak en iyi şekilde ifade eden bir büyüme modelinin kullanılması amaçlanmıştır.

Literatürde popülasyonların büyüme modelleri için birçok matematiksel model bulunmakta olup, bunların en bilinenlerinden biri matematikçi Pierre François Verhulst tarafından verilen lojistik denklemdir. $P(t)$, popülasyonun t zamanındaki boyutuna karşılık gelmek üzere bu denklem,

$$\frac{dP}{dt} = rP(t) \left(1 - \frac{P(t)}{K} \right)$$

Denklem 3.1

şeklinde ifade edilmekte olup burada, K çevrenin taşıyabildiği maksimum kapasite iken r çevre etkisiz büyüme oranına karşılık gelmektedir (Verhulst 1847). Denklem 3.1 lojistik denkleminin a ($a > 0$) gecikme sabiti ile göz önüne alınması durumunda, Hutchinson-Wright denklemi olarak da bilinen,

$$\frac{dP}{dt} = rP(t) \left(1 - \frac{P(t-a)}{K} \right)$$

Denklem 3.2

gecikmeli lojistik denklem elde edilmektedir (Hutchinson 1948, Wright 1946). Burada a gecikme sabitinin denkleme eklenmesi, önceki popülasyonların daha sonraki popülasyonları etkileyebileceği anlamına gelmektedir (Denklem 3.2). Örneğin, nüfus büyüklüğünün besin kaynaklarını etkilemesi hemen hissedilmese de, belirli bir a süresinden sonra hissedilebilir (Allen 2007).

Bu çalışmada ele alınan *Salmonella* bakterisi için,

$$\frac{dP}{dt} = rP(t) \left(b - \frac{P(t-a)}{K} \right)$$

Denklem 3.3

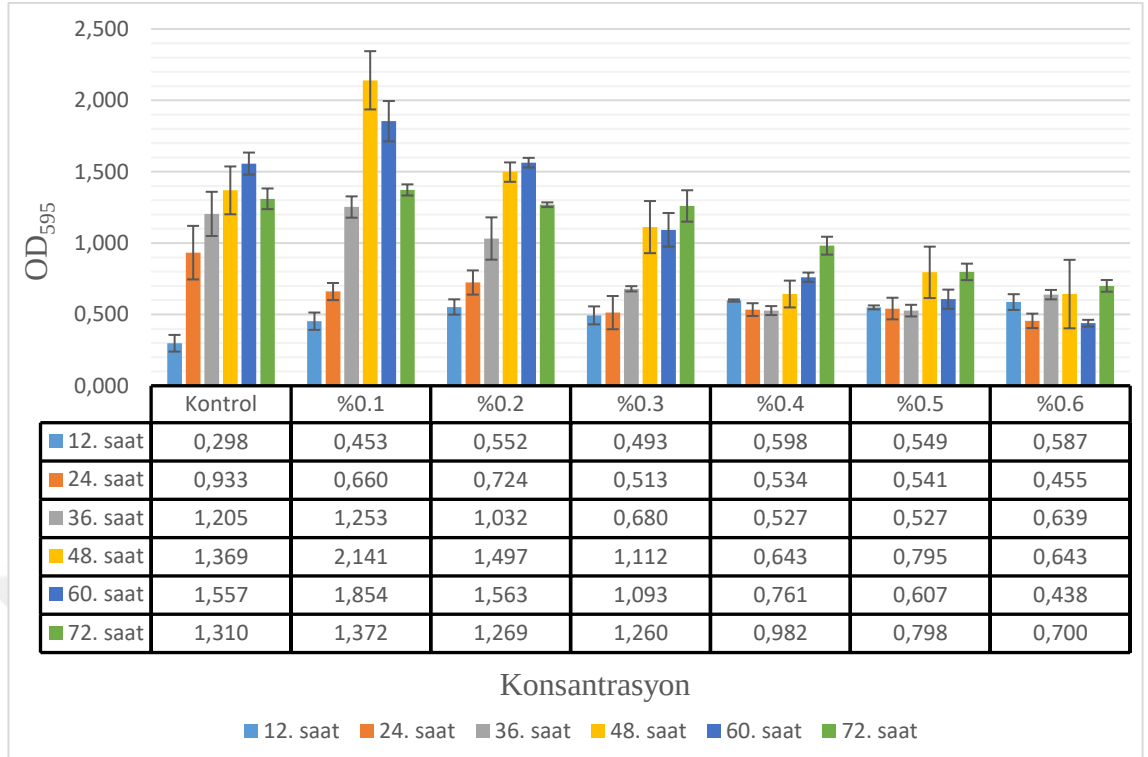
gecikmeli lojistik denklemi (Denklem 3.3) göz önüne alınmış olup, bu bakterinin glukoz, fukoz, ramnoz, sitrik asit, suksinik asit, malik asit ve asetik asit maddelerinin farklı konsantrasyonları altındaki büyümesinin ayrı ayrı incelemesi yapılmıştır.

Denklem 3.3 Maple yazılımı kullanılarak verilere uydurulmuştur. (Veriler ve denklem çizgisi arasındaki uzaklığı minimize eden parametre değerleri bulunmuştur.). Buna ek olarak, modelin uygunluğu Pearson korelasyon katsayısı ile ölçülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Glukozun *S. Typhimurium*'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi

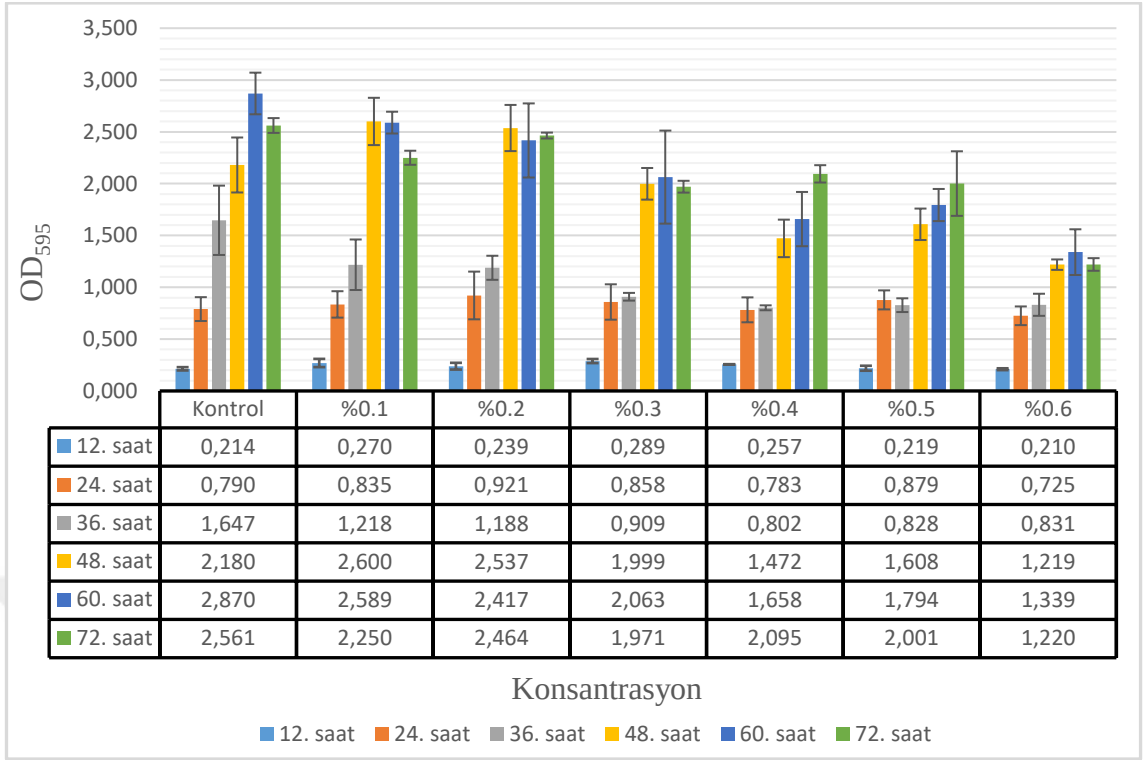
Bu denemelerde, *S. Typhimurium* 14028 suşunun, glukozun farklı konsantrasyonlarının varlığında biyofilm üretme kapasitesi belirlenmiştir. Kontrol grubu, içerisinde herhangi bir karbon kaynağı bulunmayan M9 ortamında geliştirilen *S. Typhimurium* 14028 suşunu içermektedir. Kontrol grubunun 72 saat içerisindeki biyofilm değişim miktarına bakıldığında, biyofilm miktarının 60. saate kadar artış gösterdiği ve daha sonrasında azalışa geçtiği gözlemlenmektedir. *Salmonella* suşlarının geliştirildiği M9 ortamına final konsantrasyonu % 0,1 olacak şekilde glukoz eklendiğinde, biyofilm miktarının 48. saatte maksimum değere ulaştığı ve daha sonra azalma davranışı gösterdiği belirlenmiştir. % 0,2 oranında glukoz varlığında ise, biyofilm miktarı kontrol grubu ile benzer bir şekilde 60. saatte en yüksek değere ulaşmış ve sonrasında azalma meydana gelmiştir. Ortamdaki glukoz oranı % 0,3'e çıkartıldığında, biyofilm miktarı 72. saatte en yüksek değerine ulaşmıştır. Glukoz oranının % 0,4 ve % 0,5 olduğu ortamdaki biyofilm ölçümlerine bakıldığında ise, miktarın 72. saatte en yüksek değere ulaştığı ve bu zamana kadar yapılan ölçümlerde biyofilm miktarındaki değişimlerin zaman zaman artış ve azalış halinde olduğu belirlenmiştir. Ortamdaki glukoz konsantrasyonu % 0,6 oranına çıkarıldığında ise *Salmonella*'nın biyofilm miktarı 48. saate kadar artış göstermiş ve daha sonrasında azalmıştır. 72. saatte ise biyofilm miktarında tekrar bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Glukozun (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumuna etkisi

4.2 Fukozun *S. Typhimurium*'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi

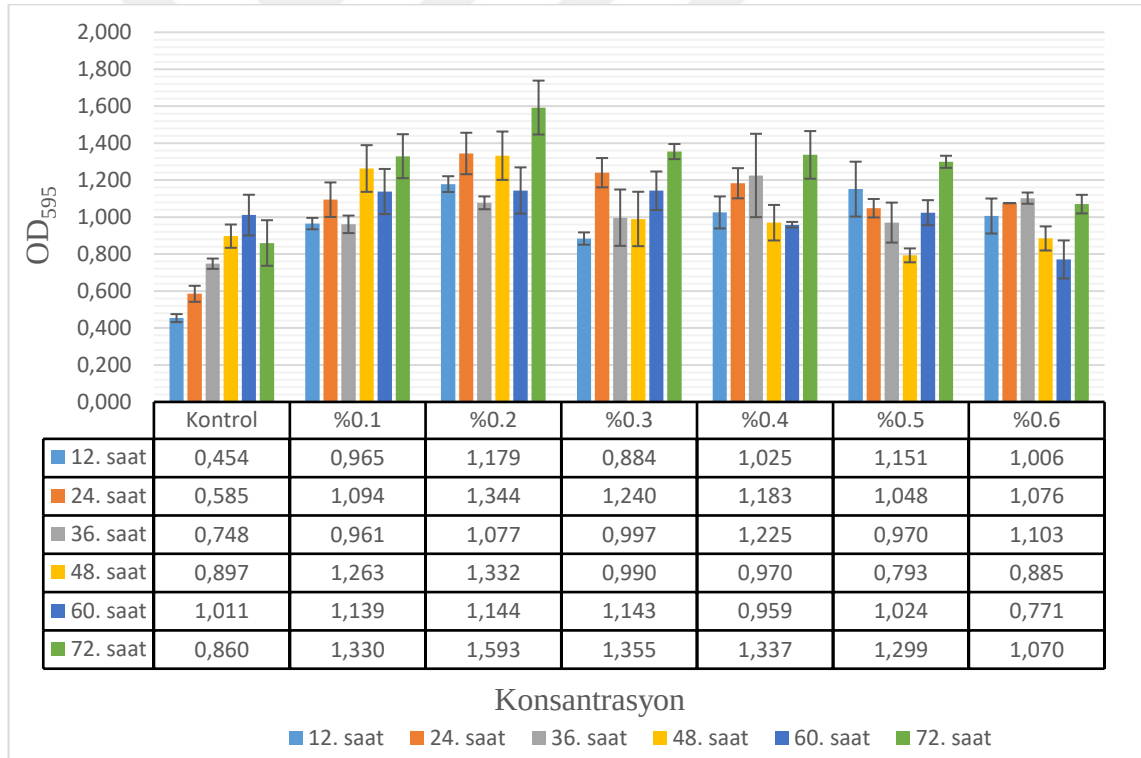
Fukozun ortamdaki farklı konsantrasyonlarının *Salmonella*'nın biyofilm oluşturma kapasitesi üzerindeki etkisi incelendiğinde, karbon kaynağı içermeyen ortamda geliştirilen kontrol suşlarındaki biyofilm miktarının 60. saatte en yüksek değerine ulaştığı ve daha sonra azalış gösterdiği saptanmıştır. Fukozun M9 ortamındaki oranı % 0,1 ve % 0,2 olduğunda, biyofilm miktarındaki en yüksek değere 48. saatte ulaşılmıştır. Fukoz oranı % 0,3'e çıkarıldığında, biyofilm miktarının 60.saat sonunda maksimuma ulaşmıştır. % 0,4 ve % 0,5 oranlarındaki fukoz varlığında, biyofilm miktarı 72. saate kadar genellikle artış eğilimi göstermiş, en yüksek değerlerine de bu zamanda ulaşmıştır. Ortamdaki fukoz oranı % 0,6'ya çıkartıldığında ise biyofilm miktarındaki en yüksek değer 60. saatte görülmüş, daha sonrasında ise bu miktarın azalmaya başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Fukozun (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumuna etkisi

4.3 Ramnozun *S. Typhimurium*'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi

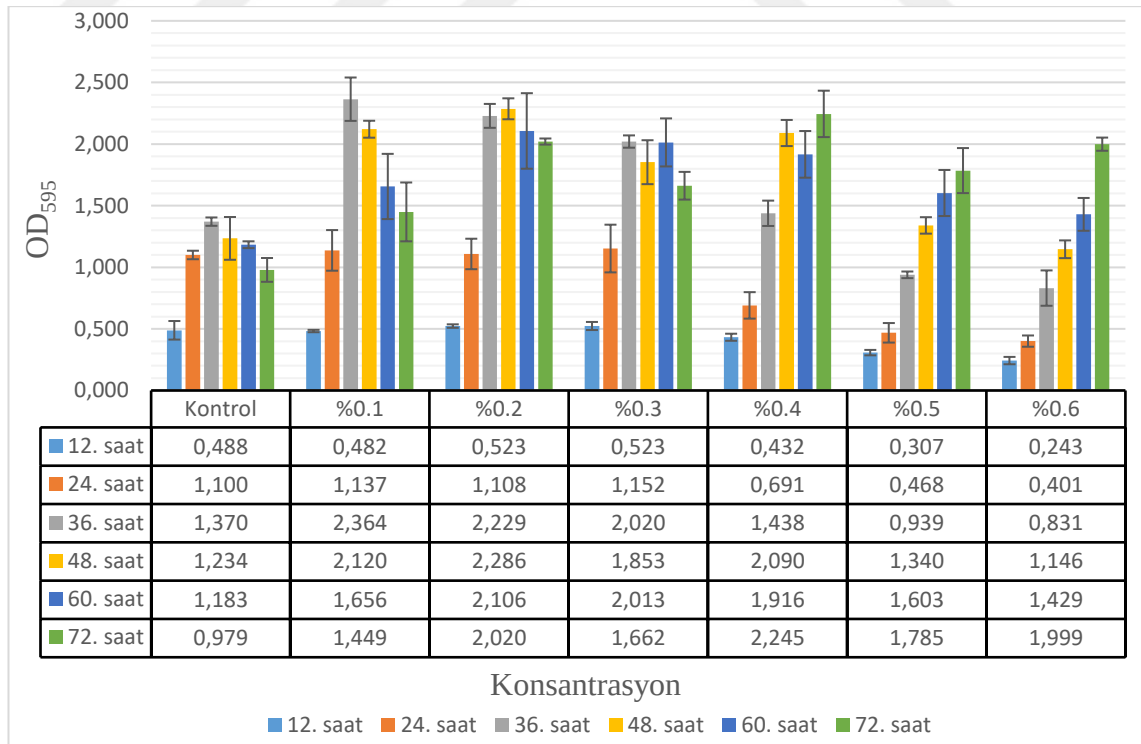
Salmonella'nın kullandığı karbon kaynaklarından bir diğer şeker olan ramnozun varlığındaki biyofilm oluşturma kapasiteleri incelendiğinde, kontrol grubundaki biyofilm miktarının 60. saatte maksimum değere ulaştıktan sonra azalma eğilimine girdiği tespit edilmiştir. Ortamdaki ramnoz oranının % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4 ve % 0,5 olduğu değerler incelendiğinde, 72 saatlik süre boyunca *S. Typhimurium*'un biyofilm miktarında zaman zaman artış ve azalışların meydana geldiği ve en yüksek değerine 72. saatte ulaştığı gözlenmiştir. % 0,6 oranındaki ramnoz varlığında ise biyofilm miktarında 36. saate kadar artış olduğu ve bu saatten 60. saate kadar olan zaman diliminde biyofilm miktarının azaldığı saptanmıştır. 72. saatte ise bu miktarın artışa geçtiği belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Ramnozun (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumuna etkisi

4.4 Sitrik asitin *S. Typhimurium*'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi

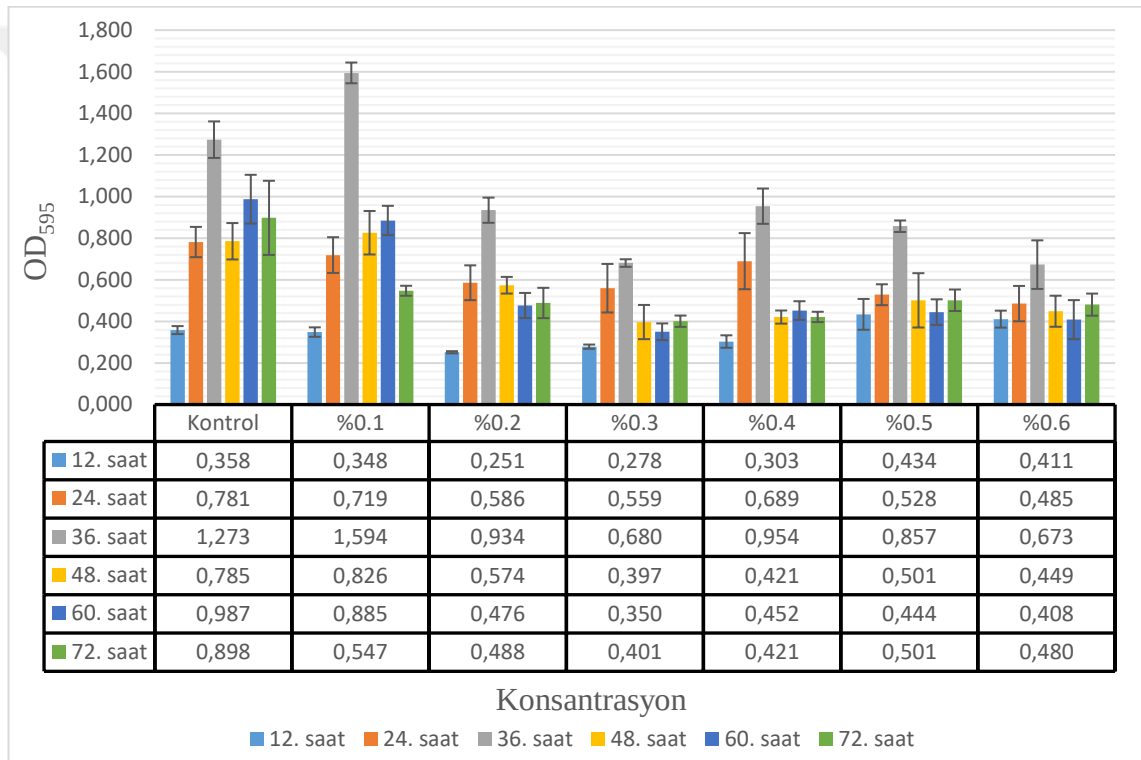
TCA'da yer alan ve *Salmonella*'nın karbon kaynağı olarak kullandığı bir metabolit olan sitrik asitin biyofilm miktarı üzerindeki etkilerine bakıldığında, herhangi bir karbon kaynağı içermeyen ortamda geliştirilen kontrol grubundaki biyofilm miktarının 36. saatte en yüksek değerine ulaşmış, daha sonraki saatlerde azalma gösterdiği belirlenmiştir. Sitrik asitin ortamda % 0,1 oranında bulunduğu durumda ise *Salmonella*'nın oluşturduğu biyofilm miktarı kontrol grubuna benzer şekilde 36. saatte maksimum değerine ulaşmış ve ardından azalışa geçmiştir. % 0,2 oranında sitrik asitin varlığında ise biyofilm miktarı 48. saatte en yüksek değere ulaşmıştır. Ortamdaki sitrik asit oranının % 0,3 olduğu durumda biyofilm miktarı 36. saatte en yüksek değere ulaşmış, daha sonraki zaman diliminde ise zaman zaman artış ve azalma davranışı göstermiştir. % 0,4 sitrik asit oranındaki biyofilm davranışı da % 0,3 oranındaki davranışa benzer olarak 48. saate kadar artış göstermiş, 60. saate azalmış, fakat 72. saatte tekrardan artışa geçmiştir. Ortamdaki sitrik asit oranı % 0,5 ve % 0,6 olduğunda ise 72. saate kadar biyofilm miktarında artış gözlenmiş ve en yüksek değere de bu saatte ulaşmıştır (Şekil4.4).



Şekil 4.4 Sitrik asitin (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumuna etkisi

4.5 Suksinik asitin *S. Typhimurium*'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi

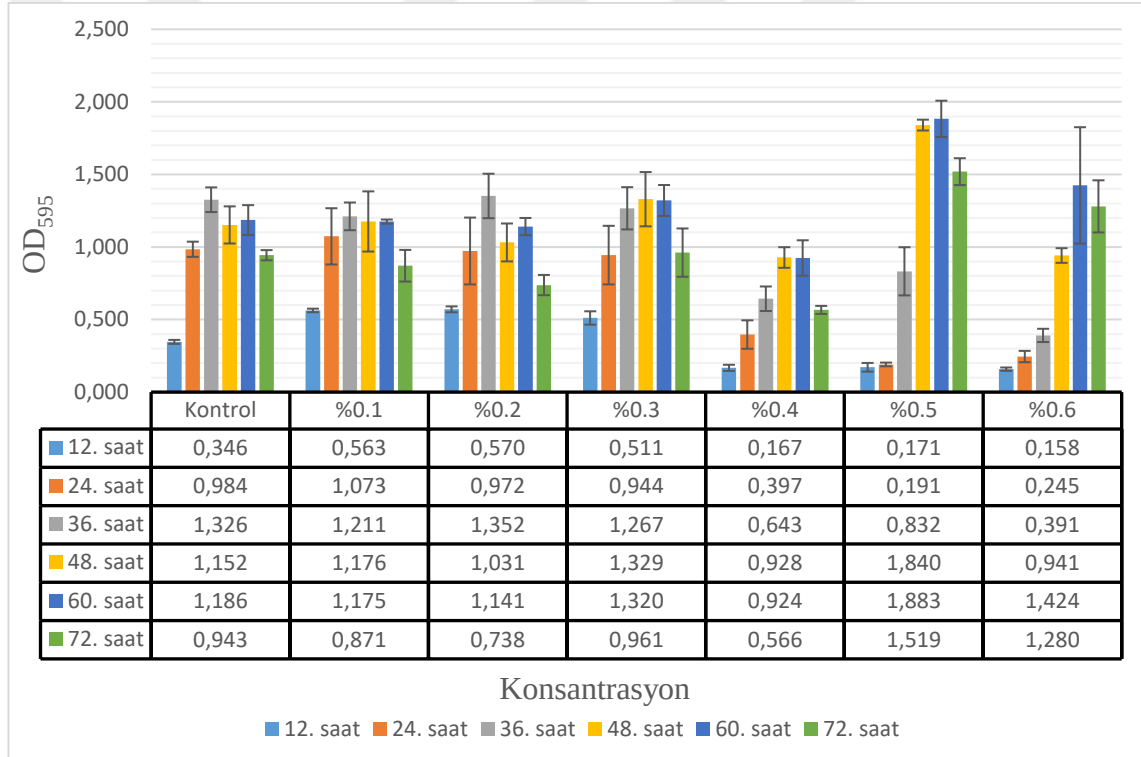
Suksinik asitin *Salmonella*'nın biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri incelendiğinde, kontrol grubunun biyofilm miktarının 36. saatte en yüksek değerine ulaştığı ve daha sonra azaldığı tespit edilmiştir. Bahsi geçen bu metabolitin ortamdaki oranı % 0,1'e çıkartıldığında biyofilm miktarının 36. saatte en yüksek miktarına ulaştığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, suksinik asitin ortamdaki diğer oranlarında da (% 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) biyofilm miktarının 36. saatte en yüksek seviyesine ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Suksinik asitin (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumuna etkisi

4.6 Malik asitin *S. Typhimurium*'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi

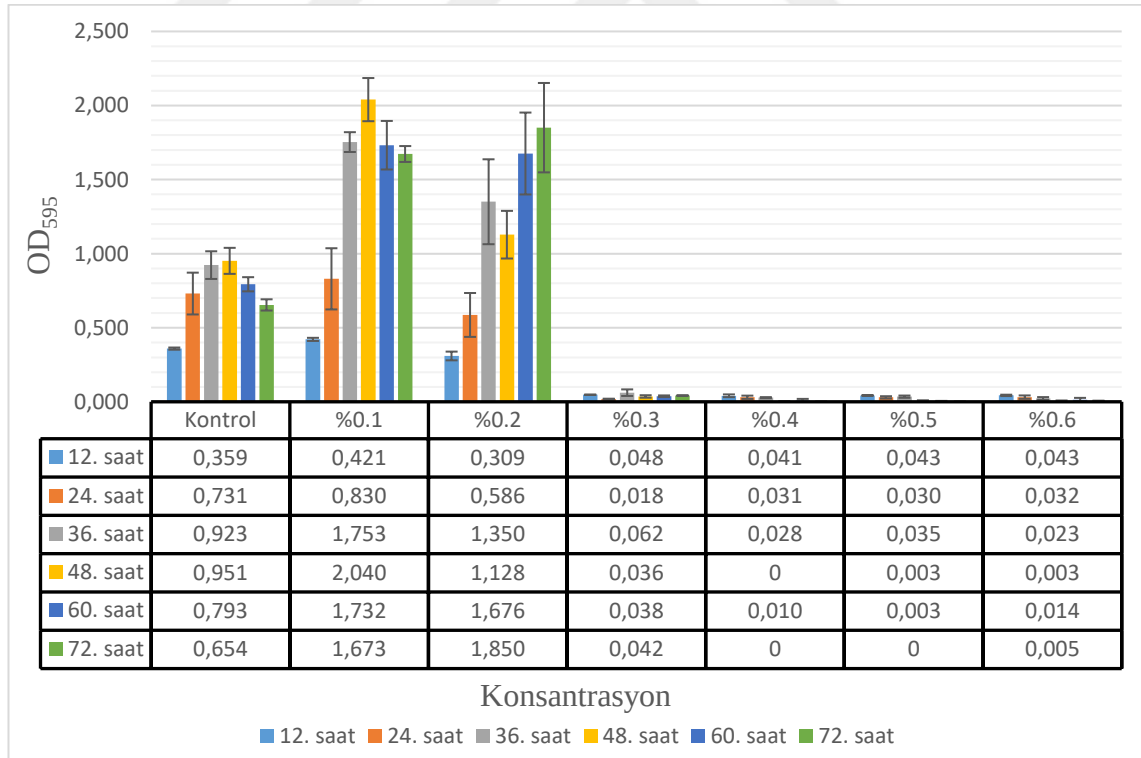
Malik asitin *Salmonella*'nın oluşturduğu biyofilm miktarı üzerindeki etkileri araştırıldığında, kontrol grubunda en yüksek biyofilm miktarına 36. saatte ulaşıldığı tespit edilmiştir. Ortamdaki malik asit oranı % 0,1 iken biyofilm miktarı maksimum değerine 36. saatte ulaşmış ve sonrasında azalmaya başlamıştır. % 0,2 oranında malik asit varlığında ise biyofilm miktarının en yüksek değeri 36. saatte gözlenmiştir. Malik asit konsantrasyonu % 0,3 ve % 0,4'te ise ölçülen biyofilm miktarının en yüksek değeri 48. saatte elde edilmiştir. Ortamdaki malik asit oranı % 0,5 ve % 0,6 değerindeyken biyofilm miktarı maksimum değerine 60. saatte ulaşmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Malik asitin (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumuna etkisi

4.7 Asetik asitin *S. Typhimurium*'da Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Asetik asitin *S. Typhimurium*'un biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yapılan denemelerde, kontrol grubundaki biyofilm miktarının 48. saatte maksimum değere ulaştığı belirlenmiştir. Ortamdaki asetik asit konsantrasyonu % 0,1 olduğunda, oluşan biyofilm miktarı 48. saatte en yüksek değere ulaşmış ve ardından azalış göstermiştir. Konsantrasyon % 0,2 oranına çıkartıldığında biyofilm miktarı en yüksek değerine 72. saatte ulaşmış fakat bu süre içerisinde biyofilm miktarında zaman zaman artma ve azalmalar gözlenmiştir. Aynı şekilde, asetik asitin ortamdaki diğer konsantrasyonlarında da 72 saatlik süre içerisinde biyofilm miktarında dalgalı bir şekilde artış ve düşüşler gözlemlenmiştir. Bu gözlemlere ek olarak, asetik asitin ortamdaki konsantrasyonu % 0,3 ve daha yüksek değerlere çıkartıldığında, *Salmonella*'nın oluşturduğu biyofilm miktarının kayda değer bir şekilde azalmalar tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Asetik asitin (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) *S. Typhimurium*'da biyofilm oluşumuna etkisi

4.8 Matematiksel Modeller

Salmonella'nın çeşitli karbon kaynakları ve konsantrasyonlarına bağlı olarak oluşturduğu biyofilm miktarını belirlemek için biyofilm deneylerinden elde edilen veriler doğrultusunda matematiksel modeller oluşturulmuştur. Karbon kaynaklarının farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri Çizelge 4.1-4.7'de verilmektedir.

Çizelge 4.1 Glukozun farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri

	Kontrol	% 0,1	% 0,2	% 0,3	% 0,4	% 0,5	% 0,6
r	1,2669	0,8175	0,9837	0,5163	0,0375	0,0875	1,8097
K	1,0043	1,2694	0,8929	0,9122	2,5304	1,9841	0,3441
a	0,0009	1,5521	2,5249	2,6280	6,6782	6,9945	0,7897
b	1,4050	1,0517	0,9524	0,9834	2,0788	1	1,6091

Çizelge 4.2 Fukozun farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri

	Kontrol	% 0,1	% 0,2	% 0,3	% 0,4	% 0,5	% 0,6
r	1,3257	0,6129	1,0371	0,7403	0,6579	0,8449	0,9938
K	2,5626	1,3710	2,2875	1,5829	1,7676	1,6526	0,9529
a	0,0012	0,8965	0,6181	0,9445	0,0015	0,0016	0,0010
b	1,0656	1,6508	1,0559	1,1781	1,2773	1,2496	1,3551

Çizelge 4.3 Ramnozun farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri

	Kontrol	% 0,1	% 0,2	% 0,3	% 0,4	% 0,5	% 0,6
r	1,3123	0,1953	0,0483	2,1371	1,9611	1,7468	1,43207
K	0,7412	1,2377	1,3295	1,0436	1,0710	0,9756	0,9982
a	2,8242	5,4901	5,4979	0,4329	1,0654	2,4287	4,0274
b	0,7914	1,0815	1,5976	1,0820	1,0344	1,1194	1,0052

Çizelge 4.4 Sitrik asitin farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri

	Kontrol	% 0,1	% 0,2	% 0,3	% 0,4	% 0,5	% 0,6
<i>r</i>	1,1529	1,1428	0,9132	1,3122	1,4153	0,6283	0,4994
<i>K</i>	1,1755	1,6873	1,6966	1,9615	3,4677	1,6025	1,9761
<i>a</i>	0,8253	0,9121	0,7163	0,5633	0,5640	0,6399	0,0010
<i>b</i>	0,9907	1,0683	1,2415	0,9439	0,6128	1,1250	1,3272

Çizelge 4.5 Suksinik asitin farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri

	Kontrol	% 0,1	% 0,2	% 0,3	% 0,4	% 0,5	% 0,6
<i>r</i>	1,4036	1,0281	1,3699	1,4592	3,5809	3,5902	1,5121
<i>K</i>	0,8996	0,6972	0,6041	0,4687	1,3597	1,4038	0,5060
<i>a</i>	0,6880	1,0155	0,9747	1,0346	1,0538	1,1358	1,113
<i>b</i>	1,0498	1,3208	1,0018	1	0,4249	0,4145	1

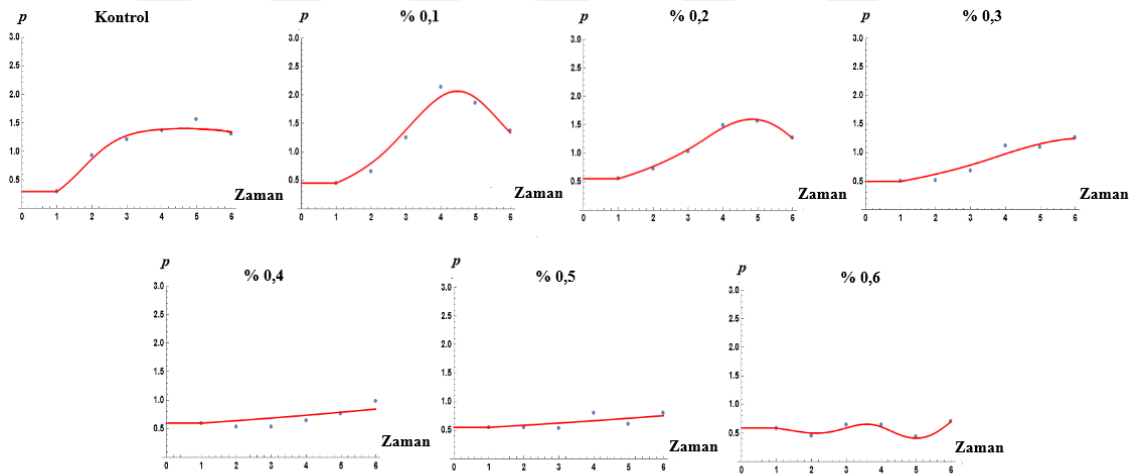
Çizelge 4.6 Malik asitin farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri

	Kontrol	% 0,1	% 0,2	% 0,3	% 0,4	% 0,5	% 0,6
<i>r</i>	2,1466	1,0327	1,0369	1,0596	1,0034	0,8977	1,3376
<i>K</i>	1,4987	1,1588	1,0218	1,3709	0,6863	1,3363	0,3284
<i>a</i>	0,5111	1,0398	1,0953	1,1918	1,4118	1,0404	3,2706
<i>b</i>	0,7555	0,9269	1	0,8256	0,9257	1,1231	0,9134

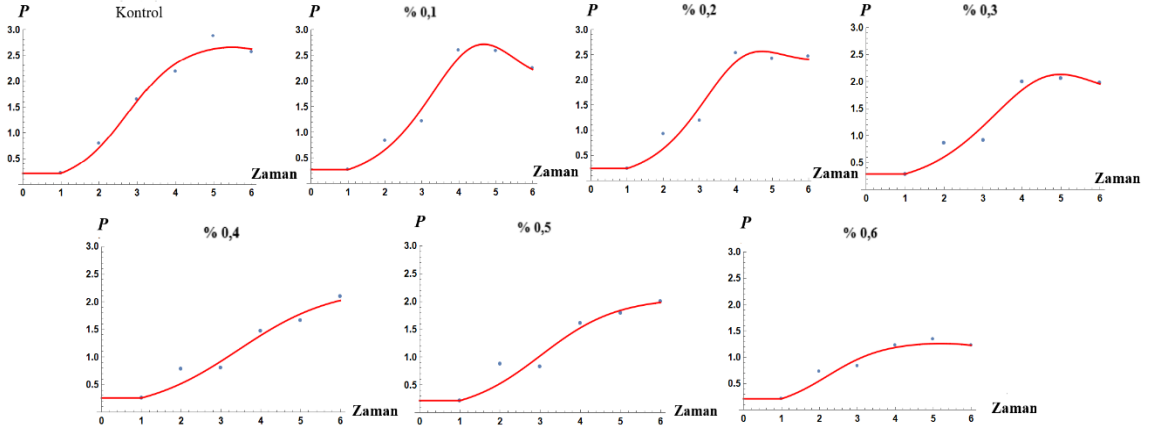
Çizelge 4.7 Asetik asitin farklı konsantrasyonlarında Denklem 3.3 için elde edilen parametre değerleri

	Kontrol	% 0,1	% 0,2	% 0,3	% 0,4	% 0,5	% 0,6
r	1,1540	0,7207	0,7827	0,1825	1,1965	1,2004	0,9413
K	0,9075	1,1912	1,4936	0,0756	0,0823	0,0789	0,0965
a	1,0459	0,8169	0,0014	0,1975	0,0014	0,0014	0,0014
b	0,8779	1,4697	1,2237	0,3208	-0,0515	-0,0224	-0,1535

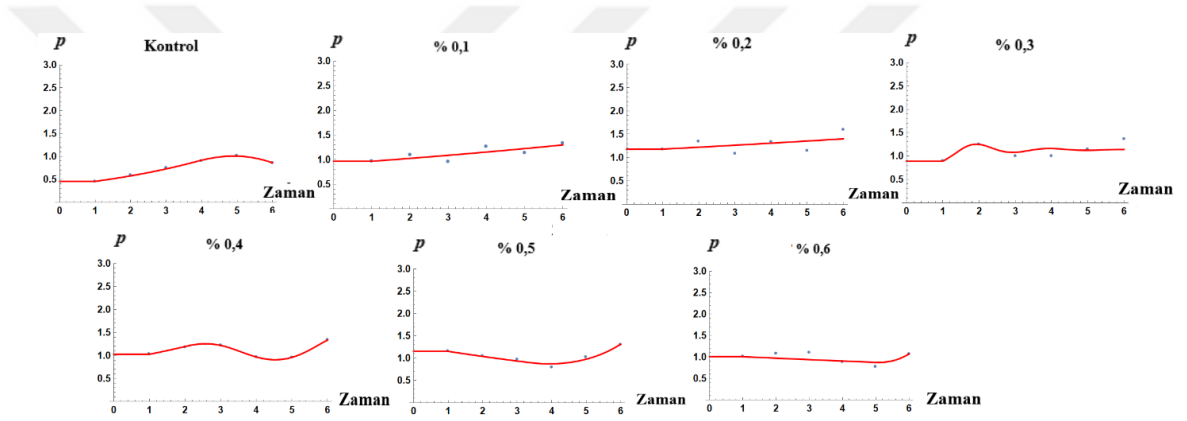
Salmonella biyofilminin farklı karbon kaynağı konsantrasyonları altındaki yörüngesi aşağıdaki gibi verilmiştir. Şekil 4.8 - 4.14, deneylerden elde edilen verilere ek olarak uygun model çizgilerini göstermektedir. Doğru parametre seçimleri yapıldığında modelin tüm deneysel verilere bir çözüm sunduğu burada net bir şekilde görülmektedir. Özetle, model çizgileri ile veri noktaları arasındaki mesafenin oldukça küçük olması, modelin önemli bir açıklayıcı güce sahip olduğunun net kanıtıdır.



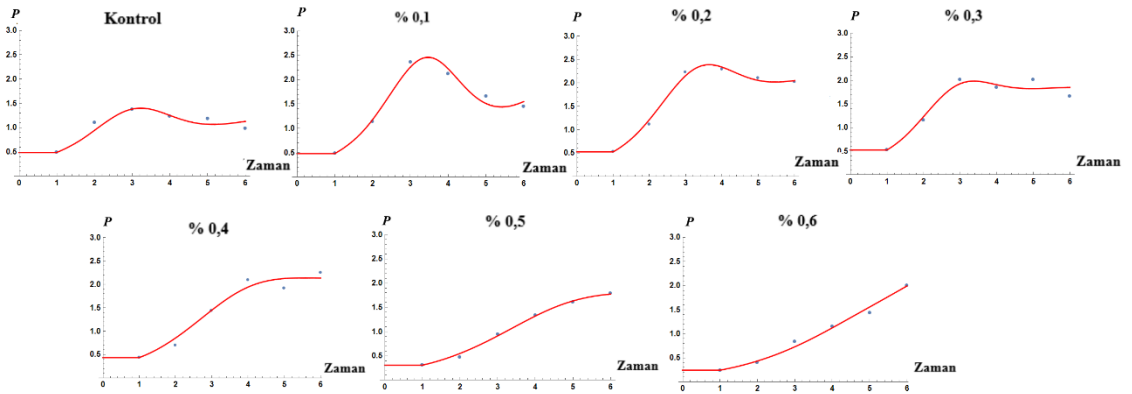
Şekil 4.8 *Salmonella* biyofilminin glukozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



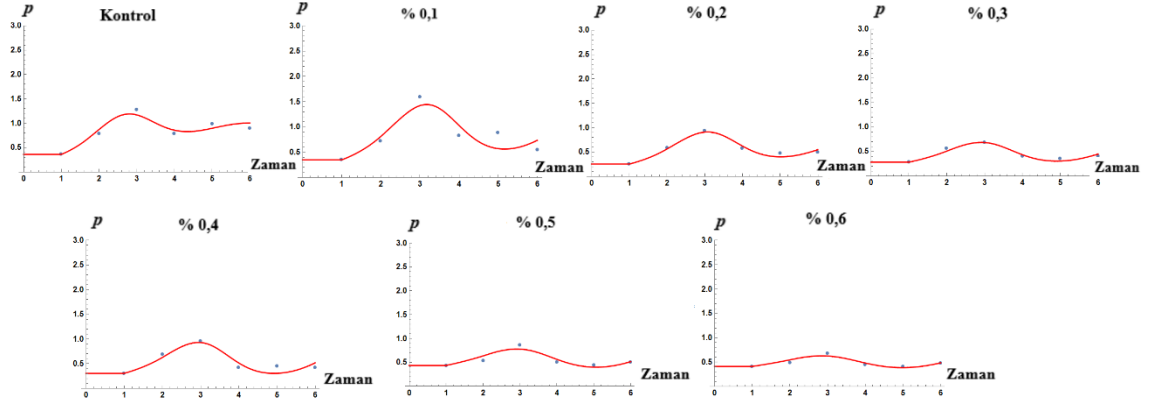
Şekil 4.9 *Salmonella* biyofilminin fukozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



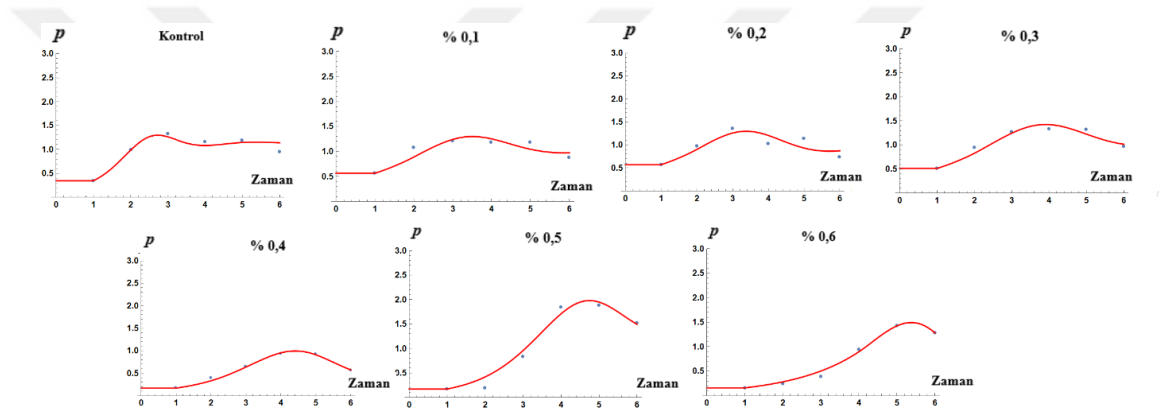
Şekil 4.10 *Salmonella* biyofilminin ramnozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



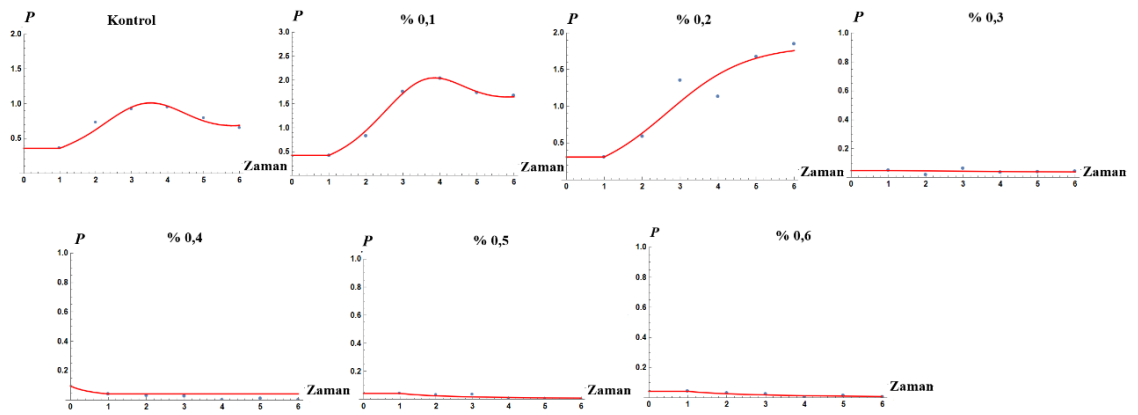
Şekil 4.11 *Salmonella* biyofilminin sitrik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



Şekil 4.12 *Salmonella* biyofilminin suksinik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



Şekil 4.13 *Salmonella* biyofilminin malik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi

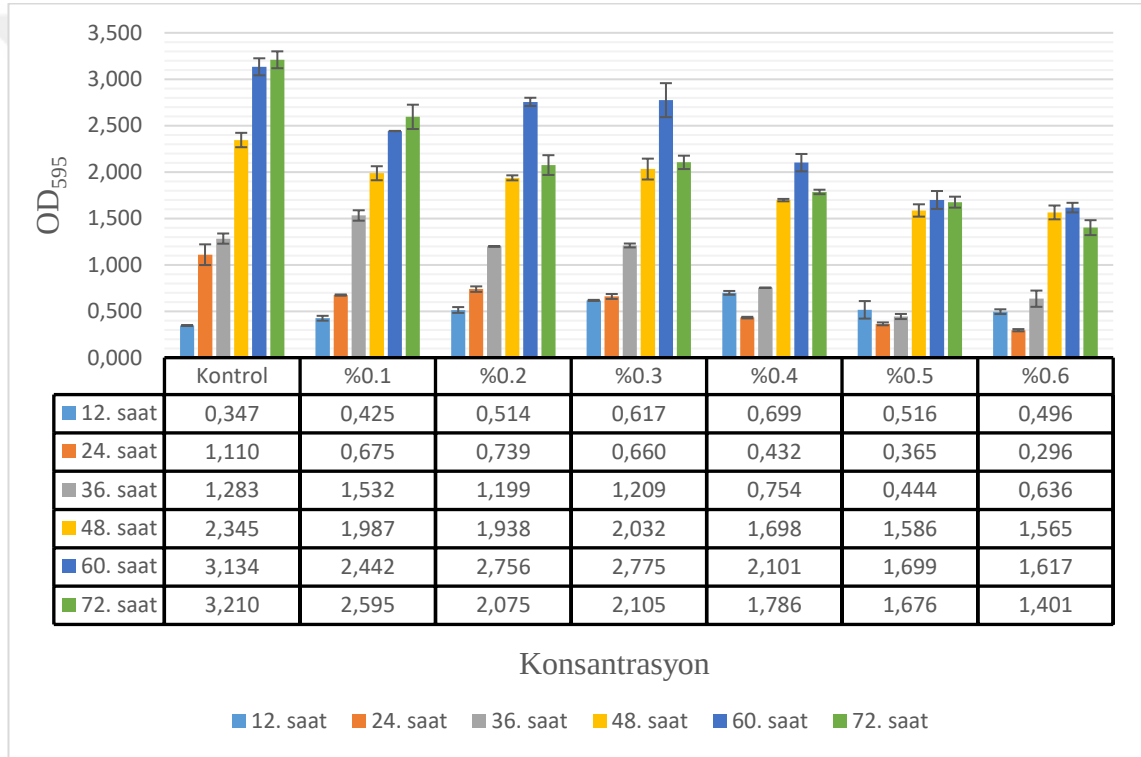


Şekil 4.14 *Salmonella* biyofilminin asetik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi

4.9 Modelin doğrulanması

4.9.1 Glukoz

Karbon kaynağı içermeyen ortamda ve % 0,1 oranında glukoz varlığında, *Salmonella* biyofilminin en yüksek değerine 72. saatte ulaştığı doğrulama deneylerinde gözlemlenmiştir. Glukoz oranlarının % 0,2 - % 0,6 aralığında olduğu denemelerde ise, biyofilm miktarının en yüksek seviyesine 60. saatte ulaştığı ve daha sonra düşüşe geçtiği tespit edilmiştir (Şekil 4.15).

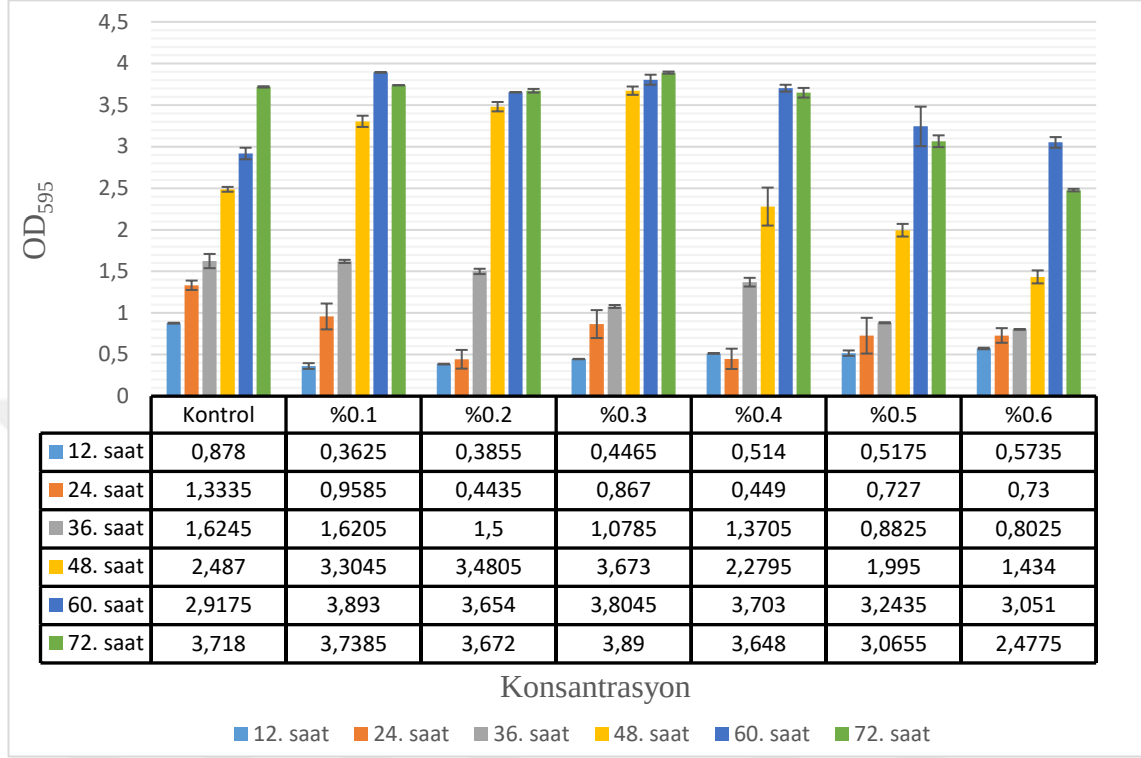


Şekil 4.15 Glukoz (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları

4.9.2 Fukoz

Karbon kaynağı içermeyen kontrol grubunda ve % 0,2 ve % 0,3 konsantrasyonlarında fukoz içeren ortamda biyofilm miktarı 72. Saatte en yüksek seviyeye ulaşmıştır. % 0,1, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6 fukoz varlığında ise biyofilm seviyelerinin 60. saate kadar artış

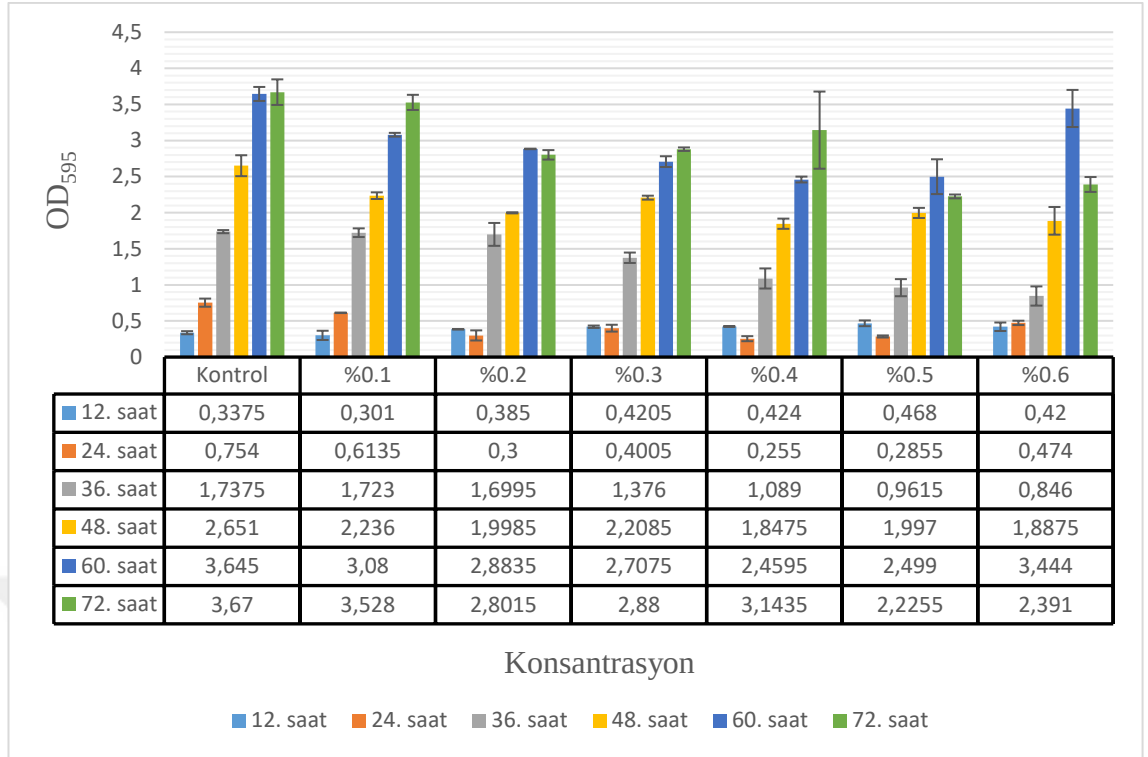
gösterdiği ve en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra miktarlarında azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Fukoz (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları

4.9.3 Ramnoz

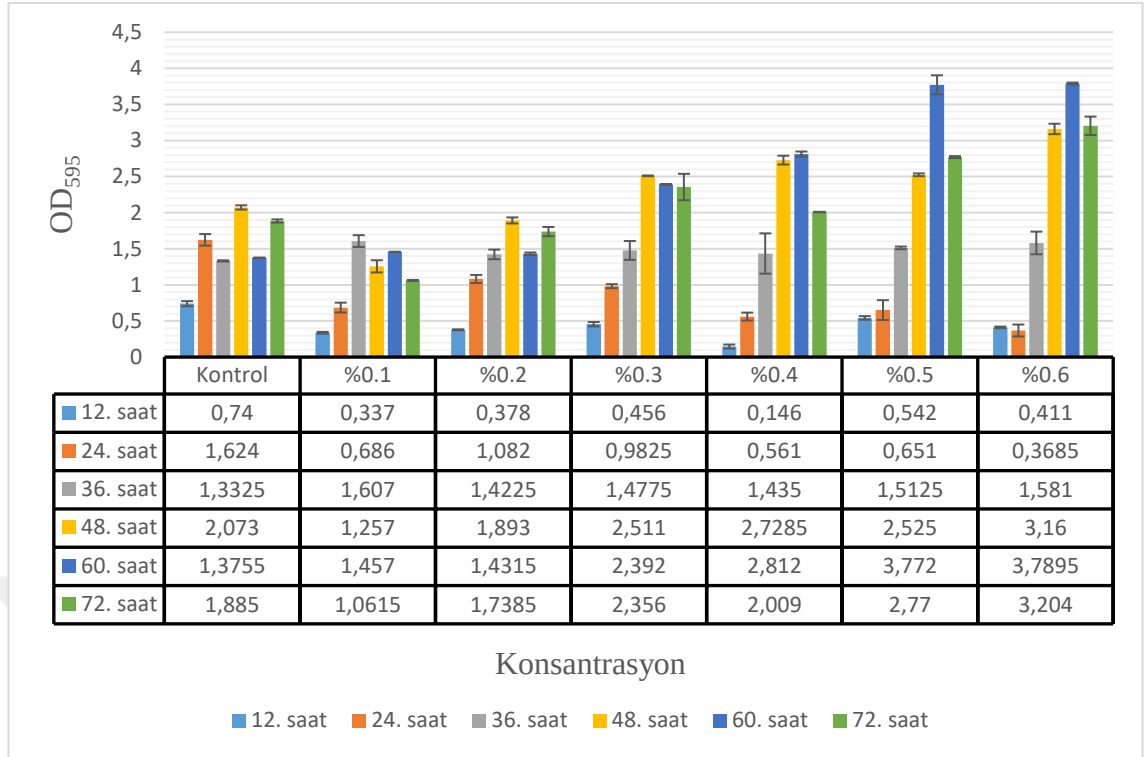
Kontrol grubunda, % 0,1, % 0,3 ve % 0,4 oranlarında ramnoz içeren M9 ortamında biyofilm seviyelerinin en yüksek değeri 72. saatte elde edilmiştir. Denemelere kullanılan diğer ramnoz oranlarında ise, en yüksek biyofilm miktarları 60. saatte meydana gelmiş ve daha biyofilm miktarında sonra azalış gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Ramnoz (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları

4.9.4 Sitrik asit

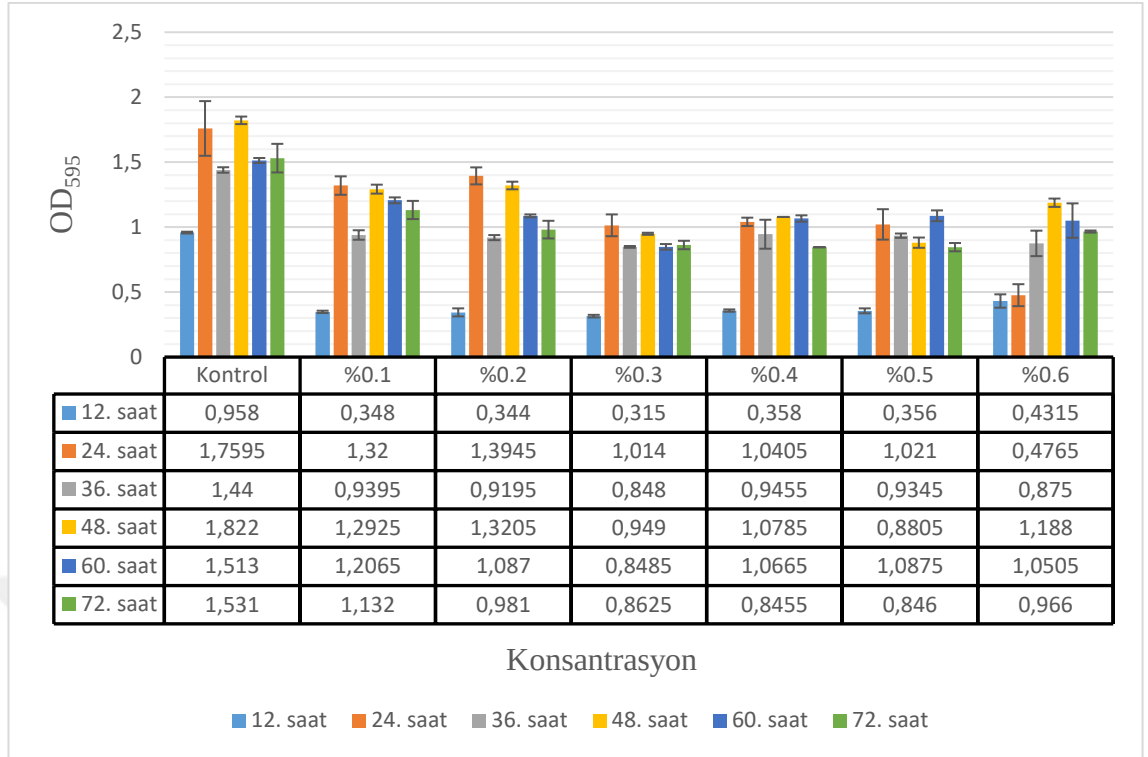
Sitrik asit ile biyofilm ilişkisinin araştırıldığı denemelerde, biyofilm miktarında genellikle osilasyon hareketi gözlenmektedir. Örneğin 24. saatte artış gösteren biyofilm seviyesi bir sonraki saat aralığında azalmış, fakat diğer saat aralığında tekrar artışa geçmiştir. Benzer hareket sitrik asitin ortamda % 0,1 ve % 0,2 oranında bulunduğu durumlarda da tekrarlanmıştır. Fakat diğer oranlarda, biyofilmin en yüksek seviyesine genellikle 60.saatte ulaştığı ve sonrasında azalmaya başladığı saptanmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Sitrik asit (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları

4.9.5 Suksinik asit

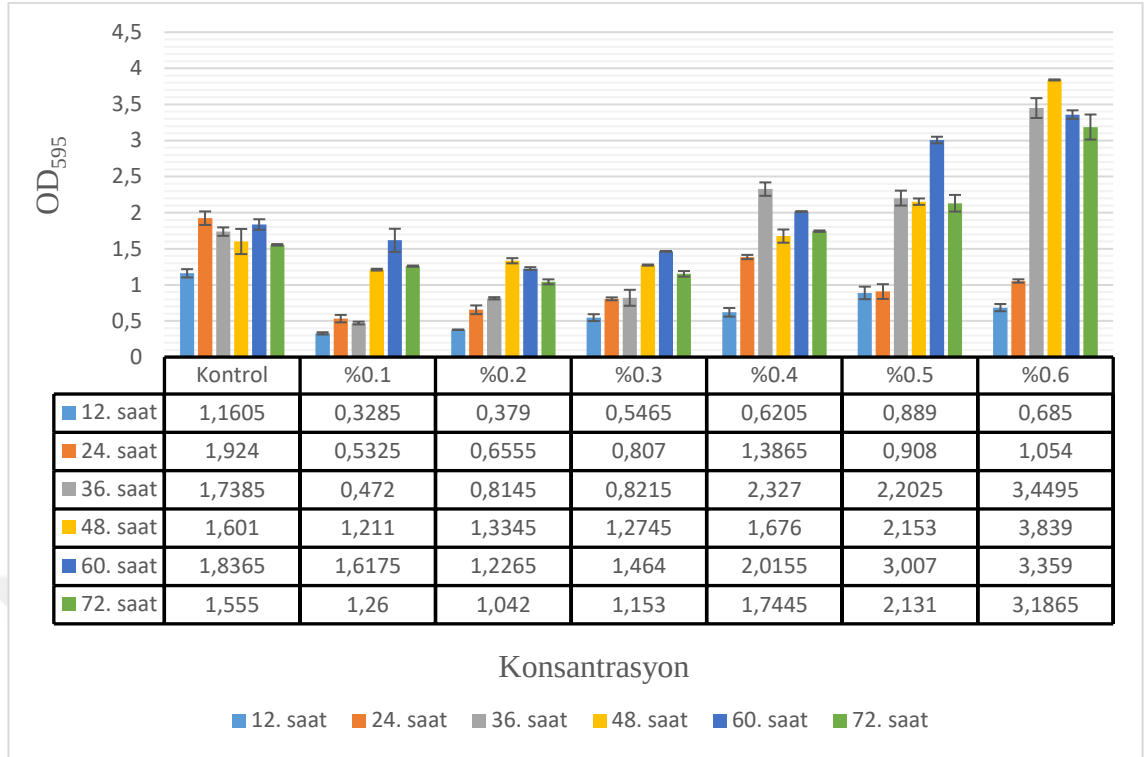
Suksinik asitle yapılan biyofilm denemelerinde de, sitrik asit denemelerine benzer bir şekilde biyofilm yörüngesinde dalgalanmalar söz konusudur. Bazı saatlerde artışa geçen biyofilm miktarı, diğer saatlerde azalıp daha sonra tekrar artışa geçmektedir. Konsantrasyon % 0,6'ya çıkarıldığında biyofilm miktarı 48. Saatte en yüksek noktaya ulaşp, ilerleyen saatlerde düşüşe geçmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Suksinik asit (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları

4.9.6 Malik asit

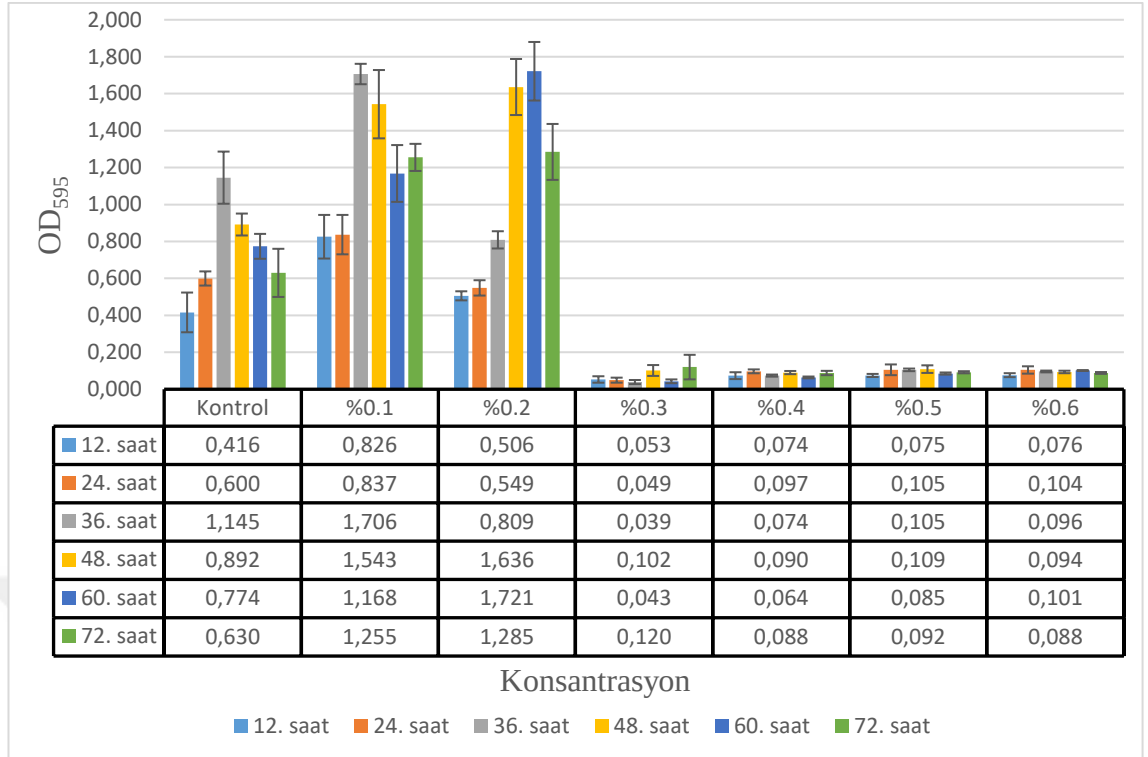
Malik asitin ortamda % 0,1, % 0,3 ve % 0,5 konsantrasyonunda bulunduğu durumlarda biyofilm miktarının en yüksek olduğu değere 60. saatlerde, % 0,2 ve % 0,6 konsantrasyonlarında ise 48. saatte ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 Malik asit (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları

4.9.7 Asetik asit

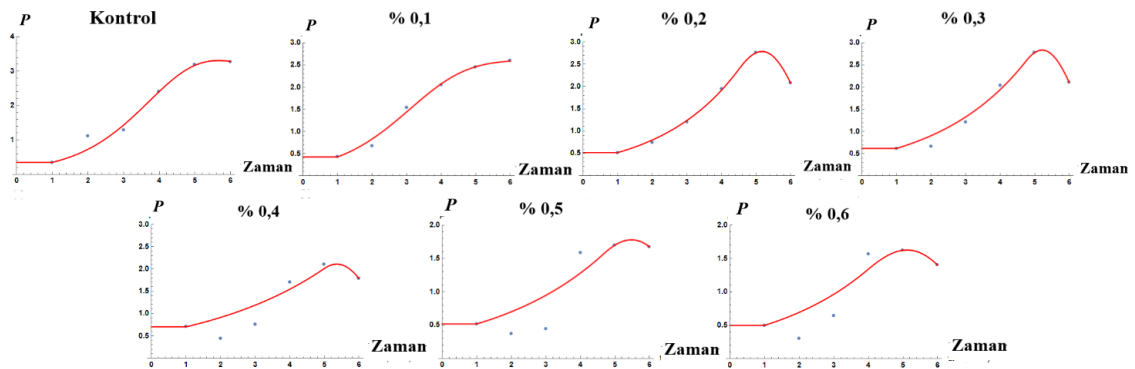
Asetik asit denemelerinde, ilk yapılan biyofilm denemelerine paralel olarak konsantrasyonun artırılması biyofilm oluşumunun inhibisyonu ile sonuçlanmıştır. % 0,2 oranından sonra, biyofilm miktarları ciddi derecede düşüş göstermektedir (Şekil 4.21).



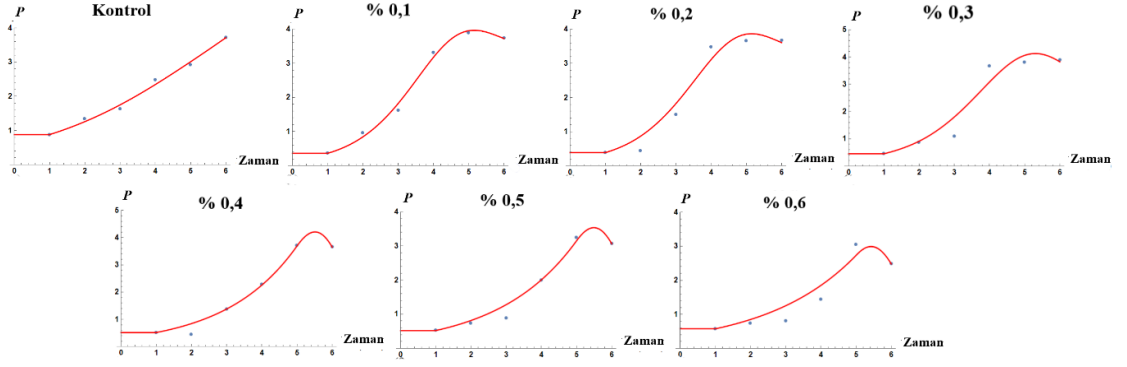
Şekil 4.21 Asetik asit (% 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5 ve % 0,6) ile yürütülen matematiksel model doğrulama testi sonuçları

4.9.8 Matematiksel modeller

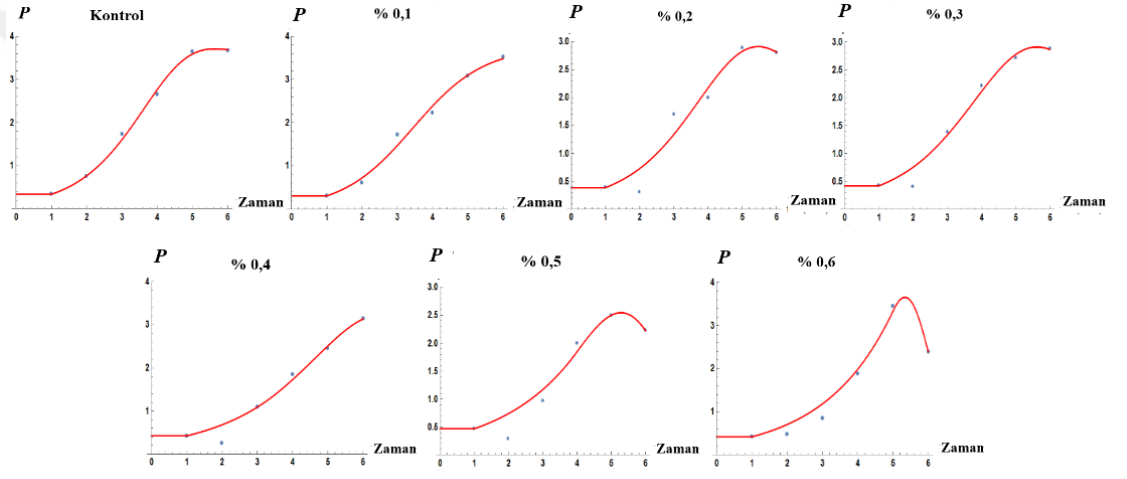
Yapılan ikinci biyofilm denemelerinden elde edilen veriler, ilk deneylerin verileriyle paralellikler göstermiş ve tekrarlanan biyofilm deneylerinden elde edilen veriler, geliştirilen matematiksel modellere uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.22-4.28).



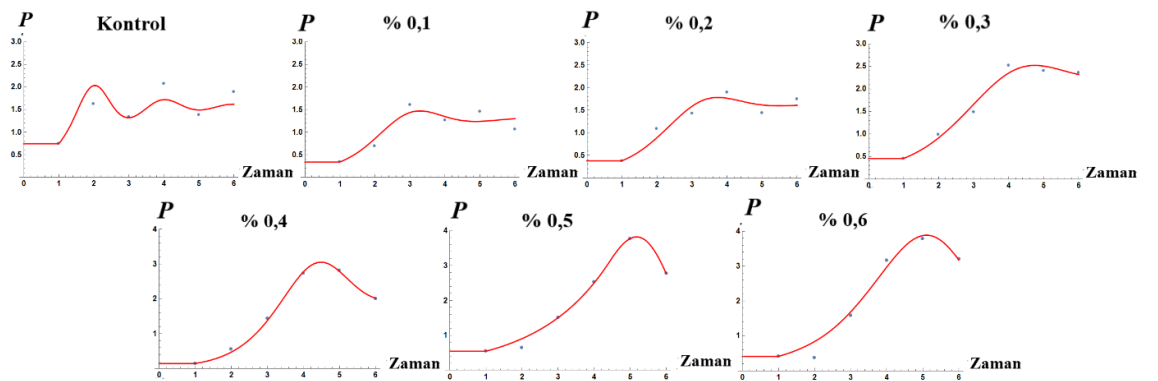
Şekil 4.22 *Salmonella* biyofilminin glukozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



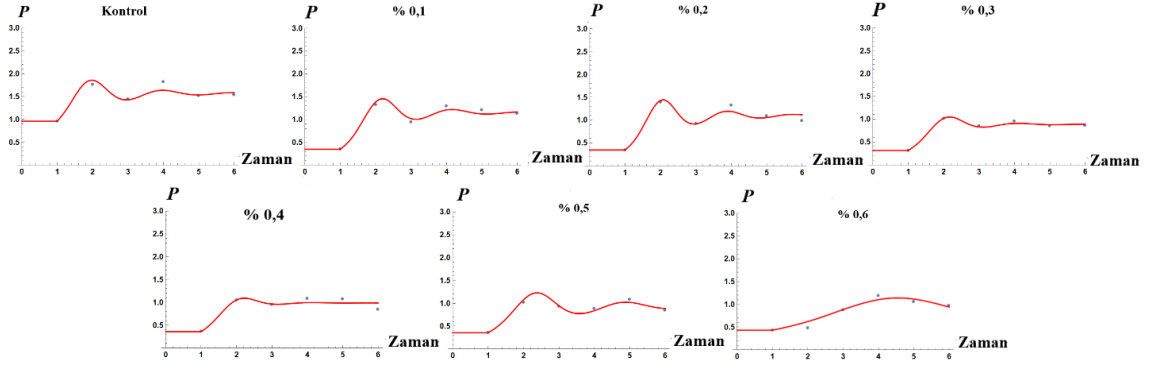
Şekil 4.23 *Salmonella* biyofilminin fukozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



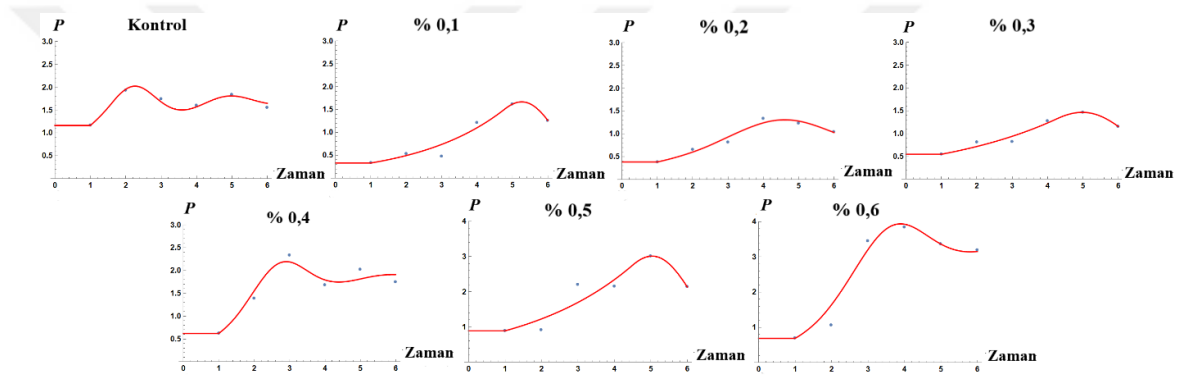
Şekil 4.24 *Salmonella* biyofilminin ramnozun farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



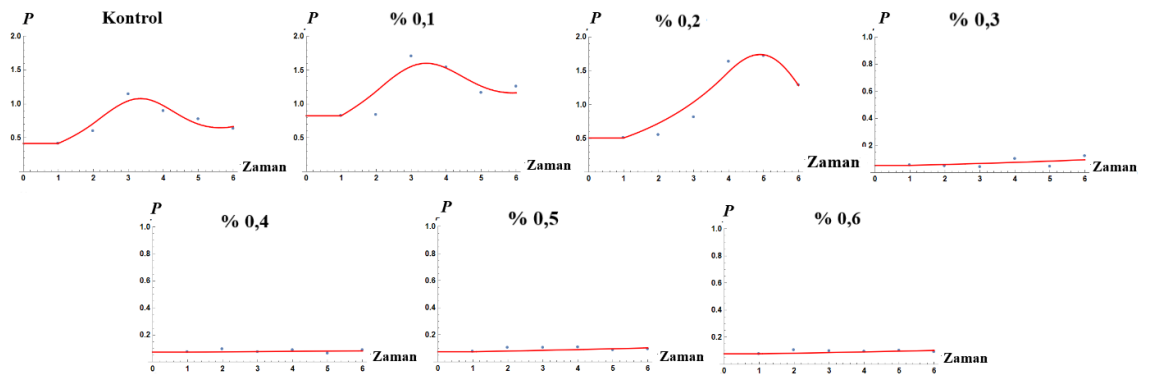
Şekil 4.25 *Salmonella* biyofilminin sitrik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



Şekil 4.26 *Salmonella* biyofilminin suksinik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



Şekil 4.27 *Salmonella* biyofilminin malik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi



Şekil 4.28 *Salmonella* biyofilminin asetik asitin farklı konsantrasyonları (% 0,1- % 0,6) altındaki yörüngesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıda patojeni olan *Salmonella* ve bu patojenin oluşturduğu biyofilm yapıları, dirençli yapılar olmalarından dolayı toplum sağlığında ve gıda endüstrisi gibi birçok alanda tehdit oluşturmaktadır. Bundan dolayı biyofilm yapıları, dünya çapında endişeye neden olmaktadır. Biyofilm yapılarının oluşturduğu tehditleri ortadan kaldırmak için bu yapıları detaylı bir şekilde anlamak önem arz etmektedir. Söz konusu tez çalışmasında, *Salmonella* biyofilmlerinin metabolik aktivitelerini açıklayabilmek için bu yapıların 7 farklı karbon kaynağına ve bu karbon kaynaklarının çeşitli konsantrasyonlarına verdikleri tepki araştırılmıştır. Glukoz, fukoz, ramnoz gibi şekerlerin ve TCA (trikarboksilik asit) veya diğer bir adıyla Krebs döngüsünde bulunan sitrik asit, suksinik asit, malik asit ve asetik asit gibi metabolitlerin, artan konsantrasyonlarına bağlı olarak *Salmonella* biyofilmlerinin zamana bağlı değişiklikleri tespit edilmiştir (Krebs, 1954). Yapılan deneyler sonucunda, biyofilmin zamana bağlı yörüngesi, Hutchinson-Wright denklemi (Wright 1946, Hutchinson 1948) baz alınarak matematiksel olarak modellenmiştir.

Literatürde, *Salmonella* biyofilmlerinin metabolik aktivitesi ve ortamdaki besin kaynaklarına verdiği tepki hakkında birtakım çalışmalar bulunsa da (Kenyon vd. 2005, Bowden vd. 1997, Kalai Chelvam vd. 2015, Paytubi vd. 2017, Roy vd. 2021), bu çalışmalar *Salmonella* biyofilminin regülasyonu ve karbon kaynakları arasındaki ilişkinin yapısına dair detaylı bilgi vermemekte ve dolayısıyla *Salmonella* biyofilmlerinin metabolik aktivitesini ve dinamiklerini açıklamada yetersiz kalmaktadır. Bu durum *Salmonella* biyofilmlerinin eradikasyonu için kullanılması gereken yöntemlerin planlanmasını zorlaştırmaktadır.

Bu çalışmada, istatistiksel analizler, çalışmada test edilen her değişkenin (zaman, kimyasal muamele, kimyasal muamelenin yoğunluğu) biyofilm yoğunluğu üzerinde etkili olduğunu gösterse de; Hutchinson-Wright denkleminin, yani gecikmeli lojistik diferansiyel denklemin (Wright 1946, Hutchinson 1948), *S. Typhimurium* biyofilmlerinin zaman içerisindeki davranışını açıklayabildiği, 7 farklı karbon kaynağının 7 farklı konsantrasyonu için de gözlemlenmiştir. Bu denklem, diğer matematiksel modelleme yöntemlerine, örneğin kısmi diferansiyel denklemlere göre, hem matematiksel çözüm

kolaylıkları hem de az değişkenle uzun bir süreci açıklayabilmesi yönüyle avantaj taşımaktadır. Ancak, farklı karbon kaynaklarının farklı konsantrasyonları için kurulan modellerde parametreler farklı bir şekilde tahmin edilmiştir. Bu durumun, incelenen süreçteki rastgeleliklerden (çevre koşullarındaki değişkenlik gibi) ve karbon kaynaklarının özgün niteliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Literatürdeki verilere göre glukozun artan konsantrasyonlarında *Salmonella* biyofilm miktarında azalma meydana geldiği veya biyofilm oluşumunun inhibe edildiği; glukozun ortamda düşük bir oranda bulunmasının ise biyofilm oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir (Ngwai 2006, Roy vd. 2021). Ortamda besin kaynaklarının kısıtlı olması durumunda, diğer bir deyişle herhangi bir stres koşulu altında planktonik yapıların biyofilm yapıya geçme eğiliminde oldukları bilinmektedir (De la Fuente- Núñez vd. 2013, Flemming vd. 2016, Cadena vd. 2019). Bu çalışmada glukoz ile yapılan biyofilm denemelerinden elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.1), glukoz konsantrasyonunun artışının biyofilm miktarında daha düşük konsantrasyonlara kıyasla azalmaya sebep olduğunu söylemek mümkündür. Buna ek olarak, bazı durumlarda biyofilm miktarının azaldıktan sonra tekrar artışa geçtiği gözlenmektedir. Bu da ortamdaki karbon kaynağının bir süre sonra tükenmesi halinde, yani bu yapılar için herhangi bir stres durumu oluştuğunda, bakterilerin biyofilm oluşturma eğiliminin arttığı görüşünü desteklemektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler, bahsi geçen açılardan literatürle paralellik göstermektedir. Literatürde her ne kadar, farklı glukoz konsantrasyonlarının *Salmonella* biyofilmi üzerindeki etkileri hakkında çalışmalar bulunsa da (Ngwai 2006, Roy vd. 2021), çeşitli karbon kaynaklarının varlığında ve bunların farklı konsantrasyonlarında biyofilm miktarının zamana bağlı değişimine yer verilmemiştir. Bu tez çalışmasında besin kaynağı konsantrasyonu ile biyofilm miktarı arasında lineer bir ilişki olmadığı ancak, lineer olmayan modelleme yaklaşımlarının bu ilişkiyi modelleyebildiği ortaya konulmuştur. Bahsi geçen bu ilişki lineer bir ilişki olmadığı için, doğrusal regresyon yaklaşımlarının biyofilm eradikasyonu planlaması için kullanılması zorlaşmakta ve dolayısıyla Hutchinson-Wright denkleminin kullanılabilirliği ön plana çıkmaktadır.

Tez çalışmasında yürütülen denemeler sonucunda, karbon kaynağının ortamdaki miktarının *Salmonella* biyofilmi üzerindeki en belirleyici etkisini gösteren

metabolitlerden birisi asetik asit olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.7). Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda, asetik asitin anti mikrobiyal etkileri araştırılmış ve asetik asitin çoğu patojenik bakterinin planktonik ve biyofilm formlarının üremesini önlediği sonucuna varılmıştır (Halstead vd. 2015). Şekil 4.7’ de görüldüğü gibi, ortamdaki asetik asit konsantrasyonu % 0,3’ e çıkarıldığında biyofilm miktarı neredeyse sıfıra düşmüştür. Bu sonuçlar, literatürdeki çalışmalarda belirlendiği gibi, asetik asitin güçlü antimikrobiyal etkilere sahip olduğu kanısını desteklemektedir. Bu veriler ışığında, biyofilm yapıları ile mücadelede asetik asitin eradikasyon yöntemi olarak kullanılabilirliği, ileride yapılacak olan çalışmalarda ele alınmalı ve detaylı bir şekilde incelenmelidir.

Bu çalışmada biyofilmin zaman yörüngesini açıklayabildiği keşfedilen Hutchinson-Wright denklemi, diğer lojistik büyüme modelleriyle taşıma kapasitesi ve önceki birim sayısına olan bağlılık gibi yönlerden aynı olup, incelenen popülasyonun (bu çalışma özelinde biyofilm yoğunluğunun) çevresel etkenlerdeki değişimlere gecikmeli olarak tepki vermesi durumunu da modele dahil eder. Dolayısıyla bu denklem, modellenen birimin çevresinde gerçekleşen bir olaya verilen tepkinin yansımalarının zaman içerisinde ortaya çıktığı durumlarda kullanılmaktadır. Diğer bir deyişle, bu denklem, incelenen sistemdeki geribildirim (*feedback*) süreçlerinin varlığını açıklamaktadır. Çeşitli kimyasal muameleler altında bu diferansiyel denklemin açıklayıcılığının bu kadar yüksek olması, bu kimyasal etkiler dahilinde biyofilimde olası geribildirim süreçlerinin olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada açıklanan matematiksel model nihayetinde veri üreten süreçlerin, yani biyofilm oluşumu ve dağılmasının, yüksek oranda otoregresif ve periyodik olduğunu göstermektedir. Yani, biyofilmin zaman içindeki yörüngesi, kullanılan ajanlardan ziyade çoğunlukla mevcut biyofilm miktarı tarafından belirlenmektedir. Bu sonuç, farklı karbon kaynakları için geliştirilen tüm modellerin aynı zamansal yörünge yapısını kullanmasıyla doğrulanmaktadır. Karbon kaynaklarındaki ve miktarlarındaki değişiklikler modelin parametre değerlerini değiştirmekte, ancak daha önce belirtildiği gibi zamansal yörüngenin topolojisini değiştirmemektedir. Biyofilm dağılması (biyofilm miktarındaki azalma), karbon kaynakları ve karbon kaynağı yoğunluklarından etkilenen belirli bir süreden sonra ölçüm süresi üzerinde geciktirici bir etkiye sahiptir. Sonuç olarak, biyofilm

oluşumu ve dağılma süreçlerinin yalnızca zamanın bir fonksiyonu olarak modellenmesi herhangi bir bilgi kaybına yol açmamıştır. Verotta ve arkadaşlarına (2017) göre, gelecekteki çalışmalarda, bu çalışmada yapıldığı gibi, çeşitli modeller oluşturularak ve modellere uydurulan parametrelerin dağılımı incelenerek model parametreleri çevresel faktörlerin (bu çalışmada karbon kaynakları ve karbon kaynağı yoğunlukları ile temsil edildiği gibi) bir fonksiyonu olarak modellenebilir.

Yapılan bu tez çalışması, *Salmonella* biyofilmleri ve metabolizmasının temellerinin anlaşılması ve biyofilm davranışının deterministik olarak tahmin edilebilmesi yönünde bir adım niteliği taşımaktadır. Fakat, *Salmonella* metabolizmasının daha detaylı bir şekilde açıklanabilmesi ve anlaşılabilmesi için bu konunun genetik yönüyle de ele alınması önem arz etmektedir. Çalışmada bahsi geçen glikoliz ve trikarboksilik asit döngüsü gibi metabolik yollarda görev alan enzimlerin ve bunları kodlayan genlerin görevlerinin belirlenmesi, biyofilm yapıları hakkında daha geniş bir bilgiye sahip olunmasına ve bu yapılarla mücadele edilmesine olanak sağlayacaktır. Buna ek olarak, *Salmonella*'nın konak hücre içerisindeki metabolik davranışının araştırılması da konak hücrenin enfeksiyona karşı ürettiği bağışıklık yanıtı *Salmonella* metabolizmasının regülasyonunu önemli derecede etkilediği için önem teşkil etmektedir.

KAYNAKLAR

- Akçelik, N., & Akçelik, M. 2022. What makes another life possible in bacteria? Global regulators as architects of bacterial biofilms. *World journal of microbiology & biotechnology*, 38(12), 236.
- Akhy, M. T., Brown, C. M., & Old, D. C. 1984. L-Rhamnose utilisation in *Salmonella typhimurium*. *Journal of applied bacteriology*, 56(2), 269-274.
- Allen, L. J. S. 2007. *An introduction to mathematical biology*. Pearson/Prentice Hall.
- Andino, A., & Hanning, I. 2015. *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *TheScientificWorldJournal*, 2015, 520179.
- Anonymous. 2017. Web sitesi, <https://www.enttoday.org>. Erişim tarihi: 26.04.2024.
- Armbruster, C. R., & Parsek, M. R. 2018. New insight into the early stages of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(17), 4317-4319.
- Badía, J., Ros, J., & Aguilar, J. 1985. Fermentation mechanism of fucose and rhamnose in *Salmonella typhimurium* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 161(1), 435-437.
- Belas, R. 2013. When the swimming gets tough, the tough form a biofilm. *Molecular microbiology*, 90(1), 1-5.
- Belas, R. 2014. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in microbiology*, 22(9), 517-527.
- Bertram, R. *Delay-Differential Equations*. Chapter B Bibliography.
- Bezek, K., Nipič, D., Torkar, K. G., Oder, M., Dražić, G., Abram, A., & Bohinc, K. 2019. Biofouling of stainless steel surfaces by four common pathogens: The effects of glucose concentration, temperature and surface roughness. *Biofouling*, 35(3), 273-283.
- Bischer, A. P., Kovacs, C. J., Faustoferri, R. C., & Quivey Jr, R. G. 2020. Disruption of L-rhamnose biosynthesis results in severe growth defects in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 202(6), 10-1128.
- Bremer, P., Flint, S., Brooks, J., & Palmer, J. 2015. Introduction to biofilms: Definition and basic concepts. *Biofilms in the dairy industry*, 1-16.
- Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., and Swaminathan, B. 2000. Guest Commentary *Salmonella* Nomenclature. In *Journal Of Clinical Microbiology*, (Vol. 38, Issue 7).
- Brown, C. 2007. *Differential equations: A modeling approach* (Vol. 150). Sage.

- Bowden, G. H. W., & Li, Y. H. 1997. Nutritional influences on biofilm development. *Advances in dental research*, 11(1), 81-99.
- Bowden, S. D., Ramachandran, V. K., Knudsen, G. M., Hinton, J. C., & Thompson, A. 2010. An incomplete TCA cycle increases survival of *Salmonella* Typhimurium during infection of resting and activated murine macrophages. *PloS one*, 5(11), e13871.
- Bowden, S. D., Rowley, G., Hinton, J. C., & Thompson, A. 2009. Glucose and glycolysis are required for the successful infection of macrophages and mice by *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and immunity*, 77(7), 3117-3126.
- Bumann, D., & Schothorst, J. 2017. Intracellular *Salmonella* metabolism. *Cellular microbiology*, 19(10), e12766.
- Burmølle, M., Thomsen, T. R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., & Bjarnsholt, T. 2010. Biofilms in chronic infections—a matter of opportunity—monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 324-336.
- Clark, D. P., & Cronan, J. E. 2005. Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources. *EcoSal Plus*, 1(2), 10-1128.
- Coenye, T. 2013. Biofilms. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 335-337.
- Coleman, M. J. 2006. *Population Modeling with Ordinary Differential Equations*. George Washington University.
- Connors, J., Dawe, N., & Van Limbergen, J. 2018. The role of succinate in the regulation of intestinal inflammation. *Nutrients*, 11(1), 25.
- Cronan Jr, J. E., & Laporte, D. 2005. Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. *EcoSal Plus*, 1(2), 10-1128.
- Dandekar, T., Astrid, F., Jasmin, P., & Hensel, M. 2012. *Salmonella enterica*: a surprisingly well-adapted intracellular lifestyle. *Frontiers in microbiology*, 3, 164.
- Dandekar, T., Fieselmann, A., Fischer, E., Popp, J., Hensel, M., & Noster, J. 2015. *Salmonella*—how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 191.
- Deatherage Kaiser, B. L., Li, J., Sanford, J. A., Kim, Y. M., Kronewitter, S. R., Jones, M. B., & Adkins, J. N. 2013. A multi-omic view of host-pathogen-commensal interplay in *Salmonella*-mediated intestinal infection. *PloS one*, 8(6), e67155.
- De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., & Hancock, R. E., 2013. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current opinion in microbiology*, 16(5), 580-589.

- Dewanti, R., & Wong, A. C. 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7. *International journal of food microbiology*, 26(2), 147-164.
- Englesberg, E., & Baron, L. S. 1959. Mutation to L-rhamnose resistance and transduction to L-rhamnose utilization in *Salmonella typhosa*. *Journal of Bacteriology*, 78(5), 675-686.
- Fàbrega, A., ve Vila, J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 308–341.
- Faith, J. J., Ahern, P. P., Ridaaura, V. K., Cheng, J., & Gordon, J. I. 2014. Identifying gut microbe–host phenotype relationships using combinatorial communities in gnotobiotic mice. *Science translational medicine*, 6(220), 220ra11-220ra11.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Frawley, E. R., Crouch, M. L. V., Bingham-Ramos, L. K., Robbins, H. F., Wang, W., Wright, G. D., & Fang, F. C. 2013. Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in *Salmonella* Typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 12054-12059.
- Galant, A. L., Kaufman, R. C., & Wilson, J. D. 2015. Glucose: Detection and analysis. *Food chemistry*, 188, 149-160.
- Gal-Mor, O., Boyle, E.C., and Grassl, G.A. 2014. Same species, different diseases: How and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in microbiology*, 5, 391.
- Gaupp, R., Schlag, S., Liebeke, M., Lalk, M., & Götz, F. 2010. Advantage of upregulation of succinate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of bacteriology*, 192(9), 2385-2394.
- Ghannoum, O., Von Caemmerer, S. V., Taylor, N., & Millar, A. H. 2013. Carbon dioxide assimilation and respiration. *Plants in Action: A Resource for Teachers and Students of Plant Science*.
- Giraud, M. F., & Naismith, J. H. 2000. The rhamnose pathway. *Current opinion in structural biology*, 10(6), 687-696.
- Griffith, R. W., Carlson, S. A., & Krull, A. C. 2019. Salmonellosis. *Diseases of swine*, 912-925.
- Gutnick, D., Calvo, J. M., Klotkowski, T., & Ames, B. N. 1969. Compounds which serve as the sole source of carbon or nitrogen for *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of bacteriology*, 100(1), 215-219.

- Halstead, F. D., Rauf, M., Moiemmen, N. S., Bamford, A., Wearn, C. M., Fraise, A. P., & Webber, M. A. 2015. The antibacterial activity of acetic acid against biofilm-producing pathogens of relevance to burns patients. *PloS one*, 10(9), e0136190.
- Han, M., Schierstaedt, J., Duan, Y., Nietschke, M., Jechalke, S., Wolf, J., & Schikora, A. 2023. *Salmonella enterica* relies on carbon metabolism to adapt to agricultural environments. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1213016.
- Harapanahalli, A. K., Younes, J. A., Allan, E., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. 2015. Chemical signals and mechanosensing in bacterial responses to their environment. *PLoS pathogens*, 11(8), e1005057.
- Hasegawa, A., Hara-Kudo, Y., & Kumagai, S. 2011. Survival of *Salmonella* strains differing in their biofilm-formation capability upon exposure to hydrochloric and acetic acid and to high salt. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(9), 1163-1168.
- Hiyoshi, H., Tiffany, C. R., Bronner, D. N., & Bäuml, A. J. 2018. Typhoidal *Salmonella* serovars: ecological opportunity and the evolution of a new pathovar. *FEMS microbiology reviews*, 42(4), 527–541.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 322-332.
- Hutchinson, G. E. 1948. Circular causal systems in ecology. *Ann. NY Acad. Sci*, 50(4), 221-246.
- Hudson, A. W., Barnes, A. J., Bray, A. S., Ornelles, D. A., & Zafar, M. A. 2022. *Klebsiella pneumoniae* l-fucose metabolism promotes gastrointestinal colonization and modulates its virulence determinants. *Infection and Immunity*, 90(10), e00206-22.
- Hussain, S. B., Shi, C. Y., Guo, L. X., Kamran, H. M., Sadka, A., & Liu, Y. Z. 2017. Recent advances in the regulation of citric acid metabolism in citrus fruit. *Critical reviews in plant sciences*, 36(4), 241-256.
- Hutchinson, G. E. 1948. Circular causal systems in ecology. *Ann. NY Acad. Sci*, 50(4), 221-246.
- Iacobazzi, V., & Infantino, V. 2014. Citrate—new functions for an old metabolite. *Biological chemistry*, 395(4), 387-399.
- Jakubovics, N. S. 2015. Intermicrobial interactions as a driver for community composition and stratification of oral biofilms. *Journal of molecular biology*, 427(23), 3662-3675.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 81(1), 7–11.

- Jensen, P. Ø., Givskov, M., Bjarnsholt, T., & Moser, C. 2010. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 59(3), 292-305.
- Jiang, L., Wang, P., Song, X., Zhang, H., Ma, S., Wang, J., & Wang, L. 2021. *Salmonella* Typhimurium reprograms macrophage metabolism via T3SS effector SopE2 to promote intracellular replication and virulence. Nature communications, 12(1), 1-18.
- Jiang, X. M., Neal, B., Santiago, F., Lee, S. J., Romana, L. K., & Reeves, P. R. 1991. Structure and sequence of the rfb (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar typhimurium (strain LT2). Molecular microbiology, 5(3), 695-713.
- Jin, X., Marshall, J. S., & Wargo, M. J., 2020. Hybrid model of bacterial biofilm growth. Bulletin of Mathematical Biology, 82(2), 1-32.
- Kalai Chelvam, K., Yap, K. P., Chai, L. C., & Thong, K. L. 2015. Variable responses to carbon utilization between planktonic and biofilm cells of a human carrier strain of *Salmonella enterica* serovar typhi. PLoS One, 10(5), e0126207.
- Kenyon, W. J., Thomas, S. M., Johnson, E., Pallen, M. J., & Spector, M. P. 2005. Shifts from glucose to certain secondary carbon-sources result in activation of the extracytoplasmic function sigma factor σE in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology (Reading, England), 151(Pt 7), 2373.
- Kırmusaoğlu, S. 2016. Staphylococcal biofilms: Pathogenicity, mechanism and regulation of biofilm formation by quorum sensing system and antibiotic resistance mechanisms of biofilm embedded microorganisms. Microbial biofilms: importance and applications. IntechOpen, 189-209.
- Kierck-Pearson, K., & Karatan, E. 2005. Biofilm development in bacteria. Advances in applied microbiology, 57, 79-111.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Molecular microbiology, 48(6), 1511-1524.
- Kornberg, H. L. 1966. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. Biochemical Journal, 99(1), 1.
- Kövilein, A., Kubisch, C., Cai, L., & Ochsenreither, K. 2020. Malic acid production from renewables: a review. Journal of chemical technology & biotechnology, 95(3), 513-526.
- Krebs, H. A. 1954. The tricarboxylic acid cycle. In Chemical pathways of metabolism (pp. 109-171). Academic Press.
- Kreve, S., & Dos Reis, A. C. 2021. Bacterial adhesion to biomaterials: What regulates this attachment? A review. Japanese dental science review, 57, 85-96.

- Kwon, Y. M., & Ricke, S. C. 1998. Survival of a *Salmonella* typhimurium Poultry Isolate in the Presence of Propionic Acid under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Anaerobe*, 4(6), 251-256.
- Lange, M. D., Farmer, B. D., Declercq, A. M., Peatman, E., Decostere, A., & Beck, B. H. 2017. Sickeningly Sweet: L-rhamnose stimulates *Flavobacterium columnare* biofilm formation and virulence. *Journal of fish diseases*, 40(11), 1613-1624.
- Lorenz, M. C., & Fink, G. R. 2002. Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic cell*, 1(5), 657-662.
- Luo, A., Wang, F., Sun, D., Liu, X., & Xin, B. 2022. Formation, development, and cross-species interactions in biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 757327.
- Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.
- Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., and International Collaboration on Enteric Disease "Burden of Illness" Studies. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical infectious diseases*, 50(6), 882-889.
- Marolda, C. L., & Valvano, M. A. 1995. Genetic analysis of the dTDP-rhamnose biosynthesis region of the *Escherichia coli* VW187 (O7: K1) rfb gene cluster: identification of functional homologs of rfbB and rfbA in the rff cluster and correct location of the rffE gene. *Journal of bacteriology*, 177(19), 5539-5546.
- Mercado-Lubo, R., Leatham, M. P., Conway, T., & Cohen, P. S. 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutants unable to convert malate to pyruvate and oxaloacetate are avirulent and immunogenic in BALB/c mice. *Infection and immunity*, 77(4), 1397-1405.
- Merli, G., Becci, A., Amato, A., & Beolchini, F. 2021. Acetic acid bioproduction: The technological innovation change. *Science of the Total Environment*, 798, 149292.
- Mills, E., & O'Neill, L. A. 2014. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends in cell biology*, 24(5), 313-320.
- Mitosch, K., Beyß, M., Phapale, P., Drotleff, B., Nöh, K., Alexandrov, T., & Typas, A. 2023. A pathogen-specific isotope tracing approach reveals metabolic activities and fluxes of intracellular *Salmonella*. *PLoS Biology*, 21(8), e3002198.
- Monds, R. D., Silby, M. W., & Mahanty, H. K. 2001. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Molecular Microbiology*, 42(2), 415-426.
- Moraes, J. O., Cruz, E. A., Souza, E. G., Oliveira, T. C., Alvarenga, V. O., Peña, W. E., & Magnani, M. 2018. Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different

- serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. *International journal of food microbiology*, 281, 90-100.
- Mumy, K. L. 2014. *Salmonella*. In *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 211–212). Elsevier.
- Neidhardt, F. C. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology.
- Ngwai, Y. B., Adachi, Y., Ogawa, Y., & Hara, H. 2006. Characterization of biofilm-forming abilities of antibiotic-resistant *Salmonella* typhimurium DT104 on hydrophobic abiotic surfaces. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 39(4), 278-291.
- Pacheco, A. R., Curtis, M. M., Ritchie, J. M., Munera, D., Waldor, M. K., Moreira, C. G., & Sperandio, V. 2012. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature*, 492(7427), 113-117.
- Pal, M. K., & Lavanya, M. 2022. Microbial influenced corrosion: understanding bioadhesion and biofilm formation. *Journal of Bio-and Tribo-Corrosion*, 8(3), 76.
- Park, S., & Sauer, K. 2022. Controlling biofilm development through cyclic di-GMP signaling. *Pseudomonas aeruginosa: Biology, Pathogenesis and Control Strategies*, 69-94.
- Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 27-33.
- Paytubi, S., Cansado, C., Madrid, C., & Balsalobre, C. 2017. Nutrient composition promotes switching between pellicle and bottom biofilm in *Salmonella*. *Frontiers in microbiology*, 8, 2160.
- Penniston, K. L., Nakada, S. Y., Holmes, R. P., & Assimios, D. G. 2008. Quantitative assessment of citric acid in lemon juice, lime juice, and commercially-available fruit juice products. *Journal of Endourology*, 22(3), 567-570.
- Petrova, O. E., & Sauer, K. 2012. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of bacteriology*, 194(10), 2413-2425.
- Prusky, D. B., & Wilson, R. A. 2018. Does increased nutritional carbon availability in fruit and foliar hosts contribute to modulation of pathogen colonization?. *Postharvest biology and technology*, 145, 27-32.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Hidayah, N. and Son, R. 2011. *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18(2).
- Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., & Handley, P. S. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in microbiology*, 11(2), 94-100.

- Riitenberg, D., & Block, K. 1944. The utilization of acetic acid for fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 154, 311-312.
- Roca, C., Alves, V. D., Freitas, F., & Reis, M. A. 2015. Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in microbiology*, 6, 137116.
- Rosenberg, G., Yehezkel, D., Hoffman, D., Mattioli, C. C., Fremder, M., Ben-Arosh, H., & Avraham, R. 2021. Host succinate is an activation signal for *Salmonella* virulence during intracellular infection. *Science*, 371(6527), 400-405.
- Roy, P. K., Ha, A. J. W., Mizan, M. F. R., Hossain, M. I., Ashrafudoulla, M., Toushik, S. H., & Ha, S. D. 2021. Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. *Poultry Science*, 100(7), 101209
- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M. 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1-52.
- Sarkhel, R., Apoorva, S., Priyadarsini, S., Sridhar, H. B., Bhure, S. K., & Mahawar, M. 2022. Malate synthase contributes to the survival of *Salmonella* Typhimurium against nutrient and oxidative stress conditions. *Scientific Reports*, 12(1), 15979.
- Schubert, C., & Uden, G. 2022. C4-dicarboxylates as growth substrates and signaling molecules for commensal and pathogenic enteric bacteria in mammalian intestine. *Journal of bacteriology*, 204(4), e00545-21.
- Shirtliff, M. E., Mader, J. T., & Camper, A. K. 2002. Molecular interactions in biofilms. *Chemistry & Biology*, 9(8), 859-871.
- Sillitoe, P. (Ed.). 2022. Sustainable development: An appraisal from the Gulf region. Berghahn Books
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., & Lasa, I. 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular microbiology*, 43(3), 793-808.
- Spiga, L., Winter, M. G., de Carvalho, T. F., Zhu, W., Hughes, E. R., Gillis, C. C., & Winter, S. E. 2017. An oxidative central metabolism enables *Salmonella* to utilize microbiota-derived succinate. *Cell host & microbe*, 22(3), 291-301.
- Staib, L., & Fuchs, T. M. 2015. Regulation of fucose and 1, 2-propanediol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Frontiers in microbiology*, 6, 160418.
- Steenackers, H. Hermans, K., Vanderleyden, J., and de Keersmaecker, S.C.J. 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 502–531.

- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, 40:175–179.
- Straub, H., Bigger, C. M., Valentin, J., Abt, D., Qin, X. H., Eberl, L., & Ren, Q. 2019. Bacterial adhesion on soft materials: passive physicochemical interactions or active bacterial mechanosensing?. *Advanced healthcare materials*, 8(8), 1801323.
- Tan, Y. N., & Li, Q. 2018. Microbial production of rhamnolipids using sugars as carbon sources. *Microbial cell factories*, 17, 1-13.
- Tolker-Nielsen, T. 2015. Biofilm development. *Microbial Biofilms*, 51-66.
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N., 2016. Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(1), 7-12
- Tretter, L., Patocs, A., & Chinopoulos, C. 2016. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(8), 1086-1101.
- Vanhooren, P. T., & Vandamme, E. J. 1999. L-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 74(6), 479-497.
- Verhulst, P. F. 1847. Deuxième mémoire sur la loi d'accroissement de la population (Vol. 269). Hayez
- Verotta, D., Haagenen, J., Spormann, A. M., & Yang, K. 2017. Mathematical modeling of biofilm structures using COMSTAT data. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2017(1), 7246286.
- Viljoen, A., Mignolet, J., Viela, F., Mathelié-Guinlet, M., & Dufrêne, Y. F. 2020. How microbes use force to control adhesion. *Journal of Bacteriology*, 202(12), 10-1128.
- Wright, E. M. 1946. The non-linear difference-differential equation. *The Quarterly Journal of Mathematics*, (1), 245-252.
- Zeikus, J. G., Jain, M. K., & Elankovan, P. 1999. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied microbiology and biotechnology*, 51, 545-552.
- Zheng, S., Bawazir, M., Dhall, A., Kim, H. E., He, L., Heo, J., & Hwang, G. 2021. Implication of surface properties, bacterial motility, and hydrodynamic conditions on bacterial surface sensing and their initial adhesion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 643722.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular microbiology*, 39(6), 1452-1463.

