

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN *SALMONELLA* BİYOFİLMİ ÜZERİNE  
İNHİBİSYON ETKİSİ**

**Şeyma GÖKSEL**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2021**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN *SALMONELLA* BİYOFİLMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİ

Şeyma GÖKSEL

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Bu çalışma kapsamında Türkiye’de geleneksel olarak üretilen fermente gıdalardan ve insan kaynaklı materyallerden izole edilerek probiyotik özellikleri tanımlanan; *Lactobacillus plantarum* M16 (plantarisin üreticisi), *Lactobacillus sake* M17 (sakasin üreticisi), *Pediococcus acidilactici* M20 (pediosin üreticisi), *Bifidobacterium langum* M23 (bifidosin A üreticisi), *Bifidobacterium bifidum* M24 (bifidosin B üreticisi) ve *Pediococcus pentosaceus* M46 (bakteriyosin benzeri antimikrobiyal bileşik üreticisi) suşlarının *Salmonella* Typhimurium’da biyofilm oluşumu ve olgun biyofilmlerin eradikasyonu üzerine etkinlikleri belirlenmiştir. Probiyotik suşların kültür filtratlarının *S. Typhimurium*’a karşı denenmesi sonucunda, doğal suş ve mutantlarda (*dam* ve *seqA*) biyofilm oluşumunun tamamen engellendiği tespit edilmiştir. Aynı filtratların olgun biyofilm yapıları üzerinde denenmesi sonucunda ise, olgun biyofilm yapılarının özellikle uygulamanın ilk 6 saatinde istatistiki açıdan anlamlı düzeylerde ( $p<0.05$ ) eradike edildiği saptanmıştır. Söz konusu kültür filtratlarında belirlenen antibiyofilm aktivitesinin kaynağının araştırılması amacı ile, kültür filtratları nötralize edilerek ve nötralize kültür filtratlarına proteinaz K muamele edilerek ayrı ayrı denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler; her iki uygulama sonucunda da başlangıçta belirlenen antibiyofilm aktivitelerinin istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde düştüğünü ( $p<0.05$ ) göstermiştir. Bu veriler ışığında, Türkiye kökenli probiyotik suşlarında tanımlanan çok güçlü antibiyofilm aktivitelerinin, büyük oranda bu suşların ürettiği bakteriyosinlerden ileri geldiği yorumu yapılmıştır.

**Ocak 2021, 76 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *S. Typhimurium*, Probiyotik Suş, Bakteriyosin, Antibiyofilm Aktivitesi

## ABSTRACT

Master Thesis

### INHIBITION EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA ON *SALMONELLA* BIOFILM

Şeyma GÖKSEL

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

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

In this study, the effectiveness of the strains *Lactobacillus plantarum* M16 (plantaricin producer), *Lactobacillus sake* M17 (sakasin producer), *Pediococcus acidilactici* M20 (pediocin producer), *Bifidobacterium langum* M23 (bifidocin A producer), *Bifidobacterium bifidum* M24 (bifidocin B producer) and *Pediococcus pentosaceus* M46 (bacteriocin like antimicrobial substance producer) which are isolated from human-sourced materials and fermented foods produced traditionally in Turkey and whose probiotic properties are defined on biofilm formation and eradication of mature biofilms in *Salmonella* Typhimurium have been determined. As a result of testing the culture filtrates of probiotic strains against *S. Typhimurium*, it was determined that biofilm formation in wild type strains and mutants (*dam* and *seqA*) was completely prevented. As a result of testing the same filtrates on mature biofilm structures, it was determined that mature biofilm structures were eradicated at statistically significant levels ( $p < 0.05$ ), especially in the first 6 hours of the application. In order to investigate the source of antibiofilm activity determined in the said culture filtrates, separate trials were carried out by neutralizing the culture filtrates and treating the neutralized culture filtrates with proteinase K. The data obtained from these studies; showed that the antibiofilm activities determined at the beginning decreased in a statistically significant way ( $p < 0.05$ ) as a result of both applications. In light of this data, it is concluded that the strong antibiofilm activities of Turkey originated probiotic strains were largely come forward from bacteriocins produced by these strains.

January 2021, 76 pages

**Key words:** *S. Typhimurium*, Probiotic Strain, Bacteriocin, Antibiofilm Activity

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi ve önerileri ile bilimsel gelişmeye başından sonuna kadar katkıda bulunan; hayata yaklaşımıyla bizlere örnek olan, bilgi ve deneyimlerini her zaman bizimle paylaşan kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), başta Sarah Farhad NİHAD olmak üzere laboratuvar ortamında benden yardımını esirgemeyen arkadaşlarıma, hayallerime giden bu yolculuğa katılmama vesile olan ve her an bana desteğini hissettiren Adem DEMİR'e katkılarından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca beni yetiştiren babam Adem GÖKSEL ve annem Ayşe GÖKSEL' e emeklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Şeyma GÖKSEL  
Ankara, Ocak 2021

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

|                                                                                                                                                                                                                          |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ETİK.....                                                                                                                                                                                                                | i    |
| ÖZET .....                                                                                                                                                                                                               | ii   |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                                                                                           | iii  |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                                                                                                                                           | iv   |
| SİMGELER DİZİNİ .....                                                                                                                                                                                                    | vii  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                                                                                                                                    | viii |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                                                                                                                           | 1    |
| 2. KURAMSAL TEMELLER.....                                                                                                                                                                                                | 4    |
| 2.1 Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi.....                                                                                                                                                                                  | 4    |
| 2.2 Biyofilm Yapılarının Bakterilere Sağladığı Yararlar .....                                                                                                                                                            | 7    |
| 2.3 Biyofilm Oluşum Aşamaları.....                                                                                                                                                                                       | 9    |
| 2.3.1 Quorum sensing (yeter sayı algılama) mekanizması.....                                                                                                                                                              | 13   |
| 2.4 Salmonella Cinsinin Genel Özellikleri .....                                                                                                                                                                          | 14   |
| 2.4.1 Salmonella biyofilmlerinin klinik ve endüstriyel önemi.....                                                                                                                                                        | 14   |
| 2.5 Laktik Asit Bakterileri.....                                                                                                                                                                                         | 17   |
| 2.6 Probiyotik Olarak Laktik Asit Bakterileri .....                                                                                                                                                                      | 19   |
| 2.7 Probiyotik Özellikte Laktik Asit Bakterileri Kullanarak Salmonella<br>Biyofilm Oluşumunun Kontrolü ve Eradikasyonu .....                                                                                             | 21   |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                                                                                                                                                                               | 25   |
| 3.1 Materyal .....                                                                                                                                                                                                       | 25   |
| 3.1.1 Bakteriler .....                                                                                                                                                                                                   | 25   |
| 3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler.....                                                                                                                                                                                        | 25   |
| 3.2 Yöntem .....                                                                                                                                                                                                         | 28   |
| 3.2.1 Agar spot ve kuyu difüzyonu yöntemi ile probiyotik suşların<br>bakteriyosin üretim yeteneklerinin belirlenmesi .....                                                                                               | 28   |
| 3.2.2 Probiyotik suşların Salmonella biyofilmleri üzerine etkilerinin<br>belirlenmesi .....                                                                                                                              | 29   |
| 3.2.2.1 Doğal ve mutant Salmonella suşlarının biyofilm üretim miktarlarının<br>belirlenmesi .....                                                                                                                        | 29   |
| 3.2.2.2 Probiyotik LAB' nin S. Typhimurium 14028 ve onun $\Delta$ dam ve<br>$\Delta$ seqA mutantlarının biyofilm oluşumları üzerine etkisi .....                                                                         | 30   |
| 3.2.2.3 Probiyotik filtratlarının Salmonella Typhimurium 14028 doğal suşu ve<br>onun $\Delta$ dam ve $\Delta$ seqA mutantlarının oluşturduğu biyofilm yapılarının<br>eradikasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi ..... | 32   |

|                                                                                                                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULAR .....</b>                                                                                                                                                       | <b>33</b> |
| <b>4.1 Probiyotik Suşların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. ....</b>                                                                                                         | <b>33</b> |
| <b>4.2 Probiyotik Suşların Kültür Filtratlarının, S. Typhimurium 14028 Doğal Suşu ve Onun dam ve seqA Mutantlarının Biyofilm Oluşturma Özelliği Üzerine Etkisinin Belirlenmesi. ....</b> | <b>35</b> |
| <b>4.2.1 Salmonella doğal suşu ve mutantlarının optimum biyofilm oluşturma süresinin belirlenmesi. ....</b>                                                                              | <b>35</b> |
| <b>4.2.2 Probiyotik suşların kültür filtratlarının, S. Typhimurium 14028 doğal suş ve mutantlarının biyofilm üretimi üzerine etkisi .....</b>                                            | <b>36</b> |
| <b>4.3 Probiyotik Kültür Filtratlarının, Salmonella Doğal Suşu ve Mutantlarının Oluşturduğu Olgun Biyofilmlerin Eradikasyonu Üzerine Etkisi .....</b>                                    | <b>37</b> |
| <b>4.4 Nisin ve Probiyotik Kültür Filtratlarının, Salmonella Doğal Suşu ve Mutantlarının Oluşturduğu Olgun Biyofilmlerin Eradikasyonu Üzerine Birlikte Etkisi .....</b>                  | <b>39</b> |
| <b>4.5 Nötralize Edilmiş (pH 7.0) Probiyotik Suş Kültür Filtratlarının Salmonella'da Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi .....</b>                                                           | <b>43</b> |
| <b>4.6 Nötralize Edilmiş (pH 7.0) Probiyotik Suş Kültür Filtratlarının Salmonella Biyofilmi Eradikasyonu Üzerine Etkisi .....</b>                                                        | <b>45</b> |
| <b>4.7 Nötralize Edilmiş Kültür Filtratları (pH 7.0) ve Proteinaz K Enziminin Kombine Kullanımının Salmonella'da Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi .....</b>                               | <b>46</b> |
| <b>4.8 Nötralize Edilmiş Kültür Filtratları (pH 7.0) ve Proteinaz K Enziminin Kombine Kullanımının Salmonella Olgun Biyofilmlerinin Eradikasyonuna Etkisi .....</b>                      | <b>53</b> |
| <b>5. SONUÇ ve TARTIŞMA .....</b>                                                                                                                                                        | <b>55</b> |
| <b>6. KAYNAKLAR .....</b>                                                                                                                                                                | <b>62</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                                                                                                                    | <b>76</b> |

## SİMGELER DİZİNİ

|                    |                                      |
|--------------------|--------------------------------------|
| $\Delta$           | Mutant                               |
| LAB                | Laktik Asit Bakterileri              |
| EDTA               | Etilen Diamin Tetraasetik Asit       |
| EPS                | Ekstrasellüler Polimerik Matriks     |
| eDNA               | Ekstraselüler DNA                    |
| NaCl               | Sodyum Klorür                        |
| PBS                | Fosfatla Tamponlanmış Su             |
| SDS                | Sodyum Dodezil Sülfat                |
| QS                 | Quorum Sensing (yeter sayı algılama) |
| DNA                | Deoksiribonükleik Asit               |
| RNA                | Ribonükleik Asit                     |
| FAO                | Tarım ve Gıda Örgütü                 |
| WHO                | Dünya Sağlık Örgütü                  |
| $^{\circ}\text{C}$ | Selsius Derecesi                     |
| $\mu\text{L}$      | Mikrolitre                           |
| mL                 | Mililitre                            |
| nm                 | Nanometre                            |
| $\mu\text{m}$      | Mikrometre                           |
| mm                 | Milimetre                            |
| mM                 | Mikromolar                           |
| $\mu\text{g}$      | Mikrogram                            |
| mg                 | Miligram                             |
| g                  | Gram                                 |
| rpm                | Dakikada Devir Sayısı                |
| v/v                | Hacim/hacim                          |
| w/v                | Ağırlık/hacim                        |
| CO <sub>2</sub>    | Karbondioksit                        |
| OD                 | Optik yoğunluk                       |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 Biyofilm makriksinin mantar ve kuleler görünümündeki genel şeması .....                                                                                                                                    | 6  |
| Şekil 2.2 Bakteriyel biyofilm yapılarının oluşum ve dağılma aşamaları .....                                                                                                                                          | 10 |
| Şekil 4.1 Probiyotik suşların Salmonella'ya karşı antimikrobiyal aktiviteleri .....                                                                                                                                  | 34 |
| Şekil 4.2 S. Typhimurium 14028 doğal suşu ve bu suşun dam ve seqA geni bakımından mutantlarının polistiren yüzeylerde biyofilm üretim miktarları                                                                     | 36 |
| Şekil 4.3 Probiyotik Filtratların Biyofilm Oluşumuna Etkisi .....                                                                                                                                                    | 37 |
| Şekil 4.4 Probiyotik suş kültür filtratların Salmonella'da olgun biyofilm yapıları (6 Saat) üzerine etkisi .....                                                                                                     | 38 |
| Şekil 4.5 Probiyotik suş kültür filtratların Salmonella'da olgun biyofilm yapıları (24 Saat) üzerine etkisi.....                                                                                                     | 39 |
| Şekil 4.6 Probiyotik suş kültür filtratları+nisin kombinasyonlarının Salmonella olgun biyofilmlerinin üzerine etkisi ( 12 saat ) .....                                                                               | 40 |
| Şekil 4.7 Probiyotik suş kültür filtratları+nisin kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun olgun biyofilmleri üzerine etkisi ( 24 Saat ) .....                                                          | 41 |
| Şekil 4.8 Probiyotik suş kültür filtratları+nisin kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun dam geni mutantının olgun biyofilmleri üzerine etkisi (24 Saat ) .....                                       | 42 |
| Şekil 4.9 Probiyotik suş kültür filtratları+nisin kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun seqA geni mutantının olgun biyofilmleri üzerine etkisi (24 Saat) .....                                       | 42 |
| Şekil 4.10 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun (WT) ve dam (DAM) ve seqA geni mutantlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (24 Saat) .....                    | 43 |
| Şekil 4.11 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun (WT) ve dam (DAM) ve seqA geni mutantlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (48 Saat) .....                    | 44 |
| Şekil 4.12 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun (WT) ve dam (DAM) ve seqA geni mutantlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi ( 72 Saat) .....                   | 44 |
| Şekil 4.13 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun (WT) ve dam (DAM) ve seqA geni mutantlarının olgun biyofilmleri üzerine etkisi (24 Saat) .....                  | 45 |
| Şekil 4.14 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun (WT) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (24 saat) .....                     | 46 |
| Şekil 4.15 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun dam geni mutantının (DAM) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (24 Saat) .... | 47 |

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.16 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun seqA geni mutantının (SeqA) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (24 Saat) .....  | 47 |
| Şekil 4.17 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun (WT) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (48 Saat) .....                         | 48 |
| Şekil 4.18 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun dam geni mutantının (DAM) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (48 Saat) ....     | 49 |
| Şekil 4.19 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun seqA geni mutantının (SeqA) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (48 Saat) .....  | 50 |
| Şekil 4.20 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun (WT) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (72 Saat) .....                         | 51 |
| Şekil 4.21 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun dam geni mutantının (DAM) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (72 Saat) ....     | 52 |
| Şekil 4. 22 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun seqA geni mutantının (SeqA) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (72 Saat) ..... | 52 |
| Şekil 4.23 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun (WT) olgun biyofilmi üzerine etkisi (24 Saat) .....                                     | 53 |
| Şekil 4.24 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun dam geni mutantının (DAM) olgun biyofilmi üzerine etkisi (24 Saat) .....                | 54 |
| Şekil 4.25 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının S. Typhimurium 14028 doğal suşunun seqA geni mutantının (SeqA) olgun biyofilmi yeteneği üzerine etkisi (24 Saat) .....     | 54 |

## 1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), birçok fermente gıda ürününün otokton mikrobiyotasının bir bölümünü oluşturmaktadır (Abriouel vd. 2012 ). Fermente gıda endüstrisinde yaygın bir şekilde starter kültür olarak kullanılan bu bakteri grubunun, söz konusu ürünlerin tipik yapı, aroma ve tat bileşiklerinin oluşturulmasına önemli ölçüde katkı sunan teknolojik özellikleri bulunmaktadır (Lahtinen vd. 2011). Söz konusu özellikleri; fermentasyon ortamında organik asit oluşturma yetenekleri, güçlü proteolitik aktivite sistemleri sayesinde proteinlerin parçalanması, antimikrobiyal bileşikler üretmeleri, sitrat fermentasyonu sonucu diasetil ve asetoin üretme kapasiteleri ve bakteriyofajlara karşı dirençlilikleri olarak özetlenebilir. Diğer yandan LAB'nin yaklaşık 10 bin yıldır gıda ve yem fermentasyonlarında kullanımı; onların genelde insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından güvenilir düzeyli (GRAS) organizmalar olarak tanımlanmalarını beraberinde getirmiştir (Liu vd. 2011, Favaro vd. 2014, Palomino vd. 2015).

LAB'nin birçok suşu günümüzde probiyotik olarak tanımlanmış ve bunların bazıları, bu amaçla endüstriyel ölçekte üretilerek gıda güvenliğinin ya da insan ve hayvan sağlığının korunmasının sağlanması doğrultusunda kullanıma sunulmuştur. Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından yapılan tanıma göre probiyotikler, yeterli miktarlarda uygulandıklarında canlı konağa sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizma preparatlarıdır ( FAO / WHO 2006 ). Probiyotiklerin temel fonksiyonel özellikleri arasında; asitlere ve safra tuzlarına dirençlilik, epitel yüzeylere tutunma ve bağırsak patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivite en kritik olanlarıdır. Probiyotikler, yukarıda sayılan temel özellikleri sayesinde; konakçı hücrelerde bulunan patojenlere karşı geliştirilmiş kolonizasyon direncine katkıda bulunarak, bağırsakta mukus salgısı ve antimikrobiyel peptitler gibi elemanların belirlediği patojen işgalini engelleyen özellikleri güçlendirerek, konakçı bağışıklık sistemini (immün sistemi) teşvik ederek ya da bağırsak mikrobiyotasının bileşimi ve aktivitesini yönlendirerek, konakçı organizma sistemlerini sağlıklı tutarlar ya da yeniden sağlıklı koşulların oluşumunu teşvik ederler (Savard vd. 2011, Wan vd. 2015, Jonkers 2016 ).

Gıda kökenli patojenler, günümüzde mikrobiyal enfeksiyonların en önemli etkenlerinin başında gelmektedir. Bu mikroorganizmalar, endüstriyel süreçlerde önemli düzeyde ürün ve zaman kayıplarına yol açmalarının yanında, insan ve hayvan sağlığı ve çevre açısından da ciddi sorunlar oluşturmaktadırlar. Ayrıca, en önemli üyelerinden birini *Salmonella* serovaryetelerinin oluşturduğu bu mikroorganizmaların tek ya da karışık suşlardan meydana gelen biyofilm oluşturma yetenekleri, onları bulundukları biyotik ya da abiyotik yüzeylerde kalıcı patojen mikroorganizma kaynağı haline getirmektedir. Çok hücreli organizma benzeri bir yaşam formu olan biyofilm formları, onları çevreleyen ekzopolimerik matriks ve bu matriks içerisindeki hücre topluluğunun koordineli genetik ve biyokimyasal regülasyonu sayesinde; sterilizasyon, dezenfeksiyon ajanlarına ve besinsel yetersizlik başta olmak üzere, her türlü çevresel stres koşuluna karşı dirençlilik kazanmaktadır (Midelet ve Carpentier 2004, Gandhi ve Chikindas 2007, Carpentier ve Cerf 2011 ). Biyofilm formlarının doğada yaygınlığı ve yukarıda özetlenen tanımlanmış özellikleri; *Salmonella* gibi tüm dünyada yaygın ve önemli gıda kökenli patojenlerle gerçekleşen enfeksiyonların kontrolü ya da eradikasyonu yönünde yürütülen mücadelede, söz konusu bakterilerin planktonik (serbest) formlarından çok, biyofilm formlarının esas alınması gerekliliğini zorunlu kılmıştır (Winkelströter vd. 2013, Pérez-Ibarreche vd. 2014, Jonkers 2016).

Biyofilmlerin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinden kaynaklanan direnci, patojen mikroorganizmalara karşı yürütülen klasik mücadele yöntemlerini birçok durumda etkisiz kılmaktadır. Özellikle kimyasal antibiyofilm ajanlarına karşı yüksek düzeyde direnç göstermeleri, planktonik formlara karşı etkin kontrol stratejilerinden herhangi bir yarar sağlanamamasının ana nedenidir ( Falagas ve Makris 2009, Hibbing vd. 2010 ). Günümüzde, biyokontrol olarak tanımlayabileceğimiz daha etkin ve güvenilir antibiyofilm stratejilerinin geliştirilmesi yönünde ciddi çabalar harcanmaktadır. Bu girişimlerin en umut vaat eden uygulamalarından biri, biyofilm yapılarının kontrolü ve eradikasyonunda probiyotik özellik taşıyan LAB suşlarının kullanımınıdır ( Lobos vd. 2009 , Gómez vd. 2012, Coughlan vd. 2016, Camargo vd. 2018). Etkinliği yanında güvenilirliği ve çevre dostu bir özelliğe sahip oluşu, bu stratejinin en önemli avantajlarıdır.

Literatürde yer alan bu temel bilgiler ve deneyimler doğrultusunda tasarladığımız tez çalışmasında; gıda ve sağlık açısından çok önemli bir patojen olan *Salmonella* serovaryetelerinin oluşturdukları biyofilm yapılarının kontrolü ve eradikasyonunda, çalışma grubumuz tarafından daha önceden geleneksel fermente ürünlerinin yanında insan örneklerinden izole edilerek, bakteriyosin üretim yetenekleri ve probiyotik özellikleri tanımlanmış olan laktik asit bakterilerinin kullanım olanaklarının araştırılması hedeflenmiştir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Biyofilmin Tanımı ve Tarihçesi

Biyofilm, bir yüzeye tutunmuş, söz konusu yapıya katılan hücrelerin salgıladığı hücre dışı DNA, proteinler, karbohidratlar ve kompleks lipitler gibi polimerleri içeren, akışkanlığı düşük sulu faza (ekzopolisakkarit=EPS) gömülü mikrobiyal hücrelerle karakterize edilen mikroorganizma topluluklarıdır (mikroorganizma kmmüniteleri). Biyofilm benzeri yapılar, ilk olarak 17. yüzyılda Hollanda'lı tüccar ve kaşif Antonie van Leeuwenhoek tarafından ileri sürülmüştür. Antonie van Leeuwenhoek, örnekleme materyali olarak kendi dişlerini kullanmış ve buradan kazıdığı katmanları, yine kendisinin geliştirdiği basit bir mercek sisteminden ibaret olan ilkel mikroskobunda incelemiştir. Bu mikroskop altında gördüğü yapıları şematize ederek, söz konusu organizmaları "animalcules" (küçük hayvancıklar) olarak tanımlamıştır (Donlan ve Costerton 2002). Yukarıda anılan tanıma en yakın yaklaşımla, bu mikroorganizma toplulukları için "Biyofilm" terimini ilk kullanan bilim insanı ise, modern biyofilm kavramının yaratıcısı Bill Costerton'dur (Scott vd. 2014). Biyofilm yapıları üzerinde sağlanan bilgi birikimi ışığında, biyofilm ifadesi zamanla değişikliklere uğramıştır. Günümüzde biyofilm terimi, en genel kabul gören biçimi ile "cansız ya da canlı yüzeylere geri dönüşümsüz bir şekilde tutunan ve ürettikleri hücre dışı polimerik matriks içerisinde çok hücreli organizma benzeri davranış gösteren mikroorganizma toplulukları" olarak ifade edilmektedir (Costerton vd. 1999, Donlan ve Costerton 2002, Hall-Stoodley vd. 2006, Hoiby vd. 2010). Mikrobiyal biyofilm; organizmaların dokuları, gıda ve gıda işleme materyali yüzeyleri, mamul gıda ürünleri taşıma ya da kaplama materyalleri, deri geçişli tıbbi implantlar, endüstriyel üretim sistemleri, içme suyu hatlarının taşıyıcı boruları veya doğal sucul sistemler gibi pek çok ortamda oluşturulabilmektedir (Kokare vd. 2009).

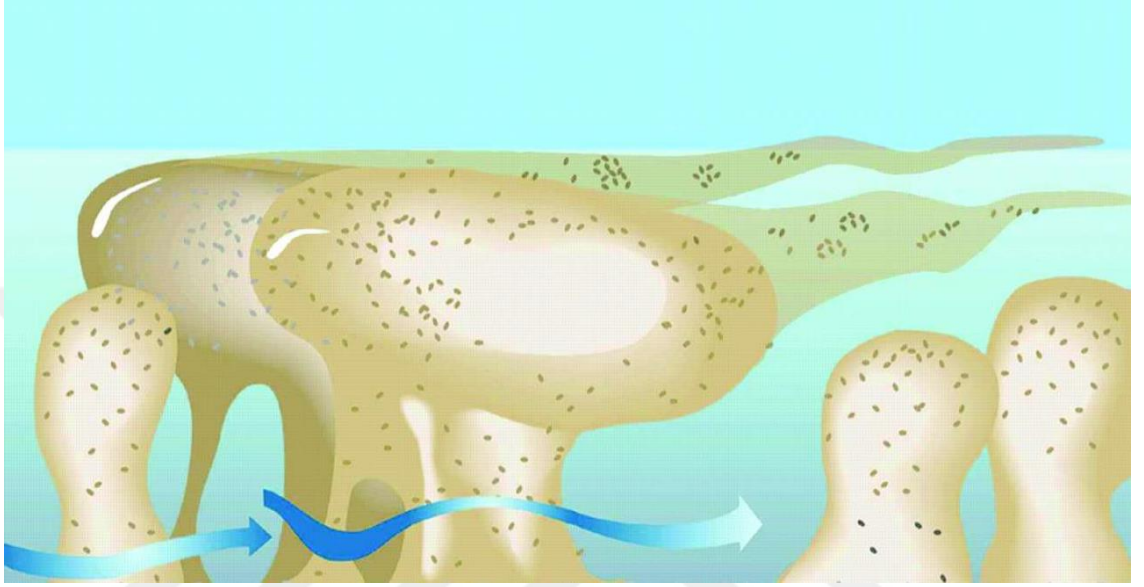
Yakın bir geçmişe kadar mikroorganizmalar, esasen temel yaşamsal fonksiyonlarını bağımsız bir şekilde yerine getiren planktonik formlar olarak görülmekteydi. Bu temel kabulden hareketle, mikroorganizmaların fizyolojisi ve fonksiyonel genetiği üzerine yapılan tüm araştırmalar planktonik karakterleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ancak

özellikle son 30 yılda biyofilm formları üzerinde yapılan yoğun araştırmalar ve buna paralel olarak oluşan bilgi birikimi, mikroorganizmaların doğadaki predominant yaşam formlarının, biyofilm formları olduğunu kanıtlamıştır. Biyofilm yapılarında en dikkat çekici özelliklerden biri, planktonik yaşam tarzlarından önemli ölçüde fenotipik ve fizyolojik farklılıklar içermeleridir (Davies 1999). Biyofilm yapısındaki bakteriler ve planktonik bakteriler arasında yaklaşık olarak % 1-10 düzeyinde gen ifadesi farkı vardır. Gen ifade düzeyleri ve metabolizma, aynı şekilde biyofilm oluşumunun farklı safhalarında da çeşitlilik göstermektedir (Schembri vd. 2003, Webb vd. 2003, Beloin ve Ghigo 2005). Biyofilm matrikslerinin içerisinde hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri, biyofilm yapılarına özgül olmayan çevresel kontaminantlar halinde bulunabilmektedir (Donlan 2002).

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur. Bakteriler ekstraselüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarit, nükleik asit, lipid ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar. Bakteriyel türlere bağlı olarak biyofilmlerin takriben % 10-25'i bakteri hücrelerinden, % 75-90'ı da ekzopolisakkarit matriksten oluşur. Fosil kayıtlarından edinilen bilgiler, prokaryotların 3 milyar yıldan daha uzun bir süreden beri biyofilmler içerisinde yaşadıklarını ortaya çıkarmıştır (Post vd. 2004, Hall-Stoodley vd. 2006, Hoiby vd. 2010).

Biyofilm oluşumları üzerinde yürütülen yapısal araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur (Davey ve O'toole 2000). Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan 'su kanalları' ihtiva eden, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptir (Bothwell ve Smith 2003). Doğal biyofilm yapılarının % 15'inin hücre ve % 85'inin ise hücre dışı polimerik ağ yapısını içerdiği belirlenmiştir. Bu yapının karakteristik şekli

mantar benzeri yükseltilerdir. İçerisinde yaşayan organizmalara bağlı olarak biyofilm matriksi farklı özellikler gösterebilir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilmler oluşturduğu ve Gram pozitif bakterilerin ise, katyonik matriksler oluşturduğu bilinmektedir (Donlan ve Costerton 2002) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Biyofilm matriksinin mantar ve kuleler görünümündeki genel şeması (Costerton ve Stewart 2000)

Biyofilm oluşumu kompleks bir süreçtir ve bu süreçte hücre dışı matriks oluşumu bir çok çevresel faktörden etkilenir. Matriks, hücre desikasyonunun önlenmesine, kimyasal dezenfeksiyon ajanları gibi çeşitli çevresel streslere karşı biyofilm içerisindeki hücrelerin korunmasına olanak sağlar (Zogaj vd. 2001, Anriany vd. 2006, Wynne vd. 2006, White vd. 2008, Steenackers vd 2012).

Biyofilmlerin içerisinde bulunan mikroorganizmalar, kendi ürettikleri sulu hücre dışı polimerik bileşenler (EPS) içerisine gömülü vaziyette kendi ideal dış çevrelerini oluşturarak yaşarlar. EPS'nin genellikle polisakkaritler, proteinler, lipitler ve nükleik asitler olarak tanımlanan ana yapısal bileşenleri; biyofilmlere mekanik bir stabilite sağlamalarının yanında, biyofilmler için kritik bir özellik olan yüzey adezyonunu güçlendirerek kohezif bir sistem oluştururlar. Bu üç boyutlu polimerik ağ, aynı zamanda, biyofilm içerisinde hücrelerin etkileşimini sağlar ve onları immobilize eder.

Tüm bunlara ilave olarak, biyofilm matriksi, eksternal bir sindirim sistemi gibi de fonksiyon gösterir. Hücrelerin yakınında bulunan hücre dışı enzimler, çözölmüş, kolloid yapıda ve katı biyopolimerlerin metabolize edilmesine yardımcı olmaktadır. Matriksin tesis ettiğı bu karmaşık organizasyon düzeyi, mikroorganizmaların dünya üzerindeki en başarılı yaşam formlarından birisi olmalarını sağlamaktadır (Donlan ve Costerton 2002).

Yukarıda yapılan tanımlardan hareketle, biyotik ya da abiyotik bir ortamda mikroorganizmalar tarafından oluşturulan her kommünitenin ‘biyofilm’ olarak adlandırılması hatasına düşölmemelidir. Zira bazı mikroorganizma kommünitelerinde planktonik hücre davranışı devam eder. Daha da önemlisi, bu yapıların hiçbirinde biyofilm içerisindeki bakterilerde izlenen farklı stres koşullarına karşı yüksek dirençlilik ve biyotik ya da abiyotik yüzeylere geri dönüşömsüz tutunma gibi özellikler bulunmaz. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki hücrelerin zamanla matriksten koparak ayrıldıkları ve serbest dolaşıma geçebildikleri de (planktonik form) unutulmamalıdır. Biyofilmlerden ayrılan hücreler planktonik forma dönüşmüş gibi görönseler de serbest dolaşıma geçen bu hücreler, planktonik formda olmalarına rağmen, salındıkları biyofilmin temel özelliklerini devam ettirirler. Bu durum, onları planktonik formlardan ayıran en temel özellikleridir (Donlan ve Costerton 2002).

## **2.2 Biyofilm Yapılarının Bakterilere Sağladığı Yararlar**

Bakteriler, laboratuvar ortamlarında ve doğal koşullarda oluşturdukları biyofilm formları sayesinde farklı koşullara uyum yetenekleri kazanırlar. Bakteriye formaların oluşturduğı biyofilmler, yapılarında bulunan hücrelere bilinen tüm çevresel faktörlere (ortanın nemi, iklimsel değışimler, H iyonu konsantrasyonu değışimleri ve radyasyon gibi) karşı yüksek düzeyde dirençlilik sağlar. Bakteriler için stok besin kaynaklarının oluşturulması ve toksik metabolitlerin hücre dışına transferi de biyofilm formlarının bakterilere sağladığı diğer avantajlardandır. Bakterilerin ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları, fagosite edilmelerini güçleştirir ve hü mor al immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmalarını engeller (Post ve Stoodley 2004). Mikroorganizmaların bağımsız formlara nazaran neden biyofilm formlarını tercih

ettikleri sorusuna yanıt olarak farklı açıklamalar yapılmaktadır. Bunlar arasında en yüksek düzeyde kabul görenleri aşağıdaki başlıklar altında toplamak mümkündür;

1) Mikroorganizmaları çevresel stres etkilerinden korumak: Biyofilm hücrelerinin salgıladıkları polimerlerden oluşan matriks (EPS), dış çevrenin neden olduğu olumsuz etkilerin temel bariyeridir. Bu kalkan sayesinde stres faktörlerinden maksimum düzeyde korunma sağlanır (Post ve Stoodley 2004).

2) Büyüme ve üreme faktörlerinin alımı ve metabolik süreçlerin koordinasyonu: Biyofilm yapılarındaki temel birimlerin (mikrokoloniler) etrafında, ilkel bir taşıma sistemi (primitif taşıma kanalları) yer alır. Söz konusu yapılar, ilkel bir dolaşım sistemi özelliklerine sahiptir. Böylece bir yandan çevreden sağlanan büyüme ve çoğalma için zorunlu materyalin biyofilm yapısında dağıtımı gerçekleştirilirken, bir yandan da hücresel atıkların uzaklaştırılması sağlanmış olur (Davey ve O'toole 2000).

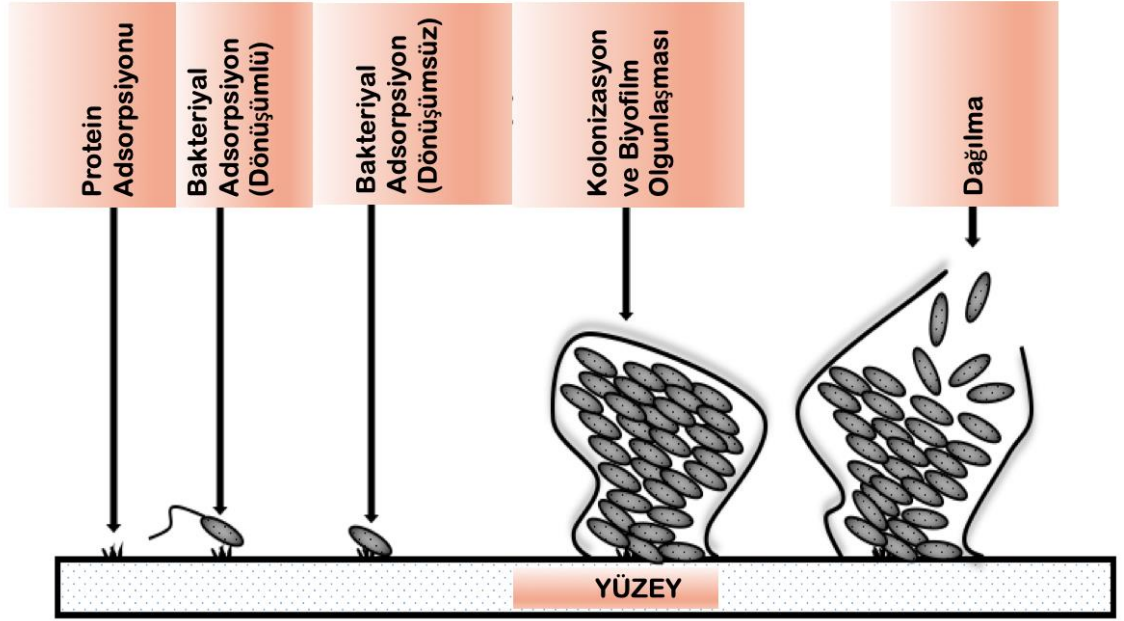
3) Genetik ve fonksiyonel düzenleme: Hücreler arasında meydana gelen lateral gen aktarımı, oluşturduğu genetik varyasyona paralel olarak, bakteriyal komünitelerin çevresel uyumunu sağlamada kritik bir rol oynamaktadır. Bu durum, çoklu ilaç dirençli formların oluşumunda bariz bir şekilde görülmektedir. Özellikle biyofilm yapısının kompakt doğası, konjugasyona ciddi kolaylıklar sağlamaktadır (Davey ve O'toole 2000).

Biyofilm oluşumunun, bakterilerin bir yüzey üzerinde yaşamaya geçmeleri gerekliliğini uyaran çevre koşullarını hissetmeleri sonucu başladığı düşünülmektedir. Bu çevresel sinyaller mikroorganizmalar arasında farklılıklar gösterebilir. Örneğin; *Pseudomonas aeruginosa* ve *P. fluorescens*, yaşamın mümkün olduğu her koşulda biyofilm oluşturabilmektedir. Buna rağmen, yeterli aminoasit miktarının bulunmadığı ortamlarda *Escherichia coli* K12 ve *Vibrio cholera* biyofilm oluşturmazlar. Ortamın besin durumu dışında, sıcaklık, osmolarite, pH, demir ve oksijen gibi diğer çevresel faktörler de biyofilm oluşumu üzerinde rol oynar. *P. gingivalis* ise düşük oksijen seviyeleri, yeterli besin kaynakları ve tutunma için uygun bir substrat yüzeyi varlığında biyofilm oluşumunu hızlandırır (Lamont vd. 2002).

Costerton (1994), biyofilm oluşumunun rastlantısal bir durumdan ziyade, bu yapıyı oluşturan hücrelerin yönlendirilmiş hareketini yansıttığını ileri sürmüştür. Söz konusu araştırmacı ileri sürdüğü tezi desteklemek için ise, sığır bağırsaklarında tespit edilen biyofilm yapıları üzerinde çalışmalar yapmıştır. Gastrointestinal sistemde selülozun sindirimi için beş farklı türün işbirliğine ihtiyaç olduğunun gösterilmesi, yukarıdaki iddiayı destekleyen en önemli kanıttır. Söz konusu türlerin selülozu metabolize edebilmeleri için ayrıca, birbiri ile koordineli biyofilm yapılarını tesis ettikleri de saptanmıştır. Öncelikle biyofilm ile bu metabolitin karşılaştığı yüzeyde, selülozu glukoz birimlerine parçalayan *Fibrobacter succinogenes* yer alır. Daha sonraki basamaktaki bakteriyal komünitede, glukoz alt ünitelerinden bütirat oluşumunu gerçekleştiren *Butirovibrio* cinsi bakteriler bulunur. Oluşan bütirat daha sonra başka türlerin oluşturduğu biyofilm yapısı tarafından asetata çevrilir. Bu sürecin son basamağında asetat, metan çevriminde rol oynayan bakteriler aracılığı ile nihai ürüne dönüştürülür. Burada tanımlanan mikrobiyel biyofilmler arasındaki işbirliği, söz konusu süreçleri rastlantının doğasından çıkarır. Ancak biyofilm yapıları için yukarıdaki örnekte tanımlanan işbirliği, esasen birçok farklı örnek için çok daha girift bir haldedir.

### 2.3 Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumunun, planktonik organizmaların hareketsiz forma geçişiyle başlayan bir süreç olduğu bilinmektedir. Oluşum evreleri; dönüşümlü (reversible) ilk tutunma evresi, kalıcı (irreversible) tutunma evresi, mikrokolonilerin oluştuğu ve EPS üretiminin yapıldığı ilk olgunlaşma evresi, tüm yapılarıyla tamamen olgunlaşmış biyofilm evresi ve olgunlaşmış biyofilmden kopma ve dağılmaların meydana geldiği son evre olarak farklı kısımlara ayrılmaktadır. Biyofilm oluşumunda rol alan aşamaların herbirinin kendine özgü karakteristikleri vardır. Ancak, bu aşamalar yeter sayı algılama (quorum sensing - QS) molekülleri tarafından regüle edilmektedir (Sauer vd. 2002) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Bakteriyel biyofilm yapılarının oluşum ve dağılma aşamaları (Akçelik 2020)

(hücre dışı yapışkan proteinlerin biyotik veya abiyotik yüzeylere adsorpsiyonu; tersinir adsorpsiyon: bakteri-protein etkileşimleri, elektrostatik kuvvetler, pH, hidrofobiklik, bakteri-yüzey etkileşimleri; geri dönüşümsüz adsorpsiyon: dipol- dipol etkileşimleri, iyonik ve kovalent bağları , H bağları; kolonizasyon ve biyofilm olgunlaşması: fimbrial yapılar ve ototransporter proteinler, ekzopolimerik matris, mikrokoloni organizasyonu; Dispersiyon: Fiziksel, kimyasal ajanlar ve enzimlerle ekzopolimerik matriks bozunması)

Bakterilerin substat yüzeyine adsorpsiyonlarının gerçekleşmesi ve biyofilm oluşumunun başlatılmasında; sıvı fazın hidrodinamik karakteri, söz konusu fazın diğer yapısal özellikleri ve tutunan hücrelerin kendi yüzey karakteristikleri de dahil, farklı faktörler etkili olmaktadır (Donlan 2002). Kabaca tanımlandığında abiyotik materyalde başlangıç tutunması genellikle yüzey ile tutunan hücre arasında özgül olmayan etkileşimlerle gerçekleşmektedir. Ancak, canlı organizma dokuları gibi biyotik yapılara ilk tutunma özgün etkileşimler aracılığı ile (lektinler, spesifik bağlanıcılar veya adezinler gibi) sağlanmaktadır. Tutunma evresi esasen iki aşamalı bir evre olarak tanımlanmaktadır. İlk tutunma bağımsız forma dönüşüm mümkün olduğu bir süreç olarak tanımlanırken,

ikinci tutunma evresi ise hücrelerin hedef yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunduğu ve biyofilm oluşumunun başlatıldığı evre olarak karakterize edilmektedir (Dunne 2002). Biyofilm yapıları üzerinde yürütülen farklı çalışmalarda; tutunma ve mikrobiyal kolonilerin oluşumunun, geniş yüzey alanlı materyallerde tutunma yüzeyinin büyük olması yanında, ayırıcı kuvvetlerden daha az etkilenmeleri nedeniyle, yüzey alanı küçük materyallere göre daha etkin olduğu saptanmıştır (Ammar 2015). Tüm bunlara ilave olarak, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip birçok mikroorganizmanın; suyu öteleyen, yüksüz yüzeylere (plastik ve teflon materyaller en iyi örnekleri teşkil eder), sıvı faz ile temas halindeki yapılara (cam ve metal gibi) oranla daha az tutunma yeteneği gösterdiği saptanmıştır (Fletcher ve Loeb 1979, Bendinger vd. 1993, O'toole vd. 2000).

Dönüşümlü aşamada, bakteri hücresi yüzey ile tam olarak temas etmemekte, ancak bakteri hücresi ile yüzey arasında uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Bunlar elektrostatik güçler, hidrofobik (sulu ortamda polar olmayan moleküllerin birleşmesini sağlayan etkileşim kuvveti) etkileşimler ve Van der Waals güçleri olup, zayıf etkileşimlerdir. Elektrostatik (-,-;+,+) etkileşimler daha çok itici güçlerdir. Çünkü bakteriler ve katı yüzeylerin her ikisi de negatif yüklüdür. Yüzeyle ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin katkısı büyüktür. Hücreler bu fazda, durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler. Dönüşümlü tutunma durumu, yapışan ve durgun haldeki hücreler arasındaki dengeli dağılımın bir sonucu olabilir. Burada mikroorganizma yüzeyin yakınındadır, ama henüz yüzeyle temas etmemiştir. Planktonik (bağımsız) bakteri hücreleri, herhangi bir yüzeye tutunarak biyofilm formu oluşturma evresine geçmeden önce, genellikle hareket yeteneklerini yitirmektedir. Tutunmanın gerçekleşmesinde birçok bakteride temel yapılar adhezif özellikteki proteinler veya onların kompleks yapıları olan fimbriyalardır (Sauer vd. 2002, Lasaro vd. 2009). Adezinler ve fimbriyalardan yoksun bakteriler için ise temel tutunma materyali ekstraselüler polimerik maddedir (EPS) (Donlan 2002).

Bakterilerin tutunmayı gerçekleştirecekleri yüzey ile karşılaşmasında; bakteri popülasyonunun yoğunluğu, bu popülasyondaki bakterilerin hareket yetenekleri, veya kimyasal çekici ya da iticilere doğru gerçekleşen hareketleri belirleyicidir. Bu aşamadan sonra tutunmanın gerçekleştirilmesinde ise; tutunulacak yüzey yanında tutunacak hücre

yüzeyinin özellikleri ve EPS belirleyici olmaktadır (Arnold ve Bailey 2000). Tutunacak hücre, tutunmanın gerçekleşebileceği bir mesafeye (genellikle 1 nm'den daha kısa bir mesafe) yaklaştığında, bu sürecin tamamlanmasındaki en kritik etkenlerin elektrostatik ve hidrodinamik güçler olduğu, farklı araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır (Carpentier ve Cerf 1993). Wang vd. (2007), *Staphylococcus epidermidis* ile yürüttükleri araştırmalarında, hiçbir kaplama materyali kullanılmayan polietilen disk yüzeylerine oranla, plazma proteinleri gibi yüzey aktif materyallerle kaplanan polietilen disk yüzeylerinde adezyonun arttığını belirlemişlerdir. Bir diğer çalışmada Herrmann vd. (1988) ise farklı *Staphylococcus* suşlarının sodyum metakrilat kaplanmış yüzeylere tutunmasının, söz konusu yüzeylerin fibronektin, fibrinojen ve lamin gibi proteinlerle muamele edilmesi halinde, önemli ölçüde arttığını saptamıştır. Yine farklı çalışmalarda biyofilm oluşturacak hücrelerin bir yüzeye tutunması için EPS'nin zorunlu olmadığı, ancak biyofilm oluşumu için mutlak bir gereklilik olduğu tanımlanmıştır (Sutherland 1999, Arnold ve Bailey 2000).

Biyotik ya da abiyotik yüzeylere bağlanma gerçekleştirildikten sonra, hücre çoğalması ve hücre dışı bir matriksin üretilmesiyle bakteriyel biyofilmlerin oluşumu tamamlanır. Matriksin işlevi, bakteri hücreleri arasında tutunmayı sağlamak ve böylece çok katmanlı bir biyofilm oluşumuna yol açmaktır. İn vitro kanıtlar, biyofilm matriksinin; ekzopolisakkaritler, proteinler ve diğer polimerler dahil olmak üzere farklı kimyasal yapıya sahip çok sayıda bileşenden oluştuğunu göstermektedir. Bu bileşenler ayrıca biyofilm formları ile sonuçlanmayan bakteri aglomerasyonlarının oluşumunu da kolaylaştırmakta ve biyofilm oluşumundan bağımsız olarak antibiyotiklerden ve konak savunmalarından koruma sağlayabilmektedirler (Mai vd. 1993, Vouno vd. 2004).

Biyofilm kolonisinden hücrelerin ayrılması (dağılma aşaması), biyofilm yaşam döngüsünün önemli bir aşamasıdır. Dispersiyon (dağılma), biyofilmlerin yeni yüzeylere yayılmasını ve kolonileşmesini sağlar. Dispersin B ve deoksiribonükleaz gibi biyofilm matriksini bozan enzimler, biyofilm dağılımında rol oynamaktadırlar. Biyofilm matriksini parçalayan enzimler, anti-biyofilm ajanları olarak tıbbi ve endüstriyel amaçlar doğrultusunda kullanılmaktadır. Son kanıtlar, bir yağ asidi öncüsü olan cis-2-dekanoik asidin, biyofilm kolonilerinin dağılımı yanında biyofilm büyümesini de

indükleyebildiğini göstermiştir. Nitrik oksidin, düşük toksik konsantrasyonlarda çeşitli bakteri türlerinin biyofilmlerinin dağılmasını tetiklediğinin belirlenmesi, bu ajanın sağlık alanında kullanımının önünü açmıştır. Zira, nitrik oksit, biyofilmlerin neden olduğu kronik enfeksiyonlardan muzdarip hastaların tedavisi için önemli bir potansiyele sahiptir. Biyofilm dağılma aşaması üzerinde yürütülen çalışmalar, bu sürecin çevresel koşullarla başlatılabileceği gibi, doğrudan biyofilm içindeki bakteriler tarafından da yönlendirilen bir süreç olabileceğine işaret etmiştir. Bu durum da, söz konusu aşamanın biyofilmlerin yeni yüzeyleri işgal etmesinde kritik bir aşama olduğunu göstermektedir (Joo ve Otto 2012).

### **2.3.1 Quorum – sensing (yeter sayı algılama) mekanizması**

Biyofilm formasyonu daha önce de ifade edildiği gibi rastlantısal olarak gerçekleşen bir süreç değildir. Bunun en temel kanıtı, söz konusu sürecin temelde yeter sayı algılama sistemi ya da quorum-sensing olarak adlandırılan sinyal aracılı sistemler tarafından kontrol edildiğinin belirlenmesidir. Yeter sayı algılama sisteminin kullandığı sinyallerin, sinyal algılama bölgesindeki yoğunluğu eşik değere ulaştığında, sinyalleri alan hücrelerin lokal kümelenmesi gerçekleştirilir. Burada oluşan kümeleşme yoğunluğunun, popülasyondaki hücreler tarafından algılanması ‘quorum - sensing’ sisteminin temel çalışma prensibini oluşturur ve bu algı paralelinde hücresel yanıtlar oluşturur. Yeter sayı algılama sistemleri ilk kez, üredikleri ortamlarda belirli bir popülasyon yoğunluğuna ulaşan Gram negatif bazı bakteri türlerinin biyoluminesans ışık oluşturduğunun tespiti ile ortaya atılmıştır (Hastings ve Nealson 1979). Bu belirlemeden sonra sürdürülen araştırmalarda, söz konusu biyoluminesans oluşumunu tetikleyen kümeleşmenin temel sinyal molekülünün N-asil homoserin lakton olduğu tespit edilmiştir (Eberhard vd. 1986).

Günümüzde sadece Gram negatif bakterilerin değil Gram pozitif bakterilerin de yeter sayı algılama sistemlerini kullandığı bilinmektedir. Ancak burada; sinyal molekülü olarak salgılanan bir peptit, hedef hücre membran sistemlerinde yer alan bir histidin kinaz reseptörü ve bir hücre içi yanıt düzenleyicisi olmak üzere, temel üç eleman bulunmaktadır. Gram pozitif bakterilerde bir başka yeter sayı algılama sistemi de, bazı

Gram negatif bakterilerde de tespit edilmiş olan otoindükleyici 2 ( autoinducer 2: AI-2) sinyal molekülünün yönlendirdiği sistemdir (Cloak vd. 2002).

## **2.4 *Salmonella* Cinsinin Genel Özellikleri**

### **2.4.1 *Salmonella* biyofilmlerinin klinik ve endüstriyel önemi**

*Salmonella* türleri, genellikle peritrik flagellaları ile hareket eden, düz, çubuk şeklinde (0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm) Gram negatif bakterilerdir. *Salmonella* cinsi fakültatif anaerobik türleri kapsamaktadır. Söz konusu türler hem anaerobik hem de aerobik koşullar altında iyi üreme özelliğine sahiptirler. Bu cinse ait bakteriler, *S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* hariç, peritrik flagella içermektedir. *Salmonella* cinsi üyelerinin tamamı Gram negatif olmalarına rağmen, metilen mavisi ve karbon fuksin boyaları ile boyanabilirler. *Salmonella* türlerinin besin ihtiyaçları oldukça basit olup, karbon ve azot içeren genel besiyerlerinde üreyebilirler ve optimum üreme sıcaklıkları 37 °C'dir (pH 7.4'te) (Gast vd. 2008).

*Salmonella* cinsi *Enterobacteriaceae* ailesine dahildir. Bu cins üyeler, genellikle diğer bağırsak kökenli patojenlerle belirgin bulaşı gösteren gıdalarda yaygın bir şekilde bulunurlar (Montville ve Matthews 2007). *Salmonella* cinsi üyeleri antijenik tiplendirme esasına göre (somatik, flagellar ve kapsüler antijenler) 2500'den fazla serotip altında toplanmıştır. Bu serotiplerden yaklaşık 50 adedinin insanlar için patojen olduğu saptanmıştır. İnsanlar için patojen serotiplerin başında *S. enterica* subspecies *enterica* serovar. Enteritidis (*S. Enteritidis*) ve *S. enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) yer almaktadır. Günümüzde tanımlanmış gıda kökenli patojenler arasında en yoğun saptanan mikroorganizma *Campylobacter jejuni* iken *Salmonella* serotipleri öldürücülükleri ile birinci sırada yer almaktadır (Sutherland vd. 1997, İpek ve Zorba 2018).

*Salmonella* cinsi bakteriler, Türkiye'de ve dünyada önemli bakteriyel patojenler arasındadır (Carlı vd. 2001, Gast vd. 2008). Bu nedenle *Salmonella* enfeksiyonlarını

önlemek hem gıda endüstrisi hem de insan ve hayvan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Enfeksiyondan korunma ancak iyi gözlem ve bu doğrultuda geliştirilecek kontrol programları ile başarılabilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre; endüstrileşme ile paralel bir şekilde gıda kökenli *Salmonella* enfeksiyonlarında giderek artan bir eğilim görülmektedir (Rodrigue vd 1990). Özellikle geçtiğimiz 20 yılda *S. Enteritidis*'in Avrupa'nın genelinde gıda kaynaklı zehirlenmelerin en yaygın sebeplerinden biri olduğunun saptanması, bu tespiti doğrulamaktadır (Rabsch vd. 2001, Medici vd. 2003). Bu gıdaların çoğunu tavuk ve yumurta ya da bunların içine girdiği ürünler oluşturmaktadır ( Hargis vd 1995, Medici vd. 2003, Suzuki vd. 2014).

*Salmonella* üyelerinin neden olduğu hastalıklar oldukça farklı semptomlar ile karakterize edilmekle birlikte, ortak hastalık adı salmonellozis olarak tanımlanmaktadır. Sadece yaygın enfeksiyonlara neden olması değil aynı zamanda ürün ve zaman kayıplarına yol açması nedenleri ile de *Salmonella*'nın gıda endüstrisinde ve tıpta özel bir yeri bulunmaktadır. Esasen *Salmonella* cinsi üyelerinin insanlarda gerçekleştirdiği enfeksiyonlar üç farklı sonuç yaratmaktadır. Tifo ve paratifo, sırasıyla *S. Typhi* ve *S. Paratyphi A* tarafından oluşturulmaktadır. Diğer hastalıklar ise; sistemik enterik kökenli hastalıklar ve dünyada salmonellozisin en yaygın tipi olan gastroenteritlerdir. İnsanlarda tespit edilen salmonellozisin yaklaşık % 95'i; tüketime sunulan et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri, yumurtalar, deniz ürünleri, kümes hayvanları ve hazır gıdalar gibi kontamine materyallerden kaynaklıdır (Foley vd. 2007, Lee vd. 2014).

*Salmonella* üyelerinin ayırıcı özelliklerinden biri de, büyük bir çoğunluğunun biyotik ve abiyotik yüzeylerde biyofilm yapıları oluşturma yetenekleridir. Biyofilm içindeki bakteriler planktonik hücrelerden belirgin bir şekilde farklı bir fenotipe sahiptir ve genellikle dezenfektanlar ve antibiyotikler gibi antimikrobiyal ajanlara karşı daha yüksek dirençlilik göstermektedirler (Mah ve O'Toole 2001, Scher vd. 2005, Wong vd. 2011). Özellikle antimikrobiyal tedavilere karşı artan toleransları nedeniyle *Salmonella* biyofilmlerin ortadan kaldırılması zordur. Bu nedenle söz konusu bakterilerin biyofilmleri, tıbbi ve endüstriyel ortamlarda en temel hijyen sorununu oluşturmaktadır. Tıpta biyofilmleri; kateterler, safra stentleri, yapay kalçalar, dişler, kontakt lensler gibi farklı yüzeylerde ve kistik fibroz hastalarının akciğerlerinde yaygın olarak

rastlanmaktadır (Stahlhut vd. 2012, Sudalayandi vd. 2012). Tüm bu bakteri enfeksiyonlarının yaklaşı % 60'nın biyofilmlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Spoering vd. 2006). Biyofilm hastalıkları yelpazesi oldukça geniştir. Kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonu (CAUTI), cihazla ilişkili en yaygın biyofilm enfeksiyonu olsa da, merkezi dolaşım sistemi ile ilişkili kan akımı enfeksiyonları (CLABSI) ve ventilatörle ilişkili pnömoni (VAP) en biyofilmleri aracılığı ile oluşan ciddi sağlık sorunları olarak tanımlanmaktadır. Tarihsel olarak biyofilmle ilişkili en belirgin hastalık, kistik fibroz (KF) hastalarında *Pseudomonas aeruginosa* aracılı akciğer enfeksiyonu, yumuşak doku enfeksiyonları, örneğin; diyabetik ayak ülserleri ve kronik ve tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları dahil mukozal enfeksiyonlar olarak belirlenmiştir. Yatay gen transferi üzerinde yürütülen çalışmalar, antibiyotik direncinin, diğer biyofilm oluşturan bakterilerde olduğu gibi, biyofilm içerisinde yer alan *Salmonella* üyelerinde de kolaylıkla aktarıldığını göstermiştir. Sistem analizleri ve metabolik ağ biyolojisi yaklaşımları, antibiyotiklerin etkilerini ve antibiyotik direncinin ortaya çıkışının altında yatan mekanizmaları incelemek için kullanıldığında; farklı bakterisidal antibiyotik sınıflarının, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerde merkezi metabolizma, hücresel solunum ve demir homeostazında değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Dwyer vd. 2007, Kohanski vd. 2008) . Bu etkiler, nihayetinde antibiyotik kaynaklı hücre ölümüne katkıda bulunan reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve diğer zararlı moleküllerin üretimine yol açar. Antibiyotik kaynaklı oksidatif stres ayrıca DNA hasarına neden olur ve etkilerin her ikisi de DNA onarımında rol oynayan recA'nın inhibisyonu ve SOS yanıtının devre dışı bırakılmasıyla artırılabilir (Shatalin vd. 2011).

Diğer yandan, gıda endüstrisinde de bakteri hücreleri, gıda işleme ekipmanı gibi gıda ile temas eden yüzeylerde biyofilm oluşturmaya başladığında sorunlar ortaya çıkar. Gıdayla temas eden yüzeylerdeki biyofilmleri; ekipmanlarda işlev yitimine yol açmaları yanında, gıda bozulmalarına veya gıda kaynaklı hastalıklara sebebiyet veren kalıcı kontaminasyon kaynakları haline de gelebilirler (Shi ve Zhu 2009, Simões vd. 2010). Özetle *Salmonella* biyofilm yapıları hem tüketici sağlığı ve hem de ekonomik kayıplar açısından tüm dünyada ciddi bir sorundur (Simões vd. 2010).

## 2.5 Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri (LAB); *Sporolactobacillus inulinus* türü hariç sporulasyon yeteneği içermeyen, asidik ortamlara dirençli, sitokrom ve katalaz enzim sistemleri olmayan, hareket yeteneğinden yoksun, çubuk ya da kok yapısında ve temel karbon kaynakları olan karbonhidratların fermentasyonu yolu ile ana son ürün olarak laktik asit üreten özel bir Gram pozitif bakteri grubudur. Söz konusu bakteri grubu üyeleri, toprak ve su ekosistemlerinde çok düşük oranlarda ve allohton bir şekilde bulunurken, temel habitatları olan bitkisel materyal üzerinde, sütlerde (özellikle fermente süt ürünlerinde), insanların ve diğer memeli hayvanların bağırsak sistemlerinde yer alırlar (Ross vd. 2002). LAB grubu içerisinde yer alan cinslerin tanımlı türleri (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus*) gıda ve yem üretimi amacı ile gerçekleştirilen geleneksel ya da endüstriyel fermentasyonların ana starter kültür bileşenlerini oluşturmaktadır (Carr vd. 2002). Söz konusu starter kültür suşlarının gıda ve yem fermentasyon süreçlerinde gerçekleştirdikleri metabolik etkinlikler sonucu oluşturdıkları bileşikler (bakteriyosinler, karbondioksit, hidrojen peroksit ve organik asitler), gıda kökenli hastalıklara veya gıda bozulmalarına yol açan mikroorganizmaların üremelerini inhibe ederek, fermente ürünlerin raf ömrünün uzatılmasının yanında, insan ve hayvan tüketiminde güvenilir olmalarını ve çevre dostu özellik kazanmalarını sağlamaktadır (Teuber 1990, Forde ve Fitzgerald 2003).

Geçmişten günümüze kadar yapılan çalışmalar ile Laktik Asit Bakterileri'nin (LAB), gıda kökenli patojen mikroorganizmaları inhibe edebildiği ve gıdaların raf ömrünü uzatmak amacı ile kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte gıdalarda gerek starter kültür gerekse koruyucu olarak kullanılabilecek yeni suşların izolasyonu ve tanısı için yapılan çalışmaların devam etmesi gerekmektedir. Tüketicilerin beslenme konusunda gittikçe bilinçlenmesi, doğal ve sağlığa faydalı ürünlere doğru olan eğilimlerinin artması, laktik asit bakterilerinin popülaritesini yükseltmekte ve bu mikroorganizmaların araştırma konusu olarak ilgi odağı olmasını sağlamaktadır (Dinçer vd. 2016). Genel olarak laktik asit bakterileri grubunda *Lactobacillus* (Lb.), *Pediococcus*, *Streptococcus* (Str.) ve *Leuconostoc* (Leu.) cinsleri incelenmekte iken, son yıllarda yapılan genetik çalışmalar sonucu *Bifidobacterium*,

*Lactococcus (Lc.)*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weissella* ve *Vagococcus* cinsleri de bu gruba alınmıştır. Gıda teknolojisinde starter kültür olarak geniş bir kullanım alanı bulmaları bu bakterileri, özellikle gıda güvenliğini sağlama çalışmalarının odak noktası haline getirmiştir. Bu nedenle bu bakteri grubu üzerinde bilimsel çalışmalar yoğunlaştırılarak; biyokimyasal, fizyolojik ve genetik özelliklerinin aydınlatılması hız kazanmıştır (Axelson 1993, Vuyst ve Vandamme 1994, Amann vd. 1995, Omar 2017). Bu çalışmalardan elde edilen veriler ışığında laktik asit bakterilerinin starter kültür suşları olarak, fermente gıdaların yapısal, aromatik bileşenlerini ve güvenlik unsurlarını oluşturma etkinliklerinde rol oynayan aktiviteleri tanımlanmıştır. Bu aktiviteleri;

- Karbonhidratları (özellikle süt şekeri laktozu) güçlü bir şekilde fermente etme yetenekleri,
- Gıda hammaddelerinde bulunan proteiner yapıların hücre dışı ve hücre içi peptidazlar aracılığı ile amino asitlere parçalanması ve hücre içine taşınımı ile tanımlanan yaygın proteolitik sistemlere sahip olma yetenekleri,
- Gıda bozulmaları ya da gıda kökenli hastalık etmeni mikroorganizmalara karşı geniş spektrumlu inhibitör proteinlerin üretimi (bakteriyosinler) ve bu proteinlere karşı dirençlilik özelliklerine sahip olmaları,
- Sitratın diasetil (tipik tereyağı aroma bileşeni) ve asetoine parçalanmasını sağlayan sitraz permeaz enzimlerine sahip olmaları sayesinde özel fermente ürünlerin aroma bileşiklerinin oluşturulması ve fermentasyon ortamlarında kontaminant olan mikroorganizmaların bu bileşikler aracılığı ile eliminasyonu,
- Özellikle endüstriyel fermentasyonlarda, starter kültür suşlarını hızlı bir şekilde lize etmeleri sonucu starter kültür aktivitesini limitleyerek önemli ürün ve zaman kayıplarına yol açan bakteriyofajlara karşı yaygın bir şekilde dirençlilik sistemleri (abortif enfeksiyon, adsorpsiyonun inhibisyonu, Restriksiyon-modifikasyon ve DNA enjeksiyonunun engellenmesi) içermeleri,
- Hammadde üzerinde fermentatif aktiviteleri sonucu sadece aroma ve tat bileşikleri değil aynı zamanda ürünün yapısal özelliklerini de belirleme aktiviteleri,
- Organik asitler ve hidrojen peroksit tiyosiyanat başta olmak üzere, bakteriyosinler dışında antimikrobiyel özelliği olan ilave bileşikler ve fermente gıdaların yapısal özelliklerinin geliştirilmesinde önemli rol oynayan ekzopolisakkaritleri (EPS) üretme

potansiyellerinin yüksek olması, başlıkları altında toplamak olasıdır (Boumerdassi vd. 1997, Hofvendahl ve Hägerdal 2000, Zhu 2000, Fitzgerald vd. 2006).

Laktik asit bakterilerinin pek çok üyesinin bakteriyosin ürettiği bilinmektedir. Bu bakteriyosinlerin en bilinen üyeleri; *Lactobacillus acidophilus* tarafından üretilen asidofilin ve laktokosidin, *Lactobacillus plantarum* tarafından üretilen laktolin ve plantarisin ya da *Lactococcus lactis* tarafından üretilen nisin'dir. Söz konusu bakteriyosinler, özellikle *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* gibi gıda kökenli patojen bakterileri inhibe edebilmektedirler. Aynı zamanda söz konusu bakteriyosinlerin bazı Gram negatif bakteriler üzerinde de etkili olduğuna dair bulgular mevcuttur (Lewus ve Montville 1991, Messi vd. 2001, Omar 2017). Gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanılabilen probiyotiklerin daha çok laktik asit bakterisi olması ve büyük bir kısmının en az bir antimikrobiyel bileşik üretmesinin yanında, tüketicilerin beslenme konusunda gittikçe bilinçlenerek doğal ve sağlığa faydalı ürünlere doğru olan eğilimlerinin artması, laktik asit bakterilerinin üzerindeki ilgiyi artırmıştır. Bu probiyotik mikroorganizmalar tarafından üretilen antimikrobiyel bileşiklerin medikal alanda da kullanım olanakları yoğun araştırmaların konusu haline gelmiştir (Dinçer vd. 2016).

## **2.6 Probiyotik Olarak Laktik Asit Bakterileri**

Probiyotikler, belirli oranlarda tüketildiklerinde genellikle bağırsak florasını iyileştirerek veya eski haline getirerek sağlık yararları sağladıkları iddiasıyla üretilen canlı mikroorganizma kültürleri ya da onlardan hazırlanan preparatlardır. Probiyotiklerin genellikle tüketilmesinin güvenli olduğu kabul edilir (GRAS düzeyli), ancak nadir durumlarda antagonistik bakteri-konak etkileşimlerine ve istenmeyen yan etkilere neden olabilirler. Latince'den türetilen bir kelime olan probiyotik, 'yaşam için' anlamına gelmektedir. Probiyotik mikroorganizmaların tanımlanmasından çok önce de insanoğlu onlardan; bira, ekmek, şarap, kefir, kıymız ve peynir gibi fermente ürünlerin üretimi yolu ile beslenme ve tedavi amaçlı olarak yararlanmıştır. Fermente gıdaların tesadüfi keşfi ile başlayan yaklaşık 10 bin yıllık probiyotik tarihi, insan ırkının evrimi ile paralel bir gelişme göstermiştir (Doron ve Syndman 2015).

Probiyotik bakteriler genel olarak Gram pozitif veya Gram negatif, sporsuz ve basil veya kok şeklinde olan bakterilerdir. Söz konusu bakteriler mide asitliğine, safra tuzuna ve lizozim enzimine karşı diğer bakterilere göre daha dayanıklıdır. Probiyotik bakteriler genellikle laktik asit, asetik asit, propiyonik asit gibi organik asitler, bakteriyosinler, proteaz ve lizozim enzim sistemleri ve hidrojen peroksit başta olmak üzere çok değişik antimikrobiyal özellikte bileşikler üreterek, bağırsaklarda istenmeyen mikroorganizmaların çoğalma hızını kontrol ederler ve doğal floranın denge içinde bulunmasını sağlarlar (Majeed vd. 2011, Jati vd. 2012).

Probiyotik bakterilerin önemli özelliklerinden biri de, bağırsak çeperine tutunabilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Bu tutunma en önemli ve hatta biyolojik etki gösterebilmeleri için mutlaka olması gereken bir özellik olarak belirtilmiştir. Probiyotik bakteriler, bağırsak çeperine tutunarak patojen mikroorganizmaların tutunmasını engellerler. Ayrıca sindirim sırasında bağırsak hareketlerinden çok fazla etkilenmeden hızla üreyerek orijinal popülasyonda azalmayı engellerler. Probiyotik olarak kullanılan mikroorganizmaların çoğu laktik asit bakterileri grubundan olup (en fazla *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinsi üyeleri), diğer türden mikroorganizmalar da (*S. boulardii*) probiyotik olarak kullanılmaktadır. *Lactobacillus* türleri, ince bağırsakta fazla sayıda bulunurken, *Bifidobacterium* 'lar kalın bağırsak kökenlidir. Probiyotik bakteri tanımının yapılabilmesi için, adayların taşınması gereken özellikler halen tartışmalı olsa da, genel kabul gören kriterleri aşağıdaki başlıklar altında özetlemek olasıdır:

- Probiyotik suşlar insan kaynaklı olmalıdır,
- Patojen ilişkili moleküler örüntüler (PAMP) taşımamalıdır,
- Asidik çevresel koşullara ve safra tuzlarına karşı belirli düzeylerde dirençlilik göstermelidir,
- Mide bağırsak sistemi epiteline tutunma ve kolonizasyon yeteneği içermelidir,
- Hastalık etmeni mikroorganizmalara karşı antagonistik etkiye sahip farklı antimikrobiyel bileşikler üretme yeteneğinde olmalıdır,
- Bağışıklık sistemini iyileştirici immün modülatör etkilere sahip olmalıdır,
- Hızlı bir şekilde metabolize edilebilmeli ve hızlı üreme yeteneğinde olmalıdır (Arihara 2006, Singhi ve Kumar 2016).

Bu özellikler esas alınarak seçilen ve patentlenen probiyotik laktik asit bakterilerinin; gıdaların sindirimini kolaylaştırdığı, laktoz intoleransını azalttığı, besin ve büyüme faktörlerinin (vitamin, mineral vb.) biyoyararlılığını arttırdığı, otonkton kolon mikroorganizma varlığının sürekliliğini sağlayarak mikrobiyotayı dengelediği, bağırsak rahatsızlıkları riskini azalttığı ve iyileşme sağladığı, ishali önlediği (rotavirüs, akut enfeksiyonlar gibi), mikrobiyotayı olumsuz yönde etkileyen patojenleri inhibe ettiği (*Streptococcus* türleri, *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Clostridium difficile* gibi), bağışıklık sistemini uyardığı, atopik rahatsızlıkları ve alerji oluşma riskini azalttığı (astım, egzema, dermatit, yüksek ateş, gıda alerjisi vb. gibi), antikanserojik aktivite içerdiği, kan serumundaki kolesterol seviyesini düşürdüğü, cilt sağlığı ve grip üzerinde pozitif etkileri olduğu ileri sürülmüştür. Ancak bazı bilim insanları bu öngörülerin yeterli bilimsel destekten yoksun olduğunu ileri sürmektedir (Arihara 2006, Leroy vd. 2008, Soccol vd. 2010, Rouhi vd. 2013, Durchschein vd. 2016).

## **2.7 Probiyotik Özellikte Laktik Asit Bakterileri (LAB) Kullanılarak *Salmonella* Biyofilm Oluşumunun Kontrolü ve Eradikasyonu**

LAB'nin biyotik ve abiyotik materyaller üzerinde biyofilmler oluşturduğu ve bu nedenle patojenlerin oluşturduğu biyofilmler ile yarışmacı özellik taşıdıkları uzun zamandır bilinmektedir. Söz konusu bakterilerin, planktonik veya biyofilm modundaki çeşitli gıda kaynaklı patojenlere karşı antagonistik etkileri, tıbbi ve endüstriyel kullanım amacı doğrultusunda yürütülen bilimsel çalışmaların konusu olmaktadır (Kubota vd. 2008). Brezilya'da gıdalardan izole edilmiş LAB türleri *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei* ve *Lactobacillus curvatis*'in, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 ve *S. Typhimurium* üzerindeki antibakteriyal ve antibiyofilm etkinliklerinin, yarışmacı agregasyon yeteneklerinden ve bakteriyosin üretim özelliklerinden kaynaklandığı saptanmıştır (Gomez vd. 2016).

Laktik asit ve diğer organik asitlerin, özellikle besin sınırlaması olan çevresel koşullar altında çok sayıda patojene karşı güçlü bir bakterisidal etkiye sahip olduğu iyi bilinen bir gerçektir (Fijan 2014). Bu gibi çevresel koşullar altında, ayrışmamış formdaki asitler

sitoplazmaya nüfuz ederler ve hücre içi pH'ı düşürerek hücre metabolik süreçleri bozarlar (Hughes ve Webber 2017). Ek olarak, bu asitler Gram negatif mikroorganizmaların hücre dış zarının geçirgenliğini artırarak sitoplazma bütünlüğünün korunmasını güçleştirirler. Hücre membran geçirgenliğinin bozulması, özellikle antimikrobiyal maddelerin geçişini kolaylaştırmakta ve bu yolla etkilerini artırmaktadır. Bu şekilde, LAB üyeleri tarafından üretilen bakteriyosinlerin *Salmonella* suşlarının da içinde bulunduğu çok sayıda patojenin üremesini engelleme (bakteriyostatik etki) ya da öldürme (bakteriyosidal etki) yeteneği kazanabildiği belirlenmiştir (Gálvez vd. 2010). Birçok *Lactobacillus* suşu tarafından üretilen hidrojen peroksit, üropatojenik *E. coli* (UPEC), salmonellozis etmeni *Salmonella* serovaryeteleri gibi bazı bakterilerin dış zarında, fimbriyaların yapısını bozarak, onların konakçı hücrelere adezyon kabiliyetlerini engellediği belirlenmiştir (Costa vd. 2012). Tüm bunların yanında ayrıca, Halder ve Mandal (2016), *Lactobacillus* cinsine ait farklı türlerin *Salmonella*, *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi enterik bakterilerin in vitro koşullarda üremelerini güçlü bir şekilde engellediğini örneklemiştir. Ayrıca, aynı cinsten farklı suş kombinasyonlarının test edildiği çalışmalarda da söz konusu kombinasyondaki suşların patojen inhibisyonu üzerinde sinerjik bir etki gösterdiği belirlenmiştir (Halder ve Mandal 2016). Bu denemeler, farklı çevrelerden izole edilen laktik asit bakterileri ile tekrarlandığında benzer ya da daha güçlü patojen inhibisyonu yeteneklerinin tanımlanması nedeni ile, farklı LAB ekotiplerinin in vivo gastrointestinal hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceği görüşü güçlenmiştir (Vuotto vd. 2014). Geniş spektrumlu antimikrobiyal özellikleri, yara iyileştirme kapasiteleri, genetik izlenebilirlikleri, heterolog proteinlerin üretimi ve salgılanması için iyi karakterize edilmiş ekspresyon sistemleri içermeleri nedeniyle bakteriyoterapi için laktik asit bakterilerinin (LAB) seçimi günümüzde genel kabul gören bir yaklaşımdır. Bunun yanında, bazı LAB'nin çoklu antibiyotik dirence sahip *P. Aeruginosa*, *Salmonella* ve diğer bazı patjenlerin klinik izolatlarının üremesini inhibe ettiğinin in vivo koşullarda tanımlanması, bu bakterilerin biyofilm formlarına karşı etkinliklerinin de araştırılmasının önünü açmıştır (Jamalifar vd. 2011). *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus rhamnosus*, suşları kullanılarak farelerde yürütülen çalışmalarda geliştirilen patojen enfeksiyon modellerinde, söz konusu laktik asit bakterilerinin planktonik formlara karşı biyofilm formlarından çok daha etkili olduğu ve iyileştirme

özelliklerini daha güçlü bir şekilde gösterdikleri belirlenmiştir (Peral vd. 2009, Khailova vd. 2013, Mohammedseed vd. 2015, Agenta vd. 2016). *L. plantarum* WCFS1 ve *L. rhamnosus* GG'nin (LGG) *Salmonella*'nın da içinde bulunduğu birçok patojenin planktonik üremesinin yanı sıra, biyofilm oluşumunun etkili inhibitörleri olduğunu gösteren kanıtlar giderek artmaktadır. *P. aeruginosa* PA14 (PA14). PA14 biyofilmlerini bozduğu bilinen enzimleri salgılamak üzere tasarlanan genetik yapısı değiştirilmiş (GMO) *L. plantarum* ve LGG'nin belirgin antibiyofilm yetenekleri kazanması, bu alana yeni bir ufuk kazandırmıştır (Campbell ve Nair 2020).

Genel bir kabul olarak, planktonik formda tanımlanan bakterisidal kapasite, aynı bakterinin biyofilm formu için de geçerli değildir. Zira biyofilm formlarının karakteristiği olan ekzopolimerik matriks yapısı, inhibitör maddelerin ya da bakterilerin biyofilm yapısına nüfuz etmesini engelleyen güçlü bir bariyerdir. Bugüne kadar bakteriyel biyofilmlerin probiyotik özellikteki LAB suşları ile inhibisyonunun esas alan çalışmalardan elde edilen bulgular çelişkilidir. Bazı araştırmalarda özellikle biyofilm matriksinin zayıflatılması halinde belirgin bir inhibisyonu etkinliğinin sağlanabileceği öne sürülmekle birlikte, söz konusu modellerin endüstriyel üretimlere adapte edilmiş uygulamaları henüz mevcut değildir (Vuotto vd. 2014, Kaur vd. 2018). Patojenlerin, biyofilm oluşumuyla ilişkili kalıcı enfeksiyonlar oluşturma yeteneğinin artması göz önüne alındığında, probiyotik uygulaması, invazif mikroorganizmaların in vivo çoğalmasını modüle edebilir veya önleyebilir (Vuotto vd. 2014, Campbell ve Nair 2020). Probiyotik bakterilerin veya bunların aktif bileşiklerinin kullanılması, gelecekte endüstriyel gıda yüzeylerinde patojenik biyofilm oluşumunu kontrol etmek için sağlık ve çevre açısından umut verici bir yöntemdir.

Fermente gıdalardan izole edilen LAB suşlarının biyofilm gelişimini ve çeşitli gıda kaynaklı patojenlerin üremesini engelleyen aktif bileşikler üretme yeteneğinde oldukları uzun zamandır bilinmesine rağmen, bu bakterilerin söz konusu patojenlerin biyofilm formlarına karşı etkinlikleri halen detaylı bir şekilde incelenmemiştir. LAB biyofilmlerinin ve aktif bileşiklerinin gıda kaynaklı patojenlerin biyofilm formlarına karşı etkinliklerini ve bu etkinliğin mekanizmaları belirlemek için, farklı ekosistemlerden izole edilen daha fazla LAB suşu ile çalışma yapılması gerekmektedir.

Zira bilim insanları ve teknologlar gelecekte bu LAB'ni insan ve hayvan yemi takviyeleri için probiyotik olarak rutin bir şekilde kullanmayı planlamaktadır. Bunun yanında LAB'nin gösterdiği yaygın antimikrobiyal aktivite, onların aynı zamanda sanitasyon amacıyla gıda işleme endüstrisinde kullanımının da önünü açmaktadır.



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Bakteriler

Araştırmada kullanılan *S. Typhimurium* 14028 suşu ve bu suşun *dam* ve *seqA* mutantları ( $\Delta dam$ ,  $\Delta seqA$ ) ile *Lactobacillus plantarum* (M16) , *Lactobacillus sake* (M17), *Pediococcus acidilactici* (M20), *Bifidobacterium langum* (M23), *Bifidobacterium bifidum* (M24), *Pediococcus pentosaceus* (M46) probiyotik suşları Prokaryot Genetiği kültür koleksiyonundan (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) sağlanmıştır. Söz konusu bakteriler, % 60 oranında steril gliserol ilave edilmiş LB broth besiyerinde ve derin dondurucuda (-80 °C 'de) saklanmıştır.

Bakteriler M17, LB, MRS +4 °C'de ve M17, LB, MRS ve GM17 ortamlarına %20 oranında steril gliserol ilave edilerek -80 °C'de saklanmıştır (Todorov vd.1999). Bu bakteriler çalışma süresince, gliserol ilave edilmemiş M17, LB, MRS broth ortamlarında ve haftalık transferler yapılarak aktif kültürler halinde tutulmuştur.

##### 3.1.2 Besiyeri ve çözeltiler

| Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (Merck, Germany) |      |
|---------------------------------------------------|------|
| İçerik                                            | g/ L |
| Trypton                                           | 10   |
| Maya Ekstraktı                                    | 5    |
| Sodyum Klorür                                     | 10   |
| Agar                                              | 15   |

Besiyeri içerikleri 1000 mL distile su ilavesi ile tamamlandıktan sonra besiyeri cam tüplere 5'er mL şeklinde taksim edilmiş ve bu ortamlar 121 °C/ 125 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

| <b>Luria Bertani (LB) Broth ve Agar (NaCl' siz)</b> |             |
|-----------------------------------------------------|-------------|
| <b>İçerik</b>                                       | <b>g/ L</b> |
| Tripton                                             | 10          |
| Maya Ekstraktı                                      | 5           |
| Agar                                                | 15          |

Besiyeri içerikleri 1000 mL distile ilave edilerek tamamlandıktan sonra, besiyeri cam tüplere 5'er mL hacimler şeklinde taksim edilmiş ve bu ortamlar 121 °C/ 125 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

| <b>Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Broth ve Agar</b> |       |
|---------------------------------------------------|-------|
| Kazein pepton                                     | 10 g  |
| Et ekstraktı                                      | 8 g   |
| Maya ekstraktı                                    | 4 g   |
| D- glukoz                                         | 20 g  |
| Dipotasyum hidrojen fosfat                        | 2 g   |
| Sodyum asetat trihidrat                           | 5 g   |
| Triamonyum sitrat                                 | 2 g   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O              | 0.5 g |
| MNSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O              | 0.2 g |
| Tween 80                                          | 1 mL  |
| Agar                                              | 15 g  |

Besiyeri içerikleri 1000 mL distile suyla tamamlandıktan sonra besiyeri cam tüplere 5'er mL hacimler şeklinde taksim edilmiş ve bu ortamlar 121 °C/ 125 dakika dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir.

| <b><u>M17 Broth ve Agar ( Merck, Germany )</u></b> |       |
|----------------------------------------------------|-------|
| <b>İçerik</b>                                      |       |
| Poliipepton                                        | 5 g   |
| Fitopepton                                         | 5 g   |
| Maya Ekstraktı                                     | 2.5 g |
| Et Ekstraktı                                       | 5 g   |
| B-disodyum gliserofosfat                           | 19 g  |
| Laktoz (%10)                                       | 50 mL |
| MgSO4. 7H2O                                        | 1 mL  |
| Askorbik Asit                                      | 0.5 g |

Ortam içerikleri son hacim 950 mL olacak şekilde distile su içerisinde çözülmüş ve 121 °C 'de 15 dakika süre ile otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ortam su banyosunda 45 °C 'ye soğutulduktan sonra içerisine, ayrı sterilize edilen 50 mL laktoz çözeltisi ilave edilmiştir.

| <b><u>PBS (Fosfat Salin Tamponu)</u></b> | <b><u>g/L</u></b> |
|------------------------------------------|-------------------|
| NaCl                                     | 8 g               |
| KCl                                      | 0,2 g             |
| Na2HPO4                                  | 1,44 g            |
| KH2PO4<br>dH2O                           | 0,24<br>1000mL    |

| <b><u>SF (Serum Fizyolojik)</u></b> | <b><u>g/L</u></b> |
|-------------------------------------|-------------------|
| NaCl                                | 8,5 g             |
| dH2O                                | 1000 mL           |

|                                      |                      |
|--------------------------------------|----------------------|
| <b><u>Alkol/Aseton Cözeltisi</u></b> | <b><u>100 mL</u></b> |
| Saf etanol                           | 70 mL                |
| Aseton                               | 30 mL                |

|                                              |        |
|----------------------------------------------|--------|
| <b><u>Glasiyel Asetik Asit Cözeltisi</u></b> |        |
| % 33'lük Glasiyel asetik asit                | 100 mL |

|                                          |                   |
|------------------------------------------|-------------------|
| <b><u>Tris/HCl (0.5 M EDTA pH:8)</u></b> | <b><u>g/L</u></b> |
| Tris                                     | 1,21 g            |
| EDTA                                     | 0,37 g            |

Tartılan ortam içerikleri, 1000 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Sterilizasyon işlemi öncesinde pH  $7.0 \pm 0.02$  ayarlanmış ve sterilizasyon işlemi  $121^{\circ}\text{C}$ ' de 15 dakika süre uygulaması ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.2 Yöntem

#### 3.2.1 Agar spot ve kuyu difüzyonu yöntemi ile probiyotik suşların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi

Probiyotik suşların antimikrobiyal aktivitelerinin tanımlanması amacı ile iki farklı test (agar spot ve kuyu difüzyon) kullanılmıştır.

Agar spot testinde öncelikle test edilecek probiyotik suşlarının bazıları  $30^{\circ}\text{C}$  'de bazıları ise  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 18 saat statik koşullarda (karıştırma yapılmaksızın) geliştirildikten sonra, MRS agar plaklarına sürme ekim yapılmış ve aynı koşullarda bir gece daha inkübasyona devam edilmiştir. Bu süre sonunda gelişen kolonilerden öze aracılığıyla MRS agar ortamına, bir petri plağında 4 farklı suş olacak şekilde nokta ekim yapılmış

ve 20 °C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Diğer yandan; LB ve LB CHL broth ortamlarında üretilen patojen bakteriler (*S. Typhimurium* 14028 LB broth ve bu suşun mutantları olan *dam* ve *seqA* genleri bakımından mutant suşları LB CHL broth ortamlarından 100 µL’lik porsiyonlar halinde alınarak, % 0.7 oranında agar içeren 5 mL yumuşak agar (LB ve LB + CHL) ortamlarına inoküle edilmiş ve nokta ekim yapılan MRS agar plaklarının üzerine ikinci tabaka halinde dökülerek homojen bir şekilde yayılmıştır. 20 °C’de 18 saat inkübasyon bitiminde probiyotik suş kolonileri çevresindeki inhibisyonu zonları gözlenmek suretiyle, probiyotik suşların antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir.

Kuyu difüzyon testinde ise, bir gün önce yukarıda tanımlı ortamlarda aktifleştirilen probiyotik suş kültürleri, 1.5 mL’lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktararak 10000 rpm ‘de 30 dk santrifüj işlemine tabi tutularak çöktürülmüştür. Söz konusu mikrosantrifüj tüpleri santrifüjden çıkarıldıktan sonra, tüplerdeki üst sıvı steril şırıngalar ya da plastik pastör pipetleri aracılığı ile alınmıştır. Bu üst sıvılar 0.45 µm por çapına sahip membran filtreden geçirilerek bakterilerden tamamen arındırılmıştır. Elde edilen bu filtratlar, *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *dam* ve *seqA* geni bakımından mutant suşlarının yayma ekimleri yapıldıktan sonra her bir Petri plakı için açılan 4 kuyucuğa, kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde uygulanmıştır. Bu şekilde hazırlanan ortamlar 20 °C ‘de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda, probiyotik suşların denenen bakterilere karşı oluşturdukları inhibisyon zonları incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir. (van Belkum vd. 1989).

### **3. 2. 2 Probiyotik suşların, *Salmonella* biyofilmleri üzerine etkilerinin belirlenmesi**

#### **3.2.2.1 Doğal ve mutant *Salmonella* suşlarının biyofilm üretim miktarlarının belirlenmesi**

Probiyotik özellik taşıyan LAB suşlarının *Salmonella* biyofilm formları üzerine etkinliğinin belirlenmesi amacı ile, öncelikle denemelerde kullanılan *Salmonella* suşlarının LB<sup>-NaCl</sup> içeren ortamlarda ve polistiren yüzeylerde zamana karşı biyofilm üretim miktarları belirlenmiştir.

*Salmonella* suşlarının polistiren yüzeyde biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Vestby vd. (2009) ve Stepanovic vd. (2000) tarafından önerilen yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla aktifleştirilmiş olan *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun  $\Delta dam$  ve  $\Delta seqA$  mutantlarının OD'leri ( $OD_{595nm}$ ' de) Elisa okuyucusunda 0.2'ye ayarlanmıştır. *S. Typhimurium* için  $LB^{-NaCl}$  broth, *dam* ve *seqA* suşları için ise (1 mL  $LB$  için 2  $\mu L$  CHL ) kloramfenikol ilave edilmiş  $LB^{-NaCl}$  broth besiyeri mikrotitre kuyucuklara 100'er  $\mu L$  olacak şekilde eklenmiştir. Ardından OD 'si 0.2 'ye ayarlanmış olan *Salmonella* suş kültürlerinden 30'ar  $\mu L$ , daha önce 100'er  $\mu L$  besiyeri aktarılmış kuyucuklar üzerine inoküle edilmiştir. Bakteri süspansiyonlarını içeren mikrotitre plakalar, 5 gün süreyle 20 °C'de statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon başlangıcından sonra her 24 saatte bir alınan örneklerde biyofilm miktarları tayin edilmiştir. Bu işlem, her gün için ayrılmış kuyucuklardaki örnekler 2 defa steril fizyolojik serum (%0,85 NaCl) kullanılarak yıkanmış ve plakalar 24 °C'de 1 saat tutulmuştur. Bu ortama % 95 konsantrasyonda metanol 15 dakika süre ile uygulanarak tespit işlemi gerçekleştirilmiştir. Metanolün kuyucuklardan uzaklaştırılması işleminden sonra kuyulara 130  $\mu L$  (% 0,1) kristal viyole çözeltisi aktarılmıştır. Boya inkübasyonu için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen plakalara, 2 kez  $dH_2O$  ile muamele edilmiştir. Biyofilm yapısı ile interaksiyon veren boyanın çözünmesi amacı ile ortama 130  $\mu L$  (% 33) glasiyel asetik asit eklenmiş ve bu ortamlar oda sıcaklığında 30 dakika tutulmuştur. Son aşamada çözünen ortam optik yoğunluğu,  $OD_{595 nm}$ 'de (Elisa, Biorad, USA) tespit edilmiş ve nihai sonuçlar, bu OD değerlerinin ortalamasından, kontrol (yalnızca  $LB^{-NaCl}$  sıvı besiyeri içeren kuyular) kuyularının OD değerlerinin ortalamasının çıkarılması suretiyle elde edilmiştir. Tüm deneyler 3 paralel ve 2 tekrar deneme deseni oluşturularak yürütülmüştür.

### **3.2.2.2 Probiyotik LAB'nin, *S. Typhimurium* 14028 ve onun $\Delta dam$ ve $\Delta seqA$ mutantlarının biyofilm oluşturma özellikleri üzerine etkisi**

Çalışmada kullanılan *Salmonella* suşları olan; *S. Typhimurium* 14028  $LB^{-NaCl}$  sıvı besiyerinde,  $\Delta dam$  ve  $\Delta seqA$  suşları ise kloramfenikollü (CHL)  $LB^{-NaCl}$  sıvı besiyerinde 200 rpm/dakika çalkalama hızında, 37 °C 'de 18 saat süreyle üretilerek aktive

edilmiştir. Probiyotik suşlardan M16 (*Lactobacillus plantarum*), M17 (*Lactobacillus sake*), M23 (*Bifidobacterium langum*), M24 (*Bifidobacterium bifidum*), M46 (*Pediococcus pentosaceus*) 37°C, M20 (*Pediococcus acidilactici*) ise 30 °C ‘de MRS broth besiyerinde statik koşullarda 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bir gün önce aktifleştirilen probiyotik suşları mikrosantrifüj tüplerine alınarak 30 dakika süresince 10000 rpm ‘de santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj işlemi bitiminde tüplerde oluşan üst sıvı steril şırınga ya da pastör pipetleri yardımıyla çekilerek 0.45µm por çaplı membran filtreden geçirilmiştir.

Bu aşamadan sonra mikrotitre plaka kuyucuklarında, elde edilen probiyotik suş kültür filtratları *Salmonella* suşlarına karşı denenerek, biyofilm oluşumunu engelleme aktiviteleri incelenmiştir. Söz konusu işlem için suşlardan 30‘ar µL ve elde edilen probiyotik filtratlarından 30‘ar µL, besiyeri ihtiva eden kuyucuklara inoküle edilmiştir. Bakteri süspansiyonlarını içeren mikrotitre plakalar, *Salmonella* suşlarının optimum biyofilm üretim zamanı bir önceki denemede 72 saat olarak saptandığı için (Şekil 4.2) 72 saat süreyle 20 °C’de statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Her 24 saatte bir bu ortamlarda, bölüm 3.2.2.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen yıkama ve boyama işlemleri sonrasında , OD<sub>595nm</sub>’ de Elisa okuyucusunda (Biorad, USA) biyofilm miktarları ölçülmüştür. Bu denemeler 3 paralel ve 2 tekrar olacak şekilde yürütülmüştür ( Stepanovic vd. 2000, Vestby vd. 2009).

Bu denemelerde ayrıca, probiyotik suş filtratlarına Proteinaz K (Sigma, USA) ilave edilerek söz konusu enzimin probiyotik suş filtratları ile sinerjetik ya da antagonistik bir etkileşim içinde olup olmadığı araştırılmıştır. Proteinaz K (Sigma, USA) denemesinde 5 N NaOH ilavesi ile pH değeri 7.0’a ayarlanmış probiyotik suş kültür filtratları üzerine 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan proteinaz K stok çözeltisinden 30‘ar µL aktararak gerçekleştirilmiştir (van Belkum vd. 1989).

### 3.2.2.3 Probiyotik filtratlarının, *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun $\Delta dam$ ve $\Delta seqA$ mutantlarının oluşturduğu biyofilm yapılarının eradikasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi

Probiyotik suş kültürlerinden hazırlanan filtratların biyofilm oluşumuna etkisinin incelenmesinin ardından, olgun biyofilm yapıları üzerindeki etkilerini belirlemek için; öncelikle denemede kullanılan *Salmonella* suşları, polistiren plaka kuyucuklarında 3 gün süreyle ve bölüm 3.2.2.1’de anlatıldığı şekilde inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sürelerinin bitiminde, kuyular 2 defa steril fizyolojik serum (% 0,85 NaCl, (Merck, Almanya) ile yıkandıktan ve plakalar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, üzerlerine 30’ ar  $\mu$ L probiyotik filtratlarından eklenerek 6. ve 24. saatlerde probiyotik filtratların olgun biyofilmler üzerine etkisine bakılmak üzere yine 20  $^{\circ}$ C’de inkübasyona bırakılmıştır.

6 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri sonunda kuyucuklardaki çözeltilerin optik yoğunlukları OD<sub>595nm</sub>’ de (Elisa, Biorad, USA) belirlenmiş ve nihai veriler bu OD değerlerinin ortalamasından, kontrol (yalnızca LB sıvı besiyeri içeren kuyular) kuyularının OD değerlerinin ortalamalarının çıkarılması sonucu tespit edilmiştir (Vetsby vd. 2009).

Bu denemeler ayrıca, probiyotik suş filtratlarına nisin (Sigma, USA) ve Proteinaz K (Sigma, USA) ayrı ayrı ilave edilerek söz konusu enzim ve bakteriyosinin probiyotik suş filtratları ile sinerjetik ya da antagonistik bir etkileşim içinde olup olmadığı araştırılmıştır. Nisin denemesinde 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan nisin stok çözeltisinden probiyotik suş kültür filtratları üzerine 30  $\mu$ L, proteinaz K (Sigma, USA) için ise 5 N NaOH ilavesi ile pH değeri 7.0’a ayarlanmış probiyotik suş kültür filtratları üzerine yine 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanan proteinaz K stok çözeltisinden 30  $\mu$ L aktararak gerçekleştirilmiştir (van Belkum vd. 1989).

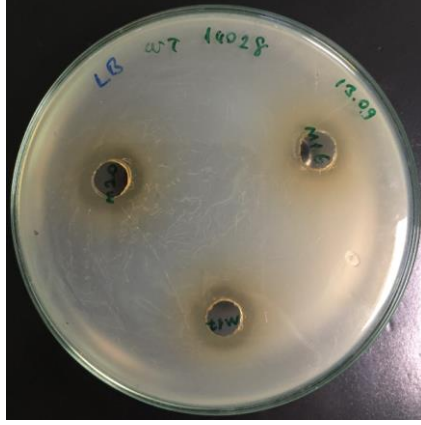
Denemeler 3 paralel ve 2 tekrar olacak şekilde yürütülmüştür.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

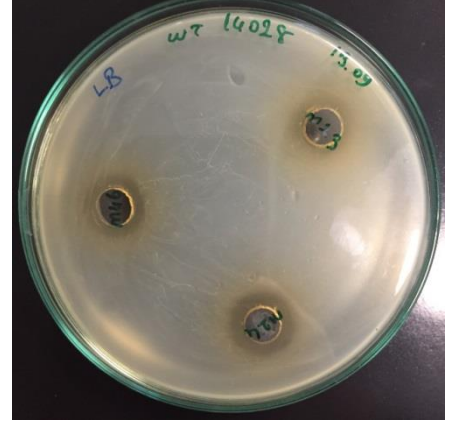
### 4.1 Probiyotik Suşların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Laktik Asit Bakterilerinin (LAB), *Salmonella*'ya karşı antimikrobiyal etkinliğe sahip olup olmadığı agar spot ve kuyu difüzyon denemeleri ile test edilmiş, ancak daha net sonuçlar veren bir yöntem olması nedeniyle değerlendirmede kuyu difüzyon testi verileri kullanılmıştır. Kuyu difüzyon testi sonuçlarına göre; M16 (*Lactobacillus plantarum*), M17 (*Lactobacillus sake*), M20 (*Pediococcus acidilactici*), M23 (*Bifidobacterium langum*), M24 (*Bifidobacterium bifidum*), M46 (*Pediococcus pentosaceus*) probiyotik suşlarının, *S.Typhimurium* 14028 doğal suşu ve onun *dam* ve *seqA* mutantlarına karşı güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bu antimikrobiyal aktivite değerlendirmesi, çalışmada kullanılacak probiyotik suşların seçiminde esas olmuştur. Çok düşük etkinlik gösteren ya da hiç antimikrobiyal aktivite göstermeyen LAB suşları çalışma kapsamından bu aşamada çıkarılmıştır.

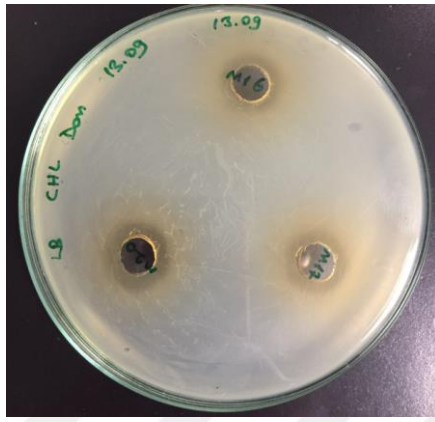
Güçlü antimikrobiyal aktivite gösteren LAB suşlarının, araştırma grubumuz tarafından yapılan daha önceki çalışmalarda, diğer probiyotik özellikleri yanında aynı zamanda bakteriyosin üretici olarak da tanımlanmış olması (M16, plantarisin üreticisi, M17 sakasin üreticisi, M20 pediosin üreticisi, M23 bifidosin A üreticisi, M24 bifidosin B üreticisi ve M46 bakteriyosin benzeri antimikrobiyal bileşik üreticisi) (Tezel vd. 2009) bu güçlü antimikrobiyal aktiviteleri açıklamaktadır. Genel bir görüş olarak Gram pozitif bakterilerin ürettiği bakteriyosinlerin Gram negatif mikroorganizmalara karşı etkili olmadığı kabul edilmekle birlikte, bakteriyosin dışında farklı antimikrobiyal ajanlarla hücre duvarı yapısı zayıflatıldığında, söz konusu bakteriyosinlerin Gram negatif patojenlere karşı da etkili olabileceği belirlenmiştir (Klaenhammer 1993, Klaenhammer vd. 1995, Hernandez vd. 2005). Bu doğrultudaki literatür verileri, denemelerimizde elde ettiğimiz ve bakteriyosin üreticisi olan LAB suşlarının Gram negatiflere karşı da etkin bir inhibitör aktivite gösterdiğine dair bulguları açıklamaktadır. Zira bu suşların fermentasyon sonucunda oluşturduğu asitler başta olmak üzere diğer kimyasal bileşiklerin hücre duvar ve membran yapısının stabilitesini bozucu ve dolayısı ile bakteriyosin etkinliğini artırıcı yönde etkilerinin olması kuvvetle muhtemeldir.



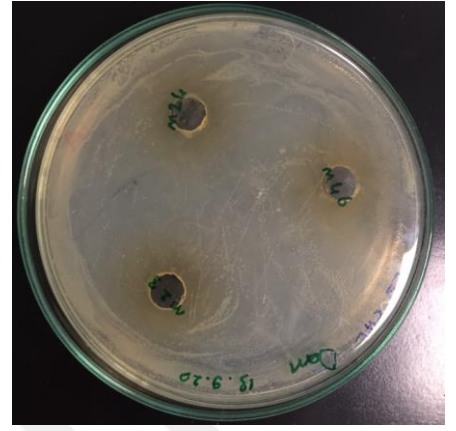
WT 14028 (M16, M17, M20)



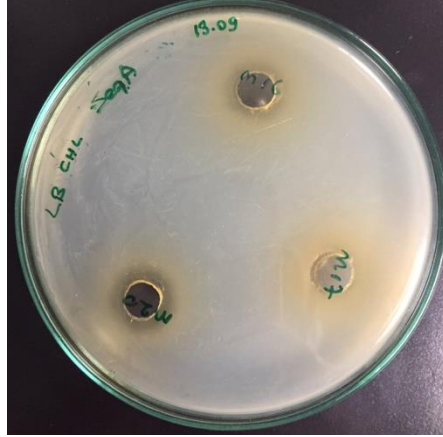
WT 14028 (M23, M24, M46)



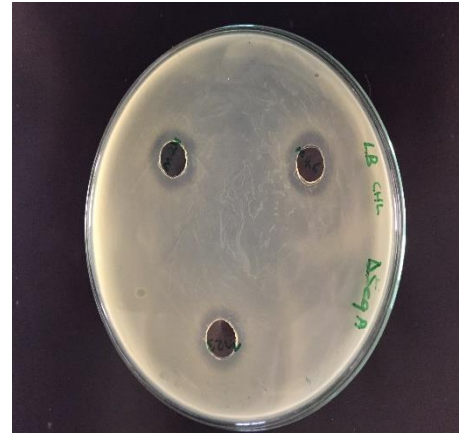
$\Delta dam$  ( M16, M17, M20 )



$\Delta dam$  ( M23, M24, M46 )



$\Delta seqA$  (M16, M17, M20)



$\Delta seqA$  (M16, M17, M20)

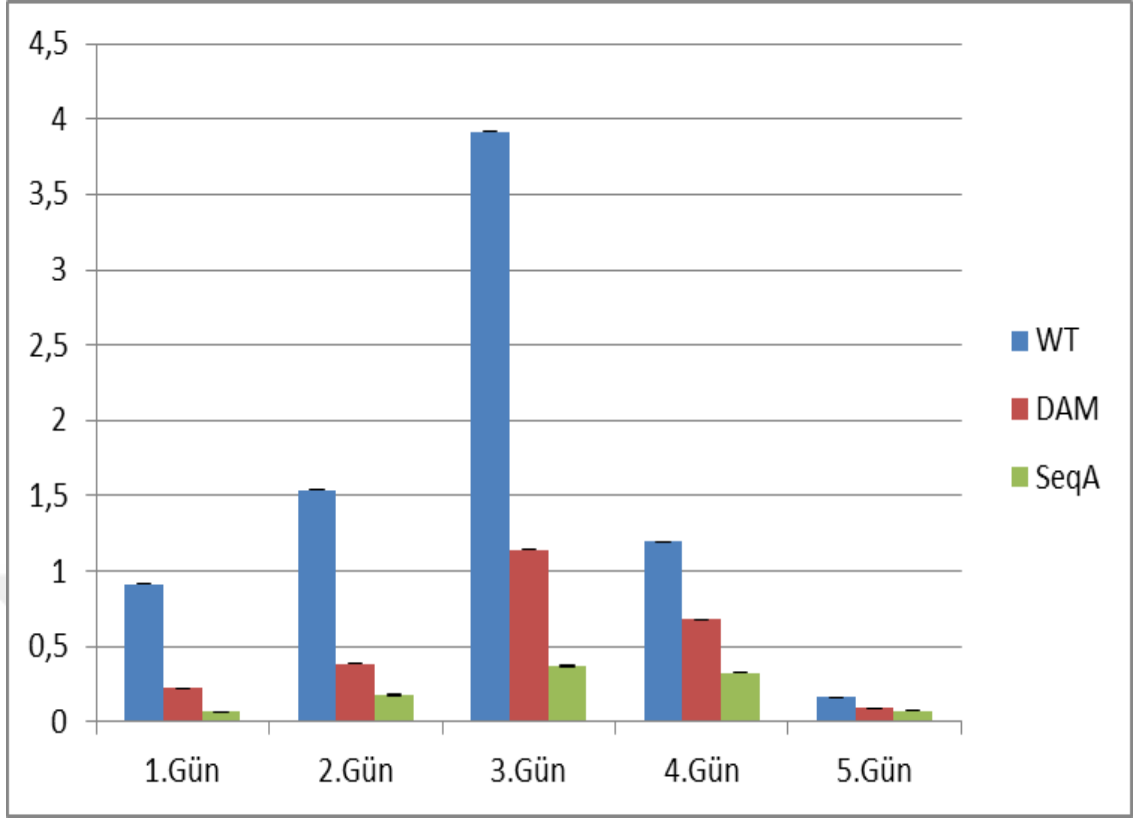
Şekil 4.1 Probiyotik suşların *Salmonella*'ya karşı antimikrobiyal aktiviteleri

## **4.2 Probiyotik Suşların Kültür Filtratlarının, *S.Typhimurium* 14028 Doğal Suşu ve Onun *dam* ve *seqA* Mutantlarının Biyofilm Oluşturma Özelliği Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**

### **4.2.1 *Salmonella* doğal suşu ve mutantlarının optimum biyofilm oluşturma süresinin belirlenmesi**

*Salmonella* doğal suşu ve mutantlarının zamana bağlı olarak optimum biyofilm üretim miktarlarının belirlenmesi için yürütülen bu çalışmada, biyofilm üretim ortamlarında inkübasyonun her 24 saatinde bir biyofilm miktarları ölçülmüş ve bu işleme 5 gün boyunca devam edilmiştir. Bu deneyde biyofilm üretim miktarının, *S. Typhimurium* 14028 suşunda ve bu suşun *dam* ve *seqA* geni bakımından mutantlarında da ilk üç gün artarak devam ettiği, üçüncü günde maksimum düzeye ulaştığı ve daha sonraki günlerde biyofilm üretim miktarlarının istatistiki açıdan anlamlı ( $p<0.05$ ) bir azalma eğilimi gösterdiği saptanmıştır.

*S. Typhimurium* 14028 doğal suşunda da biyofilm üretim eğrisi tamamen aynı yönelimi göstermiştir. Ancak, tüm örnekleme zamanlarında (özellikle ilk 4 gün) doğal suşun biyofilm üretim miktarları, mutantların oluşturduğu biyofilm miktarlarından önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Tüm zamanlar için en düşük biyofilm üretimi, doğal suşun *seqA* geni mutantında belirlenmiştir (Şekil 4.2).



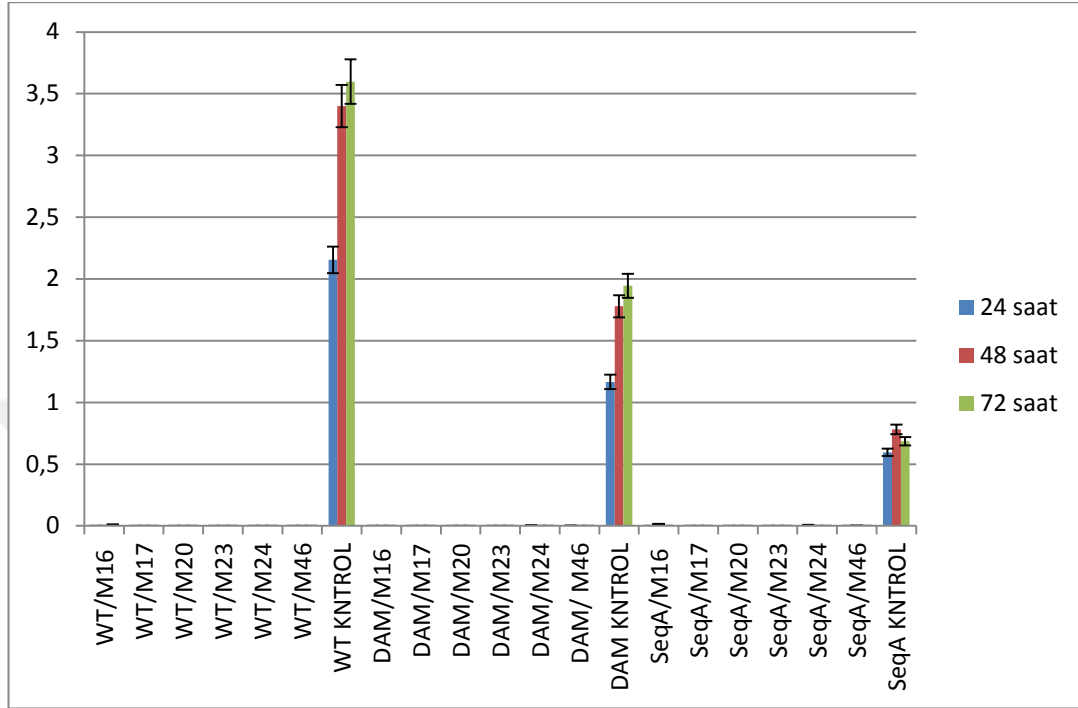
Şekil 4.2 S. Typhimurium 14028 doğal suşu ve bu suşun *dam* ve *seqA* geni bakımından mutantlarının polistiren yüzeylerde biyofilm üretim miktarları

(WT: Doğal suş; DAM: Doğal suşun *dam* geni mutanıtı; SeqA: Doğal suşun *seqA* geni mutanıtı)

#### 4.2.2 Probiyotik suşların kültür filtratlarının, S.Typhimurium 14028 doğal suş ve mutantlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi

S. Typhimurium 14028 doğal tip suşunun ve bu suşun *dam* ve *seqA* geni bakımından mutantlarının biyofilm üretimi üzerine; probiyotik suşlar olan *Lactobacillus plantarum* (M16) , *Lactobacillus sake* (M17) , *Pediococcus acidilactici* (M20) , *Bifidobacterium langum* (M23) , *Bifidobacterium bifidum* (M24) , *Pediococcus pentosaceus* (M46) kültürlerinden hazırlanan filtratların etkinliğinin belirlendiği çalışmalarda; filtratların *Salmonella* kültürlerine denenmesinden sonra 24, 48 ve 72. saatlerde biyofilm üretimleri miktarsal olarak belirlenmiştir. Kontrol grupları ise probiyotik filtratlarının uygulanmadığı *Salmonella* doğal suşu ve mutantları olarak aynı sürelerde inkübasyona tabi tutulmuştur. Tüm örnekleme zamanlarında (24, 48 ve 72 saat), probiyotik filtratları S. Typhimurium doğal suşu ve mutantlarında biyofilm üretimini tamamen engellemiştir

(bu örneklerde belirlenen çok düşük biyofilm üretimleri boya belirlenmesine dayanan yöntemin hata oranı olarak kabul edilmiştir) (Şekil 4.3).



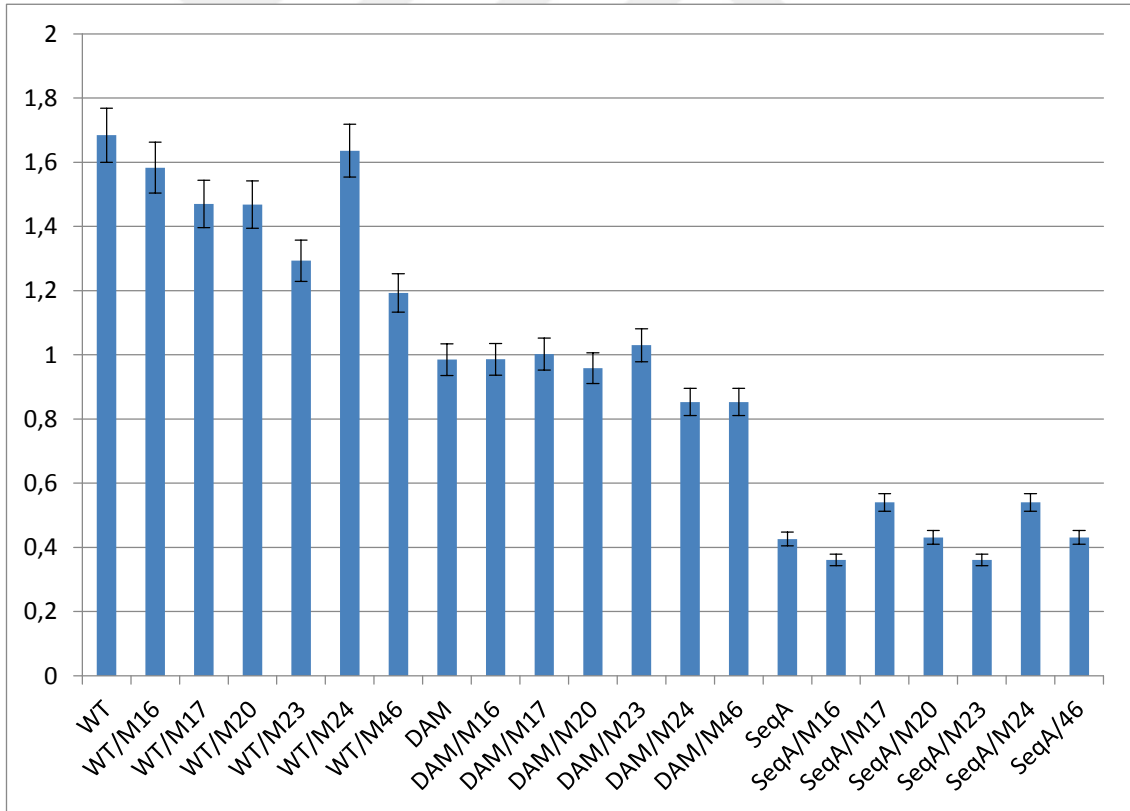
Şekil 4.3 Probiyotik suş kültür filtratların *Salmonella*'da biyofilm oluşumu üzerine etkisi

(WT: *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu; DAM: Doğal suşun *dam* geni mutanlığı; SeqA: Doğal suşun *seqA* geni mutanlığı)

#### 4.3 Probiyotik Suş Kültür Filtratlarının, *Salmonella* Doğal Suşu ve Mutantlarının Oluşturduğu Olgun Biyofilmlerin Eradikasyonu Üzerine Etkisi

Denemelerde kullanılan *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve bu suşun *dam* ve *seqA* geni bozulmuş mutantlarının maksimum biyofilm üretim zamanı 72 saat olarak daha önce belirlenmiş olduğu için (Şekil 4.2), her üç bakteri için de olgun biyofilmler 72 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilmiştir. Bu süre bitiminde her bir *Salmonella* örneği için 3 paralelli olarak hazırlanan kuyucuklara probiyotik suş kültür filtratları denenmiş ve 6 ve 24 saat inkübasyon süreleri sonucunda biyofilm miktarları ölçülerek, olgun biyofilmlerin eradikasyonu üzerine probiyotik suş filtratlarının zamana bağlı etkisi saptanmıştır.

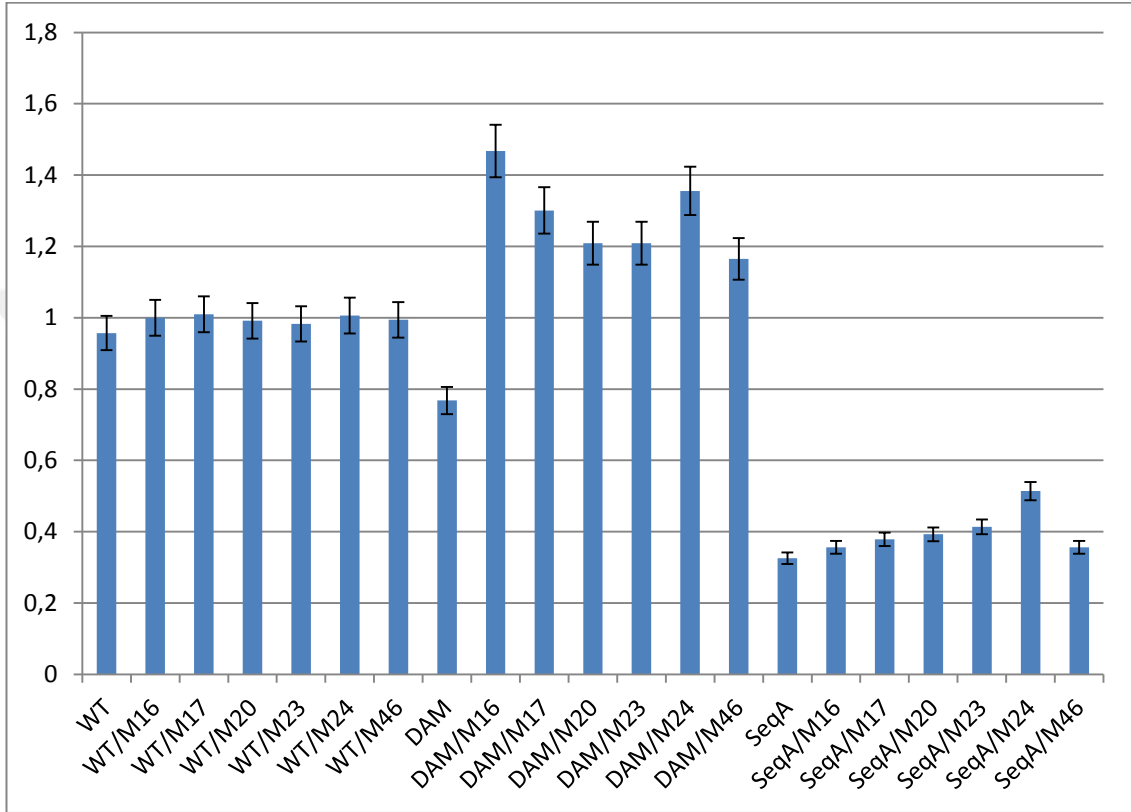
S. Typhimurium doğal suşunda M24 suşu kültür filtratı hariç tüm probiyotik suş kültür filtratlarının, olgun biyofilm yapısını, uygulamanın 6. saatinde istatistiki açıdan anlamlı kabul edilen oranlarda ( $p<0.05$ ) eradike ettiği saptanmıştır. Bu bakterinin  $\Delta dam$  mutantında M20, M24 ve M46 kültür filtratlarının olgun biyofilm yapısını istatistiki açıdan anlamlı kabul edilen oranlarda ( $p<0.05$ ) eradike ettiği, M23 suşu kültür filtratının ise tam aksine 6. saatte olgun biyofilm oranını artırdığı belirlenmiştir. M16 ve M17 suşları kültür filtratları 6 saat uygulama sonunda  $\Delta dam$  mutantının oluşturduğu olgun biyofilm yapısı üzerine istatistiki açıdan anlamlı ( $p<0.05$ ) bir farklanmaya yol açmamıştır. Diğer yandan  $\Delta seqA$  mutantının olgun biyofilminin M16 ve M23 suşu kültür filtratları ile 6 saat muamelesi sonucu biyofilm eradikasyonunun istatistiki açıdan anlamlı düzeylerde gerçekleştiği, M17 ve M24 kültür filtratları uygulaması sonucu da arttığı tespit edilmiştir. M20 ve M46 suşlarının kültür filtratları ise,  $\Delta seqA$  mutantının olgun biyofilmi üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Probiyotik suş kültür filtratlarının *Salmonella*'da olgun biyofilm yapıları (6 Saat) üzerine etkisi

(WT: *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu; DAM: Doğal suşun *dam* geni mutantı; SeqA: Doğal suşun *seqA* geni mutantı)

Probiyotik suş kültür filtratlarının olgun *Salmonella* biyofilmlerine etkinliğinin belirlenmesi amacı ile inkübasyon süresi 24 saate çıkarıldığında ise; hiçbir örnek için biyofilm eradikasyonunun gerçekleşmediği, tam aksine biyofilm miktarlarında farklı oranlarda artışların meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 4.5).



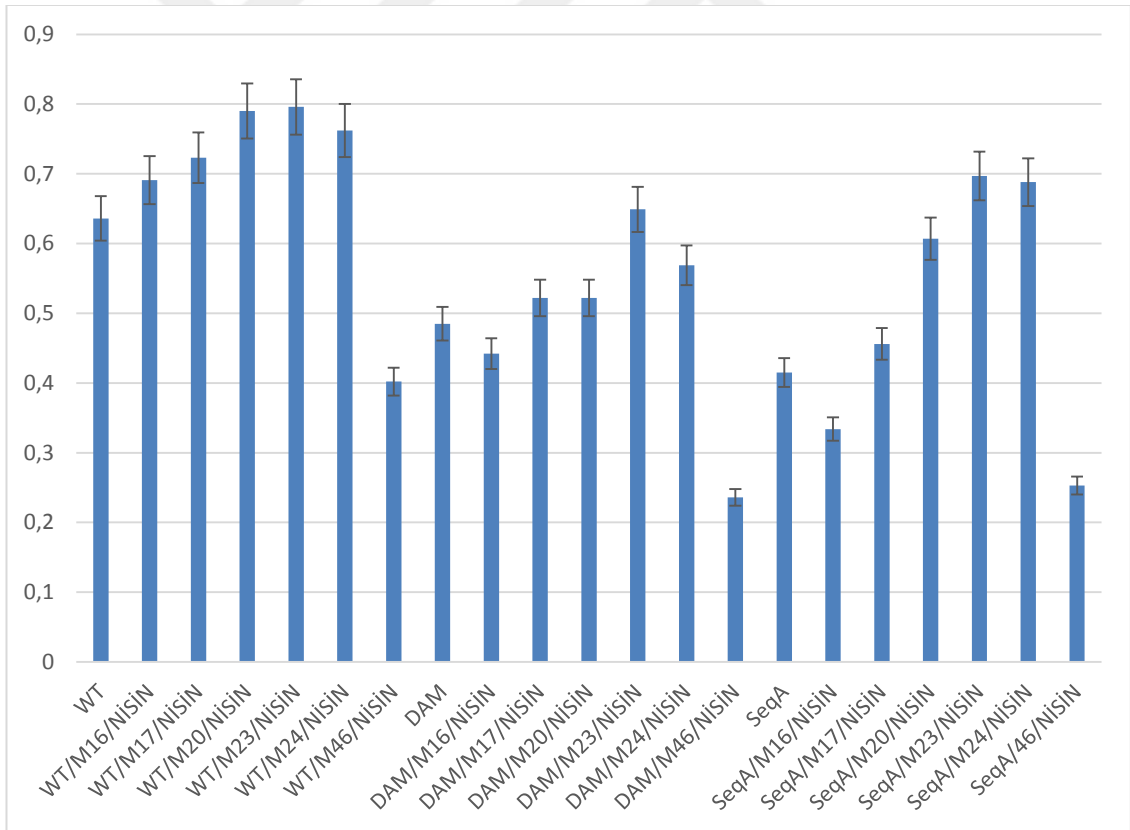
Şekil 4.5 Probiyotik suş kültür filtratların *Salmonella*'da olgun biyofilm yapıları (24 Saat) üzerine etkisi

(WT: *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu; DAM: Doğal suşun *dam* geni mutanlığı; SeqA: Doğal suşun *seqA* geni mutanlığı)

#### 4.4 Nisin ve Probiyotik Kültür Filtratlarının, *Salmonella* Doğal Suşu ve Mutantlarının Oluşturduğu Olgun Biyofilmlerin Eradikasyonu Üzerine Birlikte Etkisi

Çalışmada kullanılan probiyotik suş kültür filtratlarının tek başına *Salmonella* biyofilm yapıları üzerinde yeterli düzeyde eradikasyon etkisi göstermemesi üzerine, söz konusu filtratların ticari bir bakteriyosin preparatı olan nisin ile kombine edilerek kullanımı devreye sokulmuştur. Nisin ile kombine edilmiş kültür filtratlarının olgun biyofilmlere karşı 12 saat süreyle muamele edilmesi sonucunda; doğal suş *S. Typhimurium* 14028'de

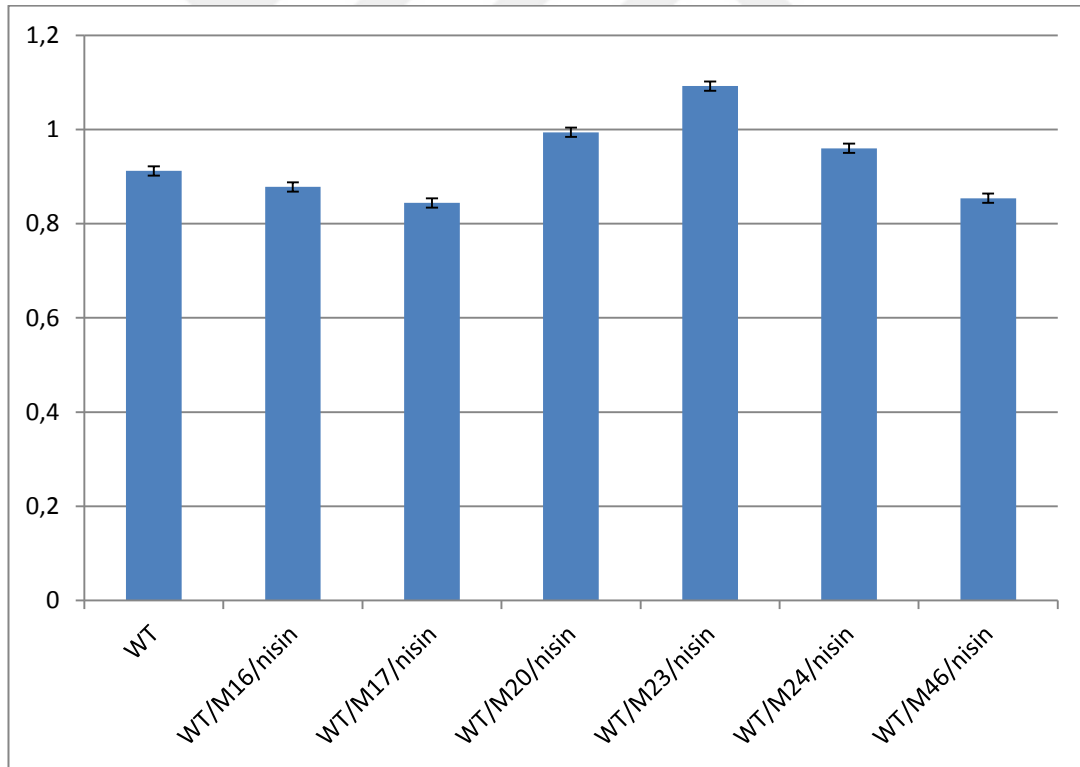
M46 suşu +nisin kombinasyonu hariç tüm kombinasyon denemelerinde 12 saat sonunda saptanan biyofilm miktarları, bu kombinasyonların denenmediği kontrol örnekten istatistiki açıdan anlamlı oranlarda ( $p<0.05$ ) fazla bulunmuştur. Doğal suşta bu inkübasyon süresi için sadece M46 (bifidosin B üreticisi) + nisin kombinasyonu, *S. Typhimurium* 14028 olgun biyofilmini istatistiki açıdan anlamlı bir düzeyde ( $p<0.05$ ) eradike etmiştir. Bu inkübasyon periyodu için doğal suş *dam* ve *seqA* geni mutantlarının olgun biyofilm yapısına karşı probiyotik kültür filtratları+nisin kombinasyonları, M16 (plantarisin bakteriyosini üreticisi)+nisin kombinasyonu hariç, aynı etkinlik eğilimini göstermiştir. M16 (plantarisin bakteriyosini üreticisi)+nisin kombinasyonu için, doğal suşta 12. Saat sonunda biyofilm miktarını artırıcı yönde bir etki saptanırken, doğal suşun *dam* ve *seqA* mutantlarında olgun biyofilmin belirgin bir oranda eradikasyona uğradığı ( $p<0.05$ ) saptanmıştır (Şekil 4.6).



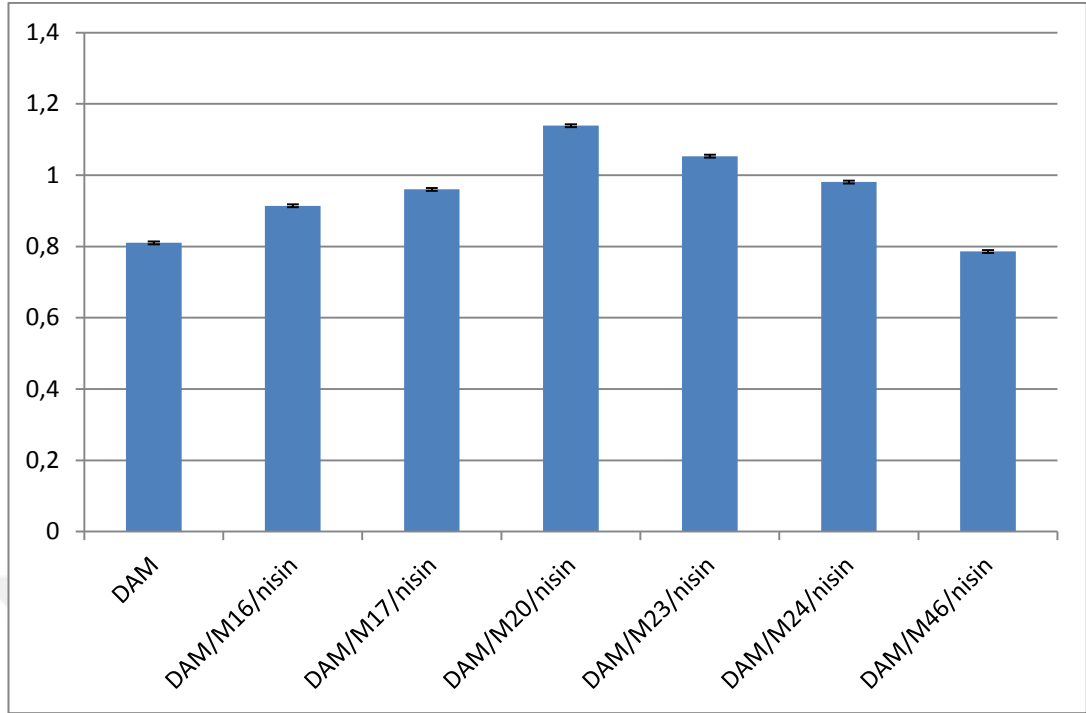
Şekil 4.6 Probiyotik suş kültür filtratları+nisin kombinasyonlarının *Salmonella* olgun biyofilmlerinin üzerine etkisi (12 saat)

(WT: *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu; DAM: Doğal suşun *dam* geni mutanı; SeqA: Doğal suşun *seqA* geni mutanı)

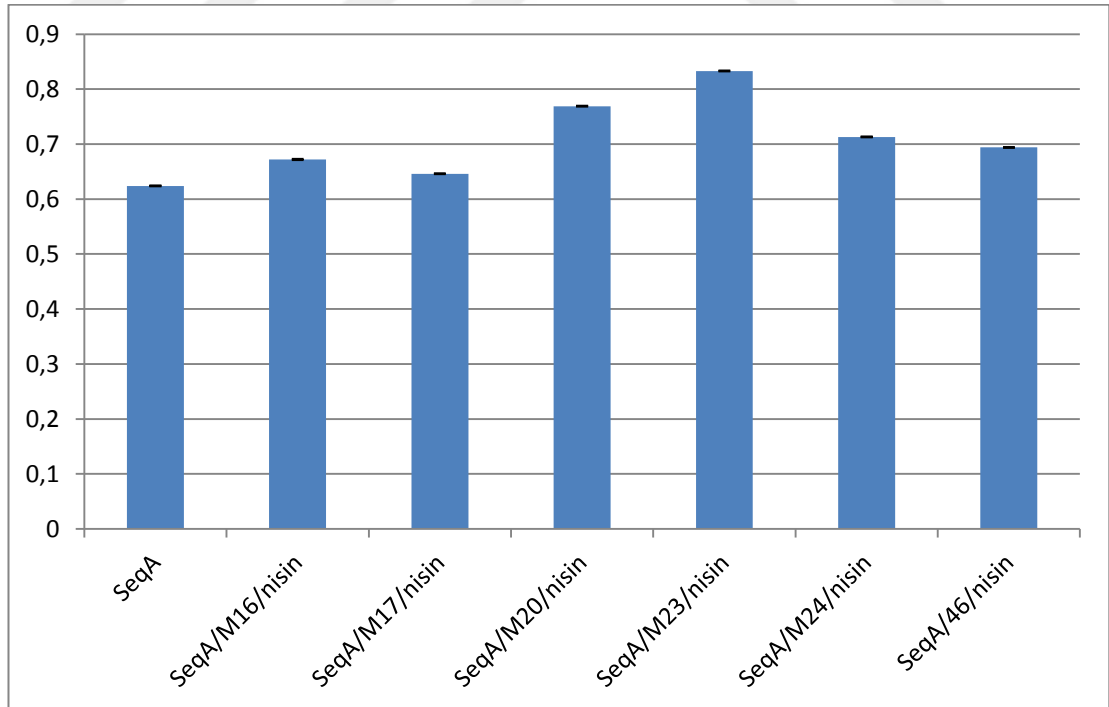
Aynı kombinasyonlar ile *Salmonella* olgun biyofilmleri 24 saat süresince muamele edildiğinde ise 12 saat inkübasyon süresi sonunda elde edilen etkinlik spektrumu denemede kullanılan her üç suş için de farklılaşmıştır. 24 saat inkübasyon süresi sonucunda; M16+nisin, M17+nisin ve M46+nisin kombinasyonlarının doğal suшта olgun biyofilmlerin oranını düşük de olsa azalttığı belirlenirken, diğer kombinasyonlarda olgun biyofilm miktarının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7). 24 saat inkübasyon periyodu için *dam* mutantının olgun biyofilmlerinde saptanan en belirgin farklılık, M46+nisin kombinasyonunun 12 saatte belirlenen eradikasyon gücünün istatistiki açıdan anlamlı ( $p<0.05$ ) bir düzeyde düşmesidir (Şekil 4.8). *seqA* mutantında ise, 12 saat sonunda M16+nisin ve M46+nisin kombinasyonları için saptanan eradikasyon gücünün 24 saat sonunda ortadan kalktığı ve bu etkilerin tam aksine söz konusu kombinasyonlarda da olgun biyofilmlerin miktarsal artış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.7 Probiyotik suş kültür filtratları+nisin kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun olgun biyofilmleri üzerine etkisi (24 Saat )



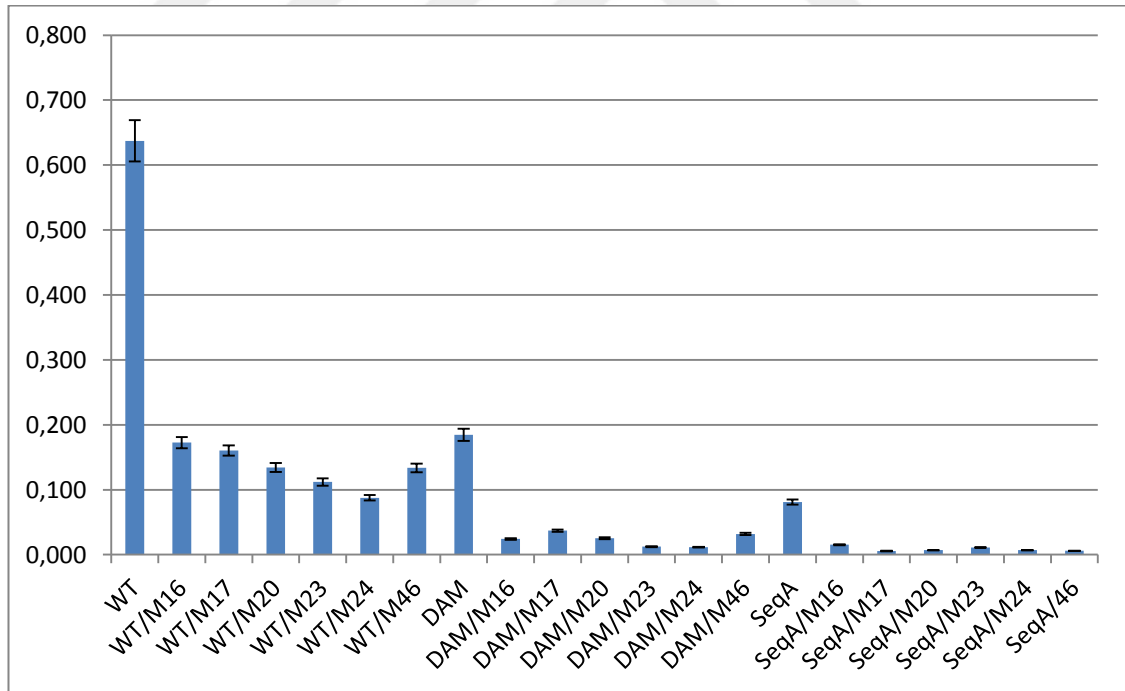
Şekil 4.8 Probiyotik suş kültür filtratları+nisin kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *dam* geni mutantının olgun biyofilmleri üzerine etkisi (24 Saat )



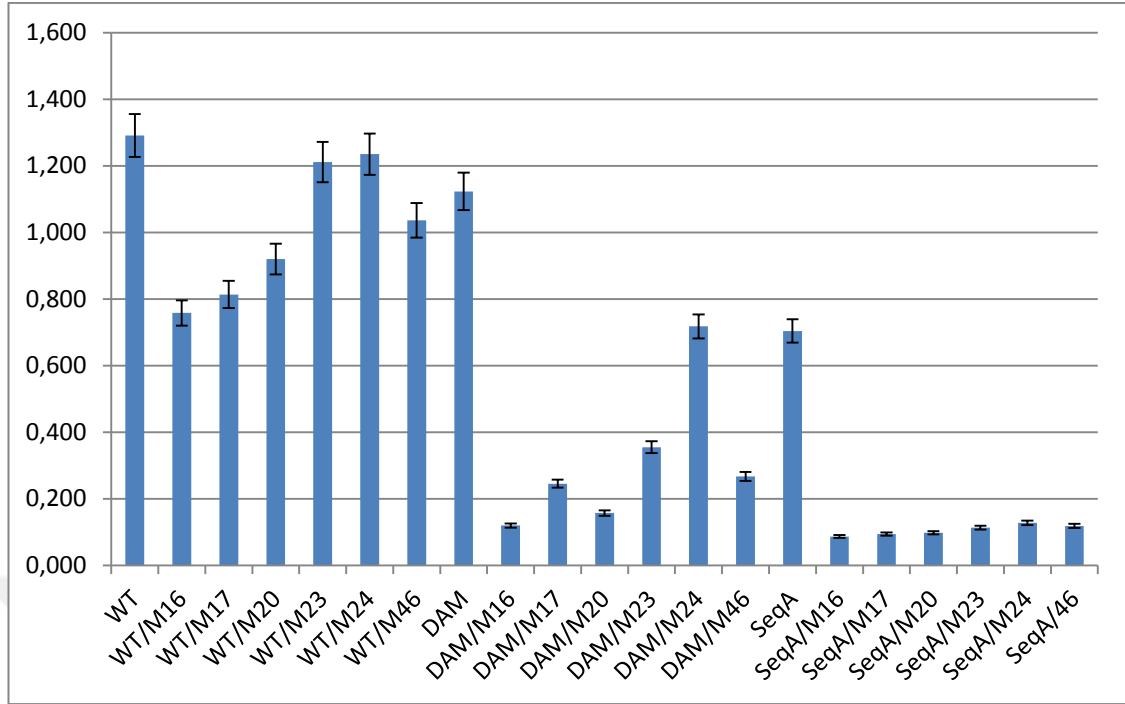
Şekil 4.9 Probiyotik suş kültür filtratları+nisin kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *seqA* geni mutantının olgun biyofilmleri üzerine etkisi (24 Saat)

#### 4.5 Nötrale Edilmiş (pH 7.0) Probiyotik Suş Kültür Filtratlarının *Salmonella*'da Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

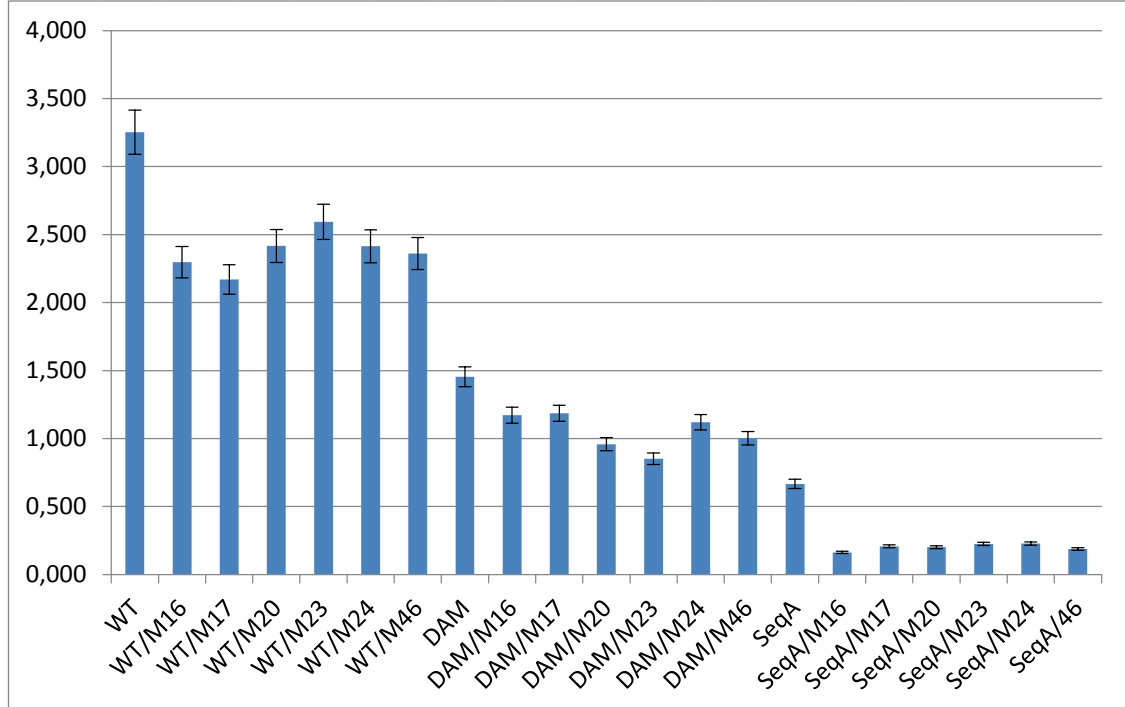
Bu deneme ile probiyotik suş kültür filtratlarının, antibiyofilm aktivitelerinin kaynaklarının araştırılması amaçlanmıştır. pH'nın nötralizasyonu, söz konusu filtratlarda özellikle suş gelişmesi sonucu oluşturulan asitlik ve hidrojen peroksit tiyosiyanat gibi antimikrobiyal maddelerin etkinliğinin minimize edilmesi suretiyle, bu bakterilerin ürettiği bakteriyosin dışı antimikrobiyal bileşiklerin antibiyofilm etkinliklerinin tanımlanması amacı ile yapılmıştır. Üç gün süresince, her 24 saatte bir yapılan örneklemeler sonucunda; doğal sušta çok belirgin olmakta birlikte, nötrale kültür filtratlarının denendiği mutantlarda da biyofilm oluşum etkinliği üzerine bu preparatların etkisinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.10). Bu çalışmada örnekleme süreleri 2. ve 3. güne uzatıldıkça; nötrale edilmiş probiyotik kültür filtratlarının her üç *Salmonella* suşuna karşı da antibiyofilm aktivitelerinde istatistiki açıdan anlamlı düzeylerde (% 30 civarında,  $p < 0.05$ ) düşmeler ortaya çıkmıştır (Şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.10 Nötrale edilmiş probiyotik suş kültür filtratlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun (WT) ve *dam* (DAM) ve *seqA* geni mutantlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (24 Saat)



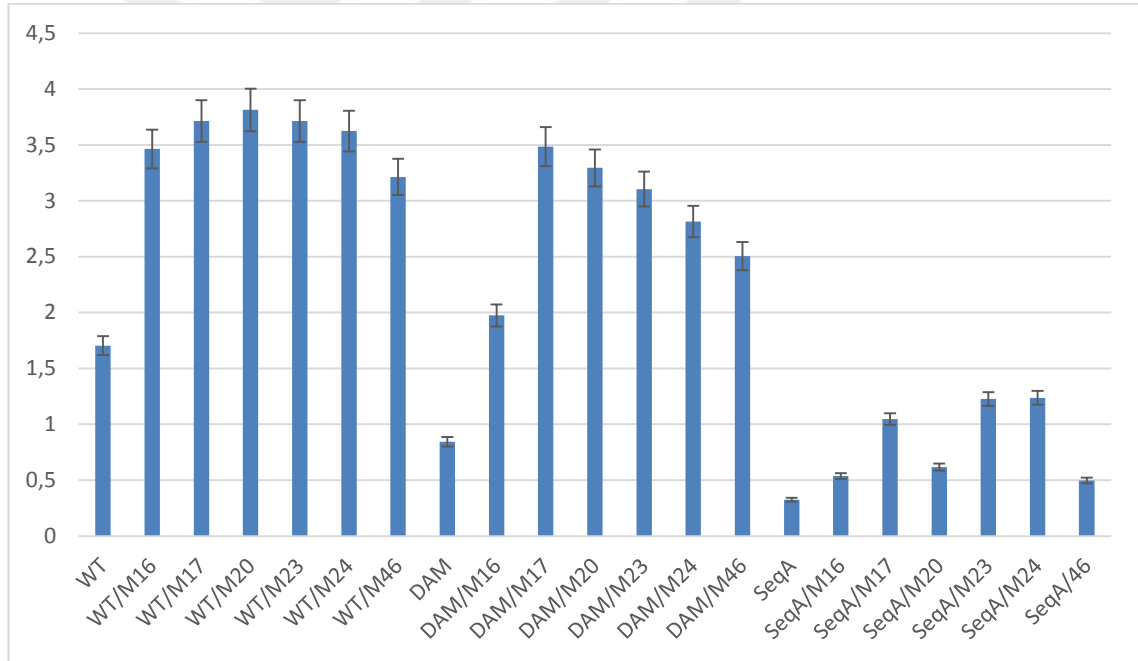
Şekil 4.11 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun (WT) ve *dam* (DAM) ve *seqA* geni mutantlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (48 Saat)



Şekil 4.12 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun (WT) ve *dam* (DAM) ve *seqA* geni mutantlarının biyofilm oluşumu üzerine etkisi (72 Saat)

#### 4.6 Nötrale Edilmiş (pH 7.0) Probiyotik Suş Kültür Filtratlarının *Salmonella* Biyofilmi Eradikasyonu Üzerine Etkisi

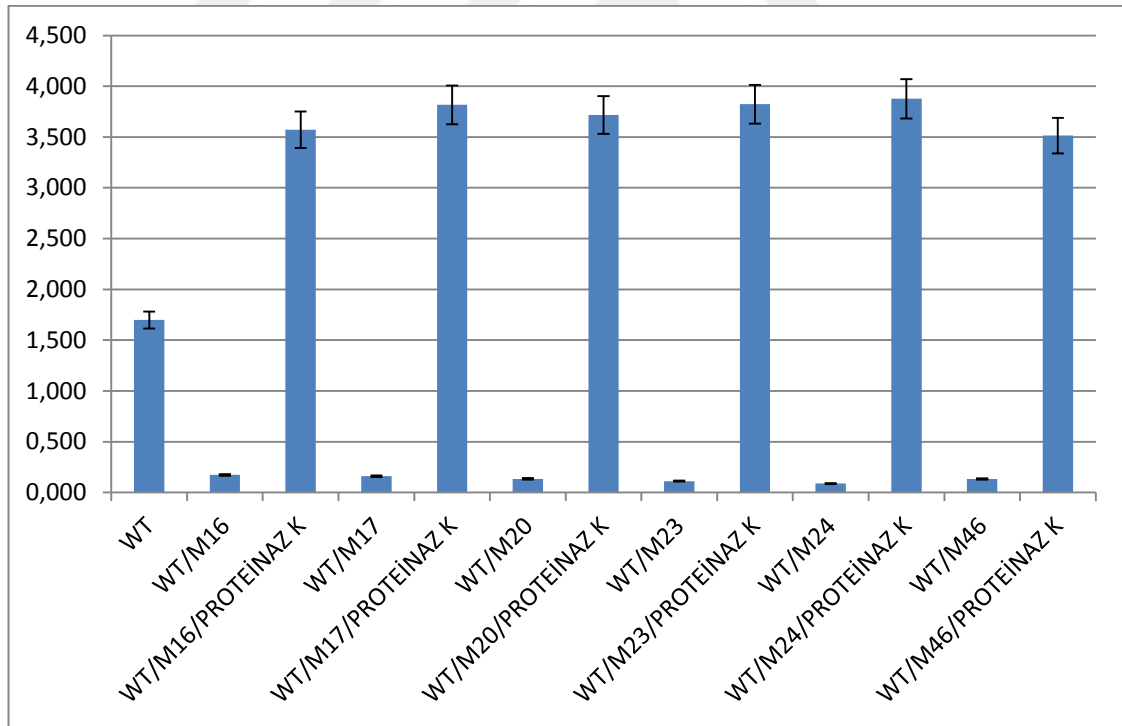
Probiyotik suşların nötrale edilmiş kültür filtratlarının, *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve mutantlarının (*dam* ve *seqA*) oluşturduğu olgun biyofilmlere karşı eradikasyon etkinliği, söz konusu filtratların 24 saat süresince olgun biyofilmlere muamele edilmesi sonucu saptanmıştır. Bu süre sonunda tüm probiyotik suş nötrale kültür filtratlarının olgun biyofilmlerin eradikasyonu üzerinde herhangi bir etkinliğinin olmadığı, tam aksine biyofilm oluşumunu yeniden teşvik ettiği belirlenmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında, probiyotik suşların nötrale edilmiş kültür filtratlarının neden olduğu farklı oranlardaki miktarsal biyofilm artışlarının istatistiki açıdan anlamlı olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.13).



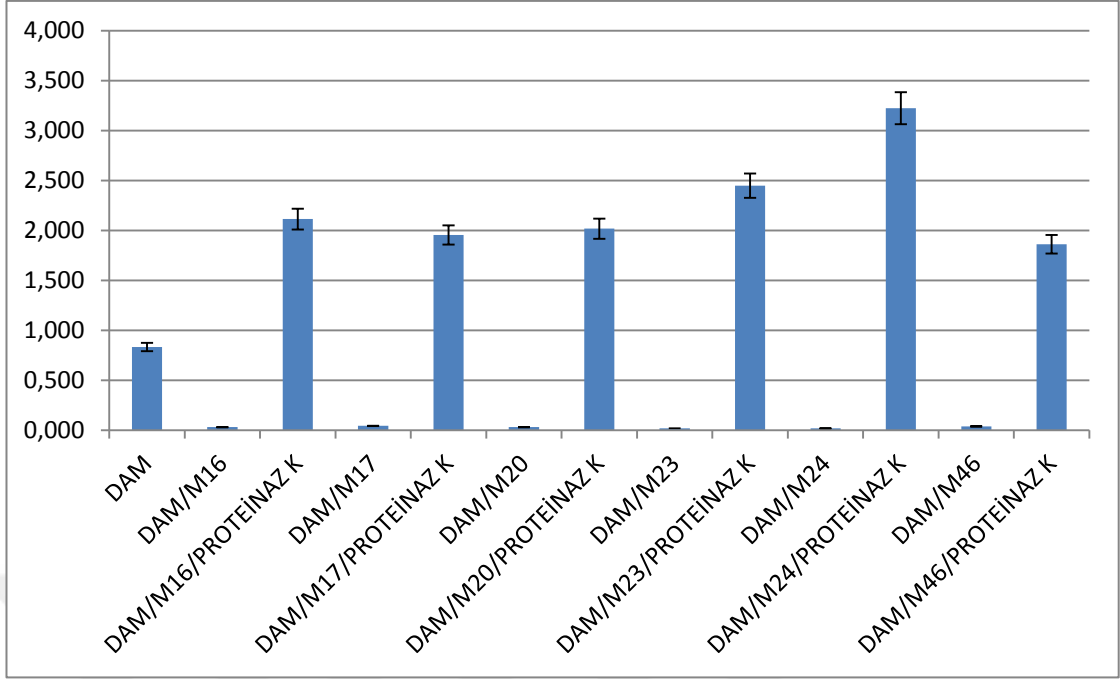
Şekil 4.13 Nötrale edilmiş probiyotik suş kültür filtratlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun (WT) ve *dam* (DAM) ve *seqA* geni mutantlarının olgun biyofilmleri üzerine etkisi (24 Saat)

#### 4.7 Nötrale Edilmiş Kültür Filtratları (pH 7.0) ve Proteinaz K Enziminin Kombine Kullanımının *Salmonella*'da Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisi

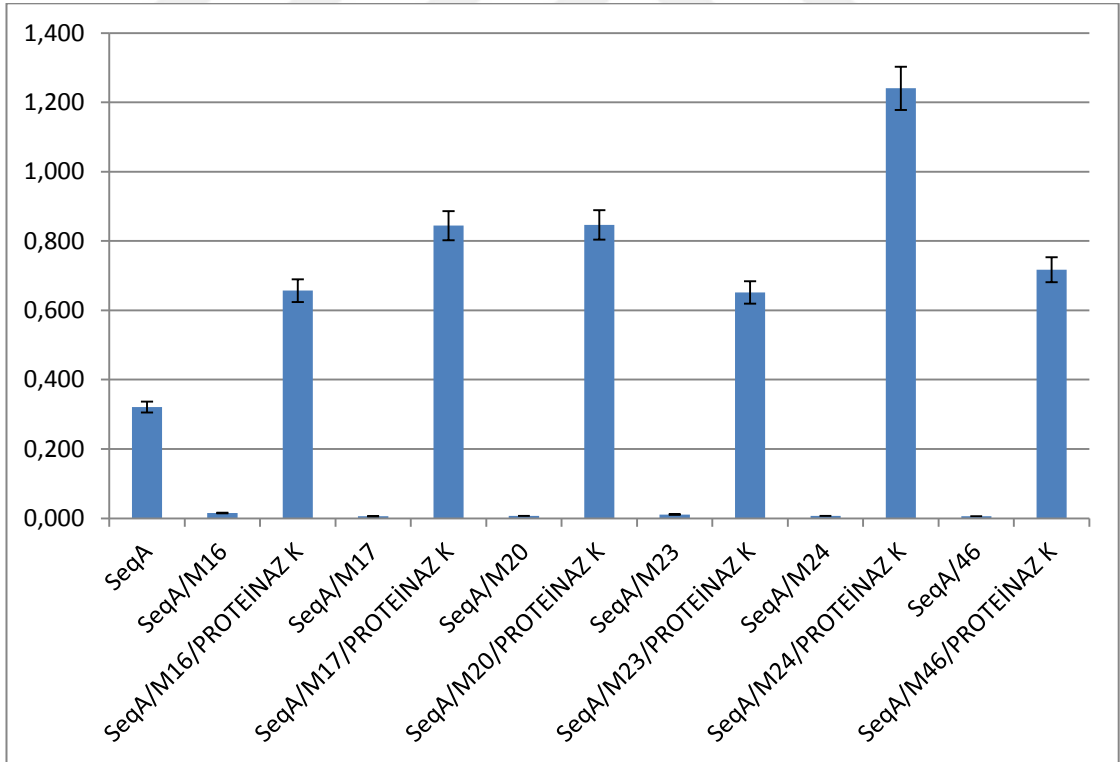
Bu çalışmada nötrale edilmiş kültür filtratlarına proteinaz K muamele edilmesinin amacı, protein yapıdaki bakteriyosinlerin parçalanması suretiyle, söz konusu bileşiklerin antibiyofilm aktivitelerinin tanımlanmasıdır. Denemelerin ilk 24 saatinde alınan sonuçlar, sadece nötrale kültür filtratları muamele edilmiş kontrol grupları ile karşılaştırıldığında; denemelerde kullanılan tüm *Salmonella* suşlarına karşı (doğal suş ve mutantlarda) proteinaz K muamele edilmiş probiyotik suş kültür filtratlarının tamamının antibiyofilm aktivite yeteneğini yitirdiği ve kontrol grupların tam aksine biyofilm oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir. Tüm örneklerin kültür filtratları muamele edilmemiş diğer kontrol gruplarında, proteinaz K+ nötrale edilmiş probiyotik suş kültür filtratları muamele edilmiş örneklere kıyasla yaklaşık 2-8 kat daha fazla biyofilm üretimleri gerçekleşmiştir (Şekil 4.14, 4.15, 4.16).



Şekil 4.14 Nötrale edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun (WT) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (24 saat)

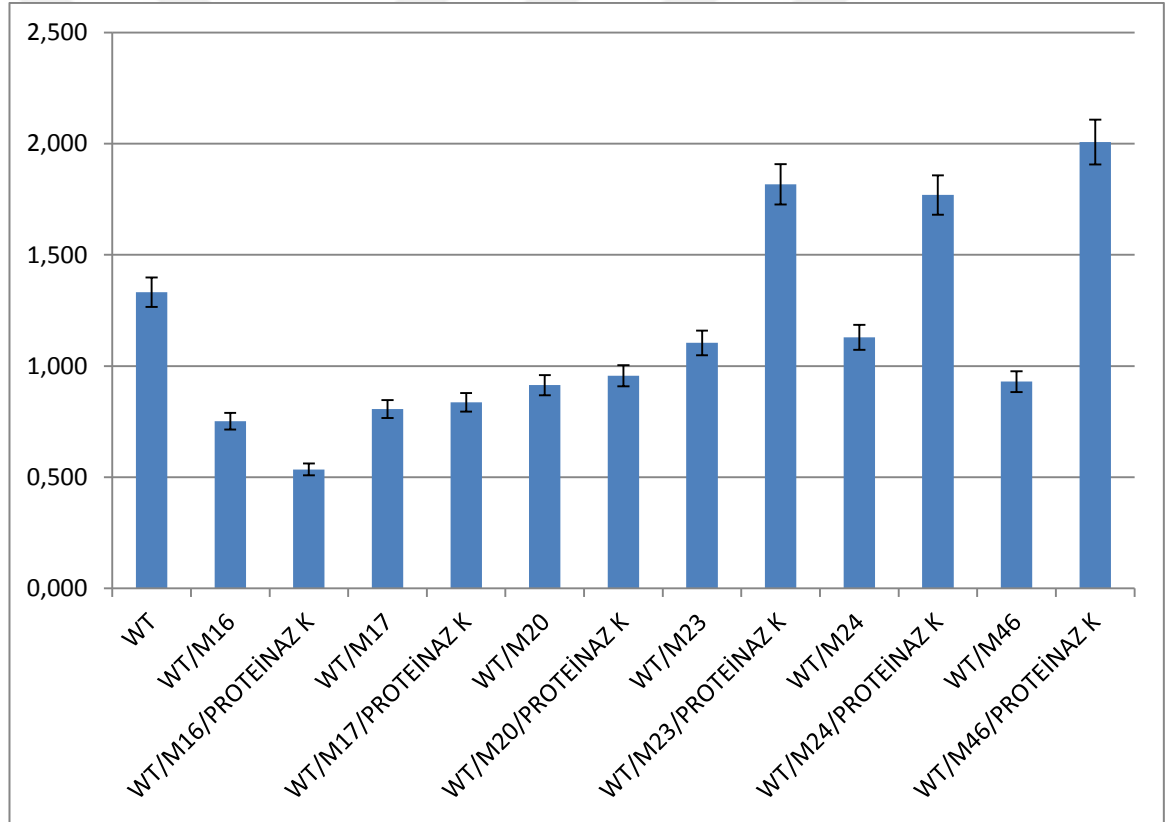


Şekil 4.15 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *dam* geni mutantının (DAM) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (24 Saat)



Şekil 4.16 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *seqA* geni mutantının (SeqA) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (24 Saat)

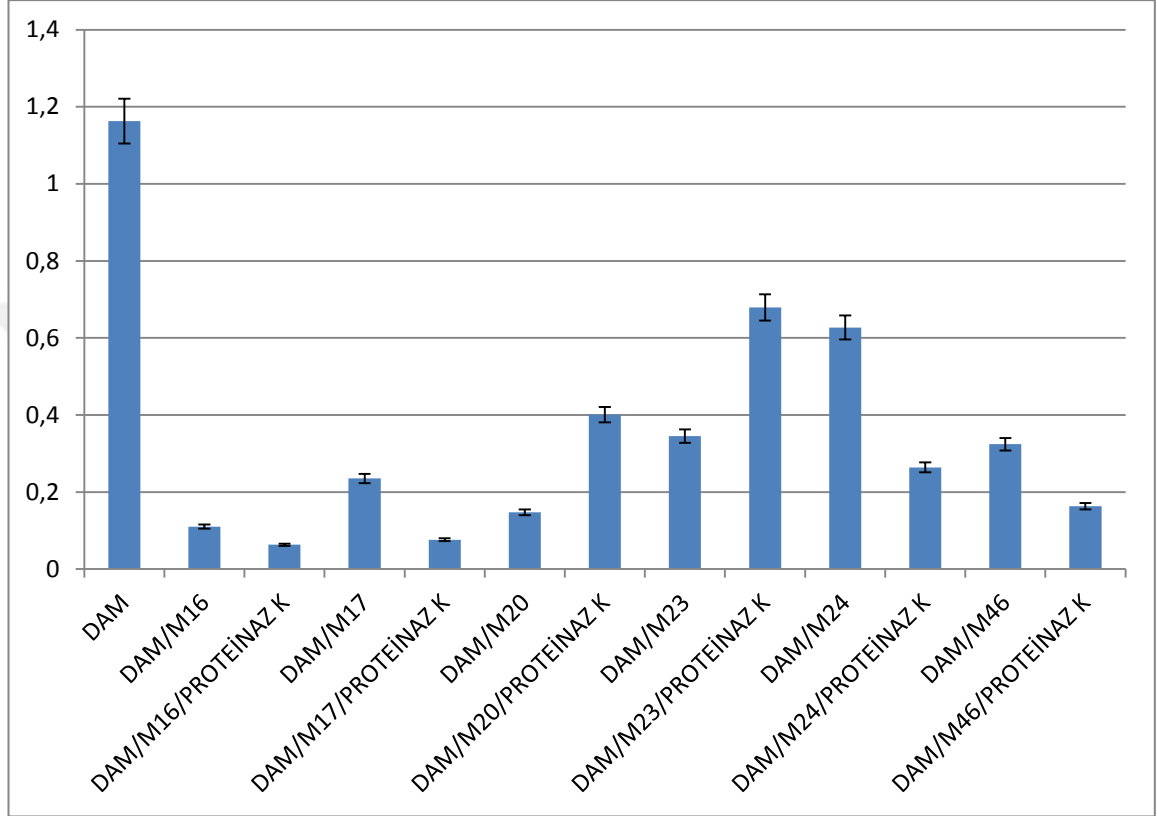
Nötrale edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonları ile yürütülen denemelerde 2. gün (48.saat) sonunda *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun biyofilm oluşumunu proteinaz K muamelesinin teşvik edici özelliği M16 filtratı+proteinaz K örneğinde ortadan kalkmış ve bu kez proteinaz K muamelesi, proteinaz K muamele edilmemiş örnekten yaklaşık % 50 daha fazla biyofilm inhibisyonuna yol açmıştır. Diğer örneklerde kültür filtratlarının etkinliğinin 2. günde düşmesine paralel bir şekilde antibiyofilm etkinlikleri proteinaz K içeren kültür filtratlarına yaklaşmıştır. Yine de bu örneklerde proteianaz K ilave edilmiş nötrale kültür filtratlarının sadece nötrale kültür filtratlarına karşı antibiyofilm etkinlikleri istatistiki açıdan anlamlı ( $p<0.05$ ) düzeylerde daha düşük belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Nötrale edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun (WT) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (48 Saat)

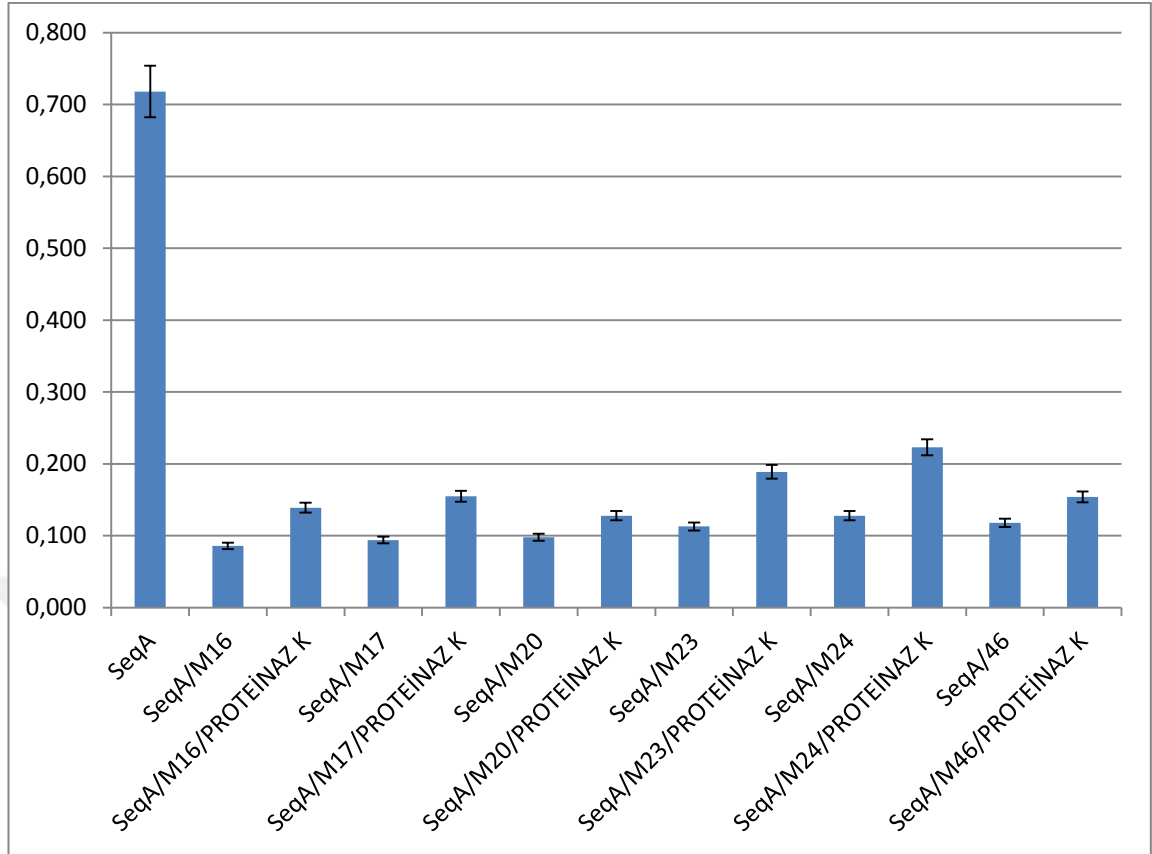
Doğal suşun *dam* geni mutantında 48. saat sonunda; M16+proteinaz K, M17+proteinaz K, M24+proteinaz K ve M46+proteinaz K muamelelerinde, söz konusu suşların nötrale kültür filtratlarına kıyasla %100 oranlarına varan antibiyofilm aktiviteleri

saptanmıştır. M20+proteinaz K ve M23+proteinaz K muamelelerinde ise hiçbir muamele yapılmamış *dam* biyofilmleri dikkate alındığında belirgin bir antibiyofilm aktivitesi belirlenmiş, ancak bu aktivite sadece bu suşların nötralize kültür filtratları ile karşılaştırıldığında istatistiki açıdan anlamlı düzeylerde düşük bulunmuştur (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *dam* geni mutantının (DAM) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (48 Saat)

*S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *seqA* geni bakımından mutantında 48. saat sonunda da hiçbir muamele yapılmamış *seqA* biyofilmleri dikkate alındığında belirgin bir antibiyofilm aktivitesi belirlenmiş, ancak bu aktivite sadece bu suşların nötralize kültür filtratları ile karşılaştırıldığında istatistiki açıdan anlamlı düzeylerde ( $p < 0.05$ ) düşük bulunmuştur (Şekil 4.19).

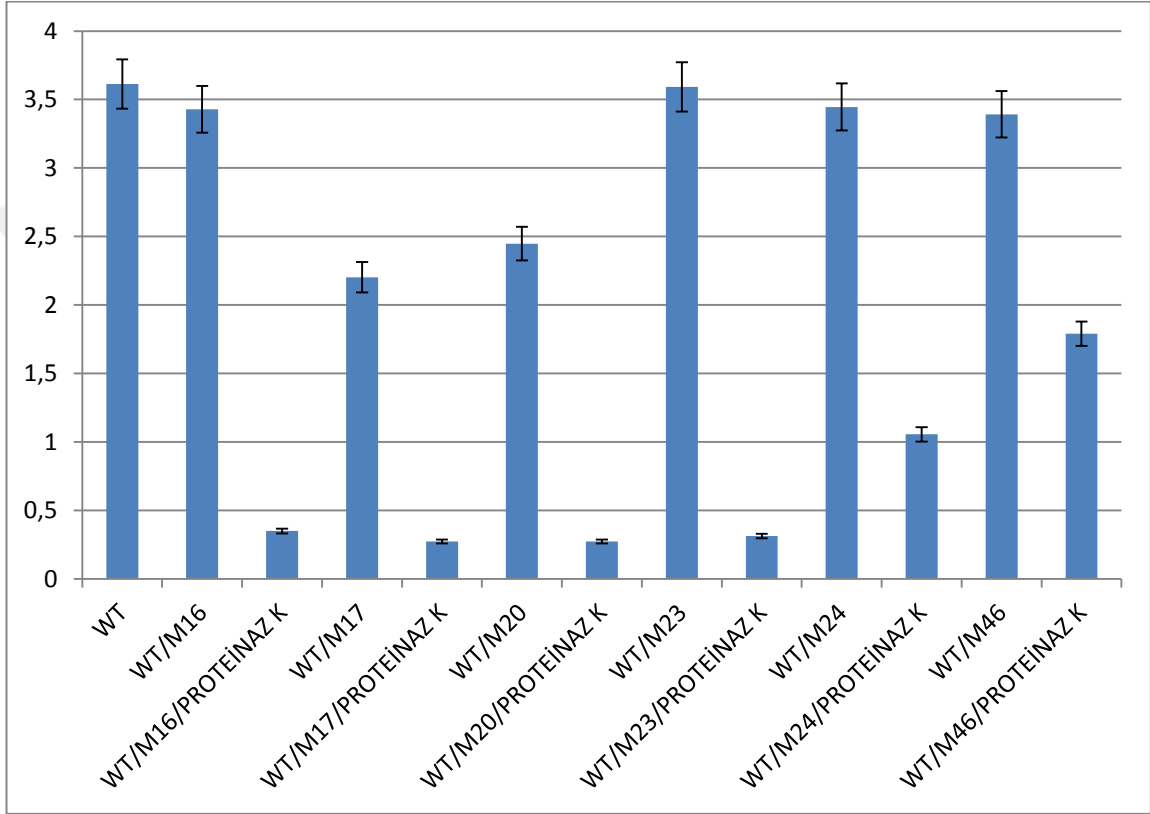


Şekil 4.19 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *seqA* geni mutantının (SeqA) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (48 Saat)

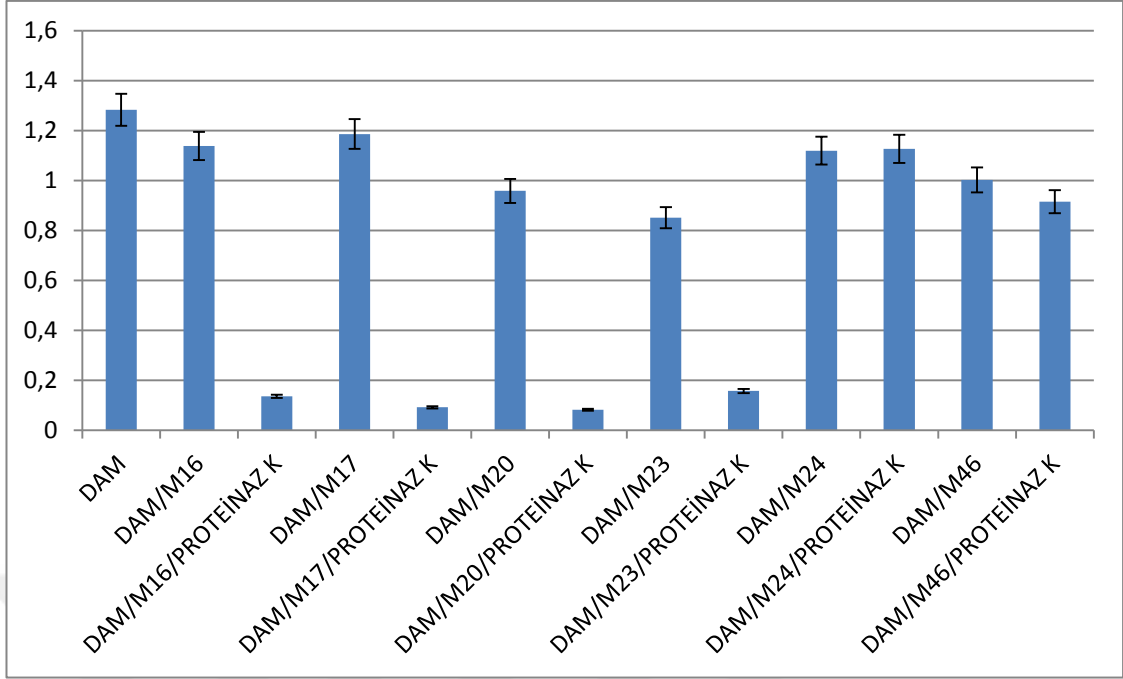
Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonları ile yürütülen denemelerde 3. gün (72. saat) sonunda *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun biyofilm oluşumu üzerine kültür filtratlarının etkinliği büyük oranda kaybolurken, ilginç bir şekilde nötralize kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının antibiyofilm etkinliğinde, nötralize kültür filtratları içeren kontrollere oranla yaklaşık 10-20 kata varan artışlar tespit edilmiştir (Şekil 4.20).

Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonları ile yürütülen denemelerde 3. gün (72. saat) sonunda *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu üzerinde tanımlanan etkinlik eğilimi, bu suşun *dam* geni mutantında da M24+proteinaz K muamelesi hariç benzer bulunmuştur. Bu mutantın biyofilmine karşı 3. gün sonunda M24 suşu nötralize kültür filtratı ile M24 suşu nötralize kültür filtratı+proteinaz K kombinasyonu muameleleri arasında istatistiki açıdan anlamlı ( $p < 0.05$ ) bir fark

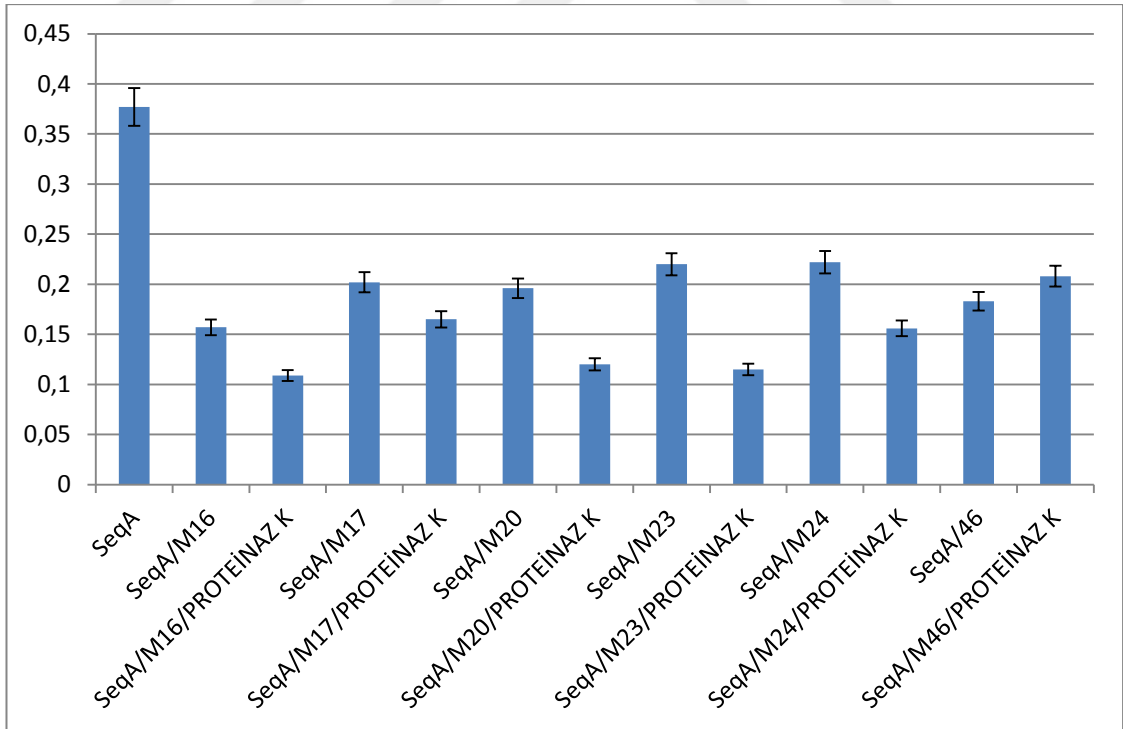
saptanmamıştır (Şekil 4.21). Nötralize suş kültürü filtratları+proteinaz K uygulamasının 3. gün için tanımlanan bu genel antibiyofilm etkinliğinde *seqA* mutanları için sapma ise M46 suşu nötralize kültür filtratı+proteinaz K muamelesinde tespit edilmiştir. Bu muamelede M46 suşunun nötralize kültür filtratından daha düşük antibiyofilm aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.20 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun (WT) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (72 Saat)



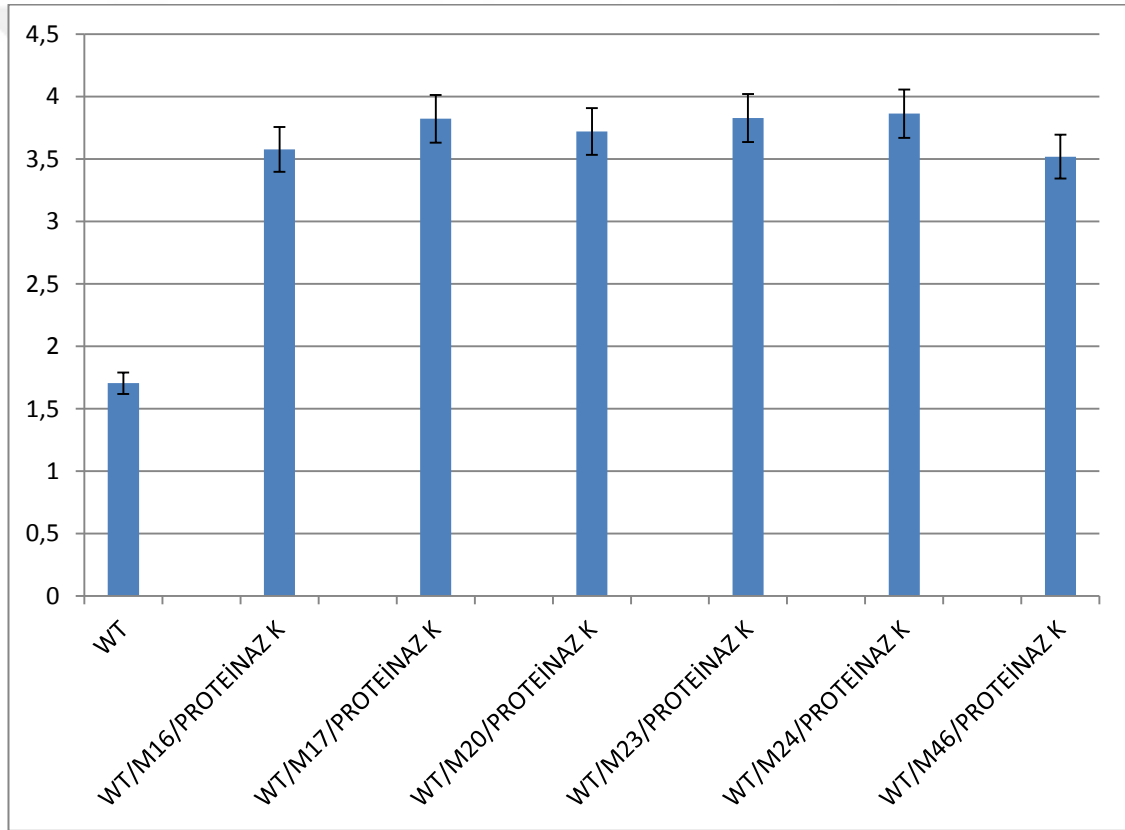
Şekil 4.21 Nötralle edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *dam* geni mutantının (DAM) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (72 Saat)



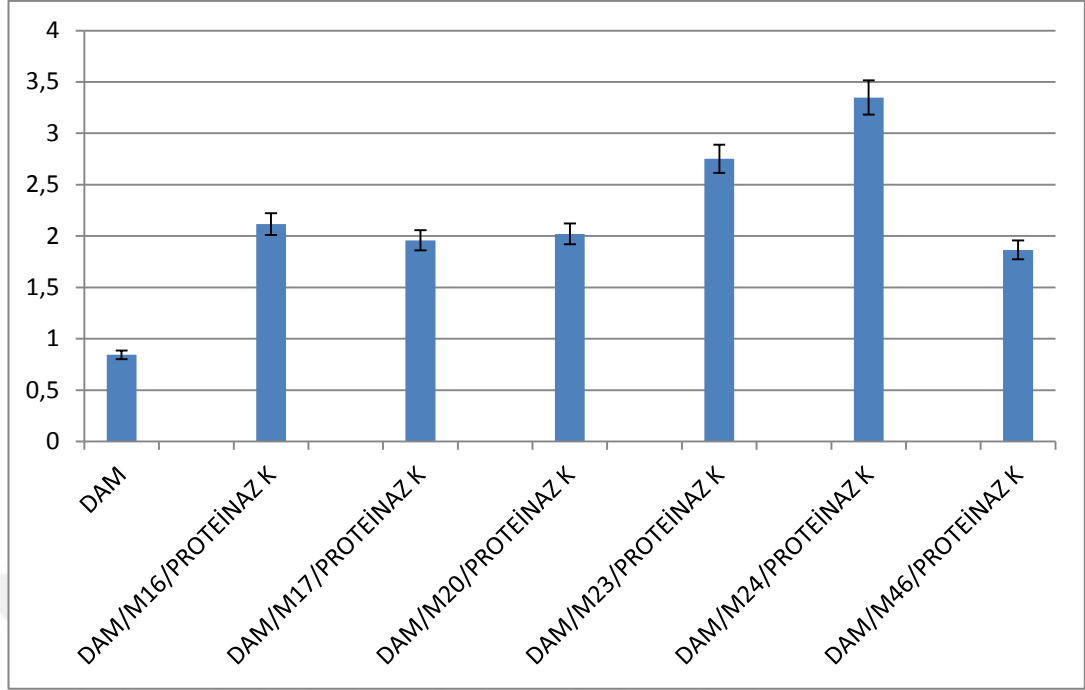
Şekil 4.22 Nötralle edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *seqA* geni mutantının (SeqA) biyofilm oluşturma yeteneği üzerine etkisi (72 Saat)

#### 4.8 Nötralize Edilmiş Kültür Filtratları (pH 7.0) ve Proteinaz K Enziminin Kombine Kullanımının *Salmonella* Olgun Biyofilmlerinin Eradikasyonuna Etkisi

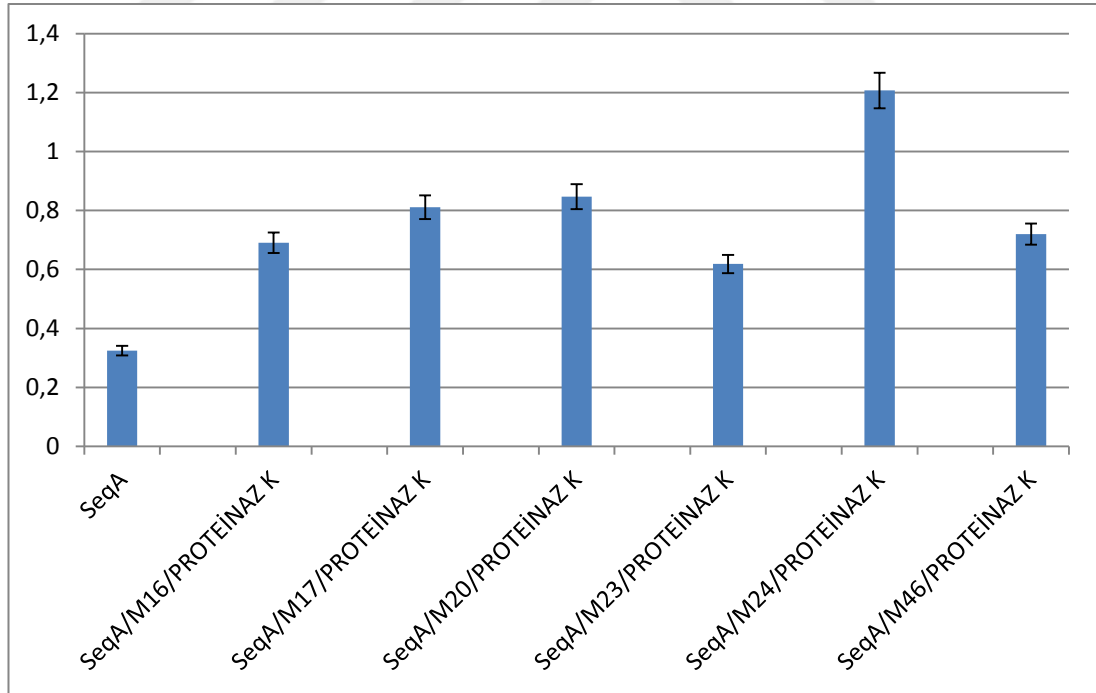
Nötralize edilmiş kültür filtratlarına proteinaz K muamele edildikten sonra *Salmonella* suşlarının olgun biyofilmleri üzerine etkinliğine bakıldığında, sadece nötralize edilmiş kültür filtratlarının olgun biyofilmleri üzerinde gerçekleştirdiği eradikasyon etkinliğinin aksine (Şekil 4.13), proteinaz K ile muamele edilmiş kültür filtratlarının hem doğal suşta ve hem de onun *dam* ve *seqA* geni bakımından mutant suşlarında uygulamanın 24. saatinde olgun biyofilm miktarının arttığı saptanmıştır (Şekil 4.23, 4.24 ve 4.25).



Şekil 4.23 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun (WT) olgun biyofilmi üzerine etkisi (24 Saat)



Şekil 4.24 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *dam* geni mutantının (DAM) olgun biyofilmi üzerine etkisi (24 Saat)



Şekil 4.25 Nötralize edilmiş probiyotik suş kültür filtratları+proteinaz K kombinasyonlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşunun *seqA* geni mutantının (SeqA) olgun biyofilmi üzerine etkisi (24 Saat)

## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

*S. Typhimurium*; yüksek düzeyde bulaşıcılığı yanında, özellikle kontrol ve önleme tedbirlerinin uygulanmasındaki güçlükler, antibiyotiklere karşı artan dirençlilik kazanma eğilimleri ve yaygın biyofilm oluşturma gibi yetenekleri nedeniyle tüm dünyada hem gıda endüstrisi hem de tüketici sağlığı açısından önemli bir sorun teşkil etmektedir (Su vd. 2004 , Shinohara vd. 2008, Lee vd. 2015). Her yıl dünya çapında, içinde ağırlıklı *S. Typhimurium* serovaryetesinin bulunduğu, *Salmonella* kaynaklı yaklaşık 16 milyon tifo vakası, 1.3 milyar gastroenterit vakası ve 3 milyon ölüm gerçekleşmektedir (Pui vd. 2011, Lee vd. 2015).

İnsan gastroenteritinin başlıca etkenlerinden biri olan *S. Typhimurium* serovaryetesinin biyotik ve abiyotik yüzeylerde kolaylıkla biyofilm yapısı oluşturabildiği ve söz konusu yapıların sterilizasyon ve dezenfeksiyon ajanları başta olmak üzere farklı çevresel stres koşullarına karşı, aynı bakterinin planktonik formlarından çok daha yüksek düzeyde dirençlilik gösterdiği saptanmıştır. Bu nedenle kalıcı (inatçı) enfeksiyonların kaynağı olarak bu biyofilm formları gösterilmekte ve temel kontrol ve mücadele programlarının bu formlara karşı planlanması önerilmektedir ( Costerton vd. 1995, Davey ve O'Tootle 2000, Joseph vd. 2001). Söz konusu mücadelede bilim insanlarının ve teknologların, özellikle tüketicilerin bu konu üzerindeki artan hassasiyetlerine paralel bir şekilde, dikkat çektiği bir diğer kritik nokta ise mücadelede kullanılacak ajan ve yöntemlerin tüketici sağlığı ve çevre yönünden güvenilir olmasıdır. Patojenlerin kontrol ve eradikasyon programlarında GRAS (insan ve hayvan tüketiminde genel olarak güvenilir kabul edilen) düzeyli ajanların kullanımı düşüncesi eski bir yaklaşım olmasına rağmen endüstriyel uygulamaları oldukça yenidir ve bu uygulamaların tamamı söz konusu patojenlerin planktonik formlarına karşı geliştirilmiştir (Eng vd. 2015, Havelaar vd. 2015, Gart vd. 2016, Oh ve Park 2017). Ancak günümüzde gıda ya da insan ve hayvan kökenli patojenlerin kalıcı (inatçı ve sürekli) enfeksiyon formlarının planktonik formlardan ziyade biyofilm formları olduğunun tanımlanması (yaklaşık % 85'i), söz konusu GRAS düzeyli ajanların biyofilm formlarına karşı da etkinliklerinin detaylı bir şekilde araştırılması zorunluluğunu doğurmuştur. GRAS düzeyli ajanların en önemli grubunu, insanoğlunun tarım toplumları halinde örgütlendiği milattan önce 8000

yılından beri fermente gıda üretiminde kullanılmaları ve patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal bileşikler oluşturmaları nedeniyle laktik asit bakterileri (LAB) oluşturmaktadır (Gaamouche vd. 2014, Kumar vd. 2018, Tilahum vd. 2018, Kim vd. 2019).

Yukarıda özetlenen gereklilikler doğrultusunda, bu araştırmada, çalışma grubumuz tarafından geçmiş 30 yıl içerisinde, Türkiye’deki geleneksel fermente gıdalardan izole edilerek identifikasyonları yapılan ve probiyotik özellikleri tanımlanan laktik asit bakterilerinin, *S. Typhimurium* biyofilmlerine karşı etkinlikleri ve bu etkinliğin mekanizması incelenmiştir.

Tez kapsamında öncelikle LAB kültür koleksiyonu içerisinde *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve mutanlarına karşı (*dam* ve *seqA* geni mutantları) etkin bakterilerin seçilmesi için, agar spot ve kuyu difüzyon testleri kullanılmıştır. Kuyu difüzyon testi sonucunda antibakteriyel etkinlikleri en yüksek düzeyde tanımlanan; *Lactobacillus plantarum* M16 (plantarisin üreticisi), *Lactobacillus sake* M17 (sakasin üreticisi), *Pediococcus acidilactici* M20 (pediosin üreticisi), *Bifidobacterium langum* M24 (bifidosin A üreticisi), *Bifidobacterium bifidum* M46 (bifidosin B üreticisi) ve *Pediococcus pentosaceus* M46 (bakteriyosin benzeri antimikrobiyal bileşik üreticisi) bakterileri ile antibiyofilm etkinliği çalışmalarına devam edilmiştir.

İlk aşamada, seçilen probiyotik özellikteki LAB suşlarının *S. Typhimurium* 14028 doğal suşu ve mutanlarına karşı (*dam* ve *seqA* geni mutantları) antibiyofilm aktiviteleri, biyofilm oluşumuna etkileri ve olgun biyofilmleri giderme aktiviteleri (eradikasyon) bakımından incelenmiştir. Probiyotik suş kültürlerinden hazırlanan üst sıvılar, söz konusu suşlarda biyofilm oluşumunu, maksimum biyofilm süresi olan 72. saate kadar, her örnekleme evresinde (24, 48 ve 72. saat) tamamen engellemiştir (Şekil 4.3). Bu bulgu bugüne kadar denenilen hiçbir probiyotik suş kültür üst sıvısı ya da kokültürü kullanılarak elde edilememiştir. Değişik araştırmalarda, probiyotik LAB suşlarının, *Salmonella*’da biyofilm oluşumunu; organik asitler, hidrojen peroksit, diasetil, asetoin, antimikrobiyal peptitler (lektinler gibi), antimikrobiyal polisakkaritler (ekzopolisakkaritler gibi) ve bakteriyosinler (nisin, bifidosin, sakasin, plantarisin,

laktosin gibi) gibi doğal gıda koruyucuları üreterek, belirli oranlarda inhibe ettiğine dair bulgular olmasına rağmen, çalışmamızda tanımlanan biyofilm oluşumunun tamamen inhibe edildiğine dair herhangi bir veri literatürde yer almamaktadır. Bu veriler söz konusu LAB suşlarının ürettiği antimikrobiyal maddelerin *Salmonella* olgun biyofilmlerine karşı uygulanmasının 6. saatinde bazı suşlar hariç (M23, *dam* mutantına karşı; M24 doğal suşa karşı ve M17 ve M24 *seqA* mutantına karşı) tutulmak üzere, aynı zamanda olgun biyofilmlerin eradikasyonunda da önemli bir giderim aktivitesine sahip olduğu (Şekil 4.4) dikkate alınırsa, söz konusu probiyotiklerin antibiyofilm ajanları olarak çok önemli bir potansiyele sahip oldukları açıkça anlaşılmaktadır. Olgun biyofilmlere karşı etkinliğin 6. saatten sonra önemli ölçüde düşmesi (Şekil 4.5) bir dezavantaj olarak görülebilir. Ancak muhtemelen biyofilm yapılarına karşı ilk aşamadaki difüzyon etkinliğinin daha sonra düşmesinden kaynaklanan bu durum, ilave ajanlarla kombine kullanım sonucu optimize edilebilir.

Özellikle LAB bakteriyosinlerinin, bazı istisnalar hariç, genellikle Gram negatif bakterilerin planktonik formlarına karşı etkinlik gösterememesi, bu bakterilere karşı ana antimikrobiyal etkinliğin yukarıda anılan diğer koruyucu bileşiklerden kaynaklanmasının ana nedenidir. Diğer yandan, hücre dışı matriks materyalinin bariyer etkisi nedeniyle *Salmonella*'nın da içinde bulunduğu Gram negatif bakterilere karşı LAB preparatlarının etkinliği daha da düşmektedir. Ancak bu etkinliğin farklı LAB suşlarının antimikrobiyal bileşik oluşturma kabiliyetlerindeki ciddi değişimlerden kaynaklanan çeşitliliği nedeni ile Gram negatif patojenlere karşı da kullanılabileceğine dair umut verici çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle LAB suşlarının kültür filtratlarının ya da ürettikleri antimikrobiyal bileşiklerin farklı endüstriyel dezenfektanlarla kombine edilmesi sonucu elde edilen antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri, ticari olarak kullanılabilecek seviyelere henüz ulaşmamış olsa da, bu konudaki çalışmaların ciddi bir ivme kazanmasına yol açmıştır (Afdora vd. 2010, Li ve Zhou 2016, Petrova vd. 2016, Cui vd. 2018, Roy vd. 2018, Pelyuntha vd. 2019, Kenar vd. 2020). Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular, LAB suşlarının coğrafik adaptasyonlarından kaynaklanan biyoçeşitliliklerinin, genetik ifade programlarını önemli ölçüde değiştirdiğini ve bu nedenle yeni doğal varyantların biyokorumada çok önemli ajanlar olabileceğine dikkat çekmesi açısından da önem taşımaktadır.

Söz konusu kombinasyon için lantibiyotik özellikte bir bakteriyosin olan nisin seçilmiştir. Nisinin GRAS özellikte bir gıda katkısı olarak tüm dünyada kabul görmesi bu seçimin temel nedenidir. Nisin, doğal bir antimikrobiyel bileşik olması ve toksik özellik içermemesi, sindirim enzimlerince kolay parçalanabilmesi gibi pek çok sebepten dolayı gıda sanayinde kullanılması en çok tercih edilen ve üzerinde en çok çalışma yapılan bakteriyosindir. Gıda ve Tarım Örgütü/Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) ve Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylıdır ve 50'yi aşkın ülkede gıda katkısı madde olarak kullanılmaktadır (De Vuyst ve Leroy 2007, Norhana vd. 2012, Khare vd. 2014, Khan vd. 2015). Nisinin üyesi olduğu lantibiyotik grubu bakteriyosinler (doğada protein yapısında nadir bulunan lantiyonin köprüleri içeren antibiyotikler) genel olarak Gram negatif bakterilere karşı zayıf bir etkinlik göstermektedirler. Bunun nedeni Gram negatif bakterilerde, nisinin ana membran hedefi olan lipid II'ye erişmesini engelleyen dış membranın varlığıdır (Hancock 1997, Nikaido 2003). Örneğin polimiksin antibiyotiği kullanılarak Gram negatif bakterilerde lipopolisakkarit yapısının lipid A bileşeni bağlanırsa, nisinin etkinliğinin önemli ölçüde artırılabilirdiği saptanmıştır (Field vd. 2016). Bu yönde tür düzeyinde yürütülen çalışmalarda, polimiksin ve nisinin kombinasyon halinde kullanımının, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı sinerjik bir antimikrobiyal etki oluşturduğu saptanmıştır (Giacometti vd. 1999, Naghmouchi vd. 2010, Naghmouchi vd. 2011). Nisinin planktonik formlara karşı tespit edilen bu düşük antimikrobiyal aktivitesi, söz konusu bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri ve olgun biyofilmleri giderme potansiyeli açısından değerlendirildiğinde daha da düşük bulunmuştur. Zira nisinin bu durumda dış membran haricinde daha güçlü bir bariyer olan hücre dışı matriksi geçme sorunu ortaya çıkmaktadır. Bu yapılar zayıflatılmadıkça, nisinin bu yapılara karşı etkinlik göstermesi mümkün değildir. Bu konuda yeterli çalışma bulunmamasına rağmen, literatürde bulunan sınırlı veriler, nisin ile farklı asit, antibiyotik ya da şelatlayıcı ajan (EDTA gibi) muamelelerinin *Salmonella* biyofilmlerinin eradikasyonunda düşük düzeyde de olsa etkinlik gösterebileceğine işaret etmektedir (Hsu vd. 2002, Devlieghere vd. 2004, Akçelik vd. 2006, Afdora vd. 2010, Almasoud vd. 2016, Pelyuntha vd. 2019, Çelik vd. 2020).

Çalışmamızda, düşük de olsa beklenen antibiyofilm aktivitesinin aksine, nisin+probiyotik suş kültür filtratları *Salmonella* olgun biyofilmlerine karşı eradikasyon değil indüksiyon etkinliği göstermiştir (Şekil 4.6-4.9). Bu durum muhtemelen, çalışmada kullanılan probiyotik suşların ürettiği bakteriyosinler ile nisin birbirlere karşı antagonistik etki göstermelerinden kaynaklanmaktadır. O nedenle kültür filtratları ile sinerjetik etki gösteren başka kimyasal GRAS düzeyli ajanların kullanımı ile belirli bir düzeyde eradikasyon etkinliğinin elde edilebilmesi mümkündür. Bu ajan ya da ajanlar, yaptığımız çalışmada kullanılan probiyotik suşların kültür filtratlarından hazırlanan preparatlar ile olgun biyofilm formlarına karşı muamele edilerek denenebilir. Ancak bu preparatların hazırlanması bir yüksek lisans tezi kapsamında mümkün olmayacağı için, bu ve benzeri çalışmalar ileri aşamalar için planlanmıştır.

Diğer yandan nisin ve probiyotik kültür filtratlarının, bu çalışmaya *S. Typhimurium* doğal suşu yanında, grubumuz tarafından *S. Typhimurium* biyofilmlerinin regülasyon sistemlerinin araştırılması amacı ile geliştirilmiş *dam* (deoksi adenin metilaz enzim geni mutan) ve *seqA* (replikasyon orijini tecrit proteini) mutantlarının (Uğur vd. 2018) dahil edilme amacı, probiyotik suş kültür filtratlarından elde edilen antibiyofilm etkinliğinin yeterli olmaması halinde söz konusu genlerin kodladığı proteinlere ait inhibitörlerin, probiyotik suş kültür filtratları ile kombine kullanımı olarak planlanmıştır. Ancak elde edilen antibiyofilm etkisinin beklenenden yüksek olması ve mutatlarda söz konusu etkinliğin düşük oranda da olsa, muhtemelen mutasyonun polar etkilerinin bir sonucu olarak farklılık göstermesi, bu öngörünün üzerine gitmemizi engellemiştir.

Bu aşamadan sonra, gerek biyofilm oluşumunda ve gerekse eradikasyonda probiyotik suş kültür filtratlarındaki özellikle bakteriyosinlerin etkinliğini tanımlamak amacı ile öncelikle probiyotik suş kültür filtratları nötralize edilerek kullanılmıştır. LAB bakteriyosinlerinin özellikle nötral pH değerlerinde etkinliklerinin düştüğü bilinmektedir (Karpanen vd 2008, Levkovich vd. 2013). Nötralize kültür filtratlarında biyofilm oluşumuna karşı etkinliğin zamana bağlı olarak ciddi bir düzeyde azalması (Şekil 4.10-4.12), probiyotik suş kültür filtratlarının bu antibiyofilm etkisinin büyük ölçüde söz konusu suşların ürettiği bakteriyosinlerden kaynaklandığına işaret etmiştir. Olgun biyofilm yapılarının eradikasyonu çalışmalarında da nötralize edilmiş probiyotik

suş kültür filtratlarının olgun biyofilmleri üzerindeki indüksiyon aktivitelerinin yükselmesi (Şekil 4.13) bu sonuçları destekler niteliktedir. Ancak pH'nın nötralizasyonunun LAB suşlarının ortamda oluşturduğu organik asitlerin etkisini de önemli ölçüde düşürdüğünün bilinmesi (Karpanen vd. 2008) nedeniyle, elde edilen bu sonucun esas olarak bakteriyosin etkinliğinin düşmesinden kaynaklanıp kaynaklanmadığının kesin tespiti için, nötralize edilmiş kültür filtratlarına, proteinaz K ile muamele edilerek denemeler sürdürülmüştür.

Nötralize edilmiş kültür filtratlarına proteinaz K uygulanmasının nedeni, proteinleri özgül olmayan bir şekilde parçalama yeteneğinden kaynaklanmaktadır. LAB bakteriyosinleri nadir olarak, lipid ya da karbonhidrat yan gruplarını içerse de, esas olarak protein yapısında olan antimikrobiyal bileşiklerdir. Dolayısı ile kültür filtratlarında etki edecekleri ve yapısını bozacakları temel bileşikler, söz konusu kültürlerde bulunan bakteriyosinlerdir (Khan vd. 2015, Roy vd. 2018, Kim vd. 2019). Bu uygulamadan sonra *Salmonella* suşlarına karşı denenen filtratların 24. saatin sonunda biyofilm inhibisyon yeteneğini tamamen kaybettiğinin saptanması (Şekil 4.14-4.16) söz konusu etkinin büyük oranda suşların ürettiği bakteriyosinlerden kaynaklandığına işaret etmektedir. Mutantlarda muhtemelen mutasyonların polar etkilerinden kaynaklanan küçük farklılıklar olmasına rağmen, tüm *Salmonella* suşlarında bu uygulamanın ikinci ve üçüncü günlerinde proteinaz K ilave edilen nötralize kültür filtratlarında biyofilm inhibisyonu aktivitelerinin geri kazanımı söz konusu olmuştur (Şekil 4.17-4.22). Bu farklılık muhtemelen proteinaz K etkisinden kaynaklanmaktadır. Bakteriyosinlerin parçalanmasına paralel olarak ilk 24 saatte ortadan kalkan antibiyofilm aktivitesi, proteinaz K' nın biyofilm yapılarına geç nüfüs etmesi (48. ve 72. saatte) nedeniyle bu zaman diliminde proteinaz K' nın bu kez biyofilm yapılarında yer alan proteinleri parçalamasından dolayı geri kazanılmıştır. Tüm bu sonuçlar çalışmada kullanılan probiyotik suşların antibiyofilm aktivitelerinin esasen ürettikleri bakteriyosinlerden kaynaklandığını kanıtlamaktadır. Bu bulguların işaret ettiği bir diğer nokta ise zayıflatılmış biyofilm yapılarına karşı proteinaz K enziminin de güçlü bir antibiyofilm ajanı olabileceğidir.

Tez çalışmasının son aşamasında proteinaz K ile muamele edilmiş kültür filtratlarının *Salmonella* suşlarının olgun biyofilmlere karşı etkinliği incelenmiştir. 24 saat süresi sonunda elde edilen veriler; proteinaz K muamelesinin, kültür filtratlarının biyofilm eradikasyon özelliğini ortadan kaldırdığını ve hatta olgun biyofilm yapılarında biyofilm oluşumunu indüklediğini göstermiştir (Şekil 4.23-4.25). Bu veriler de çalışmada kullanılan probiyotik suşların antibiyofilm aktivitelerinin esasen, söz konusu LAB suşların ürettiği bakteriyosinlerden kaynaklandığını kanıtlayan diğer bulgulardır.

Bu çalışma, bugüne dek belirlenemeyen düzeylerde antibiyofilm aktivitesi gösteren LAB suşlarının tanımlanması ve ayrıca bu suşların GRAS düzeyli preparatları ile biyofilm yapılarının kontrolü ve eradikasyonunda güvenle kullanılabileceklerinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle daha fazla bakteriyosin üreticisi doğal suş varyantının tanımlanması ve bunlardan endüstriyel düzeyde kullanılabilecek antibiyofilm preparatlarının hazırlanması çalışmaları önem kazanmaktadır. Tüm bu veriler ışığında, çalışmamızın bilimsel ve yaygın etki potansiyeli yüksek veriler içerdiği değerlendirilmesini yapmak olasıdır.

## KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fuentes, M. Á. F., Pérez-Pulido, R., & Gálvez, A. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food microbiology*, 32(2), 308-316.
- Afdora, P. T., Ardiyati, T., Sjöfjan, O., & Kalsum, U. (2010). Potential antibacterials compounds of lactic acid bacteria (LAB) from quail intestine (*Coturnix japonica*) in inhibition growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Tropical Life Science*, 1(1), 28-31.
- Akçelik, O., Tükel, Ç., Özcengiz, G., & Akçelik, M. (2006). Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates. *Molecular nutrition & food research*, 50(3), 306-313.
- Almasoud A, Hettiarachchy N, Rayaprolu S, Babu D, Kwon YM, Mauromoustakos A. 2016. Inhibitory effects of lactic and malic organic acids on autoinducer type 2 (AI-2) quorum sensing of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium*. *LWT\_Food Science and Technology*. 66:560-564.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Ammar, Y., Swailes, D., Bridgens, B., Chen, J. 2015. Influence of surface roughness on the initial formation of biofilm. *Surface and Coatings Technology* ., 284:410-416.
- Anriany, Y., Sahu, S. N., Wessels, K. R., McCann, L. M., & Joseph, S. W. (2006). Alteration of the rugose phenotype in *waaG* and *ddhC* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 is associated with inverse production of curli and cellulose. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5002-5012.
- Argenta, A., Satish, L., Gallo, P., Liu, F. & Kathju, S. Local application of probiotic bacteria prophylaxes against sepsis and death resulting from burn wound infection. *PLoS ONE* 11, e0165294 (2016).
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat science*, 74(1), 219-229.
- Arnold, J. and Bailey, G. 2000. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poultry Sci*, 79(12):1839-1845.
- Axelson, J. A. (1993). *Counseling and development in a multicultural society*. Thomson Brooks/Cole Publishing Co.
- Beloin, C., & Ghigo, J. M. (2005). Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 16-19.

- Bendinger, B., Rijnaarts, H. H., Altendorf, K., & Zehnder, A. J. (1993). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*, 59(11), 3973-3977.
- Bothwell, M. R., Smith, A. L., & Phillips, T. (2003). Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 129(5), 599-601.
- Boumerdassi, H., Monnet, C., Desmazeaud, M., & Corrieu, G. (1997). Effect of citrate on production of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 483 cultivated in the presence of oxygen. *Journal of dairy science*, 80(4), 634-639.
- Camargo, A. C., Todorov, S. D., Chihib, N. E., Drider, D., & Nero, L. A. (2018). Lactic acid bacteria (LAB) and their bacteriocins as alternative biotechnological tools to control *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. *Molecular biotechnology*, 60(9), 712-726.
- Campbell, T.C., Nair, N.U. 2020. Engineered lactobacilli display anti-biofilm and growth suppressing activities against *Pseudomonas aeruginosa*, *Biofilm And Microbiomes*, 6:48-54.
- Carli, K. T., Unal, C. B., Caner, V., & Eyigor, A. (2001). Detection of *Salmonella* in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(5), 1871-1876.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of applied bacteriology*, 75(6), 499-511.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International journal of food microbiology*, 145(1), 1-8.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28(4), 281-370.
- Costa, G. N., Suguimoto, H. H., da Silva Miglioranza, L. H., & Gómez, R. J. H. C. (2012). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains against pathogenic microorganisms “in vitro”. *Semina: Ciências Agrárias*, 33(5), 1839-1846.
- Costerton, J. W. et al. 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137–2142
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*, 49(1), 711-745.
- Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 11(3-4), 217-221.

- Costerton, J.W., and Stewart, P.S. 2000. Biofilms and device-related infections. In Persistent bacterial infections. J.P. Nataro, M.J. Blaser, and S. Cunningham-Rundels, editors. American Society for Microbiology. Washington, DC, USA. 423–437.
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., & Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in microbiology*, 7, 1641.
- Cloak, O. M., Solow, B. T., Briggs, C. E., Chen, C. Y., & Fratamico, P. M. (2002). Quorum sensing and production of autoinducer-2 in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157: H7, and *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4666-4671.
- Cui, H., Bai, M., Rashed, M. M., & Lin, L. (2018). The antibacterial activity of clove oil/chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers against *Escherichia coli* O157: H7 biofilms on cucumber. *International journal of food microbiology*, 266, 69-78.
- Cui X, Shi Y, Gu S, Yan X, Chen H. 2018. Antibacterial and antibiofilm activity of lactic acid bacteria isolated from traditional artisanal milk cheese from northeast China against enteropathogenic bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10: 601-610.
- Çelik, Ç.E., Akçelik, M., Akçelik, N. 2020. Inhibition of early stages of *Salmonella* typhimurium biofilms by extracellular dna (edna) and genomic dna (gdna). *Journal of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences*, 3: 441-444.
- De Medici, D., Croci, L., Delibato, E., Di Pasquale, S., Filetici, E., & Toti, L. (2003). Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella* enterica serotype enteritidis in poultry. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3456-3461.
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 847-867.
- Davies, D.G. 1999. Regulation of matrix polymer in biofilm formation and dispersion. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1; 93-118.
- Devlieghere, F., Francois, K., Vereecken, K. M., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., & Debevere, J. (2004). Effect of chemicals on the microbial evolution in foods. *Journal of food protection*, 67(9), 1977-1990.
- De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. In *Bacteriocins of lactic acid bacteria* (pp. 1-11). Springer, Boston, MA.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 13(4), 194-199.

- Dinçer, A. R., Güneş, Y., Güneş, E., & Ölmez Hancı, T. (2016). Sabit Yataklı Bir Biyofilm Reaktöründe Endokrin Bozucu (Bisfenol A Ve Oktil Fenol Etoksilat) Bileşiklerin Toksik Etkilerinin Araştırılması.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881–890.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Doron S, Snyderman D.R (2015). "Risk and safety of probiotics". *Clin Infect Dis* (Review). 60 Suppl 2: S129–134.
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 155-166.
- Durchschein F, Petritsch W, Hammer HF (2016). "Diet therapy for inflammatory bowel diseases: The established and the new". *World J Gastroenterol* (Review). 22 (7): 2179–2194.
- Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, Collins JJ. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* 2007; 3: 91.
- Eberhardt, A., Szczypiorski, P., & Korytowski, G. (1986). Effect of transcutaneous electrostimulation on the cell composition of skin exudate. *Acta Physiologica Polonica*, 37(1), 41-46.
- Eng, R. H., Smith, S. M., Fan-Havard, P., & Ogbara, T. (1993). Effect of antibiotics on endotoxin release from Gram-negative bacteria. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 16(3), 185-189.
- Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH. 2015. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science* 8(3):284\_293
- Eran, Z., Akçelik, M., Özcengiz, G., & Akçelik, N. (2020). Regulation of biofilm formation by marT in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Biology Reports*, 1-10.
- Falagas, M. E., & Makris, G. C. (2009). Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *Journal of Hospital Infection*, 71(4), 301-306.
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., de Melo Franco, B. D. G., & Todorov, S. D. (2014). Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food microbiology*, 38, 228-239.
- Field, D., Seisling, N., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2016). Synergistic nisin-polymyxin combinations for the control of *Pseudomonas* biofilm formation. *Frontiers in microbiology*, 7, 1713.

- Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health*, 11(5), 4745-4767.
- Fitzgerald, J. R., Foster, T. J., & Cox, D. (2006). The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 445-457.
- Foley, S. L., Zhao, S., & Walker, R. D. (2007). Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(3), 253-276.
- Forde, A., & Fitzgerald, G. F. (2003). Molecular organization of exopolysaccharide (EPS) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658. *Plasmid*, 49(2), 130-142.
- Gaamouche, S., Arakrak, A., Bakkali, M., & Laglaoui, A. (2014). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and bacteriocins isolated from a traditional brine table olives against pathogenic bacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(11), 657-666.
- Galvez, A., Abriouel, H., Benomar, N., & Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current opinion in biotechnology*, 21(2), 142-148.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International journal of food microbiology*, 113(1), 1-15.
- Gart EV, Suchodolski JS, Welsh Jr TH, Alaniz RC, Randel RD, Lawhon SD. 2016. *Salmonella* Typhimurium and multidirectional communication in the gut. *Frontiers in Microbiology* 7:Article 1827.
- Gast, R. K., Guard-Bouldin, J., Guraya, R., & Holt, P. S. (2008). Effect of passage through laying hens on organ invasiveness and phenotypic heterogeneity of *Salmonella Enteritidis*. *Poult. Sci.*, 87, 54-57.
- Giacometti, A., Cirioni, O., Barchiesi, F., Fortuna, M., & Scalise, G. (1999). In-vitro activity of cationic peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(5), 641-645.
- Gomez, E., Cazanave, C., Cunningham, S. A., Greenwood-Quaintance, K. E., Steckelberg, J. M., Uhl, J. R., ... & Berbari, E. F. (2012). Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication. *Journal of clinical microbiology*, 50(11), 3501-3508.
- Halder, D., & Mandal, S. (2016). Antibacterial potentiality of commercially available probiotic lactobacilli and curd lactobacilli strains, alone and in combination, against human pathogenic bacteria. *Transl. Biomed*, 7, 1-7.
- Hall-Stoodley, L., Hu, F. Z., Gieseke, A., Nistico, L., Nguyen, D., Hayes, J., ... & Wackym, P. A. (2006). Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *Jama*, 296(2), 202-211.

- Hancock, R. E. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in microbiology*, 5(1), 37-42.
- Hargis, B. M., Caldwell, D. J., Brewer, R. L., Corrier, D. E., & DeLoach, J. R. (1995). Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. *Poultry science*, 74(9), 1548-1552.
- Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, Praet N, Bellinger DC, De Silva NR, Gargouri N, Speybroeck N, Cawthorne A, Mathers C, Stein C, Angulo FJ, Devleeschauwer B. 2011. World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. 2015. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLOS Medicine* 12(12):e1001923.
- Hernandez, D., Cardell, E., & Zarate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of applied microbiology*, 99(1), 77-84.
- Herrmann, M., Vaudaux, P. E., Pittet, D., Auckenthaler, R., Lew, P. D., Perdreau, F. S., ... & Waldvogel, F. A. (1988). Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *Journal of Infectious Diseases*, 158(4), 693-701.
- H. Kubota, S. Senda, N. Nomura, H. Tokuda, H. Uchiyama Biofilm formation by Lactic Acid Bacteria and resistance to environmental stress *J. Biosci. Bioeng.*, 106 (2008), pp. 381-386
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature reviews microbiology*, 8(1), 15-25.
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme and microbial technology*, 26(2-4), 87-107.
- 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.
- Hsu, C. Y., Cairns, L., Hobley, L., Abbott, J., O'Byrne, C., & Stanley-Wall, N. R. (2020). Genomic differences between *Listeria monocytogenes* EGDe isolates reveal crucial roles for SigB and wall rhamnosylation in biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 202(7).
- Hughes G, Webber MA (2017). Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *British Journal of Pharmacology* 174:2237-2246.
- İpek, D., & Zorba, N. N. D. (2018). Microbial load of white cheese process lines after CIP and COP: A case study in Turkey. *LWT*, 90, 505-512.

- Jamalifar, H. Rahimi, H., Samadi, M. 2011. Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi-drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Iran. J. Microbiol. 3, 21–25 (2011).
- Jati, A., Tatli, S., Morgan, J. A., Glickman, J. N., Demetri, G. D., Van den Abbele, A., & Silverman, S. G. (2012). Imaging features of bone metastases in patients with gastrointestinal stromal tumors. Diagnostic and Interventional Radiology, 18(4), 391.
- Joo HS, Otto M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chem Biol. 2012; 19(12):1503–13.
- Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. International journal of food microbiology, 64(3), 367-372.
- Karpanen, T. J., Worthington, T., Hendry, E. R., Conway, B. R., & Lambert, P. A. (2008). Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 62(5), 1031-1036.
- Kaur, S., Sharma, P., Kalia, N., Singh, J., & Kaur, S. (2018). Anti-biofilm Properties of the Fecal Probiotic *Lactobacilli* Against *Vibrio* spp. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8, 120.
- Kenar, B., Erik, M., Erdoğan, S. F., Korcan, S. E., Köse, Z., Durmaz, G. 2020. The determination of antimicrobial and antibiofilm activities of foodborne lactic acid bacteria against *Enterobacter cloacae* isolates. Turkish Vet. Anim. Sci. 44: 59-68.
- Khailova, L., Baird, C. H., Rush, A. A., McNamee, E. N. & Wischmeyer, P. E. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves outcome in experimental *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia: potential role of regulatory T cells (2013).
- Khan, A., Vu, K. D., Riedl, B., & Lacroix, M. (2015). Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against Gram-negative and Gram-positive bacteria. LWT-Food Science and Technology, 61(1), 124-129.
- Khare, R., Espy, M. J., Cebelin, E., Boehrud, D., Sloan, L. M., Cunningham, S. A., ... & Binnicker, M. J. (2014). Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. Journal of clinical microbiology, 52(10), 3667-3673.
- Kim NN, Kim WJ, Kang SS. 2019. Anti-biofilm effect of crude bacteriocin derived from *Lactobacillus brevis* DF01 on *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. Food Control 98:274\_280.
- Kim, S. G., Jun, J. W., Giri, S. S., Yun, S., Kim, H. J., Kim, S. W., ... & Park, S. C. (2019). Isolation and characterisation of pVa-21, a giant bacteriophage with anti-biofilm potential against *Vibrio alginolyticus*. Scientific reports, 9(1), 1-10.

- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), 39-85.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, Cottarel G, Collins JJ. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* 2008; 135: 679–90.
- Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N., & Mahadik, K. R. (2009). Biofilm: Importance and applications.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547\_1549 .
- Kumar, M., Sundaram, S., Gnansounou, E., Larroche, C., & Thakur, I. S. (2018). Carbon dioxide capture, storage and production of biofuel and biomaterials by bacteria: A review. *Bioresource technology*, 247, 1059-1068.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2011). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Crc Press.
- Lamont, R. J., El-Sabaeny, A., Park, Y., Cook, G. S., Costerton, J. W., & Demuth, D. R. (2002). Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. *Microbiology*, 148(6), 1627-1636.
- Lappin-Scott, H., Burton, S. & Stoodley, P. Revealing a world of biofilms — the pioneering research of Bill Costerton. *Nat Rev Microbiol* 12, 781–787 (2014).
- Lasaro, M. A., Salinger, N., Zhang, J., Wang, Y., Zhong, Z., Goulian, M., & Zhu, J. (2009). F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Applied and environmental microbiology*, 75(1), 246-251.
- Lee, D. J., Liu, X., & Weng, H. L. (2014). Sulfate and organic carbon removal by microbial fuel cell with sulfate-reducing bacteria and sulfide-oxidising bacteria anodic biofilm. *Bioresource technology*, 156, 14-19.
- Lee, H. J., Jeong, S. E., Kim, P. J., Madsen, E. L., & Jeon, C. O. (2015). High resolution depth distribution of Bacteria, Archaea, methanotrophs, and methanogens in the bulk and rhizosphere soils of a flooded rice paddy. *Frontiers in microbiology*, 6, 639.
- Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, F., Compere, C., & Combes, D. (2008). Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. *Biofouling*, 24(1), 11-22.
- Levkovich, T., Poutahidis, T., Smillie, C., Varian, B. J., Ibrahim, Y. M., Lakritz, J. R., ... & Erdman, S. E. (2013). Probiotic bacteria induce a ‘glow of health’. *PloS one*, 8(1), e53867.
- Lewus, C. B., & Montville, T. J. (1991). Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 13(2), 145-150.

- Li, H., Zhou, E., Zhang, D., Xu, D., Xia, J., Yang, C., ... & Yang, K. (2016). Microbiologically influenced corrosion of 2707 hyper-duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Scientific reports, 6, 20190.
- Li P, Gu Q, Zhou Q. 2016. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ206, a potential probiotic strain with antimicrobial activity against food-borne pathogenic microorganisms. Journal of Biotechnology 238:52\_55.
- Liu, S. N., Han, Y., & Zhou, Z. J. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. Food Research International, 44(3), 643-651.
- Lobos, O., Padilla, A., & Padilla, C. (2009). In vitro antimicrobial effect of bacteriocin PsVP-10 in combination with chlorhexidine and triclosan against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* strains. Archives of oral biology, 54(3), 230-234.
- Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B., & Riley, M. A. (2011). Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. The ISME journal, 5(1), 71-81.
- M. Fletcher, G.I. Loeb Influence of substratum characteristics in the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces.
- Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiology, 9(1), 34-39.
- Mai. GT, Seow WK, Pier GB. Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. Infect Immun. 1993;61(2):559–564.
- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R., & Manicardi, G. (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. International journal of food microbiology, 64 1-2, 193-8.
- Midelet, G., & Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. Journal of applied microbiology, 97(2), 262-270.
- Mohammedsaeed, W., Cruickshank, S., McBain, A. J. & O'Neill, C. A. *Lactobacillus rhamnosus* GG lysate increases re-epithelialization of keratinocyte scratch assays by promoting migration. Sci. Rep. (2015). 5:16147-16153.
- Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2007). Growth, survival, and death of microbes in foods. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition (pp. 3-22). American Society of Microbiology.
- Naghmouchi, K., Drider, D., Baah, J., & Teather, R. (2010). Nisin A and polymyxin B as synergistic inhibitors of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Probiotics and antimicrobial proteins, 2(2), 98-103.
- N.C. Gómez, J.M.P. Ramiro, B.X.V. Quecan, B.D.G. de Melo Franco Use of potential probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria*

- monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherivachia coli* O157: H7 biofilms formation. *Front. Microbiol.*, 7 (2016), p. 863-868.
- Nealson, K. H., & Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological reviews*, 43(4), 496.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 593-656.
- Norhana, M. W., Poole, S. E., Deeth, H. C., & Dykes, G. A. (2012). Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 C. *Food Microbiology*, 31(1), 43-50.
- Oh, H. S., Tan, C. H., Low, J. H., Rzechowicz, M., Siddiqui, M. F., Winters, H., ... & Rice, S. A. (2017). Quorum quenching bacteria can be used to inhibit the biofouling of reverse osmosis membranes. *Water research*, 112, 29-37.
- Oh JH, Park MK. 2017. Recent trends in *Salmonella* outbreaks and emerging technology for biocontrol of *Salmonella* using phages in foods: a review. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(12):2075\_2088.
- Omar, A., Wright, J. B., Schultz, G., Burrell, R., & Nadworny, P. (2017). Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*, 5(1), 9.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- Palomino, J. M., del Árbol, J. T., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M. M., Gálvez, A., & Pulido, R. P. (2015). Application of *Lactobacillus plantarum* Lb9 as starter culture in caper berry fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 788-794.
- Pelyuntha, W., Chaiyasut, C., Kantachote, D., Sirilun, S. 2019. Cell-free supernatants from cultures of lactic acid bacteria isolated from fermented grape as biocontrol against *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium virulence via autoinducer-2 and biofilm interference. *Peer J*. 7: 7555-7570.
- Peral, M. C., Huaman Martinez, M. A. & Valdez, J. C. Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. *Int. Wound J*. 6, 73–81 (2009).
- Petrova MI, Imholz NCE, Verhoeven TLA, Balzarini J, Van Damme EJM, Schols D, Vanderleyden J, Lebeer S. 2016. Lectin-like molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibit pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* biofilm formation. *PLOS ONE* 11(8):e0161337.
- Post, J. C., Stoodley, P., Hall–Stoodley, L., & Ehrlich, G. D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 12(3), 185-190.
- Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Lee, H. Y., Tang, J. Y. H., Noorlis, A., ... & Son, R. (2011). Biofilm formation by *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit. *International Food Research Journal*, 18(1).

- Rabsch, W., Tschäpe, H., & Bäuml, A. J. (2001). Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and infection*, 3(3), 237-247.
- Rodrigue, D. C., Tauxe, R. V., & Rowe, B. (1990). International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic?. *Epidemiology & Infection*, 105(1), 21-27.
- Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., & Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Molecular cell*, 10(4), 831-842.
- Rouhi, M., Sohrabvandi, S., & Mortazavian, A. M. (2013). Probiotic fermented sausage: viability of probiotic microorganisms and sensory characteristics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(4), 331-348.
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522-554.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*, 184(4), 1140-1154.
- Savard, P., Lamarche, B., Paradis, M. E., Thiboutot, H., Laurin, É., & Roy, D. (2011). Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International journal of food microbiology*, 149(1), 50-57.
- Schembri, M. A., Kjærgaard, K., & Klemm, P. (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular microbiology*, 48(1), 253-267.
- Scher, K., Romling, U., & Yaron, S. (2005). Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Applied and environmental microbiology*, 71(3), 1163-1168.
- Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E. H<sub>2</sub>S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science* 2011; 334: 986–90.
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407-413.
- Shinohara, N. K. S., Barros, V. B. D., Jimenez, S. M. C., Machado, E. D. C. L., Dutra, R. A. F., & Lima Filho, J. L. D. (2008). *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13, 1675-1683.
- Simoes, L. C., Simoes, M., & Vieira, M. J. (2010). Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98(3), 317-329.
- Simoes, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.

- Singhi SC, Kumar S (.2016). "Probiotics in critically ill children". F1000Res (Review). 5: 407-418.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. D. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindner, J. D. D., ... & Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: a review. Food Technology and Biotechnology, 48(4), 413-434.
- Spoering, A. L., & Gilmore, M. S. (2006). Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. Current opinion in microbiology, 9(2), 133-137.
- Stahlhut, S. G., Struve, C., Kroghelt, K. A., & Reisner, A. (2012). Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 65(2), 350-359.
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2012). *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Research International, 45(2), 502-531.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of microbiological methods, 40(2), 175-179.
- Sudalayandi, K., Kumar, A., Ihemere, U., Falco, V., Narayanan, N., Guerrea, E., & Sayre, R. (2012). Detection of quorum sensing molecules from *Vibrio harveyi* and use of synthetic furanone to control *V. harveyi* during shrimp larviculture. African Journal of Biotechnology, 11(79), 14498-14508.
- Su, J., Wu, Y., Ma, X., Zhang, G., Feng, H., & Zhang, Y. (2004). Soil microbial counts and identification of culturable bacteria in an extreme by arid zone. Folia microbiologica, 49(4), 423-429.
- Sutherland, G. R., Haselbach, J., & Aust, S. D. (1997). Biodegradation of crosslinked acrylic polymers by a white-rot fungus. Environmental Science and Pollution Research, 4(1), 16-20.
- Sutherland, I. W. (1999). Biofilm exopolysaccharides. In Microbial extracellular polymeric substances (pp. 73-92). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Suzuki, N., Yoneda, M., Haruna, K., Masuo, Y., Nishihara, T., Nakanishi, K., ... & Hirofuji, T. (2014). Effects of S-PRG eluate on oral biofilm and oral malodor. Archives of oral biology, 59(4), 407-413.
- Teuber, M. (1990). Production of chymosin (EC 3.4. 23.4) by microorganisms and its use for cheesemaking. Bulletin of the International Dairy Federation, (251), 3-15.
- Tezel, B. U. (2019). Preliminary Evaluation of Anti-Listerial Bacteriocin-like Peptide Produced by *Enterococcus lactis* PMD74 Isolated from Ezine Cheese. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 7(5), 802-808.
- Tilahun B, Tesfaye A, Muleta D, Bahiru A, Terefework Z, Wessel G. 2018. Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria using 16s rRNA genes from fermented Teff (*Eragrostis tef* (Zucc.)) dough. International Journal of Food Science 2018:Article 8510620.

- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J. M., Ivanova, I., & Dousset, X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International journal of food microbiology*, 48(3), 167-177.
- Uğur, S., Akçelik, M., Yüksel, F. N., Karatuğ, N.T., Akçelik, M. 2018. Effects of dam and seqA genes on biofilm and pellicle formation in *Salmonella*. *Patogens And Global Health*. 112: 368–377.
- Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Geis, A., Kok, J., & Venema, G. (1989). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(5), 1187-1191.
- Vestby, L. K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E., & Nesse, L. L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal-and feed factories. *BMC veterinary research*, 5(1), 20.
- Vuong C, Kocianova S, Voyich JM. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem*. 2004;279(52):54881–54886.
- Vuotto, C., Longo, F., & Donelli, G. (2014). Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *International journal of oral science*, 6(4), 189-194.
- Wan, Q. Q., Ye, Q. F., & Yuan, H. (2015). Multidrug-resistant Gram-negative bacteria in solid organ transplant recipients with bacteremias. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(3), 431-437.
- Wang, R., Khan, B. A., Cheung, G. Y., Bach, T. H. L., Jameson-Lee, M., Kong, K. F., ... & Otto, M. (2011). *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(1), 238-248.
- Webb, J. S., Givskov, M., & Kjelleberg, S. (2003). Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Current opinion in microbiology*, 6(6), 578-585.
- White-Ziegler, C. A., Um, S., Perez, N. M., Berns, A. L., Malhowski, A. J., & Young, S. (2008). Low temperature (23 °C) increases expression of biofilm-, cold-shock-and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, 154(1), 148-166.
- Winkelströter, L. K., & De Martinis, E. C. (2013). Effect of bacteriocins and conditions that mimic food and digestive tract on biofilm formation, in vitro invasion of eukaryotic cells and internalin gene expression by *Listeria monocytogenes*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 5(3), 153-164.
- Wong, J. L., Koppel, D. E., Cowan, A. E., & Wessel, G. M. (2007). Membrane hemifusion is a stable intermediate of exocytosis. *Developmental cell*, 12(4), 653-659.
- Wynne, AG, Gibson, GR ve Brostoff, J. (2006). ABD Patenti No. 7,125,708 . Washington, DC: ABD Patent ve Ticari Marka Ofisi.

- Zhu, J. K. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 124(3), 941-948.
- 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.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şeyma GÖKSEL

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 26.05.1990

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

Lise : Süleyman Demirel Anadolu Lisesi (2008)

Lisans : Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji (2013)

Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı  
(Ocak 2021)

### **Uluslararası Kongre Sunum**

**Göksel, Ş., Özdemir, C., Sürkaç. T., Nihad S., Akçelik M., Akçelik N.** 2020. The Effect of a Nisin Producer Strain *L. lactis* subsp. *lactis* LL27 on the Formation of *Listeria* and *Salmonella* Biofilm. 1-3 September 2020 - Structures II. International Agricultural, Biological & Life Science Conference,Edirne, Turkey. Oral presentation: P252.