

**T.C.**  
**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**SÜT İŞLETMELERİNDEN İZOLE EDİLEN**  
***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA *ICAA* VE**  
***ICAD* GENLERİ VE BİYOFİLM ÜRETİMİNİN TESPİTİ**

**Fadimana KAYA**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman**  
**Doç. Dr. Emrah TORLAK**

**Konya-2016**



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



SÜT İŞLETMELERİNDEN İZOLE EDİLEN  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA  
*ICAA* VE *ICAD* GENLERİ VE BİYOFİLM  
ÜRETİMİNİN TESPİTİ

Fadimana KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eylül-2016

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

## TEZ KABUL VE ONAYI

Fadimana KAYA tarafından hazırlanan ‘‘Süt işletmelerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında *icaA* ve *icaD* genleri ve biyofilm üretiminin tespiti’’ adlı tez çalışması 29/09/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliğı ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Prof. Dr. Esra MARTİN

.....

#### Danışman

Doç. Dr. Emrah TORLAK

.....

#### Üye

Yrd. Doç. Dr. Hasan Hüseyin KARA

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Ahmet COŐKUN  
FBE Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## **DECLARATION PAGE**

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Fadimana KAYA

Tarih: 29/09/2016

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# SÜT İŞLETMELERİNDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA *ICA*A VE *ICA*D GENLERİ VE BİYOFİLM ÜRETİMİNİN TESPİTİ

Fadimana KAYA

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emrah TORLAK

2016, 51+xiii Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Emrah TORLAK

Prof. Dr. Esra MARTİN

Yrd. Doç. Dr. Hasan Hüseyin KARA

*Staphylococcus aureus* önemli bir gıda kaynaklı patojendir ve çoğunlukla gıda zehirlenmelerinin birincil sebebidir. Zehirlenmeye neden olan gıdaların başında süt ve süt ürünleri gelmektedir. Bu çalışmada süt işletmelerinden alınan çevresel örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarında interselüler adhezyon genlerinin (*icaA* ve *icaD* genleri) varlığı ve biyofilm üretme kapasiteleri araştırılmıştır. Çevresel örneklerden izole edilen toplam 42 *S. aureus* suşunda *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak belirlenmiştir. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildiğinde, 42 *S. aureus* suşundan 35'i (%83,3) her iki gen için pozitif, 7 *S. aureus* suşu (%16,7) ise negatif olarak bulunmuştur. *S. aureus* suşlarının biyofilm üretme yeteneği konvansiyonel mikrotitrasyon plak yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve biyofilm üretme yeteneklerine göre güçlü, orta, zayıf ve biyofilm üretmeyen olarak sınıflandırılmıştır. *S. aureus* suşlarından 39'u güçlü, bir suş orta ve bir suş zayıf biyofilm üreticisi olarak sınıflandırılmıştır. Bir suşun ise biyofilm üretme yeteneğine sahip olmadığı belirlenmiştir. Biyofilm üretme yeteneğine sahip 41 *S. aureus* suşundan 35'i *icaA* ve *icaD* genini bulundurduken 6 suşun bu genleri bulundurmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, *S. aureus* suşlarının biyofilm üretme yeteneği ile *icaA* ve *icaD* genleri arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** biyofilm üretimi, çevresel örnekler, *icaA* ve *icaD* genleri, *Staphylococcus aureus*, süt işletmeleri

## ABSTRACT

### MS THESIS

# DETERMINATION OF *ICAA*, *ICAD* GENES AND BIOFILM PRODUCTION BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM MILK PROCESSING FACILITIES

Fadimana KAYA

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah TORLAK

2016, 51+xiii Pages

Jury

Advisor Assoc. Prof. Dr. Emrah TORLAK

Prof. Dr. Esra MARTİN

Asst. Prof. Dr. Hasan Hüseyin KARA

*Staphylococcus aureus* is an important foodborne pathogen and is mostly primary cause of food poisoning. It is found in milk and dairy products of the foods that cause poisoning. In this study, biofilm production capacity and the presence of intercellular adhesin genes (*icaA* and *icaD* genes) in *S. aureus* strains that isolated from environmental samples taken from milk processing facilities were investigated. The presence of *icaA* and *icaD* genes in a total of 42 *S. aureus* strains that isolated from environmental samples were determined by polymerase chain reaction (PCR). When the PCR products were evaluated by agarose gel electrophoresis, 35 (83,3%) out of 42 *S. aureus* strains were both positive for *icaA* and *icaD* genes, 7 (16,7%) of *S. aureus* strains were both negative for *icaA* and *icaD* genes. Biofilm production ability of *S. aureus* strains were evaluated by conventional microtiter plate method and according to their biofilm production ability, *S. aureus* strains were classified as strong, moderate, weak and no ability to produce. Of the 39 out of 42 *S. aureus* strains were classified as strong biofilm producers, one strain was classified as moderate biofilm producer and one strain was classified as weak biofilm producer. It was found that the one *S. aureus* strain has no ability to produce biofilm. While 35 out of 41 *S. aureus* that have biofilm production ability were both positive *icaA* and *icaD* genes, 6 of *S. aureus* strains were both negative. The results of current study showed that there was a significant relationship between *icaA*, *icaD* genes and biofilm production ability of *S. aureus* strains.

**Keywords:** biofilm production, environmental samples, *icaA* and *icaD* genes, milk processing facilities, *Staphylococcus aureus*

## ÖNSÖZ

Bu tezin bana kattıklarını yazmak eminim çok vaktimi alır ama bu konuda bana yardımcı olan insanları söylemeden geçmek istemiyorum. Bana ilk araştırmamı nasıl yapacağımı öğreten, her sorunumda yardımcı olmaya çalışan, çözüm üreten, motive eden, kendisinden gerçekten çok fazla şey öğrendiğim değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Emrah TORLAK'a,

Her mutluluğuma ve mutsuzluğuma ortak olan, her konuda yardımcı olmaya çalışan, birlikte çok güzel anılar paylaştığımız sevgili arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Burcu ESKİCİ'ye,

Gerek laboratuvar çalışmalarına olan yardımları ile gerekse moral verici ve motive edici konuşmalarıyla her zaman akademisyenliğe teşvik eden değerli hocam Sayın Arş. Grv. Fatih ERCİ'ye,

Hayatımın her anında yanımda olan, her zaman maddi ve manevi desteklerini hissettiğim en büyük motivasyon kaynağım çok sevgili anneme, babama ve canım ablama ve bana her zaman destek olan diğer aile üyelerine ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ediyorum.

Sevgi ve Saygılarımla...

Fadimana KAYA  
KONYA-2016

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>ÖNSÖZ .....</b>	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
2.1.1. Hücre yapısı .....	5
2.1.2. Gelişme özellikleri.....	5
2.1.3. Virulans faktörleri.....	6
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ve Süt Endüstrisi .....	6
2.3. Bakteriye Biyofilmler .....	7
2.3.1. Biyofilmin yapısı .....	9
2.3.2. Biyofilm oluşum aşamaları.....	11
2.3.2.1. Yüzey koşulları .....	12
2.3.2.2. Bakterilerin yüzeye tutunması ve biyofilm oluşumu .....	12
2.3.2.3. Koloni oluşumu.....	13
2.3.2.4. Olgun biyofilm oluşumu .....	14
2.3.2.5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması .....	14
2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> Biyofilmleri.....	15
2.5. <i>ica</i> Bağımlı Biyofilm Mekanizmaları .....	16
2.6. <i>ica</i> Bağımsız Biyofilm Mekanizmaları.....	17
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
3.1. Besiyerleri.....	19
3.1.1. Maximum Recovery Diluent (MRD).....	19
3.1.2. Baird Parker Agar (BPA).....	19
3.1.3. Nutrient Agar .....	19
3.1.4. Nutrient Broth .....	20
3.1.5. Tryptone Soy Agar.....	20
3.1.6. Tryptone Soy Broth .....	21
3.2. Çözeltiler.....	21
3.2.1. Tris-EDTA buffer .....	21
3.2.2. Lizis buffer.....	21
3.2.3. PBS .....	22
3.2.4. Kristal viyole çözeltisi .....	22
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> Suşları.....	22
3.3.1. İzolasyon.....	22
3.3.2. Kültür şartları .....	23

3.4. DNA İzolasyonu .....	23
3.4.1. Su ile kaynatma yöntemi.....	23
3.4.2. TE buffer ile kaynatma yöntemi .....	23
3.4.3. Ticari izolasyon kiti .....	23
3.4.4. İzole edilen DNA'nın saflığının ve miktarının tespiti.....	24
3.5. <i>icaA</i> ve <i>icaD</i> Genlerinin Tespiti.....	25
3.5.1. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	26
3.5.1.1. Master mix hazırlanması.....	26
3.5.1.2. Amplifikasyon.....	26
3.5.1.3. Agaroz jel elektroforezi .....	27
3.6. Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Değerlendirilmesi.....	27
3.6.1. Mikrotitrasyon plak yöntemi .....	27
3.6.2. Biyofilm oluşturma yeteneğine göre sınıflandırma .....	28
3.7. İstatistiksel Değerlendirme .....	29
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>30</b>
4.1. DNA İzolasyonu .....	30
4.2. PCR Amplifikasyonu .....	32
4.3. Mikrotitrasyon Plak Yöntemi .....	34
4.4. Tartışma .....	36
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>40</b>
5.1. Sonuçlar .....	40
5.2. Öneriler .....	40
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>41</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>51</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

DNA	: deoksiribonükleik asit
dNTP	: deoksiribonükleotid trifosfat
EtBr	: etidyum bromid
HCl	: hidroklorik asit
KCl	: potasyum klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	: potasyum dihidrojen fosfat
MgCl <sub>2</sub>	: magnezyum klorür
NaCl	: sodyum klorür
NaOH	: sodyum hidroksit
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: disodyumhidrojen fosfat
°C	: derece santigrat

### Kısaltmalar

ATCC	: American Type Culture Collection
bp	: base pair
Bap	: Biofilm associated protein
BPA	: Baird Parker Agar
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EPS	: Ekstrasellüler polisakkarit
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokoklar
KPS	: Koagülaz Pozitif Stafilokoklar
OD	: Optical Density
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PIA	: Polisakkarit Interselüler Adhezin
PNAG	: Polimerik N-asetil-glukozamin
TE	: Tris-EDTA
TBE	: Tris-Borate-EDTA
Tm	: Temperature melting
TSA	: Tryptone Soy Agar
TSB	: Tryptone Soy Broth
UV	: ultraviyole
QS	: Quorum sensing

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un elektron mikroskop görüntüsü .....	4
Şekil 2.2. Biyofilm oluşum süreci .....	11
Şekil 2.3. Biyofilm oluşum basamakları.....	15

## ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>icaA</i> ve <i>icaD</i> genlerine ait primer dizileri .....	25
Çizelge 3.2. PCR karışımı.....	26
Çizelge 3.3. Uygulanan PCR döngüsü.....	27
Çizelge 4.1. Üç farklı DNA izolasyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar .....	30
Çizelge 4.2. <i>icaA</i> ve <i>icaD</i> genlerine ait PCR sonuçları.....	32
Çizelge 4.3. Mikrotitrasyon plak yönteminin sonuçları .....	34
Çizelge 4.4. Mikrotitrasyon plak yöntemi ile <i>S. aureus</i> suşlarının biyofilm üretme yeteneklerine göre sınıflandırılması.....	35

## RESİM DİZİNİ

Resim 4.1. Üç farklı yöntemle elde edilen DNA örneklerinin jel görüntüleri.....	31
Resim 4.2. Ticari kit kullanılarak elde edilen genomik DNA jel elektroforezi.....	32
Resim 4.3. <i>S. aureus</i> suşlarına ait <i>icaD</i> bant profilleri .....	33
Resim 4.4. <i>S. aureus</i> suşlarına ait <i>icaA</i> bant profilleri .....	34

## GRAFİK DİZİNİ

Grafik 4.1. *S. aureus* suşlarında (n=42) *icaA* ve *icaD* genlerinin prevalansı..... 33

Grafik 4.2. Mikrotitrasyon plak yöntemi sonucunda elde edilen sonuçlara göre 42 *S. aureus* suşunun biyofilm üretme yetenekleri yüzdeleri..... 35

## 1. GİRİŞ

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye tutunarak kendi ürettikleri polisakkarid bir matriks içine gömülü halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur. Değişik mikrobiyal türlerin, kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları mikroekosistem olarak da tanımlanabilir. Su ile temas eden tüm yüzeylerde, örneğin; endüstriyel veya evsel su sistemlerinde, su ileten borularda, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde, soğutma kulelerinde ve dış ünitelerinde biyofilm tabakasına rastlanabilir. Cansız yüzeylerin yanı sıra biyofilm canlı organizmada da çeşitli koşullar altında, çeşitli dokularda oluşabilmektedir. Biyofilm sayesinde mikroorganizmalar besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı planktonik (serbest haldeki) hücrelerden daha dirençli hale gelirler. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekzopolisakkaritler (EPS) savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. EPS bakteri hücrelerini inflamatuvar hücrelerin fagositozundan ve antibiyotik etkisinden korur. Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden biri olmadığında biyofilm oluşmaz. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta arasında zaman alır. Bakteriler biyofilm oluşumunu hücreden hücreye yollanan iletişim sinyalleri aracılığıyla kontrol etmektedir. Bu sinyal sistemi “quorum sensing” (QS) olarak adlandırılmaktadır. Bir bakteri patogenezi için çevreye uyum sağlar ve çevreden gelen uyarıları algılayarak yanıt geliştirir. Çevredeki bir koşul değişikliğinde metabolizmasında değişiklikler yaparak adapte olmaya çalışır. Herhangi bir şekilde antimikrobiyal ajanlara dirençli olmayan bir mikroorganizma biyofilm içinde dirençli hale, biyofilmden ayrıldığında ise tekrar duyarlı hale dönüşebilmektedir (Poulsen, 1999; Arnold ve Silvers, 2000; Chae ve Schraft, 2000; O’Toole ve ark., 2000; Donlan ve Costerton, 2002; Borucki ve ark., 2003; Fujishige ve ark., 2006; Leone ve ark., 2006).

Mikroorganizmaların bir kısmı milyonlarca yıldır fenotipik olarak biyofilm oluşturarak birçok zararlı dış etmenden korunmaktadır. Ancak bizler böyle bir yapının varlığını ve patojenite için önemini ancak birkaç on yıldır kavramış durumdayız. Günümüzde moleküler biyolojideki gelişmeler sayesinde yapılan proteom ve genom çalışmaları biyofilm oluşum mekanizmalarını ve biyofilmlerin bakteriyel patojenite açısından önemini daha iyi anlamamızı sağlamaktadır.

*Staphylococcus aureus* gıda zehirlenmelerinde en önemli etkenlerden biridir. Zehirlenmeye neden olan gıdaların başında süt ve süt ürünleri gelmektedir (Genigeorgis, 1986). *S. aureus* başta ısıl işlem olmak üzere mikroorganizma sayısının azaltılmasına yönelik tüm uygulamalara karşı yüksek duyarlılık göstermekte, ancak insanlarda zehirlenmeye neden olan ve ısıl işleme dayanıklı enterotoksinler üretebilmektedir (Tükel ve Doğan, 2000).

Gıda endüstrisinde bakteriyel biyofilm kaynaklı kontaminasyonlar gıda güvenliği açısından büyük risk oluşturmaktadır. Bu çalışmada süt işletmelerinden alınan çevresel örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının biyofilm üretme yeteneği ve bu suşlarda biyofilm üretimiyle ilişkili olduğu düşünülen *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçların bakteriyel biyofilmlere yönelik yapılacak çalışmalara bilgi sağlaması ve başta süt sektörü olmak üzere gıda endüstrisinde *S. aureus* biyofilmlerine karşı kontrol stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlaması amaçlanmıştır.

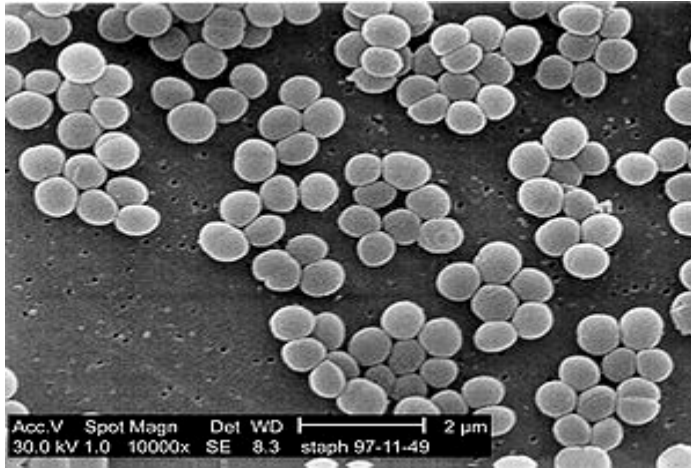
## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Stafilokoklar ilk kez Robert Koch tarafından 1878 yılında ışık mikroskobu ile tanımlanmıştır. Pasteur tarafından 1880’de sıvı besiyerinde üretilmiş ve Alexander Ogston tarafından 1881’de fare ve kobaylar için patojen olduğu gösterilmiştir. Rosenbach tarafından 1884 yılında ilk kez irinli yaralardan izole edilmiştir (Schleifer ve Bell, 1986).

Stafilokoklardaki biyofilm oluşumunun genetik ve moleküler temeli çok yönlüdür. Biyofilm oluşturma yeteneği en az iki özellik gerektirir: hücrelerin bir yüzeye tutunması ve çok katmanlı hücre kümelerini meydana getirmesi. İlgili biyosentez genlerindeki (*ica* operonu) mutasyonlar pleiotropik bir fenotipe yol açar; hücreler biyofilm ve hemaglutinasyon negatiftir ve hidrofilik yüzeylerde daha az tutunma ve virulent olma özelliği gösterir. *ica* ekspresyonu çeşitli çevresel koşullar ile modülasyona uğrayabilir. Örneğin, insersiyon dizi (IS) elemanları tarafından açılıp kapatılabilir (Götz, 2002).

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

*Micrococcaceae* familyasından olan *Staphylococcus* türleri Gram pozitif, fakültatif anaerob, spor oluşturmayan, hareketsiz ve katalaz pozitif bakterilerdir. *Staphylococcus aureus*, *Micrococcaceae* familyasında *Bacilli* sınıfında *Bacillales* takımında ve *Staphylococcaceae* ailesinde yer alır (Nakazawa ve Hosono, 1992; Dworkin ve ark., 2007; De Vos ve ark., 2009). Bu mikroorganizmalar üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayıp, üzüm salkımı şeklini aldıklarından “*Staphylococcus*” adını almışlardır (Staphyle; üzüm salkımı) (Şekil 2.1) (Schleifer ve Bell, 1986).



Şekil 2.1. *Staphylococcus aureus*' un elektron mikroskop görüntüsü (İnt. Kay. 1)

*S. aureus*'un koagüle edici özelliğini 1925 yılında Von Daranyi tespit etmiş ve koagülaz testinin *S. aureus*'un tanımlanmasında önemli olduğunu göstermiştir. Stafilokoklar, bir patojenite faktörü olarak kabul edilen koagülaz enzimi sentezleme yeteneklerine göre koagülaz pozitif stafilokoklar (KPS) ve koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede kullanılan en yaygın yöntemlerden biri olan koagülaz testi bir identifikasyon ölçütü olarak kullanılmaktadır. Plazmayı pıhtılaştırma yeteneği gösteren *S. aureus* koagülaz pozitifdir. Stafilokoklardan sadece *S. aureus* mannitolü parçalayabildiği halde koagülaz negatif olanlar parçalayamazlar. Mannitole etki testi, koagülaz testinden sonra *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en faydalı testtir. Diğer karbohidratlardan trehaloz, mannoz, maltoz, süktroz ve laktozu parçalayabilirler, ancak ksiloz, sellobioz, arabinoz ve rafinozu parçalayamazlar. Nitratları nitritlere indirgeyebilirler. Oksidaz negatiftirler (Cengiz, 1999; Waldvogel, 2000).

*S. aureus* antibiyotiklerin henüz keşfedilmediği dönemlerde çok ağır seyreden, tedavisi güç, ölümcül enfeksiyonlara neden olan bir bakteri türü idi. Penisilin 1928 yılında Alexander Fleming tarafından bulunması ve üretimine Florey ve Chain tarafından 1940 yılında başlanması ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. *S. aureus* suşlarında penisilin direnci 1944 yılında Kirby tarafından tanımlanmıştır. Günümüzde *S. aureus*'un nozokomiyal patojenler arasında önemi giderek artmaktadır (Kutlu, 2006).

### 2.1.1. Hücre yapısı

*S. aureus* 0,5-1,5 µm çapında, yuvarlak, hareketsiz, Gram pozitif, sporsuz, fakültatifdir (Bannerman, 2003). Her ne kadar hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz olarak bilinseler de, bazı *S. aureus* suşları organizmadan ilk izole edildiklerinde kapsüllü olabilmektedir (Alen ve ark., 2006; Murray ve ark., 2012). Polisakkarit yapıda olan kapsül, bakterileri fagositozdan korumanın yanı sıra dokulara ve sentetik yüzeylere bakterinin tutunma özelliğini arttırmaktadır (Bilgehan, 2000).

Bakterilerde bulunan çoklu tabakadan oluşan hücre duvarı bakteri hücrelerinin bütünlüğünü korumaktadır. Hücre duvarı; yüzey proteinleri, reseptörler ve peptidoglikan tabakadan oluşur. Hücre duvarında yer alan peptidoglikan (mukopeptid, murein) tabakası; gözyaşı, tükürük, insan monosit ve makrofajlarında bulunan lizozime (muramidaz) karşı da doğal direnç sağlar. Sadece Gram pozitif bakterilerde bulunan teikoik asit stafilokokların hücre duvarında da yer alır ve mukozalarda bulunan özgül reseptörler ile birleşerek stafilokokların konağa tutunmasına yardımcı olur. Teikoik asit, fosfodiester bağları ile bağlı şeker, fosfat ve alkol içeren uzun zincirlerdir. N-asetil glukozamin'e ribitol fosfat polimerleri ile bağlanır (Bilgehan, 2000; Tünger, 2004).

### 2.1.2. Gelişme özellikleri

Laboratuvarlarda rutin amaçla kullanılan besiyerlerinde kolay bir şekilde çoğalabilen *S. aureus* 37 °C'ta 24-48 saat içinde 2-4 mm çapında düzgün koloniler oluştururlar. Laboratuvarda 10-42 °C'ta üreyebilselerde optimum üreme sıcaklığı 37 °C'tır. Sporsuz olmalarına rağmen dış etkilere ve dezenfektanlara karşı oldukça dayanıklıdırlar. Kültürleri 4 °C'ta 2-3 ay, -20 °C'ta 3-6 ay canlılıklarını koruyabilirler. Stafilokoklar 60 °C sıcaklığa 30 dakika dayanabilirler. Fenolde (%2) 15 dakika içinde inaktive olurken, %9'luk NaCl ve sakaroza tolerans gösterebilmektedirler (Akan, 2006).

Stafilokoklar yapılarında içerdikleri karotenoidlerden dolayı pigment meydana getirirler. *S. aureus* Nutrient Agar (NA) üzerinde 37 °C'ta 1 gün inkübasyondan sonra altın sarısı renkte, parlak koloniler oluşturur. Glikolitik karbon kaynaklarını düşük seviyede içeren ortamda, pigmentasyonu etkileyen spesifik mutasyonlar barındıran bazı suşlar daha az pigment içeren koloniler oluşturur. *S. aureus* suşlarının anaerobik koşullarda pigment oluşturma yetenekleri ortadan kalkar. Stafilokoklar basit besiyerleri dahil birçok besiyerinde ürerler. *S. aureus* gelişimi için çeşitli besiyerleri

tanımlanmıştır: Brain Heart Infusion (BHI) Agar, Tryptic Soy Agar (TSA), Todd Hewitt Agar (THA), Luria-Bertani (LB) Agar, Mueller-Hinton Agar (MHA) ve Kanlı Agar. Kanlı Agar ilave olarak hemoliz yeteneğinin gözlemlenmesine imkan sağlar. *S. aureus* kanlı agarda beta hemoliz yapmaktadır (Vitko ve Richardson, 2013).

### 2.1.3. Virulans faktörleri

*S. aureus*, enzimleri ve toksinleri ile çok çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Bu enzimler ve toksinler, bakterinin dokulara yayılmasına yardımcı olur. Deri yüzeyinde enfeksiyonlar yaptığı gibi, derin dokulara da ilerleyerek bakteriyemi ve solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilirler. *S. aureus*'un virulansında önemli rol oynayan birçok enzim vardır. Stafilokoklar lipaz, hiyalüronidaz, fibrinolizin (stafilokinaz), penisilinaz ( $\beta$ -laktamaz), lesitinaz, katalaz, koagülaz ve DNaz gibi birçok enzim üretirler. Bu enzimler özellikle stafilokokların komşu dokulara yayılımını kolaylaştırarak enfeksiyon patogeneğinde rol alırlar (Bilgehan, 2000; Tünger, 2004).

## 2.2. *Staphylococcus aureus* ve Süt Endüstrisi

*S. aureus* toksin üreten patojen bir mikroorganizmadır ve gıdalarda oluşturduğu toksinlere bağlı olarak intoksikasyon tarzında gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır (Longree, 1972). Çiğ süttten yapılan süt ürünleri belirli koşullar altında büyük bir tehlike oluşturmaktadır. *S. aureus*'un çoğalmasını ve enterotoksin üretimini; aktivitesi, başlangıçtaki kontaminasyon düzeyi, starter kültür kullanımı, üretim aşamasındaki pH derecesi, ilave edilen tuzların konsantrasyonu, olgunlaşma ve depolama sıcaklığı ile antagonistik etki gösteren bakteri florası etkilemektedir. Gıdalarda *S. aureus* varlığının diğer bir önemi ise indikatör organizma olmasıdır. Gıdalarda *S. aureus* varlığı genellikle gıda üretiminde çalışan personelin deri, ağız ve solunum yollarından kaynaklanan kontaminasyonun göstergesi olarak da dikkate alınmaktadır. Ayrıca gıdaların üretiminden tüketimine kadar geçen zamanda çeşitli kaynaklardan gıdalara bulaşan *S. aureus* uygun şartlarda hızlı bir şekilde çoğalarak halk sağlığı ve ürün kalitesi açısından önemli bir risk faktörü oluşturabilmektedir (Kınık ve ark., 1998; Tunail, 2000).

Süt, mikroorganizmaların gelişmesi için oldukça uygun bir ortama sahip olduğundan çok hızlı bozulabilen bir gıdadır. Kontamine olmuş süt ve süt ürünlerinin

genellikle uygun bir şekilde dezenfekte edilmemiş ekipmanlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Jessen ve Lammert, 2003).

Gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarında mikroorganizmalardan kaynaklanan risk ve ekonomik kayıplar önleyebilmek için başlıca bulaşma kaynakları ve bulaşma yollarının öncelikli olarak belirlenmesi gerekmektedir (Dinçer, 1990; FDA and WHO, 1992).

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri başta *S. aureus* olmak üzere enterotoksijenik stafilokoklar tarafından gıdalarda oluşturulan enterotoksinlerin alınması sonucu şekillenen ve tüm dünyada yaygın olarak görülen en önemli intoksikasyonlardan biridir. Bu enterotoksinlerin ısıya dirençli olmaları ve pastörizasyon ile denatüre edilememeleri süt işletmelerinde *S. aureus* kontaminasyonunu önemli bir gıda güvenliği tehlikesi haline getirmektedir. Biyofilm tabakasının antimikrobiyal ajanlara karşı korunmada bakterilere sağladığı avantajlar nedeniyle biyofilm oluşturan türlerin dekontaminasyonu gıda endüstrisi açısından önemlidir. *S. aureus*'un biyofilm oluşturma yeteneği patojenin süt işletmelerinden eliminasyonunu oldukça zor bir hale getirmektedir. Yapılan çalışmalar gıdaların üretimi sırasında gıdalar ile doğrudan temas halinde olan alet, ekipman ve personelden kaynaklanan kontaminasyonun göz ardı edilemeyecek kadar önemli olduğunu göstermektedir (Gökalp ve Yetim, 1988; Borah ve ark., 1992).

Bu gıdaların tüketimi ile insanlara geçebilen hastalıklar göz önüne alındığında, üretimin her aşamasında hijyen kurallarına uyulması gıdaların satış yerleri ve buralarda çalışan personelin hijyenik kontrolü ve etkin bir dezenfeksiyon işlemiyle oluşabilecek olası bir kontaminasyonun önlenebileceği gerçeği ortaya çıkmaktadır (İnal, 1992; Zhao ve ark., 1998).

Süt endüstrisi açısından biyofilm oluşumunda süt proteini önemli rol oynamaktadır. Paslanmaz çelik yüzey üzerinde yapılan bir çalışmada  $\alpha$ -kazein,  $\beta$ -kazein, k-kazein ve  $\alpha$ -laktalbumin gibi süt protein fraksiyonlarının *S. aureus* ve *Listeria monocytogenes* tutunmasını azalttığı (Wong, 1998; Barnes ve ark., 1999), ancak ortama glutaraldehit eklendiğinde *S. aureus* ve *L. monocytogenes* tutunmasının arttığı belirlenmiştir (Barnes ve ark., 1999).

### 2.3. Bakteriye Biyofilmler

Biyofilmler, bir yüzeye tutunarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelimsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir

(Leone ve ark., 2006). Bakteri hücreleri tarafından üretilen bu jelimsi tabaka, “hücre dışı polimerik yapı”, “ekzopolimer” ya da “ekzopolisakkarit (EPS)” adı verilen polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır (Fujishige ve ark., 2006). Bir başka tanımlamaya göre biyofilm, birbirine ya da bir yüzeye tutunmuş bakterinin organik bir polimer matriks içine gömülmesidir (Poulsen, 1999).

Biyofilm yapısında bulunan maddeler ekstrasellüler matriks yapı ile birbirlerine tutunmaktadır. Su bakteriyel hücre kapsülleri içinde bulunabildiği gibi mikroorganizmalar tarafından monosakkaritler ile oluşturulan yüksek molekül ağırlıklı polimerler olan EPS’ye de bağlanmaktadır (Ölmez, 2009). EPS biyofilm oluşumunda rol alarak mikroorganizmaların koloni oluşturmaya ve yüzeye tutunmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca organizmayı ozmotik stres, bakteriyofajlar, toksik bileşikler ve antibiyotikler gibi zararlı etkenlere karşı da koruyabilmektedir (Mıdık ve ark., 2011). EPS formları hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüller veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen genellikle immunojenik yapılardır (Sutherland, 1998; Ramesh ve Tharanathan, 2003). *In vitro* çalışmalarda EPS varlığı katı besiyerlerinde mukoid koloni, sıvı besi ortamlarında ise oldukça viskoz bir görünüm ile tespit edilebilmektedir (Gugliandola ve ark., 2003). Biyofilm hücreleri antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelerden daha dirençli olup antimikrobiyal ajanlarla teması engelleyen ya da azaltan bariyerlere sahiptirler (O’Toole ve ark., 2000).

Biyofilm oluşumu, uygun koşullar oluştuğunda bozulma etmeni olanlar ile patojen özellik gösteren tüm mikroorganizmalar tarafından *in vivo* olarak canlı hücrelerde veya *in vitro* olarak cansız yüzeylerde meydana gelebilir. Nem miktarının fazlalığı ve besin maddelerinin ortamda bulunması biyofilm oluşumunu arttırmaktadır. Biyofilmlerin oluşumu bakteri suşu, yüzey özellikleri, pH, besin miktarı, sıcaklık gibi çeşitli çevresel faktörler etkili olmaktadır (Chae ve Schraft, 2000; Donlan ve Costerton, 2002; Borucki ve ark., 2003).

Bakterilerin yüzeylere bağlanma düzeyi, ortamın pH’sı ve sıcaklığı, bakteri türü, bakteri hücre duvar yapısı (Gram pozitif ya da Gram negatif oluşu), bakteri sayısı, tutunduğu yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin maddelerinin içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok faktör ile değişebilmektedir (Arnold ve Silvers, 2000; Lindsay ve Von Holy, 2002).

Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında bulundurabilir. Farklı türlerden oluşan biyofilmlerde her tür

kendi mikrokolonisini oluşturur, bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları vasıtasıyla ayrılırlar. Su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Bunlardan en yaygınları *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus*, *Bacillus* türleridir (Ölmez, 2009).

### 2.3.1. Biyofilmin yapısı

Biyofilmin kütesinin büyük bir kısmını (%95-97) su oluşturmaktadır. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; EPS (%1-2), globuler glikoproteinler ve diğer proteinler (%1-2), nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir (%1-2). Ancak bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (Allison, 2003).

Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstrasellüler matriks biyofilm hücrelerinin yüzeye tutunmasını sağlar. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokoloniler de büyüyüp gelişerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir. *Pseudomonas fluorescens* B52 suşunun planktonik haldeki ve biyofilm içindeki EPS üretiminin karşılaştırıldığı çalışmalarda, biyofilm içeriğinde polisakkaritlerin ramnoz, glukoz ve glukozamin dışında glukoronik ve guluronik asitlerin de temel bileşikler olduğu, cam malzemeye kıyasla paslanmaz çelik yüzeyde daha fazla miktarda biyofilm olduğu bildirilmiştir (Kives ve ark., 2006). EPS jel ya da viskoelastik davranış sergileyebilmekte ve biyofilm yapısı protein,  $Ca^{+2}$  iyonları ve polisakkaritler ile daha da sağlamlaşmaktadır (Hussain ve ark., 1993). Bununla birlikte, hidrolaz, liyaz, glikozidaz, esteraz ve diğer enzimler biyofilmin bileşimine ve fiziksel özelliklerine etki edebilir. Biyofilm yapısındaki bu enzimlerin birçoğu düşük molekül ağırlıklı parçalanma ürünlerinin oluşumuna neden olmakta, bunlar da biyofilmde tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir (Allison, 2003).

Biyofilmin yapısı, saf kültürler için türe, çoklu kültürler için substrata özgüdür. Heterojenik biyofilmlerde yapı çoğunlukla düzensizdir. Biyofilmin yapısı, etrafındaki akış oranına, farklı türlerin sayısına ve tipine bağlı olarak değişmektedir. Biyofilm kalınlığı laminer ve türbülant akış arasında maksimum seviyededir. Laminer alandaki

kalınlık substrata ulaşabilirliğine, türbülant akışta ise aşınmaya bağlı olarak değişmektedir (Poulsen, 1999).

Biyofilm geliştikçe polimer matriks içinde tutunmuş bulunan mikroorganizma sayısı artar. Biyofilm yapısının şekillenmesinde, difüzyon baskın faktör haline gelir. Gelişen biyofilmin iç tarafları oksijen ve besin bakımından nispeten fakirdir, bu yüzden biyofilmin yüzeyinde bulunan mikroorganizmalar oksijen ve besin hatta buna bağlı olarak üreme ortamı açısından da iç tarafta bulunan mikroorganizmalara göre daha avantajlı konumdadırlar. Biyofilm gelişmeye devam ettiği sürece iç tarafta bulunan bakteri hücrelerinin sayısı da artacak ve bu nedenle biyofilm yapısında başlangıçta aerobik mikroorganizmalar çoğunlukta iken, aerobik mikroorganizmaların sayılarının artması sonucunda ortamdaki oksijen miktarı hızlı bir şekilde düşecek ve oksijen noksanlığında oksijensiz (anoksik) bölge oluşumu gerçekleşecektir (Greenberg ve ark., 1999).

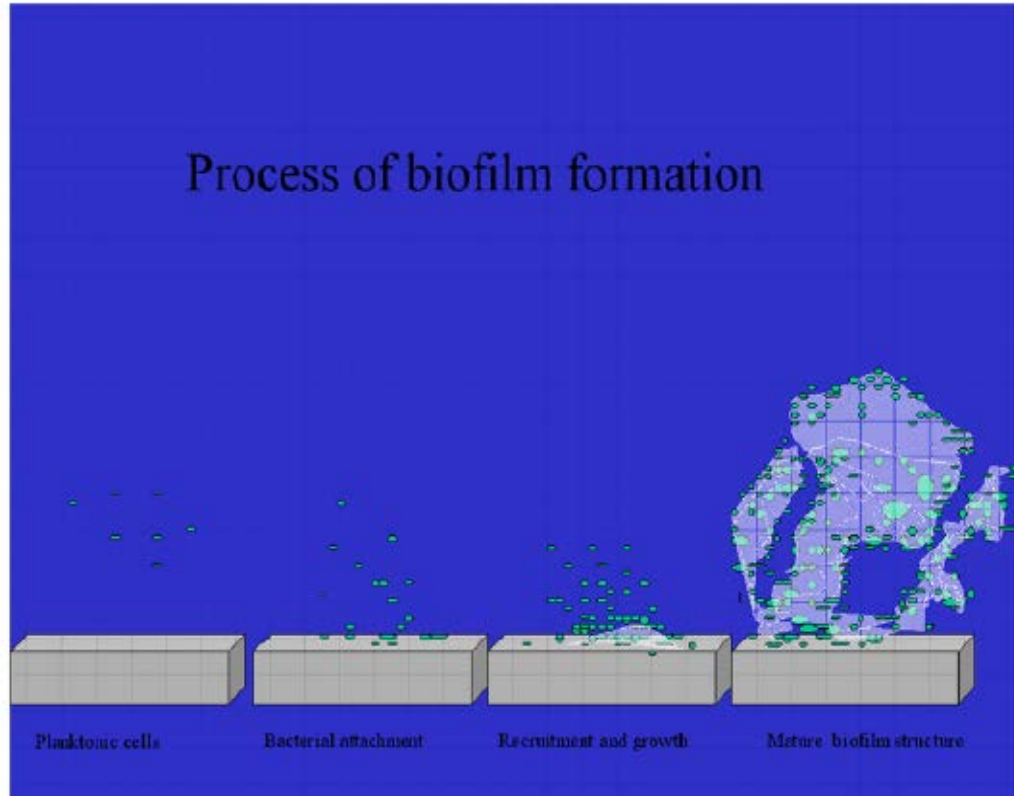
Biyofilmler yoğun yüzeyler olarak bilinmekle birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda, su ve besin maddesinin dağıtıldığı kılcal damar su kanallarının bulunduğu gözenekli bir yapısının olduğu belirlenmiştir. Biyofilmin yapısındaki su kanalları mikrokolonilerin hem altında hem de arasında bulunmaktadır. Besinlerin biyofilm tabanına taşınması bu özel kanallarla olmaktadır. Hücresel atık biyofilmin yüzeyinde kanallarla gizlenir. Taşıma işlemi, su yardımıyla ya da pasif difüzyonla kolaylaştırılır. Kolaylaştırılmış taşınma biyofilm içerisine molekül taşınmasına yardımcı olur. Ayrıca su kanallarının içteki alanlara oksijen taşıdığı da belirlenmiştir (Costerton ve ark., 1995).

Bakteriyel tutunmada, proteinler gibi organik moleküllerin yüzeye tutunmasının önemli bir rolü vardır. Yüzey proteinleri, biyofilm matriksi içinde düzenli bir şekilde oluşur (Lasa ve Penades, 2006). Bu proteinlerin bazıları EPS varlığında biyofilm oluşumunu teşvik edebilmektedir. Biyofilm ilişkili protein (Bap) yapısı, organizmanın yüzeye kolonize olması ve burada sürekli kalmasının sağlanması açısından da önemlidir (Tormo ve ark., 2005).

Biyofilmler inert veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları ve doğal akuatik sistemler yer alır. Biyofilm oluşumunda hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir (Donlan ve Costerton, 2002).

### 2.3.2. Biyofilm oluşum aşamaları

Biyofilm oluřumu bir substrat yzeyine bakterinin tutunması ve ardından hcre-hcre tutunması ile biyofilmin oklu tabakalarının oluřumunu gerektiren iki ařamalı bir srece olarak dűőnűlmektedir (Heilmann ve Gűtz, 1998). Yapılan birok çalıřmada, biyofilmlerin sabit noktalarda biyolojik dűnűőmlerini (bařlangıç, olgunlařma, muhafaza ve űzűnme) tamamladıkları gűsterilmiřtir (O'Toole ve ark., 2000). Bakterilerde biyofilm geliřiminin bařlaması besinlerin var olup olmaması gibi spesifik çevresel etmenlere baęlı olarak deęiřmektedir. Biyofilm geliřimi taze besiyeri saęlandıkça devam eder. Ancak ortamdaki besin maddeleri tűkenince yzey baęlantıları zayıflar ve planktonik hale geri dűnerler. Açlık durumu hcrelerin yeni taze besin kaynakları aramalarını, ortamlara daha iyi adapte olmalarını ve yayılmalarını saęlar (Kolter ve Tormo, 1993). Bu nedenle açlık durumunda kullanılan metabolik yolun bűtűn biyofilm geliřim dűngűsűnű kapsayabileceęi belirtilmiřtir (O'Toole ve ark., 2000).



**řekil 2.2.** Biyofilm oluřum sreci. Planktonik hcreler yzeye tutunur, biyofilm genleri aktifleřtirilir ve dięer hcreler QS ile toplanırlar. Hcreler mikrokoloniler oluřturarak yzeyde geliřirler. Mikrokoloniler kanalları (mavi) ile olgun biyofilm yapısı űreterek bűyűmeye devam ederler. Yeřil alanlar bakteri hcrelerini, beyaz ve açık mavi opak alanlar EPS'yi temsil etmektedir (Chmielewski and Frank, 2003).

### 2.3.2.1. Yüzey koşulları

Biyofilm, bakterinin tutunma yüzeyi, bakteri tutunmasını etkileyen organik ve inorganik maddelere bağlı olarak içinde bakterilerin olduğu herhangi bir sulu yüzeyde oluşabilir (Kumar ve Anand, 1998). Bakteriler farklı yüzeylere tutunabilirler. Bu nedenle biyofilm oluşturmaları ve gelişimleri de bu yüzey koşullarına göre değişebilmektedir (Mafu ve ark., 1990). Örneğin; *Legionella pneumophila* hücrelerinin kauçuk yüzeylere tutunma düzeyi  $2.2 \times 10^5$  kob/cm<sup>2</sup> civarında iken, etilen-propilen, polivinil klorür, polipropilen, yarı çelik, paslanmaz çelik ve cam yüzeylerde tutunma oranının daha az olduğu belirlenmiştir (Rogers ve ark., 1994).

Patojen veya bozulma etmeni olan birçok mikroorganizmanın paslanmaz çelik, alüminyum, cam, ahşap, teflon ve plastik materyaller üzerinde biyofilm oluşturdıkları belirlenmiştir (Trachoo, 2003; Lindsay ve Von Holy, 2006; Planchon ve ark., 2006). Naylon ve teflon yüzeyler düz olduğundan mikroorganizmalar tutunmuş gibi görünürler. Bununla birlikte, paslanmaz çelik yüzeyler çatlak ve yarılmalar nedeniyle pürüzlü bir yüzeye dönüşebilirler. Geniş çatlaklara sahip alüminyum yüzeylerde mekanik yöntemlerle uygulanan temizlik işlemlerinde bile bakterilerin yüzeye tutunduğu belirlenmiştir (Gün ve Ekinci, 2009).

### 2.3.2.2. Bakterilerin yüzeye tutunması ve biyofilm oluşumu

Mikroorganizmalar gelişim evrelerine göre planktonik ve yerleşik (sessile) olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Planktonik hücreler bireysel olarak serbest yaşarlar. Yerleşik hücreler ise bir yüzeye tutunur ve bir araya gelerek topluluk halinde fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Bakterilerin yüzeye tutunmaları zamana bağlı bir oluşumdur ve bu durum dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki basamakta incelenebilir (Kolter ve Tormo, 1993).

**Dönüşümlü tutunma:** Dönüşümlü basamakta, bakteri hücresi yüzey ile tam olarak temas etmemekte, ancak bakteri hücresi ile yüzey arasında uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Bunlar elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals güçleri olup zayıf etkileşimlerdir. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir, çünkü bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklüdür (Costerton ve ark., 1995; Poulsen, 1999). Yüzey özellikleri bakteriyel tutunmada önemli rol oynar. Bakteriler türüne göre farklı yüzeylere farklı miktarlarda bağlanabilirler. Örneğin;

*Salmonella* ve *Listeria*'nın hidrofobik yüzeylere hidrofilik yüzeylerden çok daha fazla miktarda tutunabildikleri gösterilmiştir (Sinde ve Carballo, 2000). Hücreler bu aşamada, durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca yüzeyden uzaklaştırılabilirler (Akan ve Kınık, 2014). Yüzeye ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin katkısı büyüktür (Costerton ve ark., 1995). Dönüşümlü tutunma durumu, tutunan ve durgun haldeki hücreler arasındaki dengeli dağılımın bir sonucu olabilir. Burada mikroorganizma yüzeyin yakınındadır, ama henüz yüzeye temas etmemiştir (Lindsay ve Von Holy, 2006).

**Dönüşümsüz tutunma:** Dönüşümsüz tutunmada ise yüzeye kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik bağlar, kovalent bağlar ve hidrojen bağları oluşmaktadır. Mikroorganizmalar dönüşümlü olarak bağlanırken, yüzeyde yaşamak için yeterli besin maddesi olup olmadığını araştırırlar. Bakteri hücreleri flagella, pili gibi özel yapıları sayesinde ve EPS oluşturarak yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanabilirler (Poulsen, 1999). Katyonlar, çeşitli makromoleküller ve koloidal materyaller boru hattında tutulduğunda, mikroorganizmalar öncelikle organik materyale dönüşümlü olarak, sonra da flagella ve fimbriaları ile dönüşümsüz olarak tutunurlar. Yüzeye tutunan bakteri hücreleri, membrana bağlı proteinlerden EPS üretir. Ancak EPS oluşturmayan bazı bakteri türlerinin de yüzeylere bağlanabildiği belirtilmektedir. Dönüşümsüz basamakta, hücrelerin yüzeylerden uzaklaştırılması fırçalama ve kazıma gibi güçlü işlemlerin yapılmasını gerektirmektedir (Gün ve Ekinci, 2009). Dönüşümsüz tutunma aşamasından sonra biyofilm hücrelerini yüzeyden uzaklaştırabilmek için güçlü mekanik kuvvet, enzim, dezenfektan, deterjan, sanitizeler ve/veya yüksek ısı işleme ihtiyaç vardır (Sinde ve Carballo, 2000; Maukonen ve ark., 2003; Augustin ve ark., 2004).

### 2.3.2.3. Koloni oluşumu

Mikrokoloni gelişimi bakteri hücrelerinin yüzeyde birikmesi, mikroorganizmaların gelişmesi ve EPS üretimi sonucunda gerçekleşir (Chmielewski ve Frank, 2003). EPS bakteri ve alt katmanı arasında bağ oluşumuna katkıda bulunur, koloniyi her türlü çevresel strese karşı kararlı hale getirir (Donlan ve Costerton, 2002). Bu aşamada bakterilerin yüzeyde toplanma işlemi planktonik hücrelerin sinyal molekülleriyle etkileşip bir araya gelmesiyle gerçekleşir. Tutunan bakteri gelişir ve daha sonra bölünür. EPS diğer planktonik hücrelerin yakalanmasını da sağlar. Bu aşamada

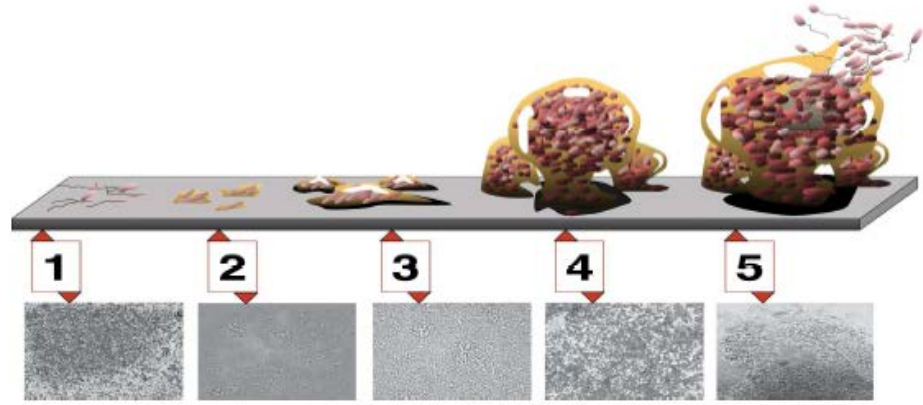
bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (birincil koloni), aynı yüzeyde diğer bakteriler de koloni oluşturur (ikincil koloni). Biyofilm büyüdükçe, polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür (Poulsen, 1999).

#### **2.3.2.4. Olgun biyofilm oluşumu**

Bu aşamada mikrokoloniler gelişirler ve mantar veya kule şeklindeki kompleks yapılara dönüşürler (Chmielewski ve Frank, 2003; Klausen ve ark., 2003). Konfokal lazer mikroskopisi ile yapılan çalışmalar, bakterilerin kompleks EPS ile çevrilmiş mikrokoloniler içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuştur. Çeşitli yüksekliklerde kule benzeri yapılar oluşturan mikrokoloniler arasında besinlerin taşınması ve metabolik atıkların uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (Kumar ve Anand, 1998; Poulsen, 1999). Hücrelerin bu yapıya ulaşabilmesi için yaklaşık 10 gün ya da daha uzun bir süre gerekmektedir (Stoodley ve ark., 2002).

#### **2.3.2.5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması**

Biyofilm oluşumunda son aşama biyofilm hücrelerinin koparak ayrılmasıdır. Bu aşamada tek bir bakteri veya bakteri toplulukları biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Hücreler böylece planktonik hallerine geri dönerler (Sauer ve ark., 2002). Artan akış kuvveti, iç enzimatik bozulma, EPS ya da yüzey bağlayan proteinlerin açığa çıkması gibi hücre içinde görülen olaylar biyofilm hücrelerinin ayrılmasında önemli rol oynar (Stoodley ve ark., 2002; Kaplan ve ark., 2004). Ayrıca ortamda besin maddelerinin tükenmesi de biyofilm hücrelerinin ayrılmasında önemli bir neden olabilmektedir (O'Toole ve ark., 2000). Bu ayrılma işlemi dış faktörlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum basamağının bir parçası olarak tek bir hücrenin veya çoklu hücrelerin kopmasının bir sonucu da olabilir (Poulsen, 1999).



**Şekil 2.3.** Biyofilm oluşum basamakları; 1. Dönüşümlü tutunma, 2. Dönüşümsüz tutunma, 3. Koloni gelişimi, 4. Biyofilm olgunlaşması, 5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması (Marshall, 1976).

Biyofilm oluşumu, bakterilerin sadece bir araya gelerek belirli bir yüzeye tutunmaları ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam etmeleri şeklinde gerçekleşen rastgele bir olay değildir. Birçok organizma aktivitelerini koordine etmek için birbirlerine sinyal verirken küçük yayılabilir molekülleri kullanırlar. Biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizma olan ve “Quorum Sensing (QS)” olarak adlandırılan bu işlem ile bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmekte ve bu verilerin diğerlerine iletilmesine imkân sağlamaktadırlar. Başka bir ifadeyle, QS ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel populasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama ‘Ben buradayım’ mesajı veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artar. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani, biyofilm içerisindeki bakteriler düşük molekül ağırlıklarına sahip intersellüler haberciler aracılığıyla haberleşmektedirler (Arnold ve Silvers, 2000).

#### **2.4. *Staphylococcus aureus* Biyofilmleri**

Bakteriyel kaynaklı enfeksiyonlar değerlendirildiğinde klinik örneklerden en sık izole edilen Gram pozitif stafilokok türü *S.aureus*’tur (Waldvogel, 2000). Ortam şartlarına oldukça dayanıklı olan *S. aureus* çevresel kaynaklarda yaygın olarak bulunan bir mikroorganizmadır. *S. aureus*’un virulansı fagositoza karşı direnç sağlayan biyofilm tabakası ile kombine olduğunda oldukça yükselmektedir (Cucarella ve ark., 2001).

*S. aureus* genellikle *icaADBC* operonu bulundurmaktadır. Bu operon poli-N-süksinil- $\beta$ -1-6 glikozamin (PIA-PNSG) polisakkarit tutunma matriksinin üretiminden sorumludur. *icaADBC* tarafından üretilen bu maktriğin ikinci aşamada hücrelerin birbirine tutunmasını sağlamakta etkili olduğu öngörülmektedir (Szczyka ve ark., 2013). Bu nedenle *icaADBC* lokusu bulduran *S. aureus* suşlarının, potansiyel biyofilm üreticisi olduğu düşünülmektedir (Szweda ve ark., 2012).

#### 2.4.1. *ica* bağımlı biyofilm mekanizmaları

Son zamanlarda stafilokollarda en iyi anlaşılmiş biyofilm mekanizması *ica* aracılı biyofilm oluşumudur. Biyofilm oluşumunun genetik kontrolü Gerke ve ark. (1998) tarafından belirlenmiştir. Çok sayıda bakteriyel ve dış faktörler tutunmayı ve birikimi etkilemesine rağmen, *ica* operonun kodladığı enzimler tarafından sentezlenen hücrelerarası polisakkarit adhezin (PIA) ya da polimerik N-asetil-glukozamin (PNAG) olarak bilinen (Mack ve ark., 1996; Maira-Litran ve ark., 2002) bir hücre dışı polisakkarit adhezin üretimi son zamanlarda stafilokoklarda en iyi anlaşılmiş biyofilm mekanizmasıdır (O’Gara, 2007).

Bakterilerin biyofilm oluşturma ve toplanma yeteneği ekstrasellüler mukoid madde (Slime) üretme kapasitesiyle ilişkilidir. Slime ana bileşenini PIA ve PNAG oluşturur (Arciola ve ark., 2002). N-asetilglukozamin biyofilm tabakasının ana maddesini oluşturmaktadır. N-asetilglukozamin, hücreler arası agregasyonu sağlayan PIA oluşumundan sorumludur (Götz, 2002).

*S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* slime üretiminden sorumlu olan *icaADBC* operonu (*ica* lokusu) içerir (Gerke ve ark., 1998; Cramton ve ark., 1999). *icaADBC* operonunda *icaA* geni PIA sentezi için gerekli olan N-asetilglukozaminiltransferaz enzimini kodlar (Gerke ve ark., 1998; Cramton ve ark., 1999). *icaD* geni kapsüler polisakkaritin fenotipik ifadesinde önemli olan N-asetilglukozamiltransferaz enziminin maksimum ekspresyonunda rol oynar (Gad ve ark., 2009). *ica* lokusu, kapsüler polisakkarit sentezi ile hücre-hücre adhezyonuna aracılık eder (Heilmann ve ark., 1996). Bununla birlikte, *icaA* ve *icaD*’nin birlikte *in vitro* olarak UDP-N-asetilglukozamini bir substrat olarak kullanarak *ica* lokusu (özellikle *icaA* geni) tarafından kodlanan bir enzim olan N-asetilglukozaminiltransferaz ile şeker oligomerlerinin sentezine aracılık ettiği gösterilmiştir (Cramton ve ark., 1999).

*icaA* geninin tek ifade edilmesi sadece düşük enzimatik aktivitesini indükler, fakat *icaA* ile *icaD* geninin birlikte ifade edilmesi aktiviteyi önemli ölçüde artırır ve kapsüler polisakkaridin fenotipik ekspresyonu ile ilgilidir (Gerke ve ark., 1998; Arciola ve ark., 2001). *icaA* gen ürünü optimum aktivite için *icaD* gen ürününü gerektiren N-asetil-glukozaminiltransferaz ile homoloji gösteren bir transmembran proteindir (Gerke ve ark., 1998).

*icaC* aktivitesi ile birlikte N-asetil-glukozaminiltransferaz aktivitesi PIA'ya karşı artan bir antikör tarafından tanınan *in vitro* bir ürün üretir. *ica* operonundan sentezlenen PIA çok katmanlı biyofilm ile bakteriyel hücre-hücre temasını destekler. PIA, lineer  $\beta$ -1,6 bağlı glikozaminoglikanlardan oluşmaktadır.

Yapılan araştırmalarda, *icaA* geni ile *icaD* geni arasında bir bağlantı olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, *icaA* ve *icaD* genlerinin birlikte N-asetilglukozamini substrat olarak kullanarak şeker oligomerlerinin sentezine aracılık ettikleri gösterilmiştir (Cramton ve ark., 1999; Vasudevan ve ark., 2003). Benzer olarak *icaC* geninin PIA ifade ettiği düşünülürken, *icaB* geninin işlevi tam olarak bilinmemektedir (Vuong ve Otto, 2002).

#### 2.4.2. *ica* bağımsız biyofilm mekanizmaları

Stafilokok biyofilm gelişiminde PIA/PNAG üretimini kontrol eden regülatör yolların ve *icaADBC* lokusunun tartışmasız önemli rolüne rağmen, son yıllarda *S. aureus* ve *S. epidermidis*'de PIA/PNAG bağımsız biyofilm mekanizmalarının varlığını vurgulamak için birçok çalışma yapılmıştır (Beenken ve ark., 2004; Fitzpatrick ve ark., 2005; Rohde ve ark., 2005, 2007; Kogan ve ark., 2006; O'Gara, 2007). Bu mekanizmaların temelinde konak ekstraselüler matrikse bağlanan hücre yüzey adhezinlerinin farklı dizilişi yatmaktadır (O'Gara, 2007). *ica* lokusunun klinik açıdan daha önemli olan *S. epidermidis* ile ilişkisinin daha olası olduğu bildirilmiştir (Ziebuhr ve ark., 1999; Fitzpatrick ve ark., 2002). Bununla birlikte, *S. aureus* izolatlarının büyük çoğunluğunun bu gen kümesini taşıdığı görülmektedir (Knobloch ve ark., 2002; Fitzpatrick ve ark., 2006; O'Gara, 2007). Bu nedenle *S. aureus* biyofilm fenotipinde *ica* lokusunun rolünün kompleks ve suş ve çevre bağımlı olduğunu varsaymak makul gibi görünmektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalar *S. aureus* ve *S. epidermidis* biyofilm gelişiminde *ica* lokusunun rolünün önemli ölçüde değişebilir olduğunu göstermiştir (O'Gara, 2007). Ancak, yapılan bazı çalışmalarda *ica* operonu bulundurmayan *S.*

*aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının biyofilm üretme yeteneğine sahip oldukları bildirilmiştir (Ziebuhr ve ark., 1999; Fitzpatrick ve ark., 2002, 20005; Frank ve ark., 2004; Rohde ve ark., 2004; Kogan ve ark., 2006; O’Gara, 2007).

İlk iyi karakterize edilmiş *ica*ADBC bağımsız biyofilm mekanizması, biyofilm ile ilişkili proteinin (Bap) *S. aureus* sığır mastitis V329 izolatı ile biyofilm gelişimi süresince ilk tutunma ve interselüler birikim için gerekli olduğu J. Penades ve I. Lasa’nın araştırma grubu tarafından tanımlanmıştır (Cucarella ve ark., 2001). Bu izolatta *ica* lokusuna ait mutasyonun biyofilm fenotipi üzerine hiçbir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Cucarella ve ark., 2004). Bununla birlikte, SarA *bap* geninin bir transkripsiyonel aktivatörü ve bu nedenle Bap aracılı biyofilm gelişiminin pozitif bir regülatörü olarak işlev görmektedir (Trotonda ve ark., 2005). Ayrıca, *ica* bağımsız biyofilme aracılık da edebilen bir Bap homolog protein bazı *S. epidermidis* ve diğer koagülaz-negatif stafilokok türlerde belirlenmiştir (Tormo ve ark., 2005). *bap* geni sığır izolatlarının sadece %5’inde ve *S. aureus* insan klinik izolatlarında yok gibi görünse de (Cucarella ve ark., 2001), Bap proteini biyofilm gelişiminde önemli bir rol oynayan çeşitli bakteri türlerinde korunmuş yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip 100’den fazla yüzey protein grubunun bir üyesi olarak ortaya çıkmıştır (Lasa ve Penades, 2006). Biyofilm pozitif *S. aureus* insan klinik UAMS-1 izolatında *ica* lokusunun delesyonunun biyofilm gelişimi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Beenken ve ark., 2004). Bunun aksine, *S. aureus* UAMS-1’de *sarA* geninin mutasyonu bozulmuş biyofilm oluşturma kapasitesi ile sonuçlanmıştır. *ica*ADBC bağımsız biyofilm oluşumunun metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarında mümkün olduğu bildirilmiştir (Fitzpatrick ve ark., 2005; O’Gara, 2007).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Besiyerleri

##### 3.1.1. Maximum Recovery Diluent (MRD)

- Pepton : 1,0 g/L
- NaCl : 8,5 g/L

Dehidre besiyeri (Merck, Darmstadt, Almanya) saf su içinde 9,5 g/L olacak şekilde çözüldürülmüştür. Tüplere taksim edildikten sonra otoklavda 121 °C'ta 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası tüpler 4 °C'ta muhafaza edilmiştir.

##### 3.1.2. Baird Parker Agar (BPA)

- Pepton (kazein) : 10 g
- Et özü : 5 g
- Maya özü : 1 g
- Sodyum pirüvat : 10 g
- Glisin : 12 g
- Lityum klorid : 5 g
- Agar – agar : 15 g

Dehidre besiyerinden (Merck) 58 g tartılarak 950 mL saf su içerisinde çözüldürülmüştür. Otoklavda 121 °C'ta 15 dakika steril edilmiştir. 45 °C'a soğutulduktan sonra içerisine egg yolk tellürit emülsiyonundan (Merck) 50 mL ilave edilerek petri kutularına taksim edilmiştir.

##### 3.1.3. Nutrient Agar (NA)

- Pepton : 5 g
- Sığır özü : 3 g

- Sodyum klorid : 8 g
- Agar : 12 g

Dehidre besiyerinden (Lab M, Lancashire, İngiltere) 28 g tartılıp 1 L saf su içerisinde çözündürülmüştür. Otoklavda 121 °C'ta 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında 48 °C'a soğutularak petrilere taksim edilmiştir.

#### **3.1.4. Nutrient Broth (NB)**

- Sığır özü : 1 g
- Maya özü : 2 g
- Pepton : 5 g
- Sodyum klorid : 5 g

Dehidre besiyerinden (Lab M) 13 g tartılıp 1 L saf su içerisinde çözündürülmüştür. Homojen karışım cam tüplere 10'ar mL taksim edildikten sonra otoklavda 121 °C'ta 15 dakika steril edilmiştir.

#### **3.1.5. Tryptone Soy Agar (TSA)**

- Tripton : 15 g
- Soy pepton : 5 g
- Sodyum klorid : 5 g
- Agar : 12 g

Dehidre besiyerinden (Lab M) 37 g tartılıp 1 L saf su ile ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. Karışım homojen hale geldikten sonra otoklavda 121 °C'ta 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrası 48 °C'a soğuduktan sonra petrilere taksim edilmiştir.

### 3.1.6. Tryptone Soy Broth (TSB)

- Pepton (kazein) : 17 g
- Pepton (soymeal) : 3 g
- D (+) glukoz monohidrat : 2,5 g
- Sodyum klorid : 5 g
- di-Potasyum hidrojen fosfat : 2,5 g

Dehidre besiyerinden (Merck) 30 g tartılıp 1 L saf su içerisinde çözündürülmüştür. Cam tüplere 10'ar mL taksim edildikten sonra tüpler otoklavda 121 °C'ta 15 dakika steril edilmiştir.

## 3.2. Çözeltiler

### 3.2.1. Tris-EDTA buffer

10 mL 1 M Tris solüsyonu (Amresco, Solon, ABD) ve 2 mL 0,5 M EDTA (Amresco) solüsyonu 988 mL steril saf su ile son hacim 1000 mL olacak şekilde karıştırıldıktan sonra pH 8.0'a ayarlanarak 1X TE buffer hazırlanmıştır.

### 3.2.2. Lizis buffer

0,242 g Tris-Cl (Amresco), 0,0744 g sodyum EDTA (Amresco), 1200 µL Triton X-100 (Merck) 100 mL ultra saf su içerisinde çözündürülmüştür. Kullanmadan hemen önce 20 mg/mL lizozim (Merck) eklenmiştir.

### 3.2.3. PBS

8 g NaCl (Sigma Aldrich, St. Louis, ABD), 0,2 g KCl (Merck), 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) son hacim 1 L olacak şekilde saf su içinde çözüldürülmüştür. HCl (Sigma Aldrich) ya da NaOH (Merck) ile pH 7.4'e ayarlanmıştır. 121 °C'ta 20 dakika otoklavlanarak 1X PBS hazırlanmıştır.

### 3.2.4. Kristal viyole çözeltisi

Çözelti halindeki kristal viyolede (Sigma Aldrich) önce 5 mL alınıp saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak %10'luk bir stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden %1'lik çözeltiler hazırlanarak kullanılmıştır.

## 3.3. *Staphylococcus aureus* Suşları

Biyofilm üretme yeteneği ve *icaA*, *icaD* genlerinin varlığının araştırılması amacı ile *S. aureus* suşları Konya ilinde faaliyet gösteren süt işletmelerinden alınan çevresel örneklerden (Örneğin; personellerin ellerinden, ekipmanlardan) izole edilmiştir.

### 3.3.1. İzolasyon

Çevresel örnekler ISO 18593 (2004) standardına göre steril swab ile alınmıştır. Alınan çevresel örneklerden *S. aureus* izolasyonu egg yolk tellürit ilave edilen BPA üzerinde gerçekleştirilmiştir. Örneklemeden sonra swablar 10 mL MRD içeren tüplere aktarılmıştır. Vorteks aşamasından sonra toplam 1 mL dilüent üç adet BPA besiyeri üzerine drigalski spatülü kullanılarak inoküle edilmiştir. İnoküle edilen besiyerleri 37±1°C'ta 48±2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda potasyum tellürit varlığından dolayı siyah veya gri renkte, etrafında lesitinaz aktivitesine bağlı olarak temiz bir zon olan tipik koloniler biyokimyasal identifikasyon paneli (API Staph, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Fransa) ile doğrulanmıştır.

### 3.3.2. Kùltür şartları

*S. aureus* olarak doğrulanan izolatların stok kùltürleri %20 oranında gliserol (Merck) ilave edilmiş NB içinde -18 °C'ta muhafaza edilmiştir. Çalışma kùltürleri NA üzerinde 4 °C'ta muhafaza edilmiştir.

### 3.4. DNA İzolasyonu

PCR amplifikasyonu öncesinde *S. aureus* suşlarından DNA izolasyonu için üç farklı DNA izolasyon yöntemi değerlendirilmiştir. Elde edilen DNA'nın miktarı ve saflığı göz önünde bulundurularak en verimli metot tercih edilmiştir.

#### 3.4.1. Su ile kaynatma yöntemi

TSA üzerinde gelişen *S. aureus* kolonileri 500 µL DNaz ve RNaz içermeyen steril saf su içinde süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon su banyosunda (Mermert, Schwabach, Almanya) 100 °C'ta 10 dakika boyunca tutulmuştur. Isıtılan süspansiyonlar 10000 x g'de 5 dakika santrifüj (Daihan, Seul, Kore) yapılmıştır. Bakteriyel DNA'yı içeren supernatant alınarak DNA saflığı ve miktarı tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2004).

#### 3.4.2. TE buffer ile kaynatma yöntemi

TSA üzerinde gelişen *S. aureus* kolonileri 500 µL TE buffer içinde süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon su banyosunda 100°C'ta 10 dakika boyunca tutulmuştur. Isıtılan süspansiyonlar 10000 x g'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra bakteriyel DNA içeren süpernatantta DNA'nın saflık ve miktar tayini yapılmıştır (Zhang ve ark., 2004).

### 3.4.3. Ticari izolasyon kiti

Ticari kit ile yapılan DNA izolasyonunda kit (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific, Vilnius, Litvanya) üreticisi tarafından sağlanan Gram pozitif bakteri genomik DNA izolasyon protokolü takip edilmiştir.

Stok kültürlerden 5 mL NB besiyerine inoküle edilerek 17 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 1.5 mL'lik ependorf tüplere 1.5 mL bakteri süspansiyonu alınmış ve 5000 x g'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine 180 µL Gram pozitif bakteri lizis buffer ilave edilerek 37 °C'ta ısıtıcı blok (Bioer, Hangzhou, Çin) içinde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üzerine 200 µL lizis solüsyon ve 20 µL proteinaz K (Thermo Scientific) ilave edilerek vorteks ile tamamen karışması sağlanmıştır. Hücrelerin lizis olması için ısıtıcı blok içinde 56 °C sıcaklıkta yarım saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 20 µL RNaz A solüsyonu (Thermo Scientific) eklendikten sonra vorteks ile karıştırılıp karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra üzerine 400 µL %50'lik etanol ilave edilmiştir. İzolasyon kolonuna hazırlanan lizat transfer edilip 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üzerine 500 µL yıkama tamponu I eklenmiş ve 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır. 500 µL yıkama tamponu II ilave edilerek maksimum hızda ( $\geq 12000$  x g) 3 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpü uzaklaştırılarak yeni steril 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir. Üzerine 100 µL elüsyon tamponu ilave edilerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildikten sonra 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

### 3.4.4. İzole edilen DNA'nın saflığının ve miktarının tespiti

Üç farklı yöntem kullanarak yapılan DNA izolasyonu sonucunda elde edilen bakteriyel DNA örneklerinin saflık ve miktar tayini yapılmıştır. Bu işlem mikrohacim spektrofotometre (Thermo Scientific, Waltham, ABD) kullanılarak absorbans ölçümüne dayalı olarak belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2004). Bu ölçüm sonucu DNA örneklerinin verdiği OD değerlerine ( $A_{260}/A_{280}$ ) göre saflıkları ve ng

cinsinden miktarları tespit edilmiştir. Ayrıca DNA örneklerine agaroz jel elektroforezi de uygulanarak bu üç farklı izolasyon yönteminden elde edilen DNA'ların kaliteleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Jel üzerine ilk kuyucuğa 1 kb'lık DNA ladder (Solis BioDyne, Tartu, Estonya) yüklenmiştir. Sonraki kuyucuklara 5 µL 1X loading dye (BM, Ankara, Türkiye) ile karıştırılmış 5 µL DNA örneği yüklenmiştir. DNA örnekleri 100 V'ta 30 dakika yürütülmüş ve UV ışık altında görüntülenmiştir (Major Science, Saratoga, ABD).

### 3.5. *icaA* ve *icaD* Genlerinin Tespiti

Çevresel örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarında *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığını tespit edebilmek için klasik PCR kullanılmıştır. Referans olarak kullanılan ATCC 25923 ve ATCC 6538 suşlarının *icaA* ve *icaD* genom dizileri *icaA* ve *icaD* genlerine ait nükleotid dizileriyle karşılaştırılmış ve %99-100 arasında benzerlik bulunmuştur (İnt. Kay. 2). PCR'da kullanılan *icaA* ve *icaD* genlerine ait primer dizileri Çizelge 3.1.'de verilmiştir (Vasudevan ve ark., 2003; Dhanawade ve ark., 2010; Castelani ve ark., 2015).

**Çizelge 3.1.** *icaA* ve *icaD* genlerine ait primer dizileri

Hedef gen	Primer dizisi	Amplikon büyüklüğü
<i>icaA</i>	forward (5'-CCTAACTAACGAAAGGTAG-3') reverse (5'-AAGATATAGCGATAAGTGC-3')	1315 bp
<i>icaD</i>	forward (5'-AAACGTAAGAGAGGTGG-3') reverse (5'-GGCAATATGATCAAGATA-3')	381 bp

### 3.5.1. Polimeraz zincir reaksiyonu

#### 3.5.1.1. Master mix hazırlanması

PCR amplifikasyonu için kullanılan master mix Çizelge 3.2.'de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.2.** PCR karışımı

Herbir Tüp	Master Mix
5 µL	10X PCR Buffer
5 µL (250 µM)	dNTPs (Stok: 10 mM, her biri 2,5 mM)
4 µL (2 mM)	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 µL x 2 (0,5 µM)	Primer <i>icaA</i> , <i>icaD</i> forward-reverse (25 µM)
0,25 µL (1,25 U)	Taq Polimeraz (5 U/ µL)
28,75 µL	H <sub>2</sub> O (Nuclease free water)
5 µL	Template DNA
Toplam: 50 µL	

#### 3.5.1.2. Amplifikasyon

*icaA* ve *icaD* genlerinin amplifikasyonu termal döngü cihazı ile (Biorad, Hercules, ABD) gerçekleştirilmiştir. Her iki gen için kullanılan primerlerin T<sub>m</sub> (erime sıcaklığı) değerlerinin yakın olmasından dolayı aynı PCR döngüsü kullanılmıştır. Yapılan ön çalışmalar ile en uygun döngü basamakları seçilmiştir. Amplifikasyon için kullanılan döngü ve sayısı Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir.

*icaA* ve *icaD* genlerine ait primerler ile PCR amplifikasyonu sonrasında bu genler için sırasıyla 1315-bp ve 381-bp büyüklüğünde ampikonlar elde edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar ile en uygun döngü basamakları seçilmiştir. Primerlerin bağlanma (Annealing) sıcaklığı primerlerin T<sub>m</sub> değerlerinden 2-3 °C yukarıda seçilmiştir. Toplam 30 döngü sonunda ampikonlar %1'lik agaroz jel içinde elektroforeze tabi tutulmuştur.

**Çizelge 3.3.** Uygulanan PCR döngüsü

Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)		
94 °C	4 dk	İlk denatürasyon	
94 °C	0:45 dk	Denatürasyon	X30 döngü
52 °C	0:30 dk	Bağlanma	
72 °C	1 dk	Uzama	
72 °C	7 dk	Final uzama	

### 3.5.1.3. Agaroz jel elektroforezi

Genomik DNA izolasyonu sonrasında elde edilen DNA örnekleri ve PCR amplifikasyonu sonucu ampliconların görüntülenebilmesi için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır.

%1'lik agaroz jel hazırlamak için; 1 g agaroz (Sigma Aldrich), 100 mL TBE buffer ile karıştırılıp mikrodalga fırında 2 dakika kaynatılmıştır. 48-50 °C'a soğutulduktan sonra 2 µL 10 µg/mL EtBr (Sigma Aldrich) ilave edilerek jel kasetine dökülmüş ve agar polimerleşince elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

PCR ampliconları jele yüklenirken ilk kuyucuğa marker olarak 1 kb'lık DNA ladder yüklenmiştir. Sonra 5 µL 1X loading dye ve 5 µL amplicon karıştırılıp sırası ile kuyucuklara yüklenmiştir. 100 V'ta 45 dakika yürütülerek UV ışık altında görüntülenmiştir.

## 3.6. Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Değerlendirilmesi

*S. aureus* suşlarının biyofilm üretme kapasiteleri kantitatif olarak mikrotitrasyon plak yöntemi ile belirlenmiştir (Cucarella ve ark., 2001).

### 3.6.1. Mikrotitrasyon plak yöntemi

*S. aureus* suşlarının stok kültürleri TSB besiyerine inoküle edilmiş ve 37 °C'ta bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler %2 oranında D (+) glukoz (Merck) içeren TSB içinde 1:40 oranında seyreltilerek biyofilm oluşumu

için süspansiyonlar hazırlanmıştır. Steril mikrotitrasyon plakasının (Anicrin, Venezia, İtalya) kuyucuklarına 200 µL biyofilm süspansiyonu ilave edilmiş ve plakalar 37 °C'ta 24 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak biyofilm üretmeyen ticari *S. epidermidis* suşu ATCC 12228 ve sadece TSB besiyeri kullanılmıştır (Christensen ve ark., 1985).

İnkübasyon sonunda her bir kuyucuktaki hacmin yarısı boşaltılarak yerine aynı miktarda %2 oranında glukoz içeren TSB eklenmiş ve plakalar 37 °C'ta 24 saat ikinci inkübasyona bırakılmıştır.

İkinci inkübasyon sonucu her bir kuyucuk üç kez 200 µL steril PBS (pH 7,4) ile plate yıkayıcı (BioTek, Winooski, ABD) kullanılarak yıkanmıştır. Yıkama sonrasında mikropalaklar ters çevrilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

Kurutma sonrasında kuyucuklara 200 µL %1'lik kristal viyole solüsyonu ilave edilerek 15 dakika boyama amacıyla bekletilmiştir. Boyama aşaması sonrasında kuyucuklar tekrar PBS ile üç kez yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuyucuklarda biyofilm matriksi tarafından tutunan boyanın salınması için her bir kuyucuğa 200 µL %95'lik etil alkol ilave edilmiş ve mikropalkanın kapağı kapatılarak 20 dakika boyanın çözünmesi beklenmiştir. Etil alkol içindeki boya konsantrasyonu bir mikropalaka okuyucu (Multiskan Go) ile 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Çalışma üç kez tekrar edilmiş ve her tekrarda her bir suş için iki kuyucuk kullanılmıştır. Elde edilen absorbans değerleri *S. aureus* suşlarının biyofilm üretme yeteneklerini tespit etmek için kullanılmıştır.

### 3.6.2. Biyofilm oluşturma yeteneğine göre sınıflandırma

Bakteriyel biyofilmlerden elde edilen OD değerlerine göre *S. aureus* suşları biyofilm üretmeyenler, zayıf, orta ve güçlü biyofilm üretenler olmak üzere dört kategoride sınıflandırılmıştır. Bu amaçla OD cut-off (ODc) değeri hesaplanmıştır. OD cut-off değeri, negatif kontrol ile elde edilen ortalama değere üç standart sapma ilave edilerek belirlenmiş ve *S. aureus* suşları aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır:

$OD \leq ODc =$  biyofilm üretmeyen

$ODc < OD \leq (2 \times ODc) =$  zayıf

$(2 \times ODc) < OD \leq (4 \times ODc) =$  orta

$(4 \times ODc) < OD =$  güçlü biyofilm üreticisi olarak kabul edilmiştir

(Stepanovic ve ark., 2000).

### 3.7 İstatistiksel Değerlendirme

*S. aureus* suşlarında *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı ile biyofilm oluşturma yetenekleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla biyofilm oluşturma yeteneği ve *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı arasındaki ortak yüzde uyum (her iki metot ile pozitif sonuç veren izolatların sayısının toplam izolat sayısına oranı) hesaplanmıştır (Quintavalla ve ark., 1996).

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. DNA İzolasyonu

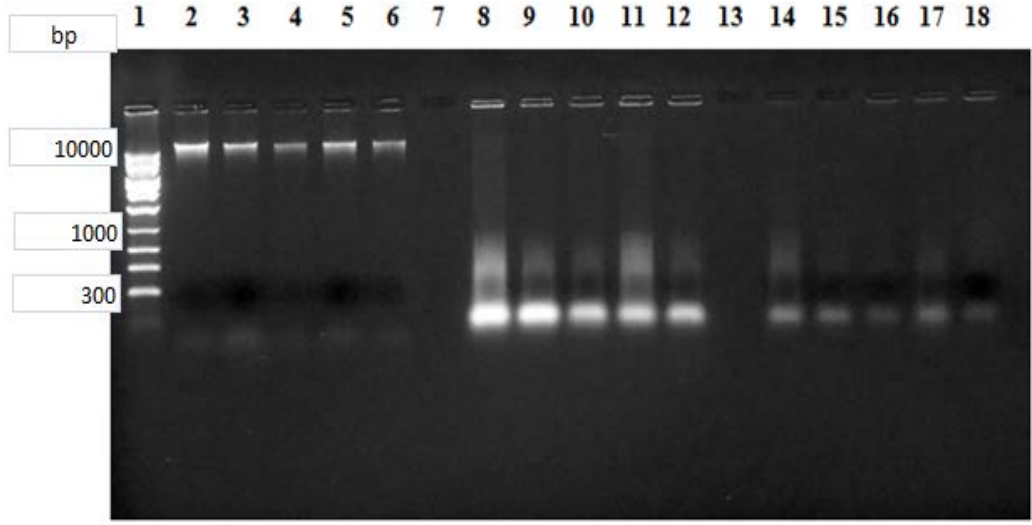
Referans (ATCC 25923 ve ATCC 6538) ve rastgele seçilen *S. aureus* (Suş 15, Suş 36, Suş 42) suşlarından DNA izolasyonu su ile kaynatma yöntemi, TE buffer ile kaynatma yöntemi ve ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada izole edilen DNA'nın saflık ve miktarlarına göre en verimli yöntem olan ticari kit ile izolasyon tercih edilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Üç farklı DNA izolasyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar

DNA örnekleri	Su ile kaynatma		TE buffer ile kaynatma		Ticari kit kullanarak	
	A260/A280 nm*	Kons. (ng) **	A260/A280 nm*	Kons. (ng) **	A260/A280 nm*	Kons. (ng) **
ATCC 25923	1,902	55,39	1,896	46,47	2,005	112,8
ATCC 6538	2,108	76,57	1,975	75,49	2,107	71,27
Suş 15	2,201	50,00	2,201	54,61	2,084	79,71
Suş 36	2,197	67,84	2,174	72,16	1,981	49,41
Suş 42	1,954	49,80	2,015	49,31	2,065	88,63

\*: 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbansı    \*\*: Konsantrasyon (ng)

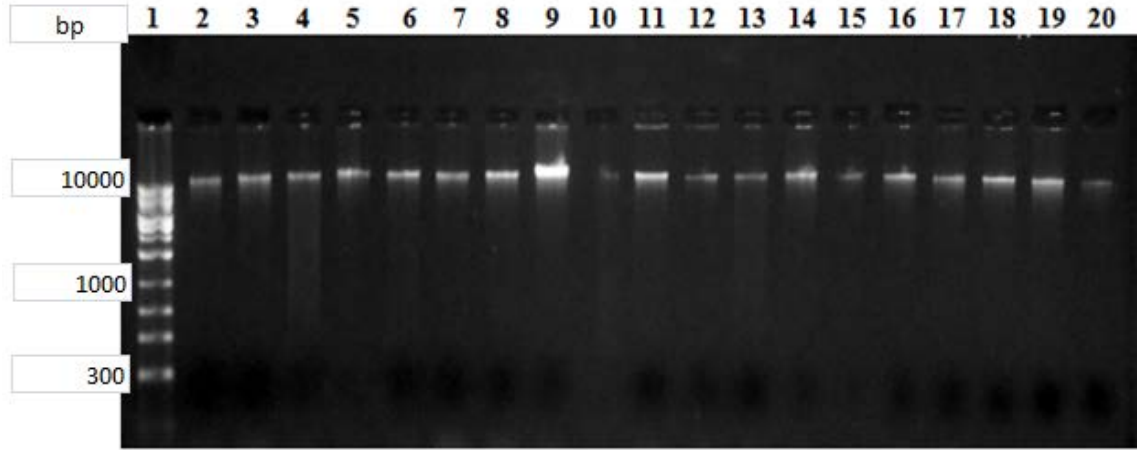
Üç farklı yöntem ile elde edilen DNA örneklerinin mikrohacim spektrofotometre ile ölçülen A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> nm oranları ve konsantrasyonları çizelge 4.1'de verilmiştir. Bunun yanı sıra jel elektroforezi uygulanarak DNA kaliteleri gözlemlenmiştir. Bu üç farklı DNA izolasyon yöntemine ait jel görüntüsü Resim 4.1'de verilmiştir.



**Resim 4.1.** Üç farklı yöntemle elde edilen DNA örneklerinin jel görüntüleri (1- DNA ladder, 2-6 ticari kit kullanılarak DNA izolasyonu, 8-12 TE buffer ile kaynatma yöntemi, 14-18 Su ile kaynatma yöntemi)

Bu sonuçlara göre DNA saflıkları ( $A_{260}/A_{280}$ ) aşağı yukarı üç izolasyon yönteminde de benzer iken en fazla DNA miktarı (ng cinsinden, Çizelge 4.1.) ticari kit ile elde edilmiştir. Ayrıca kaynatma yöntemlerinde DNA'nın kırılma ihtimali de göz önüne alınarak (Resim 4.1.) DNA izolasyonu için ticari kit ile izolasyon tercih edilmiştir. PCR amplifikasyonu için ticari kit ile izole edilen DNA örnekleri kullanılmıştır.

Ticari kit kullanılarak yapılan DNA izolasyonu sonucu elde edilen örneklerin mikrohacim spektrofotometre ile ölçümü yapıldıktan sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Jel elektroforezi sonucu elde edilen, rastgele seçilen 19 örneğe ait görüntüler şekilde verilmiştir (Resim 4.2.).



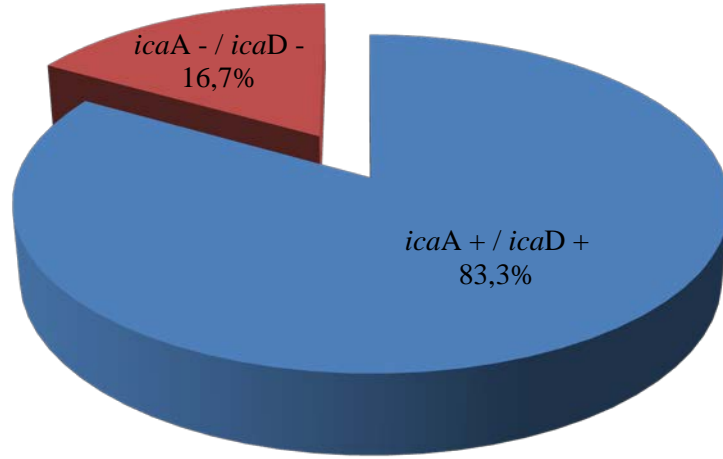
**Resim 4.2.** Ticari kit kullanılarak elde edilen genomik DNA jel elektroforezi (1- DNA ladder, 19 *S. aureus* suşuna ait genomik DNA)

#### 4.2. PCR Amplifikasyonu

Ticari kit kullanılarak DNA izolasyonu yapılan suşlara ait DNA'lar *icaA* ve *icaD* genlerini amplifiye etmek için PCR'a tabi tutulmuştur. PCR amplifikasyonu sonrası ampliconları görüntülemek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Jel görüntüleme sonucu *icaA* ve *icaD* genlerine ait jel bant profilleri tespit edilmiştir (Resim 4.4. ve Resim 4.3.).

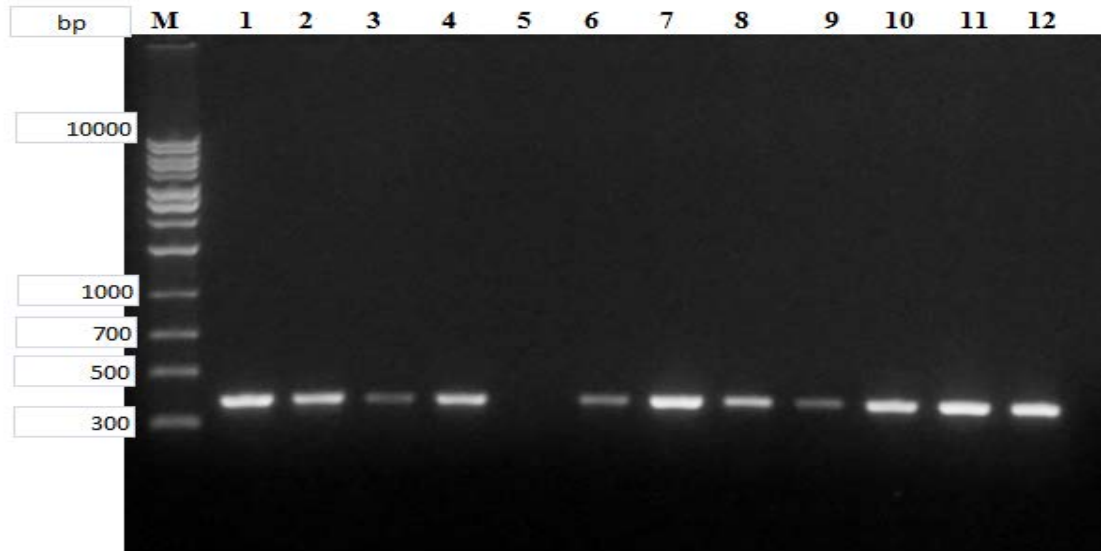
**Çizelge 4.2.** *icaA* ve *icaD* genlerine ait PCR sonuçları

	<i>icaA / icaD</i> geni
<b>pozitif</b>	35
<b>negatif</b>	7
<b>toplam</b>	42



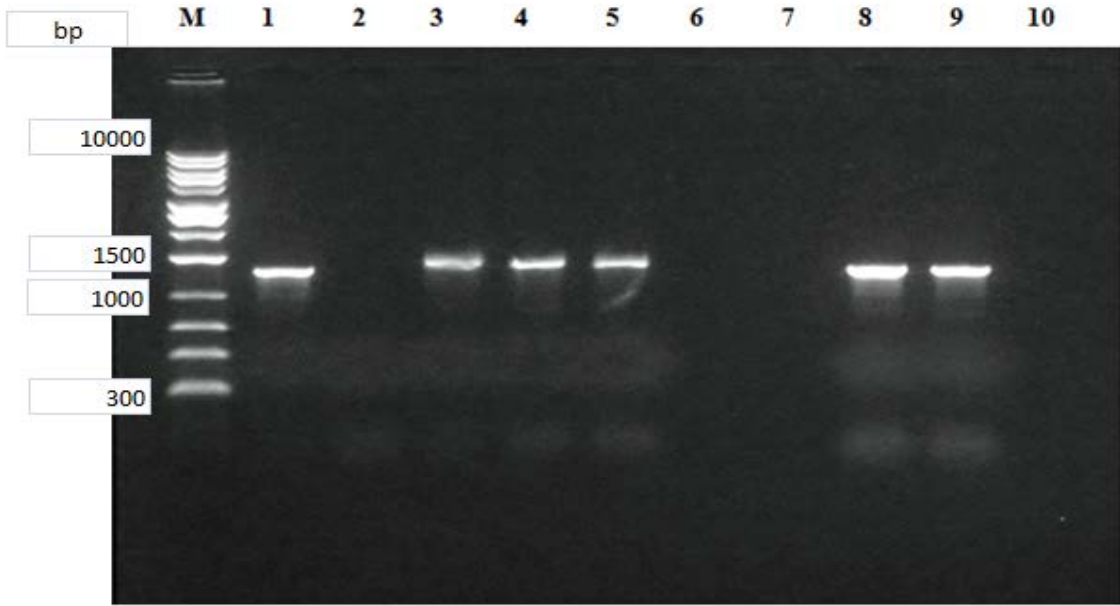
**Grafik 4.1.** *S. aureus* suşlarında (n=42) *icaA* ve *icaD* genlerinin prevalansı

Toplam 42 adet *S. aureus* suşundan elde edilen *icaD* ampliconları agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Elde edilen bant profilleri Şekil 4.3'te verilmiştir.



**Resim 4.3.** *S. aureus* suşlarına ait *icaD* bant profilleri, M- DNA ladder, 1- ATCC 6538, 2-4 *icaD* pozitif, 5- *icaD* negatif, 6-12 *icaD* pozitif.

*S. aureus* suşlarına ait *icaA* geni agaroz jel elektroforezi bant profilleri Şekil 4.4'te gösterildiği gibi elde edilmiştir.



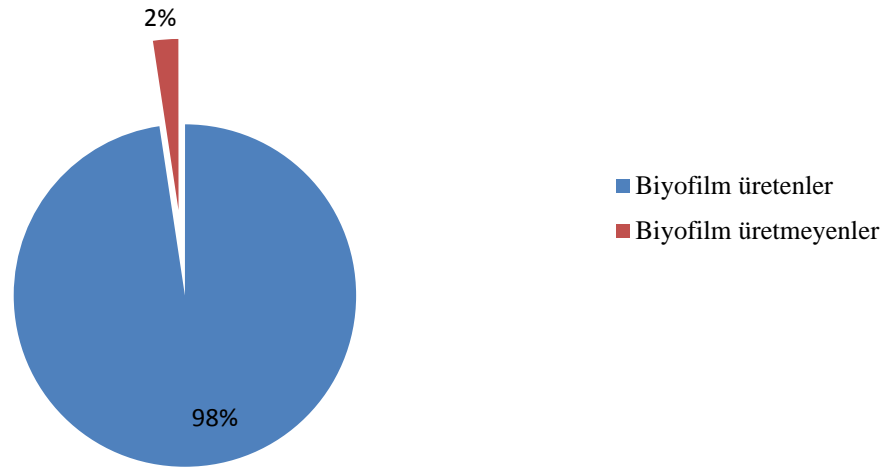
**Resim 4.4.** *S. aureus* suşlarına ait *icaA* bant profilleri, M- DNA ladder, 1- ATCC 6538; 2,6,7,10 *icaA* negatif; 3,4,5,8,9 *icaA* pozitif

### 4.3. Mikrotitrasyon Plak Yöntemi

Mikrotitrasyon plak yöntemi ile elde edilen absorbans değerlerine göre 42 adet *S. aureus* suşundan sadece bir suşun biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3.).

**Çizelge 4.3.** Mikrotitrasyon plak yönteminin sonuçları

<b>Mikrotitrasyon plak yöntemi</b>		
	<u>Biyofilm üreticisi</u>	<u>Biyofilm üretmeyen</u>
<b><i>S. aureus</i> suşları</b>	41	1



**Grafik 4.2.** Mikrotitrasyon plak yöntemi sonucunda elde edilen sonuçlara göre 42 *S. aureus* suşunun biyofilm üretme yetenekleri yüzdeleri

Mikrotitrasyon plak yöntemi sonucu alınan absorbans değerlerine göre  $OD_{600} = 0,32$  olarak hesaplanmış ve bu değerden düşük OD değerine sahip *S. aureus* suşları biyofilm üretmeyen,  $0,32 < OD \leq 0,64$  aralığında OD değerine sahip suşlar zayıf biyofilm üreticisi,  $0,64 < OD \leq 1,28$  aralığında OD değerine sahip suşlar orta biyofilm üreticisi ve  $1,28 < OD$  değerine sahip suşlar da güçlü biyofilm üreticisi olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucu *S. aureus* suşları Çizelge 4.4.'te verdiği gibi sınıflandırılmıştır.

**Çizelge 4.4.** Mikrotitrasyon plak yöntemi ile *S. aureus* suşlarının biyofilm üretme yeteneklerine göre sınıflandırılması

	<b>Negatif</b>	<b>Zayıf</b>	<b>Orta</b>	<b>Güçlü</b>
	1	1	1	39
	(%2,38)	(%2,38)	(%2,38)	(%92,86)
<b>Toplam</b>				42 (%100)

#### 4.4. Tartışma

Bu çalışmada süt işletmelerinden izole edilen toplam 42 adet *S. aureus* suşunun biyofilm oluşturma yeteneği ile ilgili genotipik ve fenotipik profilleri araştırılmıştır. İzole edilen *S.aureus* suşlarında genotipik inceleme için ilk olarak DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA örneklerinde genotipik araştırma için *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı araştırılmıştır. PCR sonucunda 42 *S. aureus* suşundan 35 (%83,3)'i *icaA* ve *icaD* geni bakımından pozitif bulunurken, 7 (%16,6) suşun *icaA* ve *icaD* geni bulundurmadığı tespit edilmiştir.

*S. aureus* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin kantitatif olarak değerlendirilmesi için mikrotitrasyon plak yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile elde edilen OD değerlerine göre suşların 41 (%97,6)'inin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip oldukları saptanmıştır. Biyofilm oluşturabilen suşların 39'unun (%95,12) güçlü, bir suşun zayıf, bir suşun da orta derecede biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *S. aureus* suşları arasında 6 tanesinin *icaA* ve *icaD* geni içermedikleri saptanmıştır. *S. aureus* suşlarında *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı ve biyofilm oluşturma yetenekleri arasındaki ilişkiyi belirlemek için ortak uyum yüzdesi hesaplanmıştır. Toplam 42 adet *S. aureus* suşunun *icaA* ve *icaD* geni bulundurması ile *in vitro* olarak biyofilm oluşturma yetenekleri arasında ortak uyum yüzdesi %83 olarak bulunmuştur. Bu sonuç ile uyumlu olarak Brezilya'da yapılan bir araştırmada 94 adet *S. aureus* suşunun, 93'ünün biyofilm pozitif olduğu fenotipik yöntemlerle belirlenirken, 90 suşun *icaA* ve *icaD* genlerine sahip olduğu PCR ile belirlenmiştir (de Castro Melo ve ark., 2013). Yine Brezilya'da yapılan bir başka çalışmada mastitisli ineklerden izole edilen 110 adet *S. aureus* izolatında %98 oranında *icaA* geni ve %100'ünde *icaD* geninin varlığı tespit edilmiştir (Castelani ve ark., 2015). Başka bir çalışmada ise 35 adet *S. aureus* izolatının tamamında *icaA* ve *icaD* geninin varlığı tespit edilmiştir (Vasudevan ve ark., 2003).

Hindistan'da yapılan çalışmada da biyofilm oluşturan 102 *S. aureus* suşundan sadece 36'sında *icaA* ve *icaD* genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir (Dhanawade ve ark., 2010). Hollanda'da yapılan bir çalışmada ise mastitli ineklerden izole edilen biyofilm oluşturabilen 99 *S. aureus* suşunun 74'ünde *ica* lokusu olmadığı bildirilmiştir (Melchior ve ark., 2009). *icaADBC* bağımsız biyofilm oluşumunun dört klinik MRSA izolatında mümkün olduğunu bildirilmiştir (Fitzpatrick ve ark., 2005; O'Gara, 2007). İlginç bir şekilde, MRSA ve metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarında farklı

biyofilm mekanizmaları için *ica* delesyon mutasyonları oluşturan faj transdüksiyonu kullanarak ve biyofilm gelişiminin çevresel düzenlenmesi incelenerek delil elde edilmiştir (Fitzpatrick ve ark., 2006; O’Gara, 2007). Özellikle, NaCl biyofilm oluşumunu MRSA izolatlarından daha çok MSSA izolatlarını uyarmak için etkili olmuştur (O’Gara, 2007). NaCl, *ica* operonunun bilinen bir transkripsiyon aktivatörüdür (Rachid ve ark., 2000; Fitzpatrick ve ark., 2005) ve bununla tutarlı olarak MSSA izolatlarında biyofilm gelişimi görünüşte *ica*ADBC bağımlıdır ve PIA/PNAG üretimini içermektedir (O’Gara, 2007). Öncelikle glikoz kaynaklı olan MRSA izolatlarında biyofilm gelişimi *ica*-bağımsızdır ve görünüşe göre bir protein adhezini içerir (Fitzpatrick ve ark., 2005; O’Neill ve ark., 2007). Bu veriler *S. aureus*'un biyofilm mekanizmaları ve düzenlenmesi açısından önceden bilinmeyen karmaşık seviyesini ortaya koymaktadır (O’Gara, 2007). Bununla birlikte, son zamanlarda *sarA* lokusunun mutasyonunun sekiz MRSA ve yedi MSSA suşunda biyofilm gelişimini durdurduğu gösterilmiştir (Beenken ve ark., 2004; Trotonda ve ark., 2005; O’Neill ve ark., 2007). Böylece, *ica*-aracılı biyofilm kontrolünde *sarA* rolününün çoktan anlaşıldığı (Valle ve ark., 2003; Tormo ve ark., 2005) göz önüne alındığında, bu veriler *sarA* lokusunun hem *ica*-bağımlı hem *ica*-bağımsız biyofilm mekanizmaları kontrol eden ana bir düzenleyici olarak rol oynayabileceğini göstermektedir (O’Gara, 2007).

Yapılan bu çalışmalarda bulunan sonuçların aksine Türkiye’de yapılan başka bir araştırmada klinik örneklerden izole edilen 152 *S. aureus* suşunun 136’sında *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisinin de bulunduğu ancak sadece 74 suşun fenotipik olarak biyofilm üretme yeteneğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Şahin, 2007). Bu sonuç *ica*ADBC operonunun ekspresyonu, faz varyasyonları ve genom düzenlemeleri tarafından modülasyon ile yüksek çeşitlilik göstermesi ile açıklanabilir (Rachid ve ark., 2000; Dhanawade ve ark., 2010). Biyofilm oluşumundaki çeşitliliğe bakterinin bulunduğu üretim şartlarındaki farklılıklar da katkıda bulunmaktadır. *In vitro* ortam şartlarının, konak dokusundaki şartlardan çok farklı olması, *in vitro* deneylerde besiyeri kompozisyonu (Dhanawade ve ark., 2010), glukoz varlığı ve konsantrasyonu, pH ve hidrojen peroksit gibi birtakım faktörlerin, biyofilm oluşumunu etkilediği bildirilmektedir (Nostro ve ark., 2014).

Çalışmalar gösteriyor ki; *icaA* ve *icaD* geni *S. aureus* mikroorganizmalarında biyofilm oluşumu için önemli olsa da tek başına bir etken değildir. Yaptığımız çalışmada *icaA* ve *icaD* geni bulundurmayan fakat biyofilm oluşturan suşların *ica* bağımsız mekanizmaları kullanarak biyofilm oluşturmuş olmaları muhtemeldir. Zira

*icaA* ve *icaD* geni bulundurmamalarına rağmen biyofilm oluşturmalarına daha makul bir açıklama getirilemez. Bu suşlarda biyofilm oluşumunu *bap* geni ya da *sarA* geni gibi *ica* lokusundan bağımsız genlerin sağlayabileceği muhtemeldir. Biyofilm oluşumunda önemli bir protein olan Bap proteininin sentezini kontrol eden *bap* geni ve bu geni stimüle eden SarA proteini *ica* bağımsız yollarda biyofilm oluşumuna neden olabilmektedirler. Ayrıca *ica* bağımsız yollarda bu genler dışında başka genlerin de rol oynadığı bilinmektedir. Bunu söyleyebilmek için ileri araştırmalara gerek vardır.

Sonuç olarak *in vitro* çalışmalarda CO<sub>2</sub> seviyeleri, anaerobik ortam, glikoz ve ozmotik stres bütün *ica* operonun ifadesini ve/veya biyofilm gelişimini (Ammendolia ve ark., 1999; Cramton ve ark., 2001; Stepanovic ve ark., 2003; Jefferson ve ark., 2004) etkileyebilir. Cramton ve ark., (Cramton ve ark., 1999), *S. aureus* ATCC 35556 *ica* operonun delesyonu bozulmuş PIA/PNAG üretimi ve biyofilm-negatif fenotipi ile sonuçlandığını göstermiştir. Ancak, yeni bir çalışma *S. aureus* suşu UAMS-1 *ica* lokusunda mutasyon *in vitro* veya *in vivo* biyofilm oluşumu üzerinde çok az etkisi olduğunu göstermiştir (Conlon ve ark., 2002). Bu sonuç bizim çalışmamızla uyumludur.

Çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre, *ica* operonun bulunması ve biyofilm üretiminin fenotipik olarak gözlemlenmesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Ancak bazı suşların *icaA* ve *icaD* geni bulundurmamalarına rağmen biyofilm oluşturma yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. Bununla birlikte, *icaADBC* operonunun ekspresyonu, faz varyasyonları ve genom düzenlemeleri tarafından modülasyon ile yüksek çeşitlilik göstermektedir (Rachid ve ark., 2000; Dhanawade ve ark., 2010). Ayrıca, *ica* lokusunda meydana gelen nokta mutasyonları, PIA oluşumunu negatif regüle eden veya biyofilm oluşumuna etki eden ve nedeni henüz bilinmeyen faktörler (Cramton ve ark., 1999; Vasudevan ve ark., 2003) *ica* lokusunun kapsüler polisakkarit adhezyon genleri (PS/A) gibi çeşitli ürünleri, *in vitro* ortamdan çok *in vivo* ortamda yüksek oranda ifade etmesi (McKenney ve ark., 1999; Vasudevan ve ark., 2003) ve *in vitro* ortamda oluşabilecek stres (Fox ve ark., 2005; Oliveira ve ark., 2006) gibi faktörler biyofilm oluşumunu etkilemektedir. Biyofilm oluşumundaki çeşitliliğe bakterinin bulunduğu üretim şartlarındaki farklılıklar da katkıda bulunmaktadır. *In vitro* ortam şartlarının, konak dokusundaki şartlardan çok farklı olması, *in vitro* deneylerde besiyeri kompozisyonu (Dhanawade ve ark., 2010; Atshan ve Shamsudin, 2011), glukoz varlığı ve konsantrasyonu, pH ve hidrojen peroksit gibi birtakım faktörlerin, biyofilm oluşumunu etkilediği bildirilmektedir (Nostro ve ark., 2014).

Biyofilm oluşumundan sorumlu olarak görülen en çok çalışılmış genlerden biri olan *ica* operonu bulundurmayan suşların bile biyofilm oluşturması sürpriz değildir. *ica* lokusunda meydana gelen delesyonlar gibi insersiyon dizileri de *ica* operonunun ekspresyonunu etkileyeceğinden biyofilm oluşumuna etki etmektedir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Süt işletmelerinden alınan çevresel örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarında biyofilm oluşumunun fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi amacıyla temelde iki yöntem kullandık: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile genotipik tiplendirme ve mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm oluşumu fenotipik olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada süt işletmelerinden alınan çevresel örneklerden izole edilen 42 *S. aureus* suşundan %83,3'ünün *icaA* ve *icaD* geni pozitif bulunurken, biyofilm oluşturma oranı %98 olarak bulunmuştur. *S. aureus* suşlarından 6 tanesi biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmasına rağmen *icaA* ve *icaD* geni bulundurmamaktadır. Bu sonuçlar biyofilm oluşumunun birden fazla faktöre bağlı olduğunu ortaya koymaktadır. Biyofilm oluşumu *in vitro* çalışma ortamlarında çok değişkenlik gösterebilmektedir. Biyofilm oluşumunu hem genetik hem de çevresel faktörler etkilemektedir.

### 5.2. Öneriler

Özellikle gıda sektöründe *S. aureus* kaynaklı biyofilm oluşumu ile mücadelede biyofilm kontrol stratejilerinde yenilikçi yolların gerekliliği açıktır. Bu mikroorganizmalar basit genom yapıları nedeni ile çevreye çok çabuk adapte olabilmekte ve besin kıtlığı, sıcaklık, pH, stres gibi pek çok çevresel zorluklarla çok kolay baş edebilmektedirler. Gıda sektöründe *S. aureus* kontaminasyonu ile baş edebilmek için farklı stratejiler geliştirilmelidir. Biyofilm oluşumunun *S. aureus* bakterileri arasındaki prevalansının bu kadar yüksek olması bir epigenetik mekanizma ile jenerasyonlar arasında aktarılıyor olması olabilir. Çalışma alanları genişleterek bu sorulara cevaplar aranmalıdır.

**KAYNAKLAR**

- Akan, M., 2006, *Staphylococcus* enfeksiyonları. In: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar, Ed.: Aydın, N., Paracıkoğlu, J., Ankara: İlke-Emek Yayınları, Bölüm 2.
- Akan, E., Kınık, Ö., 2014, Biyofilm Oluşum Mekazması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi, *Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi / Journal of Food and Feed Science – Technology*, 14:42-51.
- Aksu, F., Ünver, A., Uran, H., 2011, Gıda endüstrisinde biyofilm oluşumuna bağlı riskler, 7. Gıda Mühendisliği Kongre Kitabı Syf:105.
- Alen, S., Koneman, E., Janda, W., et al., 2006, The Grampositive cocci. Part 1: *Staphylococci* and related organism. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 539-76.
- Allison, D. G., 2003, The biyofilm matrix. *Biofouling*, 19 (2): 139-50.
- Ammendolia, M. G., Di Rosa, R., Montanaro, L., Arciola, C. R. and Baldassarri, L., 1999, Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37:3235-8.
- Arnold, J. W., Silvers, S., 2000, Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation, *Poul Sci*, 79: 1215-21.
- Arciola, C. R., Baldassarri, L., Montanaro, L., 2001, Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter associated infections. *J Clin Microbiol*, 39(6):2151-6.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Montanaro, L., 2002, Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2(5):478-84.
- Atshan, S. S., Shamsudin, M. N., 2011, Evaluation of phenotypic and genotypic detection methods for biofilm-forming methicilin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Ann Microbiol*, 61:825-31.
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T. and Atroshi, F., 2004, Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences: a Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques*, 7(1), 55-64.
- Bannerman, T. L., 2003, *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase positive cocci that grow aerobically. Manual of Clinical Microbiology. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, 8th ed. Washington DC: ASM Press, 384-404.

- Barnes, L. M., Lo, M. F., Adams, M. R., Chamberlain, A. H. L., 1999, Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 65 (10): 4543-4548.
- Beenken, K. E., Dunman, P. M., McAleese, F., et al., 2004, Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186: 4665-84.
- Bilgehan, H., 2000, Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yayınları, İzmir.
- Borah, P. R., Patgiri, G. P., Boro, B. R., 1992, Bacteriological Quality of Market Park in Guwahati City, *Indian Vet. Journal*, 69: 773-775.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D. and White, D., 2003, Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336-42.
- Castelani, L., Pilon, L. E., Martins, T., Pozzi, C. R. and Arcaro, J. R. P., 2015, Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis, *Animal Science Journal*, 86, 340-4.
- Cengiz, A. T., 1999, *Staphylococcus*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1. Baskı Ed: Ustaçelebi S., Güneş Kitabevi, Ankara: 339-49.
- Chae, M. S. and Schraft, H., 2000, Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains, *Int. J. Food Microbiol*, 5;62(1-2): 103-11.
- Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F., 2003, Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Institute of Food Technologists - Vol. 2*.
- Conlon, K. M., Humphreys, H. and O’Gara, J. P., 2002, *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 184:4400-8.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M., 1995, Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49: 711-745.
- Cramton, S., Gerke, C., Schnell, N. F., Nicholson, W. W., Götz, F., 1999, The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*, 67: 5427-33.
- Cramton, S., Ulrich, E. M., Götz, F. and Doring, G., 2001, Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 69:4079-85.

- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. and Penades, J. R., 2001, Bap a, *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation, *J. Bacteriol*, 183: 2888-96.
- Cucarella, C., Tormo, M. A., Ubeda, C., et al., 2004, Role of biofilm associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 72: 2177-85.
- de Castro Melo, P., Ferreira, L. M., Filho, A. N., Zafalon, L. F., Vicente, H. I., de Souza, V., 2013, Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Braz J. Microbiol*, 44: 119-24.
- De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., et al., 2009, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2th ed. Volume 3. New York: Springer.
- Dhanawade, N. B., Kalorey, D. R., Srinivasan, R., Barbuddhe, S. B., Kurkure, N. V., 2010, Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production, in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Res. Commun*, 34: 81-9.
- Dinçer, B., 1990, "Et Mikrobiyolojisi ve Sanitasyon", Et Hijyeni ve Teknolojisi Seminer Notları, Et ve Balık Kurumu, Ankara.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W., 2002, Biofilms : Survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiol*, 15 (2): 167-93.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E., 2007, *The Prokaryotes* [electronic resource]. Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. 3th ed. New York: Springer-Verlag.
- Federal Agricultural Organization and World Health Organization, 1992, WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe 5th Report, *Inst. Vet. Med.*, Berlin, 1985-1989.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H., Smyth, E. G., Kennedy, C. A. and O'Gara, J. P., 2002, Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect* 52: 212-8.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H. and O'Gara, J. P., 2005, Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 43: 1973-6.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H. and O'Gara, J. P., 2006, Environmental regulation of biofilm development in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Hosp Infect* 62: 120-2.
- Fox, L. K., Zadoks, R. N., Gaskins, C. T., 2005, Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol*, 107: 295-9.

- Frank, K. L., Hanssen, A. D. and Patel, R., 2004, *icaA* is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection. *J Clin Microbiol* 42: 4846-9.
- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., Hirsch, A. M., 2006, A feeling for the microorganism: structure on a small scale. *Biofilms on plant roots. Bot J Linnean Soc*, 150 (1): 79-88.
- Gad, G. F., El-Feky, M. A., El-Rehewy, M. S., Hassan, M. A., Abolella, H., El-Baky, R. M., 2009, Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J. Infect Dev Ctries*; 3: 352-51.
- Genigeorgis, C., 1986, Problems associated with perishable processed meat, *Food Technol*, 4:140-54.
- Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O., Götz, F., 1998, Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin (PIA). *J. Biol. Chem*, 17;273(29): 18586-93.
- Gökalp, H. Y., Yetim, H., 1988, “Et İşleklerinde Temizlik ve Dezenfeksiyonun Önemi ve Ete Bağlı Gıda Zehirlenmeleri”, *Et ve Balık End. Derg.*, 9 (54): 34-44.
- Götz, F., 2002, *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology* 43(6), 1367-78.
- Greenberg, E. P., Costerton, J. W., Stewart, P. S., 1999, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284:1318-22.
- Gugliandola, C., Maugeri, T. L., Cacamo, D., Stackebrandt, E., 2003, *Bacillusaeolius* sp. Nov a Novel Thermophilic, Holophilic Marine Bacillus Species from Eolian Islands (Italy), *Systematic and Applied Microbiology*, 26/2, 172-6.
- Gün, İ. ve Ekinçi, F. Y., 2009, Biyofilmler: Yüzerlerdeki Mikrobiyal Yaşam, (Derleme / Review) *GIDA*, 34 (3): 165-73.
- Heilmann, C., O. Schweitzer, C., Gerke, N., Vanittanakom, D., Mack, and F., Götz., 1996, Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20: 1083–91.
- Heilmann, C., and Götz, F., 1998, Further characterization of *Staphylococcus epidermidis* transposon mutants deficient in primary attachment or intercellular adhesion. *Zentbl. Bakteriologie*. 287: 69-83.
- Hussain, M., Wilcox, M. H., White, P. J., 1993, The slime of coagulase negative *Staphylococci*: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol.*10: 191-207.
- ISO 18593:2004, 2013, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.

- İnal, T., 1992, “Hayvansal Gıdaların Sağlık Kontrolü”, Final Ofset, İstanbul.
- Jefferson, K. K., Pier, D. B., Goldmann, D. A. and Pier, G. B., 2004, The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186:2449–2456.
- Jessen, B. and Lammert, L., 2003, Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 265-9.
- Kaplan, J. B., Rangunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H. and Ramasubbu, N., 2004, Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 2633-6.
- Kımk, Ö., Gönç, S., Akalın, A.S., 1998, “Çiğ sütte patojen mikroorganizmalar”, Uluslararası sütçülük federasyonu (IDF) Yayını, 1. basım, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 21- 44.
- Kives, J., Orgaz, B., SanJosé, C., 2006, Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids Surfaces B*, 52: 123-7.
- Klausen, M., Jorgensen, A. A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003, Involvement of Bacterial Migration in The Development of Complex Multicellular Structures in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Mol Microbiol*, 50(1): 61-8.
- Knobloch, J. K., Horstkotte, M. A., Rohde, H. and Mack, D., 2002, Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 191: 101-6.
- Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A. and Jabbouri, S., 2006, Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol Lett* 255: 11-6.
- Kolter, R., Tormo, A., 1993, The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 855-74.
- Kumar, C. G., Anand, S. K., 1998, Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J. Food Microbiol*, 42: 9–27.
- Kutlu, S.B., 2006, Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metsilin Direnci ve E-Test ile Vankomisin MIC Değerlerinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, 21: 4231-4.
- Lasa, I., Penades, J. R., 2006, Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol*, 157: 99-107.

- Leone, S., Molinaro, A., Alfieri, F., Cafaro, V., Lanzetta, R., Donato, A., Parrilli, M., 2006, The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr Res*, 341: 2456-61.
- Lindsay, D., Brözel, V. S., Mostert, J. F., Von Holy, A., 2002, Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate *J Appl Microbiol*, 92: 352-61.
- Lindsay, D., Von Holy, A., 2006, Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*, 1-13.
- Longree, K., 1972, *Quantity Food Sanitation*. Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H. and Laufs, R., 1996, The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol*, 178: 175-183.
- Mafu, A. S., Roy, D., Goulet, J., 1990, Magny P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *J Food Prot*, 53: 742-6.
- Maira-Litran, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., III, Goldmann, D. A. and Pier, G. B., 2002, Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun*, 70: 4433-40.
- Marshall, K. C., 1976, "Interfaces in microbial ecology", Cambridge, MA: *Harvard University Press*, 44-7.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T. and Saarela, M., 2003, Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 327-56.
- McKenney, D., Pouliot, K. L., Wang, Y., et al., 1999, Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science*, 284: 1523-7.
- Melchior, M. B., van Osch, M. H., Graat, R. M., 2009, Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agrtype II strains. *Vet Microbiol*, 137: 83-9.
- Mıdık F., Tokatlı M., Özçelik F., 2011, Laktik asit bakterileri tarafından üretilen ekzopolisakkaritler ve üretimini etkileyen faktörler. Syf: 106.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., 2012, Medical Microbiology, with student consult Online Access. 7: Medical Microbiology. *Elsevier Health Sciences*, 174-87.

- Nakazawa, Y., Hosono, A., 1992, Functions of Fermented Milk. Elsevier Science Published Ltd. 245 s, New York.
- Nostro, A., Cellini, L., Ginestra, G., et al., 2014, *Staphylococcal* biofilm formation as affected by type acidulant. *APMIS*, 122: 648-53.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S. F., et al., 2006, Biofilmforming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol*, 118: 133-40.
- O’Gara, J. P., 2007, *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 270: 179-88.
- O’Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Smyth, D., Humphreys, H., Robinson, D. A. and O’Gara, J. P., 2007, Association between methicillin susceptibility and biofilm regulation in *Staphylococcus aureus* isolates from device-related infections, *J Clin Microbiol*, in press.
- O’Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R., 2000, Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol*, 54: 49-79.
- Ölmez, Z., 2009, Süt sanayisinde biyofilm Oluşturan mikroorganizmalar ve biyofilm oluşumunun önlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Dordet-Frisoni, E., Bellon-Fontaine, M. N., Leroy, S., Labadie, J., Hébraud, M., Talon, R., 2006, Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. *Int J Food Microbiol*, 109: 88-96.
- Poulsen, L. V., 1999, Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. Wiss. u. Techn.*, 32 (6): 321-6.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W., 2000, Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 3357-63.
- Ramesh, H. P. and Tharanathan, R. N., 2003, Carbohydrates the Renewable Raw Materials of High Biotechnological Value, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23: 149-73.
- Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V., Keevil, C. W., 1994, Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl Environ Microbiol*, 60: 1842-51.
- Rohde, H., Kalitzky, M., Kroger, N., et al., 2004, Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* 42: 5614-9.

- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., et al., 2005, Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* 55: 1883-95.
- 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. *Bacteriol*, 184: 1140-54.
- Schleifer, K. H. and Bell, J. A., 1986, “*Staphylococcus*.” *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
- Sinde, E. and Carballo, J., 2000, Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17: 439-47.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M., 2000, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40, 175-9.
- Stepanovic, S., Djukic, N., Djordjevic, V. and Djukic, S., 2003, Influence of the incubation atmosphere on the production of biofilm by staphylococci. *Clin. Microbiol. Infect.* 9:955-8.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002, Biofilms as complex differentiated communities, *Annu Rev Microbiol*, 56, 187-209.
- Sutherland, I. W., 1998, Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides, *Tibtech.*, 38: 41-7.
- Szczuka, E., Urbańska, K., Pietryka, M., Kaznowski, A., 2013, Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia Microbiol (Praha)*, 58: 47-52.
- Szweda, P., Schielmann, M., Milewski, S., Frankowska, A., Jakubczak, A., 2012, Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland. *Pol J. Microbiol*, 61: 65-9.
- Şahin, R., 2007, *Staphylococcus aureus* suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. [Tıpta uzmanlık tezi]. Denizli: Pamukkale Üniversitesi, 14-23.
- Tormo, M. A., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I., Penades, J. R., 2005, Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer. *Microbiology*, 151: 2465-75.
- Trachoo, N., 2003, Biofilms and the food industry. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 25 (6): 807-15.

- Trotonda, M. P., Manna, A. C., Cheung, A. L., Lasa, I. and Penades, J. R., 2005, SarA positively controls bap-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187: 5790-8.
- Tunail, N., 2000, "Mikrobiyal Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar", Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, A. Ü. Zira. Fak. Gıda Mühen., 2. baskı., Sim Matbaacılık, Ankara, 82-8.
- Tükel, Ç., Doğan, H. B., 2000, *Staphylococcus aureus*. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Sim Matbaacılık, Ankara, ss. 357-66.
- Tünger, A., 2004, *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Ulusoy, S., Usluer, G., Ünal, S., Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 9-68.
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J. M., Amorena, B., Penades, J. R. and Lasa, I., 2003, SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*, *Mol Microbiol* 48: 1075-87.
- Vasudevan, P., Nair, M. K., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K. S., 2003, Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*, 92: 179-85.
- Vitko, N. P. and Richardson, A. R., 2013, Laboratory Maintenance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Curr Protoc Microbiol*; 0 9: Unit-9C.2. doi:10.1002/9780471729259.mc09c02s28.
- Vuong, C. and Otto, M., 2002, *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect*, 4: 481-9.
- Zhang, K., Sarling, J., Chow, B. L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D. L., Gregson, D. B., Louie, T. and Conly, J. M., 2004, New quadruplex PCR assay for detection of methicillin resistance and simultaneous discrimination of *S. aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4947-55.
- Zhao, P., Zhao, T., Doyle, M. P., Rubino, J. R. and Meng, J., 1998, "Development of a Model For Evaluation of Microbial cross-contamination on the kitchen", *J. Food Ptor.*, 61(8): 960-3.
- Ziebuhr, W., Heilmann, C., Götz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E. and Hacker, J., 1999, Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* 65: 890-6.
- Waldvogel, F. A., 2000, "*Staphylococcus aureus*", including toxic shock syndrome 5th ed., In Mandell, G., Bennet, J. E., Dolin, R., (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Churchill Livingstone New York, 2069-92.
- Wong, A. C. L., 1998, Biofilms in food processing environments. *J. Dairy Sci.*, 81: 2765-70.

**İnternet Kaynakları**

1) <https://tr.wikipedia.org/wiki/Stafilokok> (12.07.2016)

2) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (17.08.2016)

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Fadimana KAYA  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Konya 28.02.1990  
**Telefon** : 05456381893  
**e-mail** : fadimana.kaya@gmail.com

### EĞİTİM

<b>Derece</b>	<b>Adı, İlçe, İl</b>	<b>Bitirme Yılı</b>
Lise	: Meram Konya Lisesi, Meram, Konya	2008
Üniversite	: Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas	2013
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Konya	2016

### İŞ DENEYİMLERİ

<b>Yıl</b>	<b>Kurum</b>	<b>Görevi</b>
Şubat-2016	Afyon Kocatepe Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

### YABANCI DİLLER

İngilizce - Upperintermediate