



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDA
İCAA VE İCAD GENLERİNİN VE BİYOFİLM
ÜRETİMİNİN TESPİTİ

Burcu ESKİCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

AĞUSTOS-2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Burcu ESKİCİ tarafından hazırlanan “SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA *ICA*A VE *ICAD* GENLERİNİN VE BİYOFİLM ÜRETİMİNİN TESPİTİ” adlı tez çalışması 06/08/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. Mustafa Onur ALADAĞ

Danışman

Doç. Dr. Emrah TORLAK

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU

İmza

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet KARALI
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.

Burcu ESKİCİ

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜT ÜRÜNLERİNDEN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA *ICA*A VE *ICA*D GENLERİNİN VE BİYOFİLM ÜRETİMİNİN TESPİTİ

Burcu ESKİCİ

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

Danışman: Doç. Dr. Emrah TORLAK

2018, 57 Sayfa

Jüri

**Doç. Dr. Emrah TORLAK
Doç. Dr. Mustafa Onur ALADAĞ
Dr. Öğr. Üyesi Ali Tefik UNCU**

Staphylococcus aureus gıda zehirlenmeleri başta olmak üzere toplum ve hastane kaynaklı hastalıklarda etken olan önemli bir mikroorganizmadır ve biyofilm yapımı gibi birçok önemli virülans faktörüne sahiptir.

Biyofilm bakterilerin çevre koşulları ya da diğer hücrelerden aldıkları sinyaller doğrultusunda hareketli yaşam formlarından yüzeye tutulu durağan yaşam formlarına geçişte hücre dışına salgıladıkları polisakkaritler, proteinler, hava, su, DNA ve çeşitli sinyal moleküllerinden oluşan kompleks bir yapıdır. Bu yapıda yer alan moleküller hücrelerin yüzeye tutunmaları, yaşamlarını sürdürmeleri, hücreler arası iletişimin kurulması, gen aktarımı, fagositoz ve antibiyotik direnci gibi mekanizmaların başlatılması ve düzenlenmesinden sorumludurlar. Biyofilmin yapısında önemli bir parça olan polisakkarit interselüler adezinin (PIA) sentezlenmesini sağlayan enzimler ve yapısal genler *ica* operonunda kodlanır. *Ica* lokusunun genlerinin (*icaADBC*) PIA yapımında yer aldığı gösterilmiştir. PIA, bakterilerin yüzey ve hücreler arası tutunmayı sağlayarak çoklu biyofilm tabakası oluşturmasını sağlar.

Bakteriyel biyofilm kaynaklı kontaminasyonlar gıda güvenliği açısından büyük risk oluşturmaktadır. Bu çalışmada süt ürünlerinden izole edilen 44 *S. aureus* suşunda biyofilm oluşturma yeteneği ve bu suşlarda biyofilm üretimiyle doğrudan ilişkili olduğu düşünülen *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı araştırılmıştır.

Kongo kırmızısı agarda fenotipik ekspresyon analizine göre *S. aureus* izolatlarının %52'si biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Bununla birlikte, izolatların %90'ının spektrofotometrik ölçümlere dayanan kristal viyole testi ile bu fenotipi gösterdiği görülmüştür. İzolatların çoğunluğunun (%98) *icaA* geni taşıdığı saptanmıştır. Ayrıca *icaA* ve *icaD* genleri 42 *S. aureus* suşunda (%95) tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini incelemek için fenotipik ve genotipik testlerin birlikte kullanılması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, biyofilm, süt ürünleri, *ica* genleri.

ABSTRACT

MS THESIS

DETECTION OF *ICA*A AND *ICA*D GENES AND BIOFILM PRODUCTION IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM MILK PRODUCTS

Burcu ESKİCİ

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

2018, 57 Pages

Jury

Assoc. Prof. Emrah TORLAK
Assoc. Prof. Mustafa Onur ALADAĞ
Asst. Prof. Ali Tevfik UNCU

Staphylococcus aureus is an important microorganism that causes foodborne illnesses, especially in community and hospital-borne diseases, and constitutes many important virulence factors such as biofilm production.

Biofilm is a complex structure composed of polysaccharides, proteins, air, water, DNA, and various signal molecules that bacteria secrete out of the cell in the transition from moving life forms to surface-attached static forms in the direction of the signals from the environment or other cells. Molecules involved in this structure are responsible for the initiation and regulation of mechanisms such as cell adhesion, survival, cell-to-cell communication, gene transfer, phagocytosis and antibiotic resistance. Enzymes and structural genes that enable polysaccharide intercellular adhesin (PIA) synthesis, an important part of the biofilm structure, are encoded in the *ica* operon. It has been shown that the genes of the *ica* locus (*ica*A*DB*C) are involved in PIA construction. PIA allows bacteria to form multiple biofilm layers by providing adherence between surfaces and cells.

Contamination from bacterial biofilm poses a great risk for food safety. In this study, the biofilm production ability and the presence of the *ica*A and *ica*D genes, which are thought to be directly related to biofilm production, were investigated in 44 *S. aureus* strains isolated from milk products.

According to the analysis of phenotypic expression on congo red agar, 52% of the *S. aureus* isolates have the ability to produce biofilm. However, 90% of the isolates showed this phenotype with a crystal violet test based on spectrophotometric measurements. Majority (98%) of the isolates were found to carry *ica*A gene. It was also shown that the *ica*A and *ica*D genes were detected in 42 (95%) strains of *S. aureus*. The results of this study indicate that a combination of phenotypic and genotypic assays is recommended for examining biofilm formation in *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, biofilm, milk products, *ica* genes.

ÖNSÖZ

Bu çalışmamda desteğini ve hoşgörüsünü hiçbir zaman benden esirgemeyen değerli danışmanım Doç. Dr. Emrah TORLAK'a, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak süreçte yanımda olan Arş. Gör. Dr. Fatih ERCİ'ye, donanım ve destekleriyle katkıda bulunan Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU'ya, eğitimimiz ve çalışmalarımız boyunca arkadaşlığını ve yardımlarını esirgemeyen Fadimana KAYA'ya, maddi ve manevi varlıkları nedeniyle haklarımı ödeyemeceğim kıymetli babama, anneme ve her zaman yanımda olan abim Burak ESKİCİ'ye teşekkürü borç bilirim.

Burcu ESKİCİ
KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	3
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> Virulans Faktörleri	4
2.1.1. Hemolizinler	5
2.1.2. Lökotoksinler	6
2.1.3. Stafilokokal Eksfoliyatif Toksinler (ET'ler)	7
2.1.4. Toksik Şok Sendrom Toksini-1 (TSST-1)	7
2.1.5. Stafilokokal Enterotoksinler (SE'ler).....	7
3. BİYOFİLM	9
3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> Biyofilmleri.....	11
3.2. Ekstraselüler Polimerik Maddeler.....	11
3.2.1. Biyofilm Oluşumunun Düzenlenmesinde EPS'nin Rolü.....	14
3.2.2. EPS Üretiminin Kontrolü	15
3.2.3. Ekzopolisakkaritler	17
3.2.4. Ekstraselüler Proteinler	19
3.2.5. eDNA.....	21
3.2.6. Polisakkarit İnterselüler Adezin (PIA).....	21
3.3. Biyofilm Oluşumu.....	22
3.3.1. Biyofilmlerin Yönetilmesinde Temel Prensipler	23
3.4. Süt Ürünlerinde <i>S. aureus</i> Varlığı.....	27
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
4.1. Süt Ürünleri Örnekleri	29
4.2. Kültür Koşulları.....	29
4.3. Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi	29
4.4. Kristal Viyole Boyama Yöntemi	29
4.5. <i>İcaA</i> ve <i>İcaD</i> Genlerinin PCR ile Tespiti.....	30
5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	32
5.1. Araştırma Sonuçları	32
5.2. Tartışma	36

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ.....	57



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bp	:	Baz çifti
°C	:	Santigrat derece
g	:	Gram
dk	:	Dakika
kb	:	Kilobaz
L	:	Litre
µL	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
mM	:	Milimolar
ng	:	Nanogram
s	:	Saniye

Kısaltmalar

ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dNTP	:	Deoksiribonükleosid trifosfat
KCl	:	Potasyum klorür
KRA	:	Kongo red agar
KV	:	Kristal viyole
MgCl ₂	:	Magnezyum klorür
OD	:	Optik yoğunluk
PBS	:	Fosfat buffer salin
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
TSB	:	Triptik soy broth

1. GİRİŞ

Staphylococcus aureus insanlarda çeşitli hastalıklara ve ölüme neden olan patojen bir bakteridir. *S. aureus* deri ve yumuşak dokuları enfekte edebilir ve sistemik enfeksiyonlar, bakteremi, pnömoni, endokardit, osteomyelit, sepsis ve toksik şok sendromu (TSS) gibi hastalıklara yol açarak yayılcı hale gelebilir. *S.aureus* ayrıca sık rastlanan komensal bakteridir ve çoğunlukla herhangi bir hastalığa neden olmaksızın insan nazal mikrobiyomunun parçasıdır. *S. aureus* *Micrococcae* ailesinden Gram pozitif bir bakteridir. Ağırılıkça yaklaşık %50 peptidoglikan (PGN)'dan oluşan kalın bir hücre duvarına sahiptir. Bir komensal olmasına rağmen *S. aureus* mikrokapsüller, toksinler ve patojeniteye katkıda bulunan ilaç direnci genleri gibi çeşitli virülans faktörleriyle donatılmıştır (Lowy, 1998).

Biyofilm, bir yüzeye ya da birbirlerine tutunarak hücre dışı polimerik madde (EPS) içine gömülmüş bakteriyel hücrelerin oluşturduğu bir yaşam formudur. Makroskobik olarak opak yapıda, ortalama 100-500 µm kalınlığında, koşullara göre değişen boyutta, kaygan, pürüzsüz ve giderilmesi zor bir yapıdır (Donlan, 2002). Bir biyofilm farklı katmanlara ve bu katmanlar içinde birbirlerine tutunmuş ve EPS matrisine gömülü, büyüme, gen ekspresyonu ve protein üretimi ile ilgili olarak farklı fenotip sergileyen hücreler tarafından temsil edilen mikrobiyal kökenli sesil bir topluluk olarak tanımlanabilir (Donlan ve Costerton, 2002).

Biyofilm kalınlığı tek bir hücre tabakasından yapışkan polimerik matris içine hapsedilmiş çok sayıda hücre tabakasına kadar değişiklik gösterebilir (Costerton ve ark., 1995). Yapısal analizler biyofilmlerin mikrokoloni mimarisinin bazı durumlarda özgün sütun ya da mantar şekilli yapılar oluşturabildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, çevresel koşullara bağlı olarak farklı yapılar şekillenebilir. Biyofilm oluşturma yeteneği temel olarak hücrelerin bir yüzeye tutunma ve çok katmanlı hücre sınıfları oluşturma gücüne bağlıdır. Stafilokoklarda biyofilm oluşumunun genetik ve moleküler temeli oldukça komplekstir. Karmaşık kanal ağları bu kompleks yapı boyunca uzanır ve biyofilmin en derin bölgesindeki hücrelerin besinlere ulaşabilmesini sağlar (Costerton ve ark., 1995).

Gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bakteriyel kontaminasyon insan sağlığını etkileyen en önemli gıda güvenliği konularından biridir. *S. aureus* çeşitli gıdalarda kolaylıkla çoğalabilir ve enteretoksinler sentezleyerek gıda

zehirlenmelerine neden olabilir. Gıda kaynaklı stafilokokal enteretoksinlerin neden olduğu en yaygın semptomlar bulantı, kusma, ishal ve kramplardır. Stafilokokal enteretoksinlerin yalnızca bir kaç mikrogramı immün yetersiz bireylerde stafilokokal gıda zehirlenmesine neden olmaya yeterli bulunmuştur. Çocuklarda 100 ng düzeyinde stafilokokal enteretoksinin kan dolaşımına karışmasının stafilokokal gıda zehirlenmesine neden olduğu bildirilmiştir (Balaban ve Rasooly, 2000). Stafilokokal gıda zehirlenmeleri ABD'deki gıda zehirlenmelerinin üç yaygın tipinden biridir. ABD'deki tüm gıda kaynaklı hastalıkların yaklaşık %25'inin stafilokokal zehirlenmeden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Boothby ve ark., 1979; Liebl ve ark., 1987; Post, 1999).



2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus, *Micrococcae* ailesinden Gram pozitif bir bakteridir ve ağırlığının yaklaşık yarısı PGN'den oluşan kalın bir hücre duvarına sahiptir. *S. aureus* mikrokapsüller, toksinler ve patojeniteye katkıda bulunan ilaç direnci genleri gibi çeşitli virülans faktörlerine sahiptir. *S. aureus* kümelenme eğilimli düzenlenen üzüm salkımı olarak tanımlanan kok şeklindedir. Besiyerinde %10 tuz konsantrasyonunda çoğalabilir ve genel amaçlı besiyerlerinde sıklıkla altın sarısı renkte koloniler oluştururlar. Aerobik ya da anaerobik olarak 18-40°C sıcaklık aralığında çoğalabilir. Tipik biyokimyasal tanımlaması katalaz, koagülaz ve mannitol fermentasyonu testlerini içerir (Moormeier ve Bayles, 2017).

S. aureus sağlıklı bireylerin normal florasında, deri üzerinde ve mukoz membranlarda bulunur. Tüm yetişkinlerin yarısına yakınında kolonize olduğu ve popülasyonun yaklaşık %15'inin ön burun bölgesinde devamlı olarak *S. aureus* taşıdığı bildirilmiştir. Sağlık çalışanları, hastanede yatan hastalar ve immünitesi zayıflamış bireyler gibi bazı popülasyonlar *S. aureus* kolonizasyonuna yüksek oranda eğilimlidirler. *S. aureus* kişiden kişiye doğrudan temasla, gıda kaynaklı veya enfeksiyonla teması olan ve enfeksiyonu nakletme özelliği gösteren herhangi bir cisimle taşınabilir. *S. aureus* normal şartlar altında sağlıklı insan derisinde enfeksiyona neden olmamaktadır. Bununla birlikte, kan akışına karışması ya da derinlerdeki dokulara ulaşması durumunda çeşitli ciddi enfeksiyonlara neden olabilir (Lowy, 1998).

S. aureus insan için dünya çapında klinik hastalık belirtilerine neden olan önemli bir patojendir. *S. aureus* insanlarda en yaygın bakteriyel enfeksiyon etkenlerinden biridir ve bakteremi, infektif endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (İmpetigo, folikülit, fronkül, karbunkül, selülit, haşlanmış deri sendromu ve diğerleri), osteomyelit, septik artrit, protez aracı enfeksiyonları, pulmoner enfeksiyonlar (Pnömoni ve ampiyem), gastroenterit, menenjit, TSS ve üriner sistem enfeksiyonlarını içeren çoklu enfeksiyonlara neden olmaktadır. Enfeksiyonun yeri ve suşa bağlı olarak yayılma gösteren enfeksiyonlara veya toksin ilişkili hastalıklara neden olabilir. *S. aureus*'un toplumdan edinilen, gıda kaynaklı ve hastane kaynaklı enfeksiyonları yaygındır. Çoklu ilaç direncine sahip suşların ortaya çıkması nedeniyle bazen enfeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşılmaktadır (Moormeier ve Bayles, 2017).

S. aureus'un patofizyolojisi enfeksiyonun tipine bağlı olarak büyük oranda çeşitlilik gösterir. Konak immün cevabından kaçış mekanizmaları bir antifagositik kapsül üretimi, konak antikorlarını bloke etme, Protein A tarafından antijen maskelenmesi, biyofilm üretimi, hücre içi hayatta kalma ve lökositlerin kemotaksisini engellemeyi içermektedir. Bakterinin infeksiyöz endokardit içinde fibronektin ve ekstraselüler matris proteinlerine bağlanması fibrinojen-bağlayıcı proteinler, kümelenme faktörleri, teikoik asitler gibi bakteriyel hücre duvarı ilişkili proteinler tarafından düzenlenmektedir. Ayrıca stafilokokal süperantijenler (TSST-1 ya da toksik şok sendromu toksini 1) infeksiyöz endokardit, kan zehirlenmesi ve TSS'de önemli virülans faktörlerdir. Pnömoni enfeksiyonları Panton-Valentine lökositidin (PVL), Protein A ve alfa hemolizin ile ilişkilidir. Protez enfeksiyonları ise *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneği ve bakteriyel hücre yoğunluğuna bağlı olarak şekillenen quorum sensing iletişimi ile düzenlenir (Betley ve ark., 1990).

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları bakteriyel kromozomlarında *mec* genini taşırlar. Bu gen çoklu antibiyotik direnci sağlayan büyük Stafilokokal kromozomal kaset *mec* (SCC*mec*) bölgesi bileşenidir. *mec* geni penisilin-bağlayıcı Protein 2a (PBP-2a) proteinini kodlar. Hücre duvarı enzimi olarak tanımlanan PBP-2a penisilin bağlayıcı bir proteindir ve bakteriyel hücre duvarında peptidoglikan sentezini katalizler. PBP-2a diğer penisilin bağlayıcı proteinlerle karşılaştırıldığında beta-laktamlara düşük afinite ile bağlanır. Bu yüzden PBP-2a birçok antibiyotığın varlığında dahi bakteriyel hücre duvarının sentezini katalizlemeye devam eder. Sonuç olarak PBP-2a sentezleyen *S. aureus* suşları birçok antibiyotik varlığında çoğalabilir. MRSA suşları metisilin, nafsilin, oksasilin ve sefalosporinlere karşı dirençli olma eğilimindedir (Lowy, 1998; Moormeier ve Bayles, 2017).

2.1. *Staphylococcus aureus* Virülans Faktörleri

S. aureus'un konak immün yanıtlarına rağmen canlı kalması ve çeşitli hastalıklara neden olması çok çeşitli virülans bileşenlerine sahip olması ile açıklanabilir. *S. aureus* enfeksiyonlarının patogenezi konak dokuya bakteriyel bağlanma, çeşitli ekstraselüler toksin serilerinin salınması ve konak hücre ve dokuların yapısını bozan, konak immün savunmasının kapasitesini kısıtlayan, kaçmalarını kolaylaştıran, konak hücrelerde yayılma ve büyümeyi sağlayan yüzey proteinlerine bağlıdır (Lowy, 1998).

Toksinler *S. aureus* tarafından erken durağan ve artan çoğalma sonrası fazlar boyunca ekstraselüler matrisle salgılanan proteinlerdir. Bu proteinler genellikle dokuya nüfuz etme ve konakta bakterinin istilasını sağlamaktadır. Bunlar ayrıca sitolitikler ve parçalanmış hücrelerden demir gibi önemli besin unsurlarını toplayarak bakteri gelişimine yardımcı olurlar. *S. aureus* tarafından salgılanan en yaygın toksinler hemolizin, lökotoxin, eksfoliyatif toksin, enteretoksin ve TSST-1'dir (Betley ve ark., 1990).

Toksinlerin dışında stafilkokal virülans faktörleri, enzimleri ve yüzey proteinlerini de içermektedir. Koagülaz, proteaz ve stafilokinaz gibi enzimler bakterinin konak savunmasından kurtulmasına, konak dokuya yerleşmesine ve yayılmasına yardım eder. Bu enzimlerin çoğu konak moleküllerin degradasyonu ya da konağın metabolik yollarını ve sinyal kaskadlarını keserek işlev görürler (McAdow ve ark., 2012; Jusko ve ark., 2014). Bunların yanı sıra *S. aureus* yüzey proteinleri (kümelenme faktörleri, fibronektin proteinleri, protein A, kollajen adezin) bakteriyel adezyon, dokuya yayılma ve konak savunmasından kaçmaya yardımcı olmaktadır (Foster ve ark., 2014).

2.1.1. Hemolizinler

Hemolizinler kırmızı kan hücrelerini parçalayan toksinlerdir ve aktivitelerini genellikle reseptör aracılığı ile gerçekleştirirler. Hemolizinlerin alfa, beta ve gama hemolizinleri içeren birçok sınıfları vardır. Delta hemolizin fenolde çözülen modulin (PSM) olarak tanımlanmıştır ki hemolitik aktivitesi için reseptör gerektirmez (Valeva ve ark., 1997).

Alfa hemolizin stafilkokal hemolizinlerin en çok çalışılanıdır. Bu sitotoksin kırmızı kan hücrelerini ve lökositleri protein içerikli reseptör yoluyla ADAM10, bir disintegrin ve metalloproteinaza bağlanarak parçalar (Valeva ve ark., 1997; Wilke ve Wardenburg, 2010). Kan zehirlenmesinde, myeloid hücreler ve plateletlerde alfa toksinin birlikte aktivitesinin konak hayvanları öldürdüğü ve ADAM10 knockout modellerde bu toksinin lethal etkisinden korunulduğu bildirilmiştir (Powers ve ark., 2015). Toksinin reseptöre bağlanması hücre zarında por oluşumu ve kalsiyum iyonlarının içeri alınıp potasyum iyonlarının dışarı verilmesine neden olur ve bu hasar sonucunda nekrotik hücre ölümü gerçekleşir (Valeva ve ark., 1997).

Beta hemolizin por oluşturmeyen ve sfingomyelinaz olarak karakterize edilen toksindir. Bu toksin sfingomyelini hidrolize eder ve monositleri parçalar. Ancak düşük sıcaklıkta yalnızca eritrositleri parçalar ve lenfositler ve granulositler için sitolitik değildir (Walev ve ark., 1996). Toksinlerin hedef hücreleri bilinmesine rağmen etki mekanizmaları halen yeterince açıklanamamıştır. Yaygın olarak kabul edilen mekanizma beta hemolizinin sfingomyelin üzerine aktivitesidir. Toksinin hücre plazma membranının lipid çift tabakasını destabilize ettiği ve plazma membran akışkanlığında düzensizliğe neden olduğu düşünülmektedir (Vandenesch ve ark., 2012).

Gama hemolizin tavşan eritrositi için hemolitikdir ve membran hasar aktivitesi lökositlerde (nötrofil, monosit, granulosit ve makrofajlar) de gözlenmiştir (Vandenesch ve ark., 2012). Bu grup hemolizinler S (slow, HIgA ya da HIgC) ve F (fast, HIgB) olarak tanımlanan polipeptidlerden oluşmaktadır. S bileşenlerinin toksinlerin hücre tipine hassasiyetle etki ettiği düşünülmektedir. F bileşeninin konak hücrelerde fosfatidilkolini hedef aldığı, S bileşeninin ise bu esnada konak hücre membranına bağlandığı ve hücre parçalanmasına neden olduğu belirtilmiştir (Meyer ve ark., 2009).

PSM'ler (delta hemolizin, PSM α 1-4, PSM mec , PSM β 1-2) bazı *S. aureus* suşları tarafından üretilen stafilokokal patogeneizde çok fonksiyonlu peptidlerdir. Eritrositler, çeşitli organeller, bakteriyel protoplastlar ve sferoplastlar için hemolitiklerdir (Verdon ve ark., 2009). Amfipatik özelliğe sahip bu peptidler küçük boyutta moleküllerdir ve lipidlere karşı yüksek afinite gösterirler. (Vandenesch ve ark., 2012). *S. aureus* PSM α 'nın nötrofilleri fagositoz sonrasında parçaladığı ve biyofilm oluşumuna katkı yaptığı gösterilmiştir (Otto, 2014).

2.1.2. Lökotoksinler

Lökotoksinler beyaz kan hücrelerini parçalar ve reseptörlere ihtiyaç duyarlar. Bununla birlikte, lökotoksin reseptörlerinin birçoğu henüz karakterize edilmemiştir. Bu grup toksinler çift bileşenli Luk toksin ailesine dahildir (Otto, 2010). LukS-PV ve LukF-PV reseptörleri TLR2 ve TLR4, LukED reseptörleri CCR5, PVL ve LukAG/GH reseptörleri ise C5aR, C5L2 ve CD11b olarak bildirilmiştir. Lipidler LukS ve LukF için ortak reseptörler olarak kabul edilmektedir (Vandenesch ve ark.,

2012). PVL'nin toplumdan edinilen MRSA enfeksiyonlarıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Otto, 2010).

2.1.3. Stafilokokal Eksfoliyatif Toksinler (ET'ler)

Stafilokokal eksfoliyatif toksinler (ET'ler) ağırlıklı olarak yeni doğan ve küçük çocukları etkileyen stafilokokal haşlanmış deri sendromuna (SSSS) neden olan serin proteazlardır. Etkilenen bireyler deride kabarcık ve yüzeysel deri tabakalarında kayıp, dehidrasyon ve ikincil enfeksiyonlar yaşarlar (Bukowski ve ark., 2010).

Diğer *S. aureus* toksinlerinden farklı olarak, eksfoliyatif toksinlerin etki biçimi kesin olarak açıklanmıştır. ET'ler desmoglein 1 proteinini hedef alır ve bu proteini parçalayarak dezmozomal hücre tutunmasını yıkar ve epidermisin ayrılmasına neden olur (Eyre ve Stanley, 1987; Hanakawa ve ark., 2002). Epidermal tabakanın bozulması enfeksiyonun ilerlemesini kolaylaştırır. ET'ler TSST-1 gibi diğer süperantijenlerle karşılaştırıldığında daha zayıf süperantijenlerdir (Monday ve ark., 1999).

2.1.4. Toksik Şok Sendrom Toksini-1 (TSST-1)

SEF (stafilokokal enterotoksin F), TSST-1 (toksik şok sendrom toksin-1) olarak yeniden adlandırılmıştır (Betley ve ark., 1990). Bu toksini kodlayan genin yalnızca sınırlı sayıda *S. aureus* suşu tarafından taşındığı bildirilmiştir.

TSST-1'in etkisi T-hücre proliferasyonuna bağlı değildir. TSST-1'in IL-8 ve MIP-3 α , IL-2 ve TNF α gibi kemokinlerin salınımını uyardığı rapor edilmiştir (Otto, 2014; Stach ve ark., 2014). İmmün hücrelerin aktivasyonu inflamasyonu genişleterek mukozal hücre bariyerlerinin yıkımına ve toksin ile T-hücreleri ve makrofajların etkileşimine izin vererek toksik şok sendromuna neden olmaktadır (Larkin ve ark., 1982).

2.1.5. Stafilokokal Enterotoksinler (SE'ler)

İnsanlarda kusma ve ishale sebep olan stafilokokal enterotoksinler (SE'ler) gıda kaynaklı hastalıkların en yaygın nedenidir. Enterotoksijenik *S. aureus* suşları tarafından gıdalarda oluşturulan bu toksinler sıcaklığa dayanıklıdır ve dolayısıyla pişirme işlemleriyle parçalanmazlar. Günümüzde antijenik heterojenitelerine göre 20'den fazla stafilokokal enterotoksin tanımlanmıştır (SEA-SE/V) (Hennekinne ve ark., 2012).

Stafilokokal enterotoksinler süperantijenlerdir ve T-hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu tetiklerler. Etki mekanizmalarının salınan sitokinlerin aktivasyonu, apoptoz yoluyla hücre ölümü ve potansiyel lethal toksik şok sendromunu içerdiği düşünülmektedir. Stafilokokal enterotoksinlerin süperantijenik etki mekanizmaları iyi karakterize edilmesine rağmen kusma ve ishali başlatan etki biçimleri henüz tam olarak açıklanmamıştır (Lin ve ark., 2010; Balaban ve Rasooly, 2000).

Stafilokokal enteretoksin ailesi genel yapı, etki mekanizması ve sekans homolojisine sahip 20'den fazla farklı stafilokokal enteretoksini içermektedir. Günümüzde SEA, SEB, SEC, SED ve SEE'yi içeren farklı serolojik niteliklere sahip 23 enteretoksin tanımlanmıştır. Bu toksinler yaklaşık 220-240 aminoasitten oluşan ve benzer moleküler ağırlığa (25-30 kDa) sahip proteinlerdir (Schlievert ve Case, 2007). Gıdalardan en yaygın izole edilen stafilokokal enteretoksinler SEA ve SEB'dir. SEA stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmelerine en sık neden olan enteretoksindir (Pinchuk ve ark., 2010). SEB gıda zehirlenmelerine neden olmasının yanı sıra potansiyel bir biyolojik silah olarak tanımlanmıştır (Greenfield ve ark., 2002).

Özellikle nişasta içeren sulu gıdalar, et ve et ürünleri, kümes hayvanı etleri, yumurta, süt ve süt ürünleri stafilokokal enteretoksinler ile kontamine olabilir. Stafilokokal gıda zehirlenmesi vakalarının çoğu gıda endüstrisinde hijyen ve hammadde kontrollerindeki yetersizliklerden kaynaklanmaktadır. Enterotoksijenik suşlar 20-37°C sıcaklıkta ve pH 4-7,4 aralığında stafilokokal enteretoksin üretebilmektedir (Tamarapu ve ark., 2001; Wieneke ve ark., 1993).

Stafilokokal enteretoksin kaynaklı gıda zehirlenmesinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bazı araştırmacılar gastrointestinal kanal boyunca inflamatuvar cevap içeren ince bağırsakta ciddi hasarla karakterize kanıtlar bulmuşlardır (Banwell ve Sherr, 1973). Stafilokokal enteretoksinlerin gastrointestinal kanal boyunca doğrudan etkilerinin yanı sıra T hücrelerinin, makrofaj, monosit ve mastositlerin ürettiği sitokinler ve metabolitlerin ekspresyonunu etkilediği bildirilmiştir (Marrack ve Kappler, 1990; Kotzin ve ark., 1992).

3. BİYOFİLM

Bir biyofilm alt katmana, ara yüzeye ya da birbirlerine tutunmuş; ekstrapolimerik madde matrisine gömülü, büyüme, gen ekspresyonu ve protein üretimi ile ilgili olarak değiştirilmiş fenotip sergileyen hücreler tarafından temsil edilen mikrobiyal bir sesil topluluk olarak tanımlanabilir (Donlan ve Costerton, 2002). Biyofilm kalınlığı tek bir hücre tabakasından yapışkan polimerik çevre tarafından kaplanmış önemli bir topluluğa kadar değişebilir (Costerton ve ark., 1995). Yapısal analizler göstermiştir ki bazı durumlarda özgün sütun ya da mantar şekilli yapılar, bu yoğun biyofilmlerin mikrokoloni mimarisi tarafından oluşturulabilir. Bununla birlikte, diğer yapılar çevresel koşullara bağlı olarak şekillenir (Costerton ve ark., 1995). Karmaşık kanal ağları bu kompleks yapılar boyunca akar ve biyofilmin en derin bölgesinin önemli besinlere ulaşabilmesini sağlar. Biyofilm oluşumu kalıcı enfeksiyonlar için bir ön koşul olmamakla birlikte biyofilmi eradike etmek büyük çaba gerektirebilir (Kristian ve ark., 2004). Bir biyofilm tek hücreden köken alabilmesi ile birlikte, biyofilm matrisi içinde farklılık gösteren çevresel koşullar ayrı alt popülasyonların gelişimine neden olabilir. Biyofilm içinde değişen oksijen, besin ve elektron alıcıları seviyesi farklı yapıda gen ekspresyonuna neden olabilir (Rani ve ark., 2007). Bir stafilakok *in vitro* koloni biyofilm modelinde, hücrelerin dört farklı metabolik durumu tanımlanmıştır: aerobik, fermentatif, durağan ve ölü. Üst ara yüzeyde oksijen bakımından zengin havaya maruz kalan ve sıvı besince zengin alt ara yüzeyde yer alan hücreler metabolik olarak aktiftirler. Bununla birlikte hücrelerin çoğu durağan ve anoksik bir çevrede bulunmaktadır (Rani ve ark., 2007). Biyofilm protein ekspresyonunun heterojenliği birçok hücre duvarı ilişkili proteinler ile ispat edilmiştir. Ekspresyonun biyofilm boyunca hücre kümelerinin içinde çeşitlendiği gösterilmiştir ve hücre-hücre temelinde farklılık gösteren ekspresyon tanımlanmıştır (Brady ve ark., 2007).

Yaşamın bu sabit modunu benimseyen biyofilme gömülü mikroorganizmalar planktonik benzerlerine karşı bir takım avantajlara sahiptir. Ekstraselüler matris karbon, azot ve fosfat gibi çevresel besinleri toplama ve ayrı tutma yeteneğindedir. Biyofilm büyüme şeklinin bir diğer faydası ise bakteri hücrelerinin konak veya diğer bertaraf mekanizmalarından kurtulma yeteneğidir (Beveridge ve ark., 1997).

Antimikrobiyal etmenlere direnç anoksik çevreye ve besin yoksunluğuna uyum, hücre bölünmesinin radikal bir şekilde downregüle olması ve düşük metabolik aktivite ile karakterize bir durağan fenotip yoluyla olmaktadır (Lewis, 2010). Stresli biyofilm matrisinde antibiyotiklerin yüksek seviyelerine toleranslı birçok yavaş büyüyen hücreler oluşmaktadır (Lewis, 2010). Bu hücreler biyofilm topluluklarında aynı zamanda var olan planktonik kültürlerde de bulunmaktadır (Spoering ve Lewis, 2001). Biyofilm matrisindeki dayanıklı hücrelerde gözlemlenen direnç antibiyotiğin mikrobiyal hedeflere etkisini önleyen çoklu ilaç toleransı ile açıklanabilir (Lewis, 2010; Spoering ve Lewis, 2001). Antibiyotiklere karşı kalıcı tolerans metabolik olarak durağan durumun sürdürülmesi yoluyla antibiyotiklerin hedefleri için hücresel ihtiyaçların durdurulmasıyla başarılmaktadır (Lewis, 2010). Biyofilm matrisinde gözlemlenen antibiyotik toleransı mekanizması *S. aureus*'ta tam olarak açıklanmamıştır. Bununla birlikte, *Escherichia coli*'de antibiyotik toleransının biyofilm matrisindeki toplam mikrobiyal popülasyon içindeki hücrelerin belirli bir kısmının güçlü bir şekilde downregüle olan biyosentetik yolları ve toksin/antitoksin üretimi, dolayısıyla bu popülasyon alt kümesinde kalıcı bir fenotip oluşturularak başarıldığı gösterilmiştir (Lewis, 2010). Biyofilm içindeki bu dirençli hücrelerin korunması ve immün sistemin etkilenmesi bu popülasyonların tamamen yok edilmesini engellemektedir. Bu nedenle, antibiyotik alımı durduğunda, bu dirençli hücreler kendi durağan fenotiplerine geçebilir ve enfeksiyonu tekrar aktif hale getirebilirler (Lewis, 2010).

Biyofilm hücrelerinin antimikrobiyal tolerans özelliklerini düşük metabolik aktivite yanında farklı faktörler de etkilemektedir. Bu faktörlerden bir tanesi biyofilmlerin bazı antimikrobiyal maddelerin matris içine sızmalarını yavaşlatmak için bir difüzyon bariyeri olarak hareket etme yeteneğidir (Xu ve ark., 2000). Örneğin, bazı antimikrobiyal maddelerden reaktif klorin türleri (hipoklorit, kloraminler ya da klorin dioksit gibi) biyofilmin alt katmanlarının içine yayılmadan önce biyofilmin yüzey katmanlarında etkisizleştirilebilirler (De Beer ve ark., 1994). Son zamanlarda yapılan bir çalışma çeşitli antibiyotiklerin (oxacillin, cefotaxime ve vancomycin) *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* biyofilmlerinin alt katmanlarına nüfuz etmelerinin oldukça sınırlı olduğunu göstermiştir (Singh ve ark., 2010).

Biyofilm formunun sağladığı bir diğer fayda ise köken oluşturmak için dağılma ya da hücrel ayrılma potansiyelidir. Mikrokoloniler sıvı mekanik kesme kuvvetlerinin etkisi altında ya da dağılma süreçlerini başlatmaya aracılık eden genetik olarak programlı bir cevap yoluyla ayrılabilirler (Boyd ve Chakrabarty, 1994). Metastatik kanser hücresiyle benzer bir biçimde, ayrılan mikrokoloniler asıl topluluktan konağın enfekte olmamış bölgelerine göç eder, tutunur ve olgunlaşmamış biyofilm oluşumu başlar. *S. aureus* gibi bakteriler için durum böyle olmamasına rağmen, dağılma başlangıcı mikrokoloniye bağlı olan tek hareketli hücrenin hareketiyle de yönetilebilir (Sauer ve ark., 2002). Dolayısıyla, biyofilm oluşumu antimikrobiyal maddelere ve konak immün cevabına karşı dirençli olan dayanıklı ve aynı anda bakteriyel yayılımı destekleyen bir bakteriyel kaynak popülasyonuna izin vermektedir.

3.1. *Staphylococcus aureus* Biyofilmleri

S. aureus'un insanlardaki ekolojik nişi burun delikleridir. *S. aureus* insan popülasyonunda yaklaşık olarak %20-25 oranında devamlı kolonize hale gelmiştir (Kluytmans ve ark., 1997; Dall'Antonia ve ark., 2005). *S. aureus*'un nazal taşınması ve hastane kökenli enfeksiyon riskinin artışında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Nazal taşınma vücudun diğer bölgelerine *S. aureus*'un yayılması için konaklama zemini sağlamaktadır. Burada epitel bariyerin aşılmasının ardından planktonik büyümeye başlayan bakteri hücreleri var olan tutunma faktörlerinin artırılması yoluyla dolaşım sistemine aktarılmaktadır (Beenken ve ark., 2004; Fitzpatrick ve ark., 2005).

S. aureus birbirinden farklı protein ekspresyon profiline sahip glikokaliks tabakasına gömülü çok katmanlı bir biyofilm üretebilir. Yapılan çalışmalarda glikokaliksin özellikle teikoik asitler (%80), stafilokokal ve konak proteinlerinden oluştuğu belirtilmiştir (Hussain ve ark., 1993). Ayrıca bu yapı içerisinde PIA adında özel bir polisakkarit antijen izole edilmiştir. PIA b-1,6-bağlı *N*-asetilglukozamin kalıntılarından (%80-85), fosfat ve ester bağlı suksinat içeren düşük içerikte non-*N*-asetile *D*-glukozaminil ile anyonik bir bölümden (%15-20) oluşmaktadır (Mack ve ark., 1996).

3.2. Ekstraselüler Polimerik Maddeler

Biyofilm yapısında bulunan hücreler birbirlerine polisakkaritler, proteinler, DNA ve su karışımından oluşan bir ekstraselüler matris ile tutunmaktadır. Bu matris

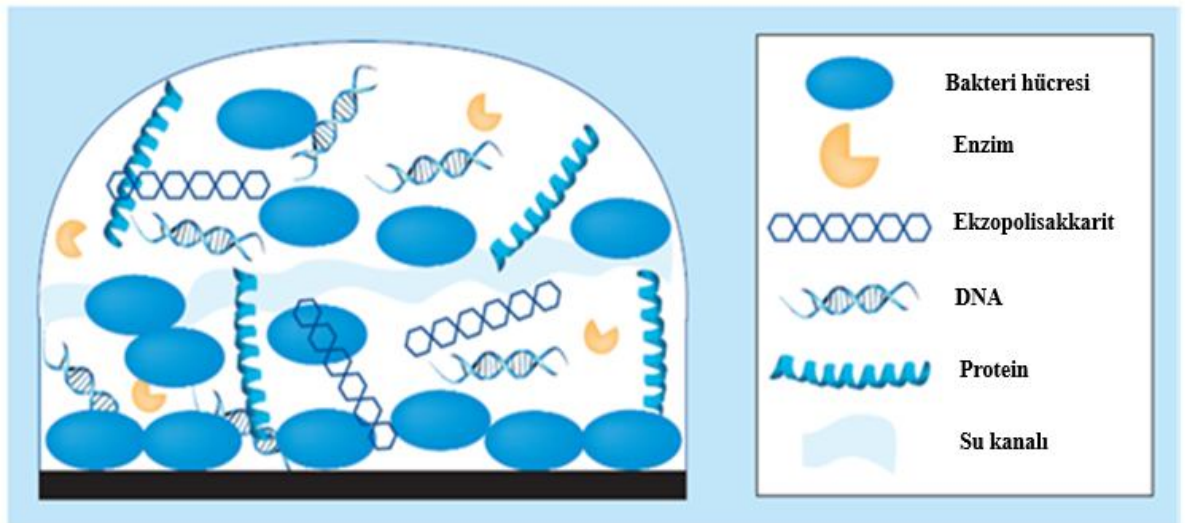
bakterilerin koloniler halinde büyümelerine yardım eden ve sert yüzeylere tutunmalarını sağlayan yapıdır (Flemming ve ark., 2007).

Genellikle ekstraselüler polimerik madde (EPS) olarak adlandırılan özellikle polisakkarit yapıda polimerik bileşiklerin karışımını içeren matrisle çevrelenmiş bakteri, alg, mantar ve protozoa topluluğu biyofilm olarak tanımlanmaktadır. Dünya üzerindeki mikroorganizmaların %99'u bu polimerlerin oluşturduğu içerik varlığında yaşam faaliyetlerini sürdürmektedir. Biyofilm oluşumu, bazı mikrobiyal toplulukların meydana gelmesi ve bakteriyel popülasyonların hayatta kalmasında gerekli ön koşullardan biri olarak görülmüştür (Flemming ve Wingender, 2001; Sutherland, 2001; van Hullebusch, 2003). Biyofilmdeki EPS oranı bu yapı içerisindeki toplam organik maddenin yaklaşık %50-90 aralığını kapsamaktadır (Donlan, 2002; Flemming ve Wingender, 2001). Gram negatif bakterilerde EPS bileşenlerinden bazı polisakkaritler nötral ya da polianyonik yapıda bulunabilmektedir. Üronik asit ya da ketal bağlı pirüvatların varlığının EPS'nin anyonik özelliğini artırdığı için gelişen biyofilmde bağlanma kuvveti yüksek olan kalsiyum ve magnezyum gibi divalent katyonların yapıyla bağ kurmasına izin verdiği gösterilmiştir. Bazı Gram pozitif bakterilerde ise katyonik yapıları nedeniyle EPS'nin kimyasal bileşiminde bu oranda farklılık gözlenmemiştir (Donlan, 2002; Sutherland, 2001). Polisakkaritlerden başka, biyo filmlerin ayrıca protein, nükleik asit, lipid ve humik maddelerden oluştuğu bildirilmiştir. EPS'nin içeriği mikroorganizmaların türüne, biyo filmin gelişim seviyesine ve biyo filmlerin oluşturulduğu farklı çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Bu çevre şartları farklı oksijen ve nitrojen seviyelerini, su stresini, sıcaklık, pH ve besine ulaşılabilirliği kapsamaktadır (Mayer ve ark., 1999).

Mikroorganizmaların farklı çevre koşullarında var olabilmeleri çevresel sinyallere cevap verebildiklerini, EPS yapılarını ve tutunma yüzeyinin özelliklerine bağlı olarak yapışma yeteneklerini değiştirebildiklerini göstermektedir (Ahimou ve ark., 2007). Katı yüzeylerde mikrobiyal kolonileşmenin çok çeşitli parametreler tarafından etkilendiği rapor edilmiştir. Örneğin, girintilerin varlığı buldukları yüzeyde paralel etkiyen kuvveti azaltacağından dolayı bakterilerin tutunma oranlarında artış sağlayan yüzey pürüzlülüğü ile kolonileşme derecesi arasında doğru orantı olduğu saptanmıştır (Donlan, 2002). Ayrıca mikroorganizmaların hidrofobik ve non-polar yüzeylere hidrofilik yüzeylerden daha hızlı tutunabildikleri bildirilmiştir (Donlan, 2002; Flemming ve Wingender, 2001).

Hücre yüzey hidrofobisitesi, fibril ve flagella varlığı ve EPS üretim seviyesinin mikrobiyal hücrelerin farklı yüzeylere tutunma oranına etkisi son derece önemli olan temel faktörler olduğu gösterilmiştir (Donlan, 2002). Bir yüzeye hücrelerin tutunması sürecinde elektrostatik etkileşim, hidrojen bağları ve Van Der Waals kuvvetlerinin yer aldığı belirtilmiştir (Flemming ve Wingender, 2001; Mayer ve ark., 1999). Biyofilm matrislerinin yapısının sabit kalmasına bu bağlanma kuvvetlerinin katkısı bulunmaktadır (Flemming ve Wingender, 2001). EPS'nin farklı bileşenleri sebebiyle hem hidrofilik hem de hidrofobik yüzeylere mikroorganizmaların tutunma derecesinde değişiklikler bulunmuştur. Bununla birlikte EPS oluşumunun bazı yüzeylerde geri dönüşümsüz tutunmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Donlan, 2002; van Hullebusch ve ark., 2003; Romani ve ark., 2008).

İçerisinde yaşayan organizmaya bağlı olarak biyofilm matrisi farklı özellikler taşıyabilmektedir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik, Gram pozitif bakterilerin ise katyonik matrisler oluşturduğu bilinmektedir (Flemming ve ark., 2007).



Şekil 1. Biyofilm yapısı (Sintim ve ark, 2015).

EPS'ler bakteri yüzeyine tutulu veya yapışkan bir şekilde ekstraselüler ortamlarda serbest olarak bulunmaktadır. Üronik asitlerin (D-glukonik, D-galakturonik ve mannuronik asitler) veya ketal bağlı piruvatların bu yapıya anyonik özellik kattığı bildirilmiştir. EPS oluşumunda; UDP-glikoz-dehidrogenaz, glikozil-transferaz, galaktozil-transferaz 1 ve 2, polimeraz gibi polisakkarit sentezine özgü olmayan birçok enzim görev almaktadır (Sutherland, 2001).

3.2.1. Biyofilm Oluşumunun Düzenlenmesinde EPS'nin Rolü

Biyofilm organik ve inorganik maddeler ile mikrobiyal hücrelerin yüzeye doğru taşınımı, daha sonra yüzeye tutunmaları ve sonuç olarak EPS üretiminin yardımıyla geri dönüşümsüz bağlanmayı içeren karışık bir işlemin sonucunda gelişmektedir (Beech, 2004). Karmaşıklığı nedeniyle, biyofilm oluşumu farklı aşamalarda çeşitli mekanizmalar ile düzenlenmektedir (Ruiz ve ark., 2008; Waters ve Bassler, 2005).

EPS üretiminin kontrolü, biyofilm oluşumu ve farklılaşmasında rol alan Quorum sensing (QS) düzenleme mekanizması üzerinde çok çalışılmıştır (Donlan, 2002; Ruiz ve ark., 2008; Waters ve Bassler, 2005; von Bodman ve ark., 1998; Rivas ve ark., 2005; Davies ve ark., 1998). QS bakterilerde hücre-hücre iletişiminin sürdürülmesi ve değişen hücre popülasyon yoğunluğuna cevap verilmesinde görevli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesine izin vermektedir (Rivas ve ark., 2005; Valenzuela ve ark., 2006). Hücre iletişimde QS süreci kimyasal sinyal moleküllerinin üretimi, salınımı ve algılanmasını içermektedir. Böylece bakteri hücreleri, hücre yoğunluğundan bağımsız yolu içeren gen ekspresyonunun düzenlenmesine izin vermektedir (Hooshangi ve Bentley, 2008). Popülasyon yoğunluğu göz önünde tutulduğunda biyofilm farklılaşması ve gelişmesinde yer alan genler aktive edilmektedir (Donlan, 2002; Waters ve Bassler, 2005).

Bakteriler için iki tipte QS tanımlanmıştır (Waters ve Bassler, 2005; Miller ve Bassler, 2001). Otoindükleyici-1 (AI-1) tipi çoğunlukla türler arası iletişimle, otoindükleyici-2 (AI-2) tipi ise tür içi etkileşimle ilişkilendirilmiştir (Farah ve ark., 2005). Gram negatif bakteriler popülasyon yoğunluğunu kontrol etme işlevini yerine getiren AI moleküllerinden biri olan *N*-asetil homoserin lakton (AHL) molekülünü sentezleyip hücre dışına salgılamaktadırlar. Bakteriler AHL sinyal moleküllerinin yoğunluğunu algılayabilmektedir. Belirli bir konsantrasyon eşiğinin üzerindeki bu sinyal molekülleri sessiz genleri aktive etmek için transkripsiyonel tetikleyicileri etkinleştirebilmektedir. (Ruiz ve ark., 2008; von Bodman ve ark., 1998).

Gram pozitif bakterilerde iletişim mekanizması, modifiye oligopeptidlerin ürettiği sinyaller ve reseptörler olarak görev yapan membrana bağlı sensör histidin kinazlar ile yerine getirilmektedir. Sinyalleşme düzenleyici cevabın aktivitesinin kontrolü olan birçok fosforilasyon basamağı aracılığıyla sağlanmaktadır. Peptid

sinyalleri membranın diğer tarafına difüze olamazlar ve bu nedenle sinyaller oligopeptid eksporter aracılığıyla hücre dışına salınmaktadır. Bakteri hücrelerinde sinyal salınımı, sinyal yapımı ve modifikasyonu ile eş zamanlı meydana gelmektedir (Waters ve Bassler, 2005; Miller ve Bassler, 2001).

Biyoluminesan bir bakteri türü olan *Aliivibrio fischeri* için tanımlanan AHL-aracılı QS sistemi üzerinde çalışmalar yürütülmüştür. Bu sistem çoğu Gram negatif bakteride QS paradigması için ideal model olarak nitelendirilmiştir. *A. fischeri*'nin ışık üretimi ile ilişkili lusiferaz operonunun ekspresyonunu kontrol eden iki proteine (LuxI ve LuxR) sahip olduğu gösterilmiştir. LuxI, S-adenosilmetiyonin üzerinden AHL indükleyicilerini üreten otoindükleyici sentaz ve LuxR, lusiferaz operonunun ekspresyonunu başlatmak için AHL indükleyicilerine gerek duyan sitoplazmik indükleyici olan bir reseptör/DNA bağlayıcı transkripsiyonel aktivatör olarak tanımlanmıştır (Waters ve Bassler, 2005; von Bodman ve ark., 1998; Miller ve Bassler, 2001). AHL molekülleri sentezlendikten çok kısa bir süre sonrasında hücre membranının içine ve dışına difüze olmaktadır. Hücre popülasyon yoğunluğu arttığında konsantrasyonları da artmaktadır. Kritik eşik konsantrasyonu aşıldığında, AHL'nin LuxR tarafından bağlandığı gösterilmiştir. Oluşan LuxR-AHL kompleksinin lusiferaz operonunun transkripsiyonunu ve farklı davranışsal cevaplarda yer alan geri bildirim döngüsü oluşturan ve ışık üretimiyle sonuçlanan LuxI ve diğer genlerin ekspresyonunu aktive ettiği rapor edilmiştir (Waters ve Bassler, 2005; Rivas ve ark., 2005; Miller ve Bassler, 2001).

3.2.2. EPS Üretiminin Kontrolü

EPS üretiminin ve biyofilm oluşumunun kontrolü için QS düzenleyici yollardan biri olarak bilinmektedir (Miller ve Bassler, 2001). Ayrıca fosfat ve polifosfat metabolizması da bu düzenleyici yollar ile ilişkilendirilmiştir (Farah ve ark., 2005; Rashid ve ark., 2000). Bununla birlikte QS düzenleyici sistem ve biyofilm oluşumu mekanizmaları bakteri türleri arasında farklılık gösterdiği için, QS'in biyofilm oluşumundaki rolü farklı türler açısından farklılık gösterebilmektedir (Hooshangi ve Bentley, 2008). Örneğin, *P. aeruginosa*'da QS adezyon, biyofilm oluşumu ve virülans faktörler için esas kontrol mekanizması olarak bildirilmiştir (Waters ve Bassler, 2005; Nakamura ve ark., 2008). *P. aeruginosa*'da, *A. fischeri*'deki LuxI/LuxR sistemiyle aynı şekilde çalışan, LasI/LasR ve RhII/RhIR QS sistemlerinin bulunduğu gösterilmiştir (Miller ve Bassler, 2001). Herhangi bir QS

sinyali üretmeyen mutant *P. aeruginosa* hücreleri ince bir biyofilm oluştururken doğadaki suşlarına kıyasla daha yoğun hücre popülasyonuna sahip oldukları bulunmuştur. Bunun yanı sıra, *LasI* geninde meydana gelen mutasyonun anormal ve farklılaşmış biyofilm oluşumu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Davies ve ark., 1998).

E. coli'de, hücresel fonksiyonlar *LsrR/LsrK* QS sistemi tarafından kontrol edilmektedir. Ayrıca biyofilm oluşumu ve yapısının düzenleme mekanizmalarında *LsrR* ve *LsrK* mutantlarında önemli ölçüde değişiklik bulunmuştur. Doğadaki suşlar ile karşılaştırıldığında mutantların fimbria, matris yapısında ve kalınlığında farklılıklar gözlenmiştir (Li ve ark., 2007).

LuxI/LuxR proteinlerine benzerlik gösteren bir QS sistemi olan *AfeI/AfeR* *Acidithiobacillus ferrooxidans*'ta tanımlanmıştır (Ruiz ve ark., 2008; Rivas ve ark., 2005). Fosfatsız kalan *A. ferrooxidans*'ta lipopolisakkarit miktarının artış gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca hücreler düşük fosfat besiyerinde kültüre edildiğinde yüksek fosfat besiyerine kıyasla *afeI* geninin transkripsiyonunda ve bu sebeple AHL seviyesinde artış gözlenmiştir. *A. ferrooxidans*'ta AHL iletişim sisteminin bulunmasıyla birlikte QS sisteminin bu bakterinin EPS üretimi ve katı yüzeylere tutunması mekanizmalarında biyofilm oluşumunu düzenlediği düşünülmektedir (Ruiz ve ark., 2008; Farah ve ark., 2005).

Hücresinin bulunduğu ortamda besin eksikliği olduğunda, katı yüzeyler üzerinde tutunmanın başlatılabilmesi amacıyla hidrofobik etkileşimleri geliştirmek için EPS üretiminin arttırıldığı bildirilmiştir. Bir yüzeye tutunan bakteri hücresinin organik işaretleme elementlerinin adsorpsiyonuna daha fazla şans verdiği gösterilmiştir (Sheng ve ark., 2008).

3.2.2.1. Minerallerin EPS'ye etkileri

Biyofilm yapısı bakteri hücrelerinin mineraller üzerinde tutunmalarını düzenleyerek kolonileşmelerinde kritik rol oynamaktadır. EPS katmanında var olan metal sülfidlerin iki varsayıma dayalı çözüldüğü düşünülmüştür. Birinci yaklaşımda, EPS'ye karışık demir iyonlarının oluşturduğu elektron tünelleme etkisi tarafından redüklenmiş olabilecekleri belirtilmiştir. İkinci yaklaşımda ise ferroz iyonu ile glukuronik asit komplekslerinin sabit olmadığı ve bu nedenle ferroz iyonlarının EPS

aralığına metal sülfidlerin migrasyonuna izin verdiği bildirilmiştir (Sand ve Gehrke, 2006).

Metal sülfidlerin dış zara doğru difüze olurlarsa burada hücrelerin enzimatik sistemi tarafından yeniden okside edilecekleri ve bu nedenle oksidasyon/redüksiyon döngüsüne tekrar giriş yapabilecekleri gösterilmiştir. Ayrıca EPS katmanının içinde var olan ferrik iyonları ile bakteriyel metabolizmanın kapsamı arasında ilişki olduğu bulunmuştur. Araştırma sonuçlarına göre ekzopolimerlerin içerisinde yüksek miktarda demir ve glukuronik asit olan hücrelerin bu bileşenlerin düşük miktarda olanından daha yüksek oksidasyon aktivitesi gösterdiği öne sürülmüştür (Sand ve Gehrke, 2006).

3.2.2.2. Patojenik mikroorganizmaların ürettiği EPS

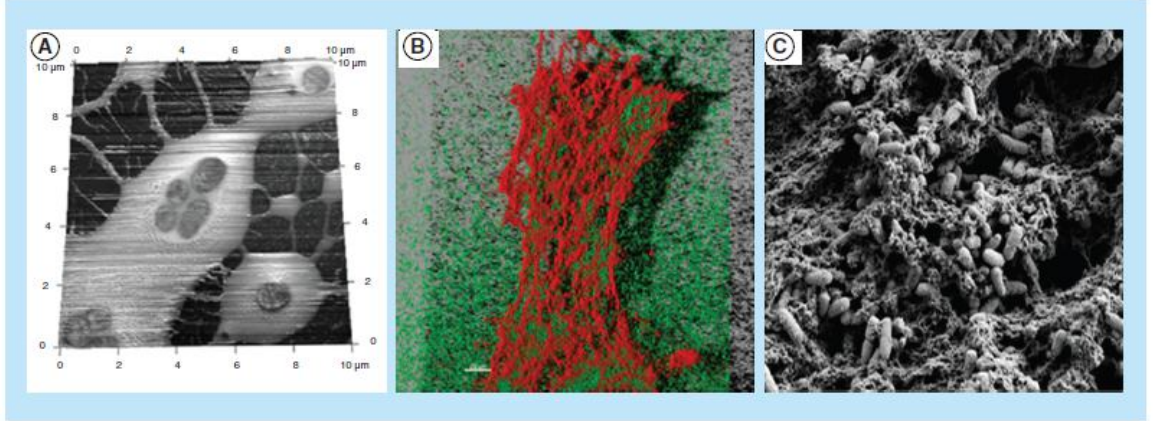
Biyofilmlerle ilişkili patojenik mikroorganizmalar çok sayıda kronik enfeksiyon hastalıklarına sebep oldukları için yoğun araştırmaların odak noktası haline gelmişlerdir (Donlan, 2002). Biyofilm oluşumunun antimikrobiyal ajanlara karşı koruma ve enfeksiyon immünitesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür (Costerton ve ark., 1999; Vuong ve ark., 2004).

Gram pozitif *S. epidermidis* ve Gram negatif *P. aeruginosa* klinik kronik enfeksiyonlarla ilişkili en yaygın patojenler olarak nitelendirilmişlerdir (Costerton ve ark., 2003; Vuong ve ark., 2004). Biyofilm içerisindeki büyüme ve çoğalma özellikleri bu bakterilerin antibiyotiklerden korunmasını ve konak savunma mekanizmasından farklı ajanların biyofilm içerisine nüfuz etmesine engel olunmasını sağlamaktadır (Costerton ve ark., 1999; Costerton ve ark., 2003). Diğer biyofilm ilişkili patojenik bakteriler *Escherichia*, *Legionella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Vibrio* cinslerini kapsamaktadır (Costerton ve ark., 1999; Costerton ve ark., 2003; Hall-Stoodly ve Stoodly, 2002).

3.2.3. Ekzopolisakkaritler

Bakteri tarafından etrafını saran çevreye salgılanan ve şeker kalıntılarından oluşan yüksek moleküler ağırlıklı polimerlere ekzopolisakkarit tanımı yapılmıştır (Nwodo ve ark., 2012). Ekzopolisakkaritler ekstraselüler veya intrasellüler olarak sentezlendikten sonra hücre dışına salgılanabilmektedirler.

Elektron mikroskopunda ekzopolisakkaritler, uzun/esnek büyük ağlar oluşturan ve hücre yüzeylerine bağlı uzun zincirlerin dallanması veya lineer şekilde görünmektedirler. Ekzopolisakkaritler diğer karbonhidratlar, proteinler, nükleik asitler ve lipidlerin tutunabilmeleri için iskelet vazifesi görmektedirler. Ekzopolisakkaritlerin bileşenleri, yapı ve özellikleri bir biyofilmi diğerinden farklı kılabilir (Sintim ve ark., 2015).



Şekil 2. *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da ekstraselüler polisakkaritler. (A) *P. aeruginosa*'da aljinatın atomik güç mikroskobu görüntüsü. (B) Su kaybetmiş *P. aeruginosa* PAO1'de Psl'nin konfokal lazer taramalı mikroskop görüntüsü. (C) *P. aeruginosa* PA14'de Pel'in SEM görüntüsü (Sintim ve ark., 2015).

Heteropolisakkaritler hücre içinde sentezlenen ve daha sonra hücre dışına çıkarılarak hücrenin etrafını saran yapıyı oluşturmaktadır. Bu işlemlerin gerçekleştirilmesi için birçok enzimin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu enzimlerden bazıları lipopolisakkaritlerin sentezinde de kullanılmaktadır. Nötral homopolisakkaritlerin sentezi ise farklılık göstermektedir. Hücre dışında üretilen bu yapılar sakkaroz varlığında sırasıyla, levansukroz ve dekstransukroz enzimlerinin aktivitesi ile ekstraselüler olarak üretilmektedir (Yılmaz ve Çelik, 2007).

Mannoz, galaktoz ve glikoz biyofilm yapısında en bol bulunan karbonhidratlar olarak tanımlanmaktadır. Bu karbonhidratları *N*-asetil-glukozamin, galakturanik asit, arabinoz, fukoza, ramnoza ve xyloza takip etmektedir. Çoğu ekzopolisakkaritler biyofilme özgü olmamakla birlikte bazılarının üretimi stres cevabının bir sonucu olarak artmaktadır. Bu duruma, *E. coli*'de kolanik asit üretimi (Prigent-Combaret ve ark., 1999) ve *P. aeruginosa*'da aljinat sentezi örnek verilmiştir (Davies ve Geesey, 1995).

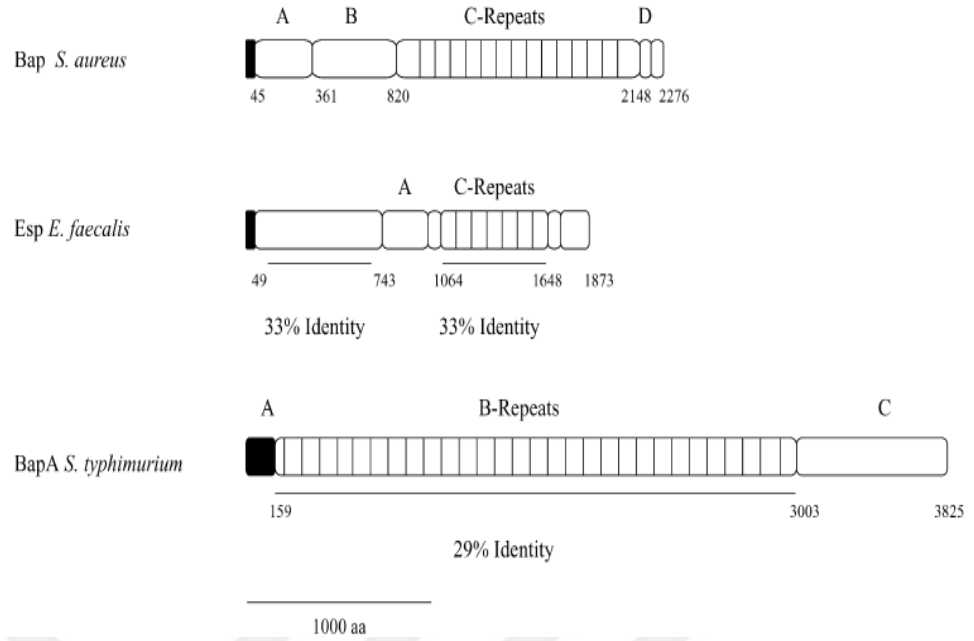
3.2.4. Ekstraselüler Proteinler

EPS matrisinin bir diğer temel bileşeni olarak ekstraselüler proteinler tanımlanmıştır. Bu proteinler biyofilm oluşumu ve stabilizasyonunda aktivite gösterdikleri için polisakkaritlere ve hücre yüzeyine bağlı bulunmaktadır (Frolund ve ark., 1996). *Streptococcus mutans* biyofilminde bulunan glukan-bağlayıcı proteinler (Gbps) bu özelliği gösteren proteinlere örnek verilmiştir. Gbps, bakteri ve ekzopolisakkaritleri bağlayarak biyofilm yapısının sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır (Lynch ve ark., 2007).

Kümelenme ilişkili protein (AAP) ve çoğunlukla durağan büyüme koşullarında varlığı gösterilen mitomisin (tüm biyofilm pozitif bakterilerde bulunmamakla birlikte) proteinleri biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Aderans genellikle mikrobiyal yüzey proteinlerini tanıma özelliğine sahip adeziv matris proteinleri (MSCRAMM) ailesi olan ve çoğu durumda hücre duvarı peptidoglikanına kovalent olarak bağlanan protein adezinler tarafından yönetilmektedir (Götz, 2002).

Amiloidler biyofilm yapısında destekleyici rol oynayan çözünmez fibröz proteinlerdir. Biyofilm yapısındaki amiloidlere *Pseudomonas* türlerinin oluşturduğu biyofilmlerde saptanan fonksiyonel *Pseudomonas* amiloidleri (Fap) örnek verilmektedir. Fap amiloidlerinin aşırı sentezi hücre kümelenmesi ve artan biyofilm oluşumuna öncülük etmektedir (Dueholm ve ark., 2013). *Bacillus subtilis* biyofilminin temel bileşenlerinden biri amiloid protein TasA'dır. TasA güçlü fiberler oluşturarak biyofilm hücrelerini bir arada tutmaktadır ve şiddetli yıkıcı güçleri tolere edebilmektedir (Romero ve ark., 2010).

Dış membran lektinlerinden galaktofilik lektin lecA (Diggle ve ark., 2006) ve L-fukoz bağlayıcı lektin lecB biyofilm matrisinde tespit edilen önemli proteinlerdendir (Tielker ve ark., 2005). Ekstraselüler proteinlere diğer bir örnek biyofilm ilişkili protein (Bap) ailesidir. Birbirinden farklı bakteri türlerinde sentezlenen ve matris yapımı için aynı polisakkaritlere (selüloz, poli-beta-1,6-N-asetil glukozamin), biyotik veya abiyotik yüzeylere adezyona öncülük eden Bap protein ailesi ile homoloji gösteren *Enterococcus faecalis*'te Esp proteininin ve *Salmonella enteritidis*'de BapA yüzey proteinlerinin varlığı saptanmıştır (Latasa ve ark., 2006).



Şekil 3. Bap'ın homoloji gösterdiği Esp ve BapA proteinler ile yapısal analizi (Latasa ve ark., 2006).

Biyofilm ilişkili protein (Bap) Gram pozitif bakterilerde bulunan hücre duvarına yerleşik proteinlere benzer özgün yapısal nitelikler göstermektedir. N-terminal bölgesi ekstraselüler salınma için bir sinyal sekansı (ilk 44 amino asitten oluşan) içermektedir. Birbirinden farklı ikili tekrar dizisinden oluşan 32 amino asit tekrarıyla devam eden (45'ten 360. amino asite kadar) bölge A bölgesi olarak isimlendirilmiştir. Kalan 818 amino asite kadar olan sekans B bölgesi olarak tanımlanmıştır (Latasa ve ark., 2006).

In vitro deneyler sonucunda Bap'ın yalnızca bakterinin ilk tutunma aşamasında ilgili olmadığını aynı zamanda PIA/poli-N-asetil- β -(1-6)-glukozamin (PNAG) polisakaritlerinin varlığında hücrelerin bir araya gelip toplanması ve böylece biyofilmin olgunlaşmasında görev aldığı gösterilmiştir (Latasa ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalarda global virülans düzenleyici olan SarA proteininin Bap ekspresyonunda bir aktivatör olarak görev aldığı ortaya konmuştur. SarA'nın bozulması *ica* operonunun transkripsiyonunu azaltarak toplamda PIA/PNAG-bağımlı biyofilm oluşumunu zayıflattığı bildirilmiştir. SarA gen transkripsiyonunu hedef genin promotörüyle doğrudan etkileşim veya *agr* düzenleyici kaskadını aktiveleştirme yoluyla düzenleyebilmektedir. Ayrıca SarA proteininin Bap promotor bölgesine doğrudan bağlandığı gösterilmiştir (Chien ve ark., 1999).

Biyofilm yapısı içinde gerçekleştirilen horizontal gen transferi mikrobiyal komünitelerde genetik değişimi sağlamak için büyük ölçüde kabul edilmiş olan ideal çevre koşullarının oluşmasına, virülans veya antibiyotik direnç genlerinin yayılmasına katkıda bulunmaktadır. Bap geni yardımcı fajın varlığına ihtiyaç duymaksızın mobil olan transpozon benzeri element ile taşınabilmektedir (Latasa ve ark., 2006).

3.2.5. eDNA

Ekstraselüler DNA'lar (eDNA), DNaz I'in *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumunu önlediği ortaya konmadan önce lize olmuş hücrelerden kalan DNA parçaları olarak kabul edilmiştir (Whitchurch ve ark., 2002). eDNA'nın sadece lize hücrelerden kalan DNA parçaları olmadığı aynı zamanda biyofilm oluşumunda önemli role sahip olan eDNA'nın bakteriyel hücrelerden kontrollü olarak hücre dışına etkin bir şekilde salgılandığı belirtilmiştir (Hamilton ve ark., 2005).

eDNA'nın negatif yükü ilk tutunmada itme gücü olarak vazife görmektedir. Ancak hücre ve yüzey arasındaki mesafe birkaç nanometre olduğunda, adezyonu kolaylaştırmak için alt katman yüzeyindeki reseptörlerle etkileşmektedir (Das ve ark., 2010). Ayrıca, eDNA'nın biyofilm genişlemesinde motilite aracılı kasılma hücre hareketini düzenlediği bulunmuştur (Gloag ve ark., 2013).

Negatif yüklü olduğu için eDNA, metal katyonları ve bazı pozitif yüklü antibiyotikleri şelatlayabilmektedir. eDNA Mg^{+2} ile şelat oluşturabilir ve *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica* ve diğer Gram negatif bakterilerde antimikrobiyal peptid direncine yol açan PhoPQ/PmrAB iki bileşenli sistemi aktive edebilmektedir (Lewenza, 2013; Mulcahy ve ark., 2008).

3.2.6. Polisakkarit İnterselüler Adezin (PIA)

Stafilokokal biyofilmlerin ekstraselüler polimerik maddelerini polisakkarit interselüler adezin (PIA), ekstraselüler DNA, proteinler ve amiloid fibrilleri oluşturmaktadır. PIA kısmen deasetile, pozitif yüklü, sentezleri *icaADBC* lokusu tarafından yönetilen bir poli- β (1-6)-*N*-asetil glukozamindir. *ica* lokusunda DNA sekansları homolog, aralarında *S. lugdunensis* de olan yaygın olarak proteinlerden oluşan biyofilm üreten birçok koagülaz negatif stafilokok türü bulunmaktadır (Arciola ve ark., 2015).

icaA gen ürünü, UDP-*N*-asetilglukozamin'den PIA oligomerleri sentezleyen bir *N*-asetilglukozaminiltransferaz'dır. *icaD* gen ürünü protein ise *icaA*'ya en yüksek

aktiviteyi verme özelliğine sahiptir. *icaC* gen ürünü protein yeni oluşan polisakkaritin dışarı verilmesinde ilişkilendirilmektedir. *icaB* gen ürünü PIA'nın kısmi deasetilasyonundan sorumlu olan bir *N*-deasetilaz'dır. *ica* lokusunun anlatımı çevresel şartlar tarafından etkilenmektedir. *S. aureus* ve *S. epidermidis*'de biyofilm üretiminin *ica*-bağımsız alternatif mekanizmaları tanımlanmıştır. *S. epidermidis* ve *S. aureus* biyofilm üretimi için sırasıyla, *icaC* geninde bir insersiyon sekansının transpozisyonu ya da *icaC* geni içerisinde doğal olarak barınan art arda dizili tekrarların genişleme ya da daralması olarak tanımlanmış olan bir faz farklılaşması geçirmiştir (Arciola ve ark., 2015).

3.3. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm ekstraselüler matrisle kaplı olan bir yüzeye tutunmuş mikroorganizmalar topluluğu yapısı olarak tanımlanmaktadır. Bir biyofilmin yaşam döngüsü hücrelerin yüzeye başlangıç tutunması, ilgili yüzeyde mikrokolonilerin oluşması, kurulmuş biyofilmin iç katmanlarına doğru mikrokolonilerin gelişmesi ve olgun biyofilmden bakterilerin kopması şeklinde dört aşamadan meydana geldiği savunulmaktadır (O'Neill ve ark., 2008). Başlangıç aşamasında planktonik fenotipe sahip bakteri hücreleri katı, canlı ya da cansız yüzeyin alt tabakasına van der Waals kuvvetleri, sterik etkileşimler ve DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey ve Overbeek) kuvvetleri olarak bilinen elektrostatik etkileşimlerle geri dönüşümlü olarak tutunmaktadırlar (Garrett ve ark., 2008).

Alt tabakanın yüzeyi bakterilerin tutunmasını kolaylaştıran konak matris proteinleri (fibrinojen, fibronektin ve kollajen) tarafından uygun hale getirilmiştir (Francois ve ark., 2000). Yüzeye geri dönüşümlü tutunan bir dizi bakteri, yüzey ve bakteri hücreleri arasındaki hidrofobik ve hidrofilik etkileşimlerin sonucu olarak hareketsiz hale gelerek yüzeye geri dönüşümsüz tutunmuş olmaktadır (Liu ve ark., 2004). Bu bakteri hücreleri daha sonra büyüyüp çoğalarak mikrokolonileri oluşturmaktadırlar (Stoodley ve ark., 2008). Mikrokoloniler bir kere oluştuklarında ve optimal büyüme koşullarında, biyofilmin iç kesimlerine doğru besinlerin akışını sağlamak amacıyla su kanallarıyla donatılmış daha kompleks bir yapının kurulduğu olgunlaşma aşamasına geçmektedirler. Farklı fizikokimyasal koşullar varlığında ulaşılabilirlik, oksijen varlığı, substratlar ve metabolik yan ürünlerin dağıtılabilirliği, pH ve hücre yoğunluğu biyofilmin başka bölgelerindeki hücreler için farklı gen ekspresyon modellerinin gösterimine neden olabilmektedir. Gelişimin final

aşamasında, bazı bakteri hücreleri fiziksel kopma ya da ekzopolisakkaritlerin hidrolizi tarafından aktive edilen sinyalleşme olayları ile biyofilmden ayrılabilir ve yeni nişlere yerleşmeye olanak veren planktonik duruma geri dönebilmektedirler (Boles ve Horswill, 2011).

Tüm bu biyofilm oluşum fazlarında QS sisteminin popülasyon yoğunluğu ve metabolik aktivitenin düzenlenmesiyle ilgili olduğu belirtilmiştir (Kalia ve Purohit, 2011). Genel olarak, QS sisteminin komşu hücreler arasındaki iletişim için genetik olarak hücre yoğunluğuna bağımlı bir şekilde difüz edebilen küçük sinyal molekülleriyle ekstraselülere cevap vermeyi sağlayan ve bakteriyel hücre-hücre iletişimde merkezi önemi olan özelliğe sahip olduğu açıklanmıştır (Asad ve Opal, 2008). Bu şekilde, molekül sinyallerin üretimi bakterilere konakta yeterli kolonizasyon gerçekleştirildikten sonra ekzotoksinlerin salgılanmasıyla konakçı savunmayı aşabilmelerinde yardımcı olarak kontrolü sağlayabildikleri bildirilmiştir. Stafilocoklarda kullanılan molekül sinyaller ya da otoindükleyiciler, *agr* lokusu tarafından sentezi düzenlenen AgrD peptidi gibi otoindükleyici peptidler (AIP) olarak tanımlanmıştır (Pan ve Ren, 2009).

3.3.1. Biyofilmlerin Yönetilmesinde Temel Prensipler

Stafilokokal biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisindeki en büyük zorluk biyofilm yapısındaki bakterilerin antimikrobiyal ajanlara ve konak savunma mekanizmalarına artan dirençleri olarak gösterilmiştir (del Pozo ve Patel, 2007). Antimikrobiyal ajanlara direnç, anoksik çevreye ve besin yoksunluğuna adaptasyondan kaynaklanan durağan bir fenotip vasıtasıyla olmaktadır. Sonuç olarak birçok yavaş büyüyen hücrenin ve antimikrobiyal ajanların yüksek seviyelerine dayanıklı kalıcı hücrelerin alt popülasyon oluşturmalarıyla bakteriyel hücrelerin metabolik seviyeleri düşmektedir ve hücre bölünmesinde kesin olarak downregülasyon gerçekleşmektedir (Lewis, 2010). Bu nedenle yalnızca bölünen stafilocokal hücrelere karşı aktif olan beta laktamlar gibi antibiyotikler biyofilm enfeksiyonlarının ortadan kaldırılmasında kayda değer bir etki gösterememektedirler (Hoiby ve ark., 2010). EPS matrisi bazı antimikrobiyal ajanların içeri sızmasını geciktirmek için bir difüzyon bariyeri olarak hareket etmektedir (Xu ve ark., 2000). Bu ajanların içerisinde bir takım reaktif klorin türleri biyofilmin iç kısımlarına etki edmeden biyofilmin yüzey tabakalarında deaktive olabilmektedirler (de Beer ve ark., 1994). Çoklu ilaç direncine sahip *S. aureus*'un ortaya çıkmasıyla birlikte

biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisi için yeni yaklaşımlara ihtiyaç zorunlu hale gelmiştir. Biyofilm oluşumunu engellemek ya da farklı biyofilm gelişim aşamalarını hedeflemek için üç temel strateji geliştirilmiştir. İlk temel strateji başlangıç aşamasında bakterinin canlı ya da cansız yüzeylere tutunmasının önlenmesidir, böylece biyofilmin kurulması ve daha da gelişme şansı azaltılmaktadır. İkinci strateji olgunlaşma işlemi boyunca biyofilm yapısının parçalanmasını hedef almıştır (Kalia ve Purohit, 2011). Üçüncü strateji QS inhibisyonunu içeren bir antipatojenik ya da sinyal yolağını engellemektir. *S. aureus*, özel bir çevrede yaşama yeteneğini artırmak için biyofilm oluşumu ve virülans faktörlerin ekspresyonunu QS aracılığıyla düzenlemektedir. QS ya da quorum quenching (QQ) sisteminde bir bozulmanın virülans faktörlerin ekspresyonu ve dağıtımına etki ettiği gösterilmiştir (Wright ve ark., 2004).

Bakterilerin yüzeylere tutunması yüzey proteinleri, pili ya da fimbriae ve özgün ekzopolisakkaritler gibi bir dizi faktörler tarafından düzenlenmektedir (Maira-Litran ve ark., 2002; Conrady ve ark., 2008). Genelde tutunma daha pürüzlü, hidrofobik, uygun filmlerle kaplı olan yüzeylerde rahatlıkla meydana gelmektedir (Donlan, 2002). Minosiklin ve rifampin ile kaplı kateterlerin *S. aureus* ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının görülme sıklığını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Ramos ve ark., 2011). Bu nedenle, kalıcı medikal cihazların yüzeyinin bakterisidal ya da bakteriyostatik maddeler ile kaplanması gibi yüzey özelliklerinin değiştirilmesi biyofilm ilişkili enfeksiyonları önleyebilmektedir.

Aril rhodaninler ve şelatlayıcı maddeler gibi küçük moleküllerin de stafilokokal biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Aril rhodaninler özellikle *S. aureus* ve diğer Gram pozitif bakterilerin biyofilm oluşturmasını inhibe etmektedir. Ancak Gram negatif bakterilerin biyofilm oluşturmasını inhibe edememektedir. Yapılan bazı çalışmalar aril rhodaninlerin bakterilerin yüzeye tutunmalarını önleyerek özellikle biyofilm gelişiminin erken aşamalarını inhibe ettiğini göstermiştir (Opperman ve ark., 2009). Bu moleküller hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite sergilememektedirler. Farklı *S. aureus* suşlarında biyofilm oluşumunda kalsiyum şelatlayıcısı etilen glikol tetra asetik asit (EGTA) ve trisodyum sitrat (TSC)'a çeşitli cevaplar oluşmuştur. Bazı suşlarda, şelatlayıcılar biyofilm oluşumunu önlerken, diğerlerinde ise biyofilm oluşumu üzerine bir etkisi olmamış ya da biyofilm oluşumunu artırmıştır. Bu

nedenle, bu maddelerin uygun olan engelleyici doza ulaşana kadar sürekli kullanımı önemli görülmüştür (Abraham ve ark., 2012). Metalik gümüş, gümüş iyonları ve gümüş nanopartikülleri kronik yara ve yanıkların tedavisinde antimikrobiyal madde olarak kullanılmaktadır. Gümüş iyonlarının *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella* türleri, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* ve *Candida albicans* gibi bakterilere karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (Chernousova ve Epple, 2013). Gümüş nanopartikülleri mikroorganizmalar ile daha iyi temas sağlayan oldukça geniş yüzey alanına sahip oldukları için etkin antimikrobiyal özellik göstermiştir. Nanopartiküller hücre membranına tutunarak bakteri hücresinin içine girebilmektedirler. Partiküllerin hücre membranındaki sülfür içeren proteinlerle ve DNA gibi fosfor içeren moleküllerle etkileşime girdikleri gösterilmiştir (Rai ve ark., 2009). Gümüş ayrıca bakteri hücrelerinin solunum enzimlerinde bulunan tiyol gruplu bileşikleriyle de etkileşmektedir. Sonuç olarak, gümüş uygulaması DNA replikasyonu, ribozomal ve diğer hücre proteinlerinin ifadesini inhibe etmektedir ve hücre solunum mekanizmasını durdurarak hücre ölümüne yol açabilmektedir (Feng ve ark., 2000; Klasen, 2000; Yamanaka ve ark., 2005). Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışma nanopartikül gümüş iyon kaplı implantların 28 gün sonra bile konak dokularda gümüş birikimine neden olmadan *S. aureus* biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir (Secinti ve ark., 2011).

Olgun biyofilmler, biyofilm içindeki organizmaların çeşitli gelişme aşamalarında olmaları nedeniyle antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek dayanıklılığa sahip yapılar olarak tanımlanmıştır (Donlan ve Costerton, 2002). Bu yapı içerisindeki bakteri hücreleri dirençli alt popülasyonlar oluşturmaktadırlar (Ito ve ark., 2009). Biyofilmler ayrıca *S. aureus*'ta antibiyotik direnç genlerinin horizontal transferini başlatabilmektedir (Savage ve ark., 2013).

Cis-2-Dekanoik asit (C2DA) *S. aureus* ile birlikte diğer Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde biyofilmlerin dağılmasını başlatabilen, *P. aeruginosa* tarafından üretilen kimyasal mesajcı niteliğinde bir yağ asidi olarak tanımlanmıştır (Davies ve Marques, 2009). Yürütülen bir çalışmada C2DA'nın biyofilm oluşumunun başlamasına ek olarak var olan biyofilmin dağılmasını potansiyel olarak kontrol edebildiği gösterilmiştir. C2DA'nın metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarında biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Davies ve Marques, 2009).

Bir çalışmada D-amino asitlerin bir karışımının *B. subtilis* ve *P. aeruginosa* gibi *S. aureus*'ta biyofilmin parçalara ayrılmasını tetiklediği bildirilmiştir. Bu amino asitlerin peptidoglikan içerisine katılımının biyofilm matrisi ile birlikte bağlı bulunan hücrelerdeki ekstraselüler matrisin (ECM) proteinli bileşeni olan amiloid fiberlerinin salınımı ile sonuçlandığı belirtilmiştir. Bu küçük moleküllerin biyofilm inhibisyon mekanizmaları hala bilinmemesine rağmen, *in vitro* veriler ümit verici olarak nitelenmiştir (Kolodkin-Gal ve ark., 2010; Jermy, 2012).

Polisakkarit, eDNA ve proteinler gibi matris bileşenlerinin dağılma ve parçalanması biyofilmleri zayıflatıp dağıtabilmektedir. Gram negatif periodontal patojen *Actinobacillus actinomycetecomitans* tarafından üretilen Dispersin B'nin bazı stafilokok türlerinde biyofilm oluşumu için önemli olan b-1,6-N-asetil-D-glukozamin (PGA) polisakkaritini depolimerize ederek biyofilmi inhibe ettiği ve dağıttığı bildirilmiştir (Itoh ve ark., 2005). Biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahip *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşları üzerine yapılan çalışmalar Dispersin B'nin, cefamandole nafate (CEF) antibiyotikinin biyofilm matrisi içine difüzyonunu kolaylaştırarak antibiyotik hücresel hedeflerine ulaşımını sağlaması sayesinde antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitesini önemli ölçüde artırabildiğini göstermiştir (Donelli ve ark., 2007).

DNaz I enziminin biyofilm matrisindeki eDNA'yı parçalayarak cam, plastik ve titanyum gibi abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunu önlediği bildirilmiştir (Mann ve ark., 2009; Kiedrowski ve Horswill, 2011). Dispersin B ve DNaz I kombinasyonu uygulandığında işlem uygulanmamış biyofilmlere göre biyofilm oluşumu 3-4,3 kat inhibe olmuş, enzimler tek başına uygulandığında ise biyofilm oluşumu 1,6-2,8 kat azalmıştır (Lynch ve Abbanat, 2010).

Lizostafin, özellikle stafilokokal peptidoglikanda çapraz köprü yapıya sahip pentaglisini parçalayan ve *S. aureus* biyofilmlerinin ekstraselüler matrisini bozan bir glisin endopeptidaz olarak tanımlanmıştır. Lizostafin *S. aureus* klinik izolatlarının oluşturduğu biyofilmlere uygulandığında biyokütle miktarını önemli ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir (Wu ve ark., 2003).

Proteinaz K yüzey ya da matris proteinlerini parçaladığı için biyofilm oluşumunu inhibe etmektedir ve var olan biyofilmin dağılmasını başlatabilmektedir. Dispersin B'yi takiben Proteinaz K ya da tripsin uygulamasının durağan yüzeylerde

stafilokokal suşların oluşturduğu biyofilmleri yok etme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Chaignon ve ark., 2007). Küçük moleküllerde olduğu gibi bu enzimlerin var olan biyofilmlerin yok edilmesindeki etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Uygulama esnasında konağın proteinleri ile inflamatuvar ve alerjik reaksiyonlara neden olabilecekleri için bu enzimlerin tedavideki potansiyelleri sınırlıdır (Chen ve ark., 2013).

Stafilokokal enfeksiyonların tedavisi için geçerliliği kabul edilebilecek immünoterapilerin geliştirilmesi amacıyla araştırmacılar çeşitli çalışmalar yürütmektedir (Proctor, 2012). Bu çalışmalarda, özellikle çok çeşitli ve sayıda virülans faktöre sahip olan *S. aureus* suşları kullanılmaktadır (Harro ve ark., 2010). Bu alandaki araştırmaların büyük çoğunluğu akut, planktonik ilişkili *S. aureus* enfeksiyonlarından korunma üzerine odaklanmıştır. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar gen ifadesi ve protein üretimi, biyofilm ile planktonik büyüme modları arasında geniş ölçüde farklılıklar göstermiştir (Beenken ve ark., 2004; Brady ve ark., 2006; Resch ve ark., 2006). Bu nedenle, bakteriyel gelişmenin birçok moduna karşı koruyucu özellik gösterebilen genel bir *S. aureus* aşısı geliştirilebilmesinin zorluğu ortaya konmuştur. Hücreye tutulu adezyon proteinleri ve ekzotoksinleri içeren farklı yeni antijenler potansiyel *S. aureus* aşısı olarak test edilmektedir (Schaffer ve Lee, 2009).

3.4. Süt Ürünlerinde *S. aureus* Varlığı

Gıda güvenliği son yıllarda önem verilen bir halk sağlığı konusudur ve gıda kaynaklı hastalıklar nedeniyle sağlık açısından temel düzenlemeleri gerektiren uygulamalardandır. *S. aureus* gıda ürünlerindeki kontaminasyonlara sıklıkla neden olan ve dünya genelinde gıda kökenli patojenlerin başında gelmektedir. Stafilokokal enteretoksinler bazı *S. aureus* suşları tarafından üretilmektedir. Bu enteretoksinler stafilokokal gıda zehirlenmesi salgınlarına yol açabilecek niteliktedir (Liebl ve ark., 1987).

S. aureus hem insan hem de zoonotik komensalde sık rastlanan bir bakteri olarak tanımlanmıştır (Jay, 1997). *S. aureus* sütte, süt ürünlerinde, sebzelerde, çiğ ve fermente etlerde bulunabilir. Bu bakteri türü ayrıca yüksek tuz toleransı, nitritlere karşı dirençli ve düşük su etkinliği ile gıdalarda çoğalma yeteneğine sahiptir (Jay, 1997). *S. aureus* ısıya karşı kararlı enterotoksinlerin üretimi nedeniyle gıdalarda

potansiyel olarak tehlikeli görülmektedir (Doan ve Davidson, 1999; Erkmen, 1997; Jay, 1997). Bu özelliklerinden dolayı *S. aureus* önemli bir gıda kaynaklı patojendir (Liebl ve ark., 1987; Post, 1999).

En az dokuz enterotoksin (A, B, C, D, E, G, H, I ve J) *S. aureus* tarafından üretilmektedir (McKillip ve ark., 2000). Bunlar arasında tip C toksini C1, C2 ve C3 alt tiplerine ayrılmıştır (Jawetz ve ark., 1989; Jay, 1997). Tip C enteretoksini gıda kaynaklı intoksikasyonun önemli bir sebebidir ve genellikle süt sığırlarından izole edilen *S. aureus* tarafından üretilmektedir (Jablonski ve Bohach, 1997; Wilson ve ark., 1991).

S. aureus çoğunlukla çiğ sütte bulunur ve mastitisli ineklerin sütünde yüksek miktarlarda varlığı saptanmıştır. *S. aureus* ya da onun ısıya karşı kararlı enteretoksinleri çiğ süt kontaminasyonundan ötürü işlenmiş süt ürünlerinde de var olabilir (Post, 1999).

Süt ve süt ürünlerinin *S. aureus* kontaminasyonu ürün güvenliği ve kalitesini etkilemektedir. Bu kontaminasyon süütün işlendiği ekipmanların biyofilm kaplı olduğuna işaret edebilir. Süt işletmelerinde rastlanılan biyofilmler önemli ölçüde protein ve kalsiyum fosfat barındırmaktadır (Jay, 1997). Süt işletmelerinde biyofilm oluşumuna ilişkin bir çalışmada, boruların bağlantısı için kullanılan plastik contaların kullanım süreleriyle doğru orantılı olarak izole edilen bakteri sayısının arttığını ve süt akış hızının azalarak durgunlaştığı bölümlerde biyofilm oluşumunun hızlandığı belirtilmiştir. Zamanla aşınan ekipman yüzeyinde oluşan çatlak ve çiziklerin bakteri tutunmasına uygun ortam sağladığı saptanmıştır (Chechowski, 1990).

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Süt Ürünleri Örnekleri

Bu çalışmada genotipik ve fenotipik olarak biyofilm oluşturma kabiliyetleri değerlendirilen suşlar süt ürünlerinden izole edilmiştir. Bu amaçla, Konya ve Bursa illerinde faaliyet gösteren üretim tesisleri ve satış noktalarından temin edilen pastörize süt, ayran, yoğurt, beyaz peynir ve kaşar peyniri örnekleri *S. aureus* varlığı yönünden analiz edilmiştir.

Süt ürünü örneklerinden *S. aureus* izolasyonu egg yolk tellurit ilave edilmiş Baird Parker Agar (BPA; Lab M, İngiltere) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Başlangıç süspansiyonu 10 g gıda örneğinin 90 mL maximum recovery dileunt (Lab M) içinde homojenize edilmesi ile hazırlanmıştır. Başlangıç dilüsyonlarından toplam 1 mL üç adet BPA üzerine drigalski spatülü kullanılarak inoküle edilmiştir. İnoküle edilen besiyerleri $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 ± 2 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda potasyum tellurit varlığından dolayı siyah veya gri renkte, etrafında lesitinaz aktivitesine bağlı olarak temiz bir zon olan tipik koloniler biyokimyasal identifikasyon paneli (Microgen Bioproducts, İngiltere) ile doğrulanmıştır.

4.2. Kültür Koşulları

Biyofilm-pozitif ve biyofilm-negatif kontrollere referans olarak Microbiologics Inc.'den (ABD) temin edilen sırasıyla ATCC 2593 *S. aureus* suşu ve ATCC 12228 *S. epidermidis* suşu çalışmada kullanılmıştır. Referans suşların stok kültürleri ve izolatlar -18°C 'de %20 gliserol içeren Triptik Soy Broth (TSB; Lab M) içinde muhafaza edilmiştir.

4.3. Kongo Kırmızısı Agar Yöntemi

Slime oluşumunun kalitatif (nitel) analizi izolatların 0,8 g/L kongo red boyası ve 36 g/L sakkaroz içeren Kongo Red Agar (KRA) üzerinde kültüre edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. İzolatlar KRA üzerine inoküle edilmiş ve 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Slime üreten izolatlar siyah koloniler oluştururken, slime üretmeyenler kırmızı koloniler oluşturur.

4.4. Kristal Viyole Boyama Yöntemi

TSB içinde bir gece kültüre edilen izolatlar %2,5 glukoz içeren TSB'de 100 kat dilüe edilmiştir. 96-kuyucuklu steril polistren mikropilaka (Anicrin, İtalya)

çukurları 200 µL dilüe kültürlerle doldurulmuştur. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra, kuyucuklardaki kalıntılar boşaltılmış ve kuyucuklara tutunmayan hücreleri uzaklaştırmak için üç kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkanan kuyucuklar hava ile kurutulmuş ve kuyucuk yüzeylerindeki biyofilm biyokütle seviyeleri kristal viyole (KV) boyama yöntemiyle ölçülmüştür. Biyofilmdeki bakteri hücreleri %1 kristal viyole ile 5 dakika süreyle boyandıktan sonra etanol ile sabitlenmiştir. Boyamadan sonra kuyucuklar üç kez steril distile suyla yıkanmış ve havayla kurutulmuştur. Son olarak bağlı kristal viyole %95 etanol ilavesi ile serbest bırakılmıştır ve etanoldeki kristal viyole seviyesi plaka okuyucu (Thermo, ABD) ile 595 nm dalga boyunda optik yoğunluk (OD) ölçümüyle tespit edilmiştir. Kantitatif biyofilm biyokütle ölçümü tüm izolatlar için üç kez tekrarlanmıştır. Cut-off OD değeri (OD_c) biyofilm-negatif kontrol suşu ile elde edilen OD değerleri ile hesaplanan standart sapma değerinin OD ortalamasına eklenmesiyle hesaplanmıştır. Ortalama OD değeri > OD_c olan izolatlar biyofilm üretici olarak nitelendirilmiştir.

4.5. *icaA* ve *icaD* Genlerinin PCR ile Tespiti

S. aureus izolatlarından ticari DNA ekstraksiyon kiti (Thermo) ile kit üreticisi tarafından Gram pozitif bakteriler için tanımlanan protokol takip edilerek toplam DNA ekstrakte edilmiştir.

icaA ve *icaD* genleri sırasıyla 1315 ve 381 baz çiftlik (bp) fragmentler oluşturmak için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çoğaltılmıştır. PCR reaksiyon karışımları (50 µL); 2 mM MgCl₂, 0,5 µM forward ve reverse primerler, her bir dNTP'den 250 µM, 1,25 U Taq DNA polimeraz, KCl içeren 5 µL Taq buffer (10X) ve 50 ng DNA kalıbından oluşmuştur. Otuz amplifikasyon döngüsünden (92°C'de 45 s denatürasyon, 52°C'de 30 s bağlanma ve 72°C'de 1 dk uzama) oluşan reaksiyon thermocycler cihazında 72°C'de 7 dk final uzaması ile gerçekleştirilmiştir.

PCR ürünleri Qiaxcel DNA High Resolution Kiti (Qiagen) kullanılarak, Qiaxcel Advanced kapiller elektroforez sisteminde (Almanya) yürütülmüştür. Doğrulama işaretleri ve büyüklük standartları her bir gene özgü ampikonun görselleştirmesine uygun bir aralık sağlamak için seçilmiştir. QX DNA Size Marker 100 bp - 2,5 kb ve QX Alignment Marker 15 bp - 3 kb (Qiagen) *icaA*'ya özgü ampikonları görselleştirmek için kullanılırken, QX DNA Size Marker 25 - 500 bp ve QX Alignment Marker 15 - 600 bp (Qiagen) *icaD*'ye özgü ürünlerin

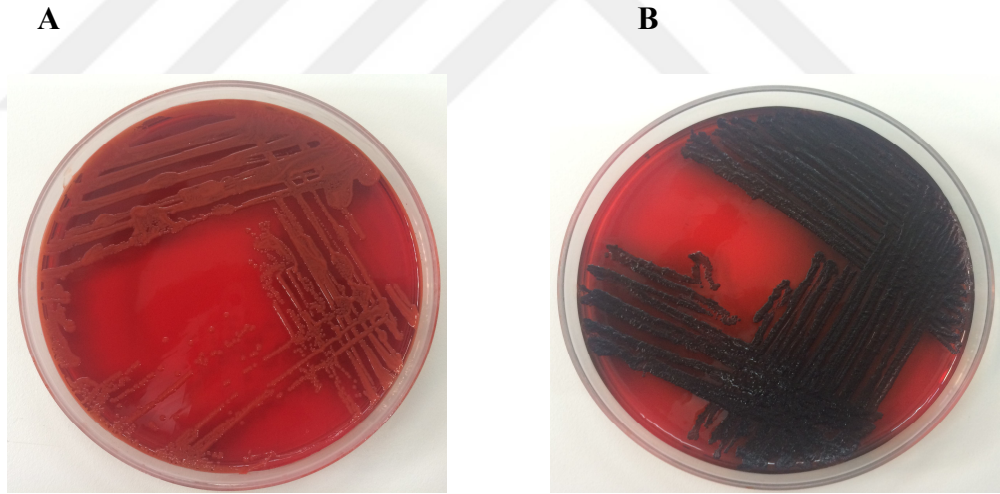
görselleştirilmesi için kullanılmıştır. Ürün püskürtme süresi 10 s olan yüksek çözünürlükte yürütme metodu OM800 uygulanmıştır. Gene özgü PCR ampliconlarının görüntülenmesi için Qiaxcel ScreenGel Software (Qiagen) kullanılmıştır.



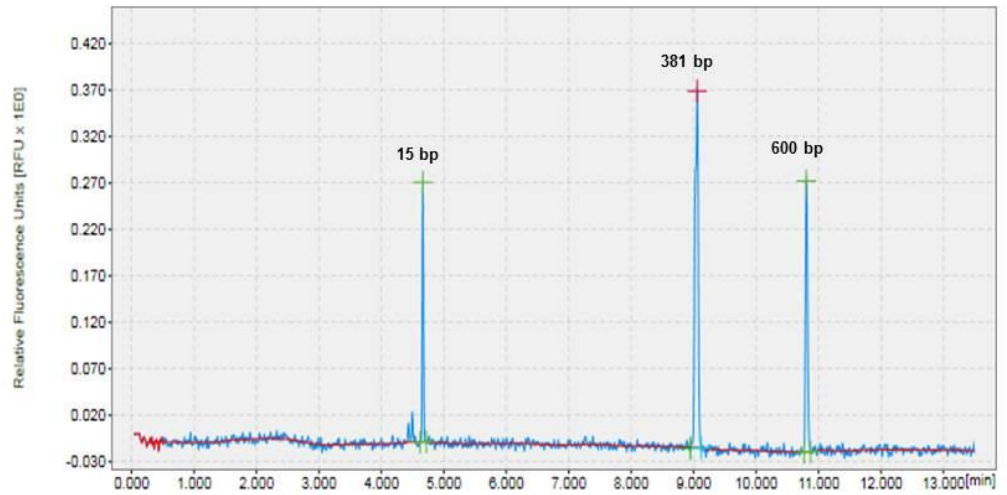
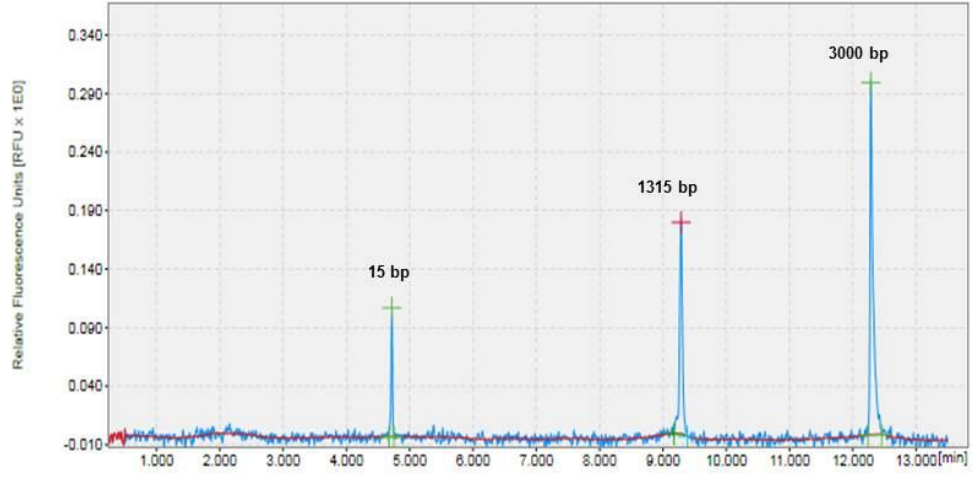
5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

5.1. Araştırma Sonuçları

Süt ürünlerinden izole edilen toplam 44 adet *S. aureus* izolatının biyofilm oluşturma yetenekleri fenotipik ve genotipik analizler ile değerlendirilmiştir. Fenotipik biyofilm üretimi izolatların KRA üzerinde oluşturdukları kolonilerin morfolojisi ve KV boyama yöntemi ile değerlendirilmiştir. İzolatların genotipik değerlendirmesi ise *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığının PCR ile saptanması yoluyla gerçekleştirilmiştir. KRA'da fenotipik ifadeye bağlı koloni morfolojilerine göre *S. aureus* izolatlarının %52,2'sinin biyofilm üreticisi olduğu saptanmıştır. Spektrofotometrik ölçüm temelli KV boyama yöntemi ile izolatların %90,9'u biyofilm üreticisi olarak tanımlanmıştır. PCR ürünlerinin elektroferogramları izolatların çoğunluğunun (%97,7) *icaA* genini taşıdığını göstermiştir. *S. aureus* izolatlarından 42'sinin (%95,4) her iki geni (*icaA* ve *icaD*) taşıdığı saptanmıştır.



Şekil 4. Kongo Red Agar üzerinde biyofilm oluşumunun fenotipik ifadesi. A. Kırmızı koloniler, biyofilm üreticisi olmayan B. Siyah koloniler, biyofilm üreticisi.



Şekil 5. PCR ürünlerinin kapiller elektroferogramları.

Çizelge 1. *S. aureus* izolatlarında *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı, Kongo Red Agar üzerinde (K: Kırmızı, S: Siyah) ve Kristal viyole boyama yöntemi sonuçları.

İzolat Numarası	<i>IcaA</i>	<i>icaD</i>	<i>icaA+icaD</i>	Kongo Red Agar	Kristal Viyole
1	+	+	+	S	+
2	+	+	+	K	+
3	+	+	+	S	+
4	+	+	+	K	+
5	+	+	+	S	+
6	+	+	+	S	+
7	+	+	+	K	+
8	+	+	+	S	+
9	+	+	+	S	+
10	+	+	+	S	+
11	+	+	+	K	+
12	-	+	-,+	K	-
13	+	+	+	K	+
14	+	+	+	S	+
15	+	+	+	K	+
16	+	+	+	K	+
17	+	+	+	S	+
18	+	+	+	K	+
19	+	+	+	S	+
20	+	+	+	S	+
21	+	+	+	S	+
22	+	+	+	K	+
23	+	+	+	S	+
24	+	+	+	K	+
25	+	+	+	S	+
26	+	+	+	S	+
27	+	+	+	K	+
28	+	+	+	K	+
29	+	+	+	K	+
30	+	+	+	K	+
31	+	+	+	S	+
32	-	-	-	S	-
33	+	+	+	K	+
34	+	+	+	S	+
35	+	+	+	S	+

Çizelge 1. *S. aureus* izolatlarında *icaA* ve *icaD* genlerinin varlığı, Kongo Red Agar üzerinde (K: Kırmızı, S: Siyah) ve Kristal viyole boyama yöntemi sonuçları.

İzolat Numarası	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>icaA+icaD</i>	Kongo Red Agar	Kristal Viyole
36	+	+	+	K	+
37	+	+	+	S	+
38	+	+	+	S	+
39	+	+	+	S	+
40	+	+	+	K	-
41	+	+	+	S	+
42	+	+	+	S	+
43	+	+	+	S	+
44	+	+	+	K	+

Çizelge 2. PCR, Kongo Red Agar ve Kristal viyole boyama yöntemi ile elde edilen pozitif ve negatif sonuç oranları.

	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>icaA+icaD</i>	KRA	KV
Pozitif	42 (%95,5)	43 (%97,7)	42 (%97,7)	25 (%52,2)	%90,9
Negatif	2 (%4,5)	1 (%2,3)	2 (%2,3)	19 (%47,8)	%9,1

5.2. Tartışma

Araştırma sonuçlarımız KRA üzerinde koloni morfolojisine dayalı ve KV boyama kantitatif biyofilm ölçüm yöntemi ile elde edilen biyofilm fenotipleri arasındaki uyumun zayıf olduğunu göstermektedir. İki yöntem ile elde edilen sonuçlar arasındaki zayıf uyum daha önce yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir ve KRA üzerinde elde edilen koloni morfolojisine dayalı sınıflandırma *S. aureus* suşlarında biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi için tavsiye edilmemiştir (Knobloch ve ark., 2002). İki yöntem ile elde edilen sonuçlar arasında gözlenen farklılık test besiyerlerindeki glukoz konsantrasyonu arasındaki farklılık ile açıklanabilir. KV boyama yönteminde TSB'ye %1 oranında glukoz ilavesinin biyofilm pozitif *S. aureus* izolat oranını %34,4'ten %83,3'e arttırdığı rapor edilmiştir (Rohde ve ark., 2001). Bir grup araştırmacı stafilocok izolatları üzerine yaptıkları çalışmalarında karbonhidrat kaynağı olarak TSB içerisine glukoz ilavesinin biyofilm oluşumunda dramatik bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (Ammendolia ve ark., 1999). Bir diğer çalışma sonuçları, KRA'da glukozun yüksek konsantrasyonlarının *S. epidermidis* suşlarında slime oluşumunu önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Kaiser et al., 2013).

Kongo kırmızısının polisakkaritlere, sialik asit ve amiloide afinite gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle polisakkarit yapısında olan biyofilm KRA'da koyu kristalize renk oluşumuna neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada KRA besiyerinde 72 saatlik inkübasyon sonucunda 23 *S. aureus* suşunun 14'ünde (%60,8) biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Bu suşlardan 24 saat inkübasyon sonucunda siyah koloni oluşturan iki tanesinin 48 saat inkübasyon sonunda KRA üzerinde kolonilerinin merkezinin siyah etrafının ise kırmızı renkte olduğu görülmüştür. Gözlenen koloni renk değişimi nedeniyle bu suşların *ica* gen ifadeleri incelenmiş ve faz varyantları olarak tanımlanmışlardır (Arciola ve ark., 2001). KRA üzerinde inkübasyon süresinin uzaması ile farklı sonuçlar elde edilen suşlar üzerine yapılan çalışmada insersiyonel mutasyonla (IS256 bölgesi) *icaC* geninin inaktive olmasının faz değişimine neden olduğu bildirilmiştir (Arciola ve ark., 2004).

Vasudevan ve ark. (2003) KRA üzerinde 35 *S. aureus* suşunun 32'sini biyofilm pozitif olarak tanımlamışlardır. Aynı suşların KV boyama yöntemiyle yalnızca 24'ünde biyofilm pozitif sonuç bildirmişlerdir. Bir çalışmada 128 *ica* pozitif *S. aureus* suşunun *in vitro* biyofilm oluşturma yetenekleri mikropılaka KV boyama

yöntemi, tüp KV boyama yöntemi ve KRA kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar mikropilaka ve tüp KV boyama yöntemlerinin sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, KRA üzerinde suşların çoğunluğu için diğer iki yöntemden farklı sonuç elde edildiği bildirilmiştir (Knobloch ve ark., 2002). Oliveira ve ark. (2006) mastit enfeksiyonlu sığırlardan izole edilen 16 *S. aureus* suşunun biyofilm oluşturma kapasitesini KRA ve KV yöntemiyle değerlendirmişlerdir. KRA'da 16 izolatın 6'sı (%37,5) biyofilm pozitif bulurken, KV yöntemiyle 3'ünü (%18,75) pozitif bulmuşlardır. Yalnızca 2 izolatı her iki yöntemle de pozitif değerlendirmişlerdir.

Mathur ve ark. (2006) mikropilaka KV boyama yöntemi, tüp KV boyama yöntemi ve KRA üzerinde 152 klinik *S. aureus* suşunu biyofilm oluşturma yeteneği yönünden karşılaştırmışlardır. Mikropilaka KV boyama yöntemi ile suşların 22'sini (%14,4) güçlü biyofilm oluşturan, 60'ını (%39,4) orta düzey biyofilm oluşturan ve 70'ini de (%46) zayıf biyofilm oluşturan veya biyofilm oluşturmeyen olarak sınıflandırmışlardır. Tüp KV boyama yöntemi ile suşların 18'sini (%11,8) güçlü biyofilm oluşturan, 45'ini (%29,6) orta düzey biyofilm oluşturan ve 89'ünü (%58,6) zayıf biyofilm oluşturan veya biyofilm oluşturmeyen olarak tanımlamışlardır. Aynı çalışmada KRA üzerinde elde edilen koloni morfolojilerine göre 152 klinik *S. aureus* suşunun yalnızca 8'ini (%5,2) biyofilm pozitif olarak sınıflandırmışlardır. Bu sonuçlar mikropilaka ve tüp KV boyama yöntemleri ve KRA besiyeri üzerinde elde edilen sonuçlar arasında zayıf bir uyum olduğunu göstermektedir.

S. aureus izolatlarından 42'sinin (%95,4) *icaA* ve *icaD* genlerini taşıdığı saptanmıştır. Benzer şekilde, Yazdani ve ark. (2006) yara enfeksiyonlarından izole ettikleri ve *in vitro* testler ile biyofilm pozitif (%52) ve negatif (%48) olarak tanımlanan toplam 50 *S. aureus* suşunun tamamında *icaAD* genlerini belirlemişlerdir. *icaA* ve *icaD* genleri *S. aureus*'un lineer β -1,6-bağlı glukozaminoglikanlardan oluşan PIA sentezini düzenleyerek biyofilm oluşturma yeteneğini belirlemektedir. Hedef DNA'nın zayıf amplifikasyonu klasik agaroz jel elektroforezinde yanlış-negatif bir sonuca sebep olabilmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada *ica* gene-özü PCR ampikonlarını tararken yanlış-negatif sonuçları önlemek amacıyla hassas, yüksek çözünürlüğe sahip bir kapiller elektroforez cihazı kullanılmıştır. *N*-asetil-glukozaminiltransferaz enzimi tarafından UDP-*N*-asetil-glukozamin'den PIA sentezlendiği *in vitro* gösterilmiştir. *icaA* gen ürünü *N*-asetil-

glukozaminiltransferaz ile homoloji gösteren, en iyi aktivitesi için *icaD* gen ürününe gerek duyan bir transmembran proteindir (Gerke ve ark., 1998). Bu çalışmada izolatların PCR ve KV boyama yöntemi ile ortaya konulan genotip ve fenotiplerinde yüksek oranda benzerlik gözlenmiştir. KV boyama tekniğinin bakteriyel biyofilmler için geniş uygulanabilirliği, güvenilirliği ve yüksek tekrarlanabilirliği önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (Peeters ve ark., 2008). PCR ve KV boyama yöntemi sonuçları *ica* genlerini taşıyan az sayıda izolatın mikropılaka çukurlarında biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmadığını göstermiştir. Benzer şekilde, daha önceki çalışmalarda *ica* lokusuna sahip olduğu halde *in vitro* biyofilm oluşturma yeteneğinden mahrum olan *S. aureus* suşları rapor edilmiştir (Crampton ve ark., 1999; Fowler ve ark., 2001). Bu sonuçlar biyofilm oluşumunun farklı düzenleyici mekanizmalara bağlı olması ve *ica* genlerinin ifadesinin glukoz, sıcaklık, ozmolarite ve aneorobik koşullarda gelişme gibi çevresel faktörlerden önemli düzeyde etkilenmesi ile açıklanmıştır (Beenken ve ark., 2004; Kim ve ark., 2008).

S. aureus suşlarında *ica* genlerinin delesyonuna bağlı olarak *N*-asetil glukozaminiltransferaz aktivitesinin, PIA üretiminin ve dolayısıyla biyofilm oluşturma yeteneğinin kaybolduğu bilinmektedir. Crampton ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada bir *S. carnosus* suşu hariç diğer tüm stafilokok türlerinde *icaADBC* genlerini göstermişlerdir. *ica* genlerinin veya çevresel şartların varlığına rağmen, birkaç suşta *ica* lokusunda nokta mutasyonuna bağlı olarak, PIA sentezinin negatif regülasyonu dolayısıyla biyofilm oluşturmamış olduğunu göstermişlerdir.

Ayrıca *ica* operonunun transkripsiyonel düzenlenmesi birbirine bağlı olan ve bağımsız çeşitli aktivatör ve represörlerin aktivitesini içermesi nedeniyle oldukça karmaşıktır. Lokusun farklı transkripsiyonel düzenlenmesi ve *ica*-bağımsız olduğu kabul edilen mekanizmalar biyofilm üretim fenotipini etkilemektedir (O'Gara, 2007). *ica* lokusunda insersiyonel inaktivasyon ve nokta mutasyonları *S. aureus*'ta biyofilm-negatif varyantların ortaya çıkmasına mantıklı bir gerekçe olarak rapor edilmiştir (Ziebuhr ve ark., 1999). Bu nedenle, fenotipik ve genotipik testlerin birlikte uygulanması biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *S. aureus* izolatlarının tanımlanmasında daha doğru sonuçlar elde edilebilmesini sağlamaktadır.

Stafilokoklarda biyofilm oluşturma mekanizmalarından en iyi anlaşılan *icaADBC*'nin kodladığı enzimler aracılığıyla polisakkarit adezinlerin sentezlenmesi

olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte çevresel uyarıcılara bağı olarak *icaADBC* genlerinin aktivitesindeki değişim ve biyofilm üretimindeki artış her zaman uyumlu bulunmamıştır. Buna karşılık glukoza bağımlı olarak biyofilm üretimindeki artış uyumlu bulunmuştur. Böylece çevresel faktörlerin *icaADBC*'den bağımsız olarak biyofilmin gelişim sürecindeki önemi ortaya konmuştur (Fitzpatrick ve ark., 2005).



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Beslenme insanoğlunun yaşamını sürdürmesi için bir zorunluluktur. Son on yılda sağlıklı, zararlı veya toksik maddeler içeren gıdalar ile ilgili çok sayıda vaka rapor edilmiştir. Bu nedenle sürdürülebilir gıda arzı ve gıda güvenliği son zamanlarda önemli bir çalışma alanı haline gelmiştir. Küresel bir konu olan gıda güvenliği, yalnızca gıda kaynaklı hastalıklarla sınırlı değil "çiftlikten sofraya" gıda yaklaşımları ile ilişkili tüm güvenlik konularını da kapsamaktadır. Daha önceleri gıda güvenliği kapsamını ağırlıklı olarak patojen bakteriler ile sınırlı gıda kaynaklı mikroorganizmalar ve gıdalarda toksik maddeler oluşturmaktaydı. Bununla birlikte, günümüzde mikroorganizmaların çeşitliliği, mikrobiyal gelişmeye yönelik çeşitli mekanizmalar, polimikrobiyal etkileşim ve çevresel faktörleri içeren ekosistemin karmaşıklığı nedeniyle gıda güvenliği ile ilişkili bir dizi yeni mikrobiyal sorun tanımlanmıştır.

Ağırlıklı olarak *S. aureus* tarafından üretilen stafilokokal enteretoksinlerin sindiriminin ardından meydana gelen stafilokokal gıda zehirlenmeleri dünyada gıda kaynaklı hastalıkların en yaygınlarından bir tanesidir (Jablonski ve Bohach, 1997). Stafilokokal enterotoksinler ile ilişkilendirilen ilk gıda kaynaklı zehirlenme tanımı Michigan (ABD) Eyaletinde 1884 yılında Vaughan ve Sternberg tarafından rapor edilmiştir. Bu gıda zehirlenmesi vakası stafilokoklar tarafından kontamine olmuş bir peynirin tüketilmesi nedeniyle gerçekleşmiştir. Stafilokokal gıda kaynaklı zehirlenmelerin önlenmesi gıdalarda *S. aureus* kontaminasyonunun engellenmesi veya azaltılması için hijyen önlemlerini gerektirmektedir.

Gıda zehirlenmesine neden olan *S. aureus* kontaminasyonlarının en önemli kaynağının biyofilmler olduğu belirtilmiştir (Costerton ve ark., 1999). Gıda işlenmesi sırasında biyofilmler, ısının yüzeyden iletimini geciktirerek, sıvının ve yüzeydeki kimyasalın sürtünme direncini artırarak ciddi sorunlara neden olabilmektedir. Gıda sektöründe biyofilmler daha çok süt, et, kanatlı ve deniz ürünleri için sorun oluşturmaktadır (Chmielewski ve Frank, 2003).

Süt mikroorganizmaların gelişmesine uygun ortam sağladığı için hızla bozulabilir. Süt ve süt ürünlerinin doğru yöntemle dezenfekte edilmemiş ekipmanlar

nedeniyle kontamine oldukları düşünölmektedir (Jessen ve Lammert, 2003; Koutzayiotis, 1992). Bu kontaminasyon süt ürünlerinin özellik, kalite ve güvenliğini etkiler. Üretim hattında oluşan biyofilm; hat boyunca akışın ve ısı iletiminin azalmasına, ürünün bakteriyel kontaminasyonuna neden olabilmektedir (Jayaraman ve ark., 1997; Poulsen, 1999).

Biyofilm tespiti için gıdanın işlendiği hattan ve sıvılardan örnekler alınarak mikrobiyolojik testlerin yapılması gereklidir. Üretim hattında biyofilm oluşumunun önlenmesinde en önemli aşama bakterilerin yüzeye tutunmalarını engellemektir. Bunun sağlanması için düzenli ve etkili temizleme işlemleri yapılmalıdır. Gıda işletmelerinde biyofilmin uzaklaştırılması için mekanik kuvvet, kimyasal maddeler, enzimler, ultrason, elektriksel alan gibi yöntemler kullanılmaktadır (Simoes ve ark., 2006).

KAYNAKLAR

- Abraham NM, Lamlerthton S, Fowler VG & Jefferson KK (2012) Chelating agents exert distinct effects on biofilm formation in *Staphylococcus aureus* depending on strain background: role for clumping factor B. *J Med Microbiol* 61: 1062–1070.
- Ahimou, F.; Semmens, M.J.; Haugstad, G.; Novak, P.J. Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73, 2905-2910.
- Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3235–3238.
- Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L, Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2151–2156.
- Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Donati ME, Montanaro L. Presence of fibrinogen-binding adhesin gene in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheters-associated and orthopaedic implant-associated infections. *Biomaterials* 2004; 25: 4825-4829.
- Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5: 7.
- Asad S & Opal S (2008) Bench-to-bedside review: quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Crit Care* 12: 236–246.
- Balaban, N.; Rasooly, A. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 61, 1–10.
- Banwell, J.; Sherr, H. Effect of bacterial enterotoxins on the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1973, 65, 467.
- Beech, I.B. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms--current understanding and state-of-the art methods of study. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 2004, 53, 177-183.
- Beenken KE, Dunman PM, McAleese F, Macapagal D, Murphy E, Projan SJ, Blevins JS & Smeltzer MS (2004) Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol* 186: 4665–4684.

- Berkley, S.F.; Hightower, A.W.; Broome, C.V.; Reingold, A.L. The relationship of tampon characteristics to menstrual toxic shock syndrome. *JAMA* 1987, 258, 917–920.
- Betley, M.J.; Schlievert, P.M.; Bergdoll, M.S.; Bohach, G.A.; Iandolo, J.J.; Khan, S.A.; Pattee, P.A.; Reiser, R.R. Staphylococcal gene nomenclature. *ASM News* 1990, 56, 182.
- Beveridge TJ, Makin SA, Kadurugamuwa JL, Li Z. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev* 1997; 20:291-303.
- Boles BR & Horswill AR (2011) Staphylococcal biofilms disassembly. *Trends Microbiol* 19: 449–455.
- Boothby, J., C. Genigeorgis, and M. J. Fanelli. 1979. Tandem coagulase/thermonuclease agar method for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:298–302.
- Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:2355-9.
- Brady RA, Leod JG, Camper AK, Costerton JW & Shirtliff ME (2006) Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to biofilm infection. *Infect Immun* 74: 3415–3426.
- Bukowski, M.; Wladyka, B.; Dubin, G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 2010, 2, 1148–1165.
- Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB & Jabbouri S (2007) Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 125–132.
- Chechowski, M.H., 1990. Bacterial attachment to Buna-N gaskets in milk processing equipment. *Journal of Dairy Technology*, 45, 113-114.
- Chen M, Yu Q & Sun H (2013) Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm-related infections. *Int J Mol Sci* 14: 18488–18501.
- Chernousova S & Epple M (2013) Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angew Chem Int Ed Engl* 52: 1636–1653.
- Chien Y, Manna AC, Projan SJ, Cheung AL. *SarA*, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation. *J Biol Chem.* 1999 Dec 24;274(52):37169-76.
- Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comp Rev in Food Sci and Food Safety.* 2003, 1541-4337.

- Conrady DG, Brescia CC, Horii K, Weiss AA, Hassett DJ & Herr AB (2008) A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. *P Natl Acad Sci USA* 105: 19456–19461.
- Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284, 1318-1322.
- Costerton, J.W.; Geesey, G.G.; Cheng, K.J. How bacteria stick. *Sci. Am.* 1978, 238, 86-95.
- Costerton, W.; Veeh, R.; Shirtliff, M.; Pasmore, M.; Post, C.; Ehrlich, G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1466-1477.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:711-45.
- Crampton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilmformation. *Infect Immun* 1999;67:5427–33.
- Crampton SE, Ulrich M, Gotz F, Doring G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 2001; 69: 4079-4085.
- Dall’Antonia M, Coen PG, Wilks M, Whiley A, Millar M. Competition between methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* in the anterior nares. *J Hosp Infect* 2005; 61:62-7; PMID:15893854.
- Davies, D.G.; Parsek, M.R.; Pearson, J.P.; Iglewski, B.H.; Costerton, J.W.; Greenberg, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998, 280, 295-298.
- Davies DG & Marques CN (2009) A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol* 191: 1393–1403.
- Davies DG, Geesey GG. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Mar; 61(3):860-7.
- de Beer D, Srinivasan R & Stewart PS (1994) Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 60: 4339–4344.
- del Pozo JL & Patel R (2007) The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* 82: 204–209.

- Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, Cámara M, Williams P, Winzer K. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*. 2006 Jun;8(6):1095-104.
- Doan, C. H., and P. M. Davidson. 1999. Growth and production of enterotoxin A by *Staphylococcus aureus* on home style French fries. *J. Food Sci.* 64:913–917.
- Donelli G, Franlini I, Romoli D, Guaglianone E, Piozzi A, Ragnath C & Kaplan JB (2007) Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2733–2740.
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8: 881–890.
- Donlan RM & Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167– 193.
- Dueholm MS, Otzen D, Nielsen PH. Evolutionary insight into the functional amyloids of the *Pseudomonas*. *PLoS One*. 2013; 8(10): e76630.
- Erkmen, O. 1997. Behaviour of *Staphylococcus aureus* in refrigerated and frozen ground beef and in Turkish style sausage and broth with and without additives. *J. Food Process. Preserv.* 21:279–288.
- Eyre, R.W.; Stanley, J.R. Human autoantibodies against a desmosomal protein complex with a calcium-sensitive epitope are characteristic of pemphigus foliaceus patients. *J. Exp. Med.* 1987, 165, 1719–1724.
- Farah, C.; Vera, M.; Morin, D.; Haras, D.; Jerez, C.A.; Guilliani, N. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 7033-7040.
- Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN & Kim JO (2000) A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 52: 662–668.
- Fitzpatrick F, Humphreys H, O’Gara JP. The genetics of staphylococcal biofilm formation will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11:967-73.
- Flemming, H.C.; Wingender, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.* 2001a, 43, 1-8.

- Foster, T.J.; Geoghegan, J.A.; Ganesh, V.K.; Hook, M. Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014, 12, 49–62.
- Fowler Jr VG, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME. The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol* 2001;189:127–31.
- Francois P, Schrenzel J, Stoerman-Chopard C, Favre H, Hermann M, Foster TJ, Lew DP, Vaudaux P. Identification of plasma proteins adsorbed on hemodialysis tubing that promote *Staphylococcus aureus* adhesion. *J Lab Clin Med.* 2000, 135: 32–42.
- Frolund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation Exchange resin. *Water Res.* 1996; 30(8)1749-1758.
- Garrett TG, Bhakoo M & Zhang Z (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci* 18: 1049–1056.
- Gerke C, Kraft A, Süssmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the *N*-acetylglucosaminyl transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem.* 1998 Jul 17;273(29):18586-93.
- Gloag ES, Turnbull L, Huang A, Vallotton P, Wang H, Nolan LM, Mililli L, Hunt C, Lu J, Osvath SR, Monahan LG, Cavaliere R, Charles IG, Wand MP, Gee ML, Prabhakar R, Whitchurch CB. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 2013 Jul 9;110(28): 11541-6.
- Greenfield, R.A.; Brown, B.R.; Hutchins, J.B.; Iandolo, J.J.; Jackson, R.; Slater, L.N.; Bronze, M.S. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. *Am. J. Med. Sci.* 2002, 323, 326–340.
- Götz F. *Staphylococcus aureus* and biofilms. *Mol Microbiol.* 2002 Mar; 43(6):1367-78.
- Hall-Stoodley, L.; Stoodley, P. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002, 13, 228-233.
- Hamilton HL, Domínguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT, Dillard JP. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 2005, 55, 1704–1721.
- Hanakawa, Y.; Schechter, N.M.; Lin, C.; Garza, L.; Li, H.; Yamaguchi, T.; Fudaba, Y.; Nishifuji, K.; Sugai, M.; Amagai, M.; et al. Molecular mechanisms of

- blister formation in bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome. *J. Clin. Invest.* 2002, 110, 53–60.
- Harro JM, Peters BM, O'May GA, Archer N, Kerns P, Prabhakara R & Shirtliff ME (2010) Vaccine development in *Staphylococcus aureus*: taking the biofilm phenotype into consideration. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 306–332.
- Hennekinne, J.A.; De Buyser, M.L.; Dragacci, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012, 36, 815–836.
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S & Ciofu O (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35: 322–332.
- Hooshangi, S.; Bentley, W.E. From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008, 19, 550-555.
- Hussain M, Wilcox MH, White PJ. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 10:191-207.
- Ito A, Taniuchi A, May T, Kawata K & Okabe S (2009) Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Appl Environ Microbiol* 75: 4093–4100.
- Itoh Y, Wang X, Hinnebusch BJ, Preston JF & Romeo T (2005) Depolymerization of b-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J Bacteriol* 187: 382–387.
- Jablonski, L. M., and G. A. Bohach. 1997. *Staphylococcus aureus*, p. 353–375. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.), *Food microbiology fundamentals and frontiers*. American Society of Microbiology Press, Washington, D.C.
- Jawetz, E., J. L. Melnick, E. A. Adelberg, G. F. Brooks, J. S. Butel, and L. N. Ornston. 1989. *Medical microbiology, 18th ed.* Appleton & Lange, San Mateo, Calif.
- Jay, J. M. 1997. *Modern food microbiology, 5th ed.* Chapman & Hall, New York.
- Jayaraman A, Cheng ET, Earthman JC, Wood TK. Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1997, 18: 396–401.
- Jermy A (2012) Biofilms: disassembly instructions included. *Nat Rev Microbiol* 10: 376.

- Jessen B, Lammert L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2003, 51:265-269.
- Jusko, M.; Potempa, J.; Kantyka, T.; Bielecka, E.; Miller, H.K.; Kalinska, M.; Dubin, G.; Garred, P.; Shaw, L.N.; Blom, A.M. Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. *J. Innate Immun.* 2014, 6, 31–46.
- Kaiser TD, Pereira EM, Dos Santos KR, Maciel EL, Schuenck RP, Nunes AP. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013 Mar;75(3):235-9.
- Kalia V & Purohit H (2011) Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets. *Crit Rev Microbiol* 37: 121– 140.
- Kaplan JB, Ragunath C, Velliyagounder K, Fine DH & Ramasubbu N (2004) Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2633–2636.
- Kiedrowski MR, Horswill AR. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann NY Acad Sci.* 2011, 1241: 104–121.
- Kim JH, Kim CH, Hacker J, Ziebuhr W, Lee BK, Cho SH. Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. *J Microbiol Biotechnol* 2008;18:28–34.
- Klasen HJ (2000) A historical review of the use of silver in the treatment of burns. *Part I Early uses. Burns* 30: 1–9.
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:505-20.
- Knobloch JK, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002; 191: 101-106.
- Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R & Losick R (2010) D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* 328: 627–629.
- Kotzin, B.L.; Leung, D.; Kappler, J.; Marrack, P. Superantigens and their potential role in human disease. *Adv. Immunol.* 1992, 54, 99–166.
- Koutzayiotis, C. Bacterial biofilms in milk pipelines. *African Journal of Dairy Science.* 1992, 24, 19-22.
- Kristian SA, Golda T, Ferracin F, Cramton SE, Neumeister B, Peschel A, et al. The ability of biofilm formation does not influence virulence of *Staphylococcus*

- aureus and host response in a Mouse tissue cage infection model. *Microb Pathog* 2004; 36:237-45.
- Larkin, S.M.; Williams, D.N.; Osterholm, M.T.; Tofte, R.W.; Posalaky, Z. Toxic shock syndrome: Clinical, laboratory, and pathologic findings in nine fatal cases. *Ann. Intern. Med.* 1982, 96, 858–864.
- Latasa C, Solano C, Penadés JR, Lasa I. Biofilm-associated proteins. *C R Biol.* 2006 Nov;329(11):849-57.
- Lewenza S. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2013; 4: 21.
- Lewis K (2010) Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 64: 357– 372.
- Li, J.; Attila, C.; Wang, L.; Wood, T.K.; Valdes, J.J.; Bentley, W.E. Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: effects on small RNA and biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 6011-6020.
- Liebl, W., R. F. Gotz, and K. H. Schleifer. 1987. Use of staphylococcal nuclease gene as DNA probe for *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:179–184.
- Lin, C.F.; Chen, C.L.; Huang, W.C.; Cheng, Y.L.; Hsieh, C.Y.; Wang, C.Y.; Hong, M.Y. Different types of cell death induced by enterotoxins. *Toxins* 2010, 2, 2158–2176.
- Liu S, Yang S, Xu H, Qin L & Tay J (2004) The influence of cell and substratum surface on hydrophobicities on microbial attachment. *J Biotechnol* 110: 251–256.
- Lowy, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 1998, 339, 520–532.
- Lynch AS & Abbanat D (2010) New antibiotic agents and approaches to treat biofilm-associated infections. *Expert Opin Ther Pat* 20: 1373–1387.
- Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, et al. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 1996; 178:175-83.
- Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G, Goldman DA & Pier GB (2002) Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun* 70: 4433–4440.
- Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan T, Tsang LH, Smeltzer MS, Horswill AR & Bayles KW (2009) Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One* 4: e5822.

- Marrack, P.; Kappler, J. The Staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990, 248, 705–711.
- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24: 25-29
- Mayer, C.; Moritz, R.; Kirschner, C.; Borchard, W.; Maibaum, R.; Wingender, J.; Flemming, H.-C. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 1999, 26, 3-16.
- McAdow, M.; DeDent, A.C.; Emolo, C.; Cheng, A.G.; Kreiswirth, B.N.; Missiakas, D.M.; Schneewind, O. Coagulases as determinants of protective immune responses against *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2012, 80, 3389–3398.
- McKillip, J. L., L. A. Jaykus, and M. A. Drake. 2000. A comparison of methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially contaminated dairy products using PCR. *J. Appl. Microbiol.* 89:49–55.
- Meyer, F.; Girardot, R.; Piemont, Y.; Prevost, G.; Colin, D.A. Analysis of the specificity of Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin F component binding. *Infect. Immun.* 2009, 77, 266–273.
- Miller, M.B.; Bassler, B.L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55, 165-199.
- Monday, S.R.; Vath, G.M.; Ferens, W.A.; Deobald, C.; Rago, J.V.; Gahr, P.J.; Monie, D.D.; Iandolo, J.J.; Chapes, S.K.; Davis, W.C.; et al. Unique superantigen activity of staphylococcal exfoliative toxins. *J. Immunol.* 1999, 162, 4550–4559.
- Moormeier D. E. ve Bayles K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology* (2017) 104(3), 365–376.
- Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 2008 Nov;4(11):e1000213.
- Nakamura, S.; Higashiyama, Y.; Izumikawa, K.; Seki, M.; Takeya, H.; Yamamoto, Y.; Yanagihara, K.; Miyazaki, Y.; Mizuta, Y.; Kohno, S. The roles of quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008, 61, 375-378.
- Nwodo UU, Green E, Okah AI. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospect. *Int J Mol Sci.* 2012. Oct 30;13(11):1400-15

- O’Gara JP. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2007;270:179–88.
- Oliveira M, Bexiga R, Nunes S.F, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol*. 2006 Nov 26;118(1-2):133-40.
- O’Neill E, Pozzi C, Houston P, Humphreys H, Robinson DA, Loughman DA, Foster TJ & O’Gara J (2008) A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol* 190: 3835–3850.
- Opperman TJ, Kwansny SM, Williams JD, Khan AR, Peet NP, Moir DT & Bowlin TL (2009) Aryl rhodanines specifically inhibit staphylococcal and enterococcal biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 4357–4367.
- Otto, M. *Staphylococcus aureus* toxins. *Curr. Opin. Microbiol*. 2014, 17, 32–37.
- Otto, M. Phenol-soluble modulins. *Int. J. Med. Microbiol*. 2014, 304, 164–169.
- Otto, M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Microbiol*. 2010, 64, 143–162.
- Pan J & Ren D (2009) Quorum sensing inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 19: 1581–1601.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 2008;72:157–65.
- Pinchuk, I.V.; Beswick, E.J.; Reyes, V.E. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins* 2010, 2, 2177–2197.
- Post, D. E. 1999. Foodborne pathogens (*Staphylococcus aureus*). *Monograph number 6*. Oxoid, England.
- Powers, M.E.; Becker, R.E.; Sailer, A.; Turner, J.R.; Bubeck Wardenburg, J. Synergistic action of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin on platelets and myeloid lineage cells contributes to lethal sepsis. *Cell. Host Microbe* 2015, 17, 775–787.
- Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1999 Oct; 181(19):5993-6002.
- Proctor RA (2012) Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin Infect Dis* 54: 1179–1186.

- Rai M, Yadav A & Gade A (2009) Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 27: 76–83.
- Ramos ER, Reitzel R, Juang Y et al. (2011) Clinical effectiveness and risk of emerging resistance associated with prolonged use of antibiotic-impregnated catheters: more than 0.5 million catheter days and 7 years of clinical experience. *Crit Care Med* 39: 245–251.
- Rani SA, Pitts B, Beyenal H, Veluchamy RA, Lewandowski Z, Davison WM, et al. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 2007; 189:4223-33.
- Rashid, M.H.; Rumbaugh, K.; Passador, L.; Davies, D.G.; Hamood, A.N.; Iglewski, B.H.; Kornberg, A. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 9636-9641.
- Resch A, Leicht S, Saric M, Pasztor L, Jakob A, Gotz F & Nordheim A (2006) Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics* 6: 1867–1877.
- Rivas, M.; Seeger, M.; Holmes, D.S.; Jedlicki, E. A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol. Res.* 2005, 38, 283-297.
- Rohde H, Knobloch JK, Horstkotte MA, Mack D. Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2001;190:105–112.
- Romani, A.M.; Fund, K.; Artigas, J.; Schwartz, T.; Sabater, S.; Obst, U. Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microb. Ecol.* 2008, 56, 427-436.
- Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci.* 2010 Feb 2;107(5):2230-4.
- Ruiz, L.M.; Valenzuela, S.; Castro, M.; Gonzalez, A.; Frezza, M.; Soulère, L.; Rohwerder, T.; Queneau, Y.; Doutheau, A.; Sand, W.; Jerez, C.A.; Guiliani, N. AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. *Hydrometallurgy* 2008, 94, 133-137.

- Sand, W.; Gehrke, T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res. Microbiol.* 2006, *157*, 49-56.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002; 184:1140-54.
- Savage VJ, Chopra I & O'Neill AJ (2013) *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 1968–1970.
- Schaffer AC & Lee JC (2009) Staphylococcal vaccines and immunotherapies. *Infect Dis Clin North Am* 23: 153–171.
- Schlievert, P.M.; Case, L.C. Molecular analysis of Staphylococcal superantigens. In Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols; Springer: New York, NY, USA, 2007; pp. 113–126.
- Secinti KD, Ozalp H, Attar A & Sargon MF (2011) Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J Clin Neurosci* 18: 391–395.
- Sheng, X.; Ting, Y.P.; Pehkonen, S.O. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. *J. Colloid Interface Sci.* 2008, 321, 256-264.
- Simões, M., Simões, L. C., Machado, I., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. *Food and Bioproducts.* 2006, 84(4), 338-345.
- Singh R, Ray P, Das A & Sharma M (2010) Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 65: 1955–1958.
- Singh, R.; Paul, D.; Jain, R.K. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol.* 2006, 14, 389-397.
- Sintim HO, Rabin N, Zheng Y, Clement OT, Yixuan D, Bonsu E. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* (2015) 7(4), 493–512.
- Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001; 183:6746-51.
- Stach, C.S.; Herrera, A.; Schlievert, P.M. Staphylococcal superantigens interact with multiple host receptors to cause serious diseases. *Immunol. Res.* 2014, 59, 177–181.

- Stoodley P, Nistico L, Johnson S, Lasko LA, Baratz M, Gahlot V, Ehrlich GD & Kathju S (2008) Direct demonstration of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in an infected total joint arthroplasty: a case report. *J Bone Joint Surg Am* 90: 1751–1758.
- Sutherland, I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001, 147, 3-9.
- Tamarapu, S.; McKillip, J.L.; Drake, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Protect.* 2001, 64, 664–668.
- Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F, Jaeger KE. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*. 2005 May;151(Pt 5):1313-23.
- Walev, I.; Weller, U.; Strauch, S.; Foster, T.; Bhakdi, S. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 1996, 64, 2974–2979.
- Waters, C.M.; Bassler, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005, 21, 319-346.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002 Feb 22;295(5559):1487.
- Wieneke, A.; Roberts, D.; Gilbert, R. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969–1990. *Epidemiol. Infect.* 1993, 110, 519–531.
- Wilke, G.A.; Bubeck Wardenburg, J. Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, 107, 13473–13478.
- Wilson, I. G., J. E. Cooper, and A. Gilmour. 1991. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and the thermonuclease gene nuc. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1793–1798.
- Wright J, Lyon G, George E, Muir T & Novick R (2004) Hydrophobic interactions drive ligand-receptor recognition for activation and inhibition of staphylococcal quorum sensing. *P Natl Acad Sci USA* 101: 16168–16173.
- Wu JA, Kusuma C, Mond JJ & Kokai-Kun JF (2003) Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3407–3414.

- Xu KD, McFeters GA & Stewart PS (2000) Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* 146: 547–549.
- Valenzuela, L.; Chi, A.; Beard, S.; Orell, A.; Guiliani, N.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F.; Jerez, C.A. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 2006, 24, 197-211.
- Valeva, A.; Walev, I.; Pinkernell, M.; Walker, B.; Bayley, H.; Palmer, M.; Bhakdi, S. Transmembrane beta-barrel of staphylococcal alpha-toxin forms in sensitive but not in resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 11607–11611.
- van Hullebusch, E.D.; Zandvoort, M.H.; Lens, P.N.L. Metal immobilisation by biofilms: mechanisms and analytical tools. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2003, 2, 9-33.
- Vandenesch, F.; Lina, G.; Henry, T. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: A redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012, 2, 12.
- Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol.* 2003 Mar 20;92(1-2):179-85.
- Verdon, J.; Girardin, N.; Lacombe, C.; Berjeaud, J.M.; Hechard, Y. Delta-hemolysin, an update on a membrane-interacting peptide. *Peptides* 2009, 30, 817–823.
- von Bodman, S.B.; Majerczak, D.R.; Coplin, D.L. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 7687-7692.
- Vuong, C.; Kocianova, S.; Voyich, J.M.; Yao, Y.; Fischer, E.R.; DeLeo, F.R.; Otto, M.A. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 54881-54886.
- Yamanaka M, Hara K & Kudo J (2005) Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Appl Environ Microbiol* 71: 7589–7593.
- Yazdani R, Oshaghi M, Havayi A, Pishva E, Salehi R, Sadeghizadeh M, Foroohesh H. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iranian J Publ Health* 2006; 35: 25-28.
- Yılmaz M, Çelik GY. Bakteriye Ekstrasellüler Polisakkaritler (EPS). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 2007. 05, 2, 7-13.

Ziebuhr W, Krimmer V, Rachid S, Löbner I, Götz F, Hacker J. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* 1999;32:345–56.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Burcu Eskici
Uyruğu : T. C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Akşehir-12/05/1991
Telefon : 05057409987
Faks :
e-mail : eskici.burcu@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	Akşehir Anadolu Öğretmen Lisesi-Akşehir/KONYA	2009
Üniversite	Moleküler Biyoloji ve Genetik İstanbul Kültür Üniversitesi-İSTANBUL	2013
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik Necmettin Erbakan Üniversitesi	2018
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
-----	-------	--------

UZMANLIK ALANI

Moleküler Biyoloji ve Genetik

YABANCI DİLLER

İngilizce, Almanca

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

Analysis of Biofilm Production and Presence of *icaA* and *icaD* Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Milk Products. Burcu ESKİCİ, Emrah TORLAK, Fatih ERCİ (01.06.2016 -05.06.2016), 2nd International Conference on Pure & Applied Science.