

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

***E. COLI'* DE PORİN PROTEİNLERİNİN BİYOFİLM
OLUŞUMUNDA ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Fatma ER
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Cihan DARCAN**

BİLECİK, 2018

Ref. No: 10219550



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

***E. COLI'* DE PORİN PROTEİNLERİNİN BİYOFİLM
OLUŞUMUNDA ROLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Fatma ER
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Cihan DARCAN**

BİLECİK, 2018



ANADOLU UNIVERSITY



**BILECIK SEYH EDEBALI
UNIVERSITY**

**Institute of Science
Department of Molecular Biology and Genetics**

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF PORIN PROTEIN IN
BIOFILM FORMATION IN *E. COLI***

**Fatma ER
Master's**

**Thesis Advisor
Professor Cihan DARCAN**

BILECIK, 2018



BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK LİSANS
JÜRİ ONAY FORMU**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun (6/11/2018) tarih ve 68/1... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 26/11/2018 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Fatma ER'in "*Escherichia coli*'de Porin Proteinlerinin Biyofilm Oluşumunda Rollerinin Araştırılması" başlıklı tez alışıması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/ ~~çoklukla~~ ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI): Doç. Dr. Cihan DARCAN

ÜYE :

Prof. Dr. Tuba İÇA

ÜYE :

Doç. Dr. Nalan SARIÖZLÜ

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
.../.../... tarih ve .../.../... sayılı kararı.

İMZA/ MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım boyunca tez çalışmamın tüm evrelerinde desteğini, fikirlerini ve deneyimlerini benden esirgemeyen ve her türlü katkıda bulunan çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Cihan DARCAN'a,

Tez çalışmamda laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü yardımda bulunan çok değerli hocalarım Özge KAYGUSUZ ve Gülçin ÇETİN'e,

Hayata adımımı attığım ilk andan bu zamana kadar hayat yolculuğumda hep yanımda olan, eğitim ve öğretim hayatımın tüm basamaklarında desteklerini her daim arkama alarak büyük başarılarla adım attığım sevgili annem Nedime ER, babam Mustafa ER ve kardeşim Ahmet ER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

FATMA ER

ÖZET

Biyofilm, çevresel stres koşullarına karşı mikroorganizmaların oluşturduğu yaşam formlarıdır ve mikroorganizmalar için büyük bir avantajdır. Bu çalışmada *Escherichia coli*'nin biyofilm oluşumunda dış membranında bulunan porin proteinlerinin (OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB ve PhoE) rolleri araştırılmıştır. Ayrıca bu rolde çevresel faktörlerden pH (5.5, 6.0, 6.5, 7, 7.5 ve 8) ve bazı metallerin (Bakır, Nikel, Çinko) varlığının biyofilm oluşumuna etkisi de incelenmiştir.

Elde edilen verilere göre, yabani tip *E. coli*'de görülmemesine rağmen *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutant *E. coli*'nin farklı pH değerlerinde biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir. pH 5.5, 6.0, 7, 7.5 ve 8 ortamlarında katı-sıvı ara fazında *ompC* mutant *E. coli* suşu biyofilm oluşturmaktadır. *ompA* mutant *E. coli* suşu ise hava-sıvı ve katı-sıvı ara fazlarında pH 6.5, 7, 7.5 ve 8 ortamlarında orta seviyede biyofilm oluşturmaktadır. *lamB* mutant *E. coli* suşu sadece pH 7 ve 7.5 ortamlarında katı-sıvı ara fazında biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. Yabani tip *E. coli* W3110 ve *ompF*, *ompG*, *ompT* ve *phoE* porin mutantlarında farklı pH ortamlarında biyofilm oluşumu tespit edilmemiştir. Farklı metallerin varlığında yapılan biyofilm denemelerinde ise bakır, nikel varlığında cam tüpte *ompA* ve *lamB* mutant *E. coli* suşlarında biyofilm oluşumu metallsiz ortam denemeleriyle aynıdır. Bu yüzden bakır ve nikel varlığının biyofilm oluşumunda rollünün olmadığı tespit edilmiştir. Fakat *ompC* mutant *E. coli* suşunda bakır ve nikel varlığında daha kuvvetli biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan bir başka metal olan çinko varlığında *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutant *E. coli* suşlarında ise ilginç bir sonuç alınmıştır. Çinko olmadığı zaman bu mutant suşlarda biyofilm oluşumu görülürken, çinkonun varlığında biyofilm oluşmadığı tespit edilmiştir. Yabani tip *E. coli* W3110, *ompF*, *ompG*, *ompT* ve *phoE* mutant suşlarında çalışılan tüm metallerde biyofilm tespit edilmemiştir. Dolayısıyla *ompA*, *ompC* ve *lamB* genlerinin yokluğu biyofilm oluşturma mekanizmasını tetiklediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*; biyofilm; porin proteinleri; pH; omp

ABSTRACT

Biofilms are the life forms of microorganisms against environmental stress conditions and are a great advantage for microorganisms. In this study, the roles of porin proteins (OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB and PhoE) in the outer membrane of *Escherichia coli* were investigated. In addition, the presence of pH (5.5, 6.0, 6.5, 7, 7.5 and 8) and some metals (Copper, Nickel, Zinc) on relationship between the formation of biofilm and porin genetic regulation were investigated.

According to the data obtained, it was observed that *ompA*, *ompC* and *lamB* mutant *E. coli* formed biofilm at different pH values although they were not seen in wild type *E. coli* W3110. In the case of pH 5.5, 6.0, 7, 7.5 and 8 the *ompC* mutant *E. coli* strain in the solid-liquid intermediate phase forms the biofilm. The *ompA* mutant *E. coli* strain forms mid-level biofilm in the air-liquid and solid-liquid intermediate phases of 6.5, 7, 7.5 and 8 environments. The *lamB* mutant *E. coli* strain was found to form biofilm in the solid-liquid intermediate phase only in pH 7 and 7.5 media. No biofilm formation was detected in *E. coli* W3110 and *ompF*, *ompG*, *ompT* and *phoE* porin mutants. Biofilm tests in the presence of different metals, in the presence of copper, nickel, the biofilm formation in the glass tube by the *ompA* and *lamB* mutant *E. coli* strains is the same as that of metal-free media. Therefore, it was found that there was no role in the formation of biofilm in the presence of copper and nickel. But in the *ompC* mutant *E. coli* strain, stronger biofilm formation was detected in the presence of copper and nickel. An interesting result was obtained in the *ompA*, *ompC* and *lamB* mutant *E. coli* strains in the presence of zinc, another metal used in the study. While biofilm formation was observed in these mutant strains when there was no zinc, but biofilm did not occur in the presence of zinc. Biofilm was not detected in all metals studied in wild type *E. coli* W3110, *ompF*, *ompG*, *ompT* and *phoE* mutant strains. The absence of the *ompA*, *ompC* and *lamB* genes thus produced a result that triggered the biofilm formation mechanism.

Key words: *Escherichia coli*; biofilm; porin proteins; pH; omp

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 <i>Esheria coli</i> ‘nin Genel Özellikleri.....	5
2.2 Dış Membranın Genel Özellikleri	6
2.3 Porin Proteinlerinin Genel Özellikleri.....	7
2.3.1. Porin proteinlerinin anatomik yapısı	10
2.4 Porinleri Etkileyen Çevresel Faktörler	12
2.4.1 Porin proteinlerinin pH stresindeki fonksiyonu.....	12
2.4.2 Porin proteinlerinin metal stresindeki fonksiyonu.....	14
2.4.3. Porin proteinlerinin diğer çevresel şartlardaki fonksiyonları	15
2.5 Biyofilm.....	18
2.6 Biyofilmin Yapısı	20
2.7 EPS’ nin Genel Özellikleri	21
2.8 Biyofilm Oluşum Mekanizması	23
2.8.1 Dönüşümlü tutunma.....	24
2.8.2 Dönüşümsüz tutunma	25
2.8.2.1 Mikrobiyal selüloz	26
2.8.2.2 Curli	27
2.8.2.3 Poli-β-1,6-N-asetil-glukosamin (PGA/ PNAG).....	29
2.8.3 Koloni oluşumu	30
2.8.4 Olgun biyofilm oluşumu.....	30
2.8.5 Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması.....	31
2.9 Yüzey Koşulları.....	31

Sayfa No

2.10 Sinyal Molekülüyle İletişim (Quorum Sensing)	32
2.11 Biyofilm Oluşumunun Düzenlenmesi Karışan Diğer Faktörler.....	34
2.12 Çalışmanın Amacı	36
3. MATERYAL METOD	37
3.1 <i>Escherichia coli</i> Suşları.....	37
3.2 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar.....	38
3.2.1 Luria-Bertani brot besiyeri	38
3.2.2 Luria-Bertani agar besiyeri	38
3.2.3 SOB medium	38
3.2.4 SOC medium	38
3.2.5 Kongo kırmızılı agar.....	38
3.2.6 TBE hazırlama	38
3.2.7 TE hazırlama.....	39
3.2.8 IPTG (İzopropil β -D-1-tiogalaktopironasid) hazırlama.....	39
3.2.9 Tamponların hazırlanması	39
3.2.10 Kullanılan metallerin hazırlanması.....	39
3.2.11 pH değerleri	39
3.3 Koloni PZR.....	39
3.3.1 Agaroz jel elektroforezi	41
3.4 Rollerini Olduğu Belirlenen Mutantların Tamamlama Testleri İle Doğrulamasının Yapılması.....	42
3.5 Komplementasyon Deneyi	42
3.5.1 Primer tasarımı.....	42
3.5.2 Primer sulandırma.....	42
3.5.3 Ligasyon	42
3.5.4 PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	43
3.5.5 Transformasyon	43
3.6 Yabani Tip ve Mutantların Normal Şartlarda Büyüme Grafiğinin Belirlenmesi .	44
3.7 Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi	44
3.8 Biyofilm Testi.....	45
3.9 Mikrotitrasyon Plağı Yöntemi (Kantitatif Yöntem)	46

Sayfa No

3.10 Koloni Morfolojisi Tayini	46
3.11 Biyofilm Oluşumun Kongo Kırmızılı Agarda Tespiti	47
3.12 Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)	47
3.13 RNA İzolasyonu	47
3.13.1 Ters Transkripsiyonlu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT - PZR).....	47
3.13.2 Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR)	47
3.14 İstatistiksel Analizler	48
4. BULGULAR	49
4.1 Yabani Tip ve Mutant Suşların PZR Görüntüleri	49
4.2 <i>E. coli</i> W3110, Mutantların ve Komplementlerin Büyüme Grafikleri.....	52
4.3 <i>E. coli</i> W3110'nun Biyofilm Oluşturma Durumunun Belirlenmesi.....	53
4.4 Porin Proteinlerinin Biyofilm Oluşumundaki Rollerinin Belirlenmesi.....	54
4.5 Biyofilm Oluşumu Üzerine pH Etkisi ve Mutantlarla İlişkisi.....	55
4.6 pH'nın Bakteriyal Yapışmaya Etkisi.....	69
4.7 Biyofilm Oluşumu Üzerine Metal Etkisi ve Mutantlarla İlişkisi	71
4.8 Kullanılan Malzemenin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisinin Araştırılması ve Mutantlarla İlişkisi	78
4.9 Kongo Kırmızı Bağlama İle Biyofilm Tayini	79
4.10 Morfoloji Tayini	82
4.11 Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri (Scanning Electron Microscopy)	85
4.12 Gerçek zamanlı PZR (Real-Time PCR) Sonuçları.....	89
5. TARTIŞMA-SONUÇ	96
6. ÖNERİLER	110
7. KAYNAKLAR	112
ÖZGEÇMİŞ.....	

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. <i>E. coli</i> 'nin taksonomisi	6
Çizelge 2.2. Yüzeye tutunma ve biyofilm oluşumunda etkili faktörler	32
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar.	37
Çizelge 3.2. Bir örneklik koloni PZR reaksiyon karışımı.....	40
Çizelge 3.3. PZR (Thermo) döngü koşulları.....	40
Çizelge 3.4. Kullanılan Primerler.	40
Çizelge 4.1. Farklı pH'lardaki LB Brot besiyerinde 24 saatlik biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi.....	67
Çizelge 4.2. Farklı pH'lardaki LB Brot besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonrası biyofilm oluşumundaki pH değişiminin değerlendirilmesi	68
Çizelge 4.3. Farklı pH'lardaki LB Brot besiyerinde <i>E. coli</i> 35218 suşunun 24 saatlik inkübasyon sonrası biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi	69
Çizelge 4.4. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 suşunda metallerin minimal inhibisyon değeri.	71
Çizelge 4.5. Farklı metaller bulunan LB Brot besiyerinde 24 saatlik biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi	77
Çizelge 4.6. İlgili suşlar ve morfortip farklılıkları	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. <i>Escherichia coli</i> 'nin SEM'deki görüntüsü	6
Şekil 2.2. Gram negatif bakterilerde iç ve dış membranının şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.3. Gram-negatif bakterilerin yapısal olarak karakterize edilmiş dış zar proteinlerinin biyolojik fonksiyonları	10
Şekil 2.4. Üç farklı porin proteini yapılarının şematik üç boyutlu gösterimleri	11
Şekil 2.5. Biyofilm oluşum aşamaları.....	24
Şekil 2.6. Biyofilm oluşumu için gerekli hücre dışı matris bileşenlerinin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici ağın güncel modeli	26
Şekil 2.7. Mikrobiyal selülozun kimyasal yapısı	26
Şekil 2.8. Bakteriyal biyofilm matrislerinin bir bileşeni PNAG.....	29
Şekil 3.1. pLATE 51 vektör haritası	43
Şekil 4.1. Yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantlarının f-r primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.....	49
Şekil 4.2. Yabani tip <i>E. coli</i> ve mutantlarının f-k1 primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.....	50
Şekil 4.3. <i>E. coli</i> ve pLATE51 mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü.....	51
Şekil 4.4. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantların büyüme grafiği.....	52
Şekil 4.5. Komplement hücrelerin büyüme grafiği.....	52
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> suşlarının pH 7.0 ortamında biyofilm oluşumu.....	53
Şekil 4.7. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantların inkübasyonunun 18. saatinde biyofilm durumu	54
Şekil 4.8. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve mutantların inkübasyonunun 24. saatinde biyofilm durumu	54
Şekil 4.9. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 5.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.	55
Şekil 4.10. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 6.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.....	56
Şekil 4.11. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 6.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.....	56

Sayfa No

Şekil 4.12. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 7.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.....	57
Şekil 4.13. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 7.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.....	57
Şekil 4.14. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantlarının pH 8.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.....	58
Şekil 4.15. pH 5.5 ve 6.0 değerinde <i>E. coli</i> W3110, <i>ompC</i> mutantı ve komplement hücrenin doğrulama testi.....	58
Şekil 4.17. pH 7.0 değerinde <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> , <i>ompC</i> , <i>lamB</i> mutantları ve komplement hücrelerin doğrulama testi.....	59
Şekil 4.18. pH 7.5 değerinde <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> , <i>ompC</i> , <i>lamB</i> mutantları ve komplement hücrelerin doğrulama testi.....	60
Şekil 4.19. pH 8.0 değerinde <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> , <i>ompC</i> mutantları ve komplement hücrelerin doğrulama testi.....	60
Şekil 4.20. <i>E. coli</i> ATCC 35218 suşunun farklı pH değerlerine sahip ortamda biyofilm oluşumu.....	61
Şekil 4.21. <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantların pH 5.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği.....	61
Şekil 4.22. <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantların pH 6.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği.....	62
Şekil 4.23. <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantların pH 6.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu grafiği.....	62
Şekil 4.24. <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantların pH 7.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği.....	63
Şekil 4.25. <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantların pH 7.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği.....	63
Şekil 4.26. <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantların pH 8.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği.....	64
Şekil 4.27. pH 5.5 LB broth ortamında <i>E. coli</i> W3110, <i>ompC</i> mutant <i>E. coli</i> ve komplement hücre <i>plate51::ompC</i> biyofilm sonucu.....	64

Sayfa No

Şekil 4.28. pH 6.0 LB broth ortamında <i>E. coli</i> W3110, <i>ompC</i> mutant <i>E. coli</i> ve komplement hücre <i>plate51::ompC</i> biyofilm sonucu.....	65
Şekil 4.29. pH 6.5 LB broth ortamında <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> mutant <i>E. coli</i> , <i>ompC</i> mutant <i>E. coli</i> ve komplement hücrelerin biyofilm sonucu	65
Şekil 4.30. pH 7.0 LB broth ortamında <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> mutant <i>E. coli</i> , <i>ompC</i> mutant <i>E. coli</i> , <i>lamB</i> mutant <i>E. coli</i> ve komplement hücrelerin biyofilm sonucu	66
Şekil 4.31. pH 7.5 LB broth ortamında <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> mutant <i>E. coli</i> , <i>ompC</i> mutant <i>E. coli</i> , <i>lamB</i> mutant <i>E. coli</i> ve komplement hücrelerin biyofilm sonucu	66
Şekil 4.32. pH 8.0 LB broth ortamında <i>E. coli</i> W3110, <i>ompA</i> mutant <i>E. coli</i> , <i>ompC</i> mutant <i>E. coli</i> ve komplement hücrelerin biyofilm doğrulaması.....	66
Şekil 4.33. <i>ompA</i> mutant <i>E. coli</i> suşunun farklı pH değerlerindeki adezyon durmu.....	70
Şekil 4.34. <i>ompC</i> mutant <i>E. coli</i> suşunun farklı pH değerlerindeki adezyon durmu.....	70
Şekil 4.35. <i>lamB</i> mutant <i>E. coli</i> suşunun farklı pH değerlerindeki adezyon durmu.....	70
Şekil 4.36. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantların Nikel metali bulunan LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.	71
Şekil 4.37. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantların Bakır metali bulunan LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.	72
Şekil 4.38. Yabani tip <i>E. coli</i> W3110 ve porin mutantların Çinko metali bulunan LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu	72
Şekil 4.39. Nikel metali varlığında biyofilmde rolü olduğu tespit edilen suşların komplement testleri.....	73
Şekil 4.40. Bakır metali varlığında biyofilmde rolü olduğu tespit edilen suşların komplement testleri.....	73
Şekil 4.41. <i>E. coli</i> ATCC 35218 suşunun farklı metallerin varlığında biyofilm oluşumları	74
Şekil 4.42. Nikel varlığında ve yokluğunda LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği.....	75
Şekil 4.43. Bakır varlığında ve yokluğunda LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği.	75
Şekil 4.44. Çinko varlığında ve yokluğunda LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği.....	76

Sayfa No

Şekil 4.45. Nikel, Bakır ve Çinko varlığında <i>ompA</i> , <i>ompC</i> , <i>lamB</i> ve komplement hücrelerin biyofilm doğrulaması	76
Şekil 4.46. Cam malzeme olan deney tüplerinde biyofilm oluşumu	78
Şekil 4.47. Polivinil klorür (PVC) üzerindeki biyofilm oluşumu.....	78
Şekil 4.48. <i>E. coli</i> 35218 referans suşunun kongo kırmızılı agar besiyerinde kongo kırmızı bağlama ile biyofilm tayini.....	79
Şekil 4.49. <i>E. coli</i> W3110 ve mutant porinlerin kongo kırmızı bağlama ile biyofilm tayini.....	80
Şekil 4.50. Komplement hücrelerin kongo kırmızı bağlama ile biyofilm tayini	81
Şekil 4.51. <i>E. coli</i> 35218 referans suşunun kongo kırmızılı agar besiyerinde fenotipi ..	83
Şekil 4.53. Kongo kırmızılı agar besiyerinde komplement hücrelerin fenotipik farklılıkları.....	84
Şekil 4.54. <i>E. coli</i> W3110 ve <i>E. coli</i> 35218 taramalı elektron mikroskop görüntüleri...86	
Şekil 4.55. <i>ompA</i> mutant <i>E. coli</i> suşunun 24 saatlik inkübasyonu sonrası sıvı ortamdan alınan bakterilerin SEM görüntüsü.	87
Şekil 4.56. <i>ompC</i> mutant <i>E. coli</i> suşunun 24 saatlik inkübasyonu sonrası sıvı ortamdan alınan bakterilerin SEM görüntüsü.	87
Şekil 4.57. <i>lamB</i> mutant <i>E. coli</i> suşunun 24 saatlik inkübasyonu sonrası sıvı ortamdan alınan bakterilerin SEM görüntüsü.	88
Şekil 4.58. <i>ompA</i> ve <i>ompC</i> mutantlarına ait 24 saatlik biyofilm kütlelerinin SEM görüntüsü.....	88
Şekil 4.59. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>nhaR</i> geninin ekspresyon seviyesi.	90
Şekil 4.60. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>nhaR</i> geninin ekspresyon seviyesi90	
Şekil 4.61. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>nhaR</i> geninin ekspresyon seviyesi91	
Şekil 4.62. pH 7.5 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>nhaR</i> geninin ekspresyon seviyesi	91
Şekil 4.63. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>yhiU</i> geninin ekspresyon seviyesi 93	
Şekil 4.64. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>ygiU</i> geninin ekspresyon seviyesi 93	
Şekil 4.65. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>ygiU</i> geninin ekspresyon seviyesi 94	

Sayfa No

Şekil 4.66. pH 7.5 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>ygiU</i> geninin ekspresyon seviyesi	
.....	94
Şekil 4.67. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile <i>csgD</i> geninin ekspresyon seviyesi	95

SİMGELER DİZİNİ

A	: Adenin
Ag ⁺²	: Gümüş
C	: Sitozin
C ₆ H ₁₂ O ₆	: Glikoz (Şeker)
Ca ⁺²	: Kalsiyum
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
Cu	: Bakır
CuSO ₄	: Bakır Sülfat
IPTG	: İzopropil β -D- 1 - Tiogalaktopiranosid
Mg ⁺²	: Magnezyum
Ni	: Nikel
NiCl ₂	: Nikel klorür
G	: Guanin
T	: Timin
U	: Urasil
Zn	: Çinko
ZnSO ₄	: Çinko sülfat
%	: Yüzde
°C	: Santigrad Derece
+	: Pozitif
-	: Negatif
σ	: Sigma

KISALTMALAR DİZİNİ

AHL	: Açillenmiş Homoserin Laktonlar
Amp	: Amfisilin
Bap	: Biyofilm İlişkili protein
bdar	: kahverengi, kuru ve pürüzlü (brown, dry and rough)
bp	: Baz çifti
bsc	: Bakteriyel selüloz biyosentezi
Cd	: Kadminyum
Cm	: Kloramfenikol
Co	: Kobalt
CV	: Kristal Viyole
csg	: Curli alt ünite geni (Curli subunit gene)
dH ₂ O	: Deiyonize su
dk	: Dakika
DM	: Dış Membran
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit Trifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ELISA	: Enzim Bağlantılı Bağışıklık Testi
EPS	: Ekzopolisakkarit
EtBr	: Etidiyum Bromür
f	: forwad (ileri primer)
Fe	: Demir
gr	: Gram
IPTG	: İzopropil β-D-1-tiogalaktopironasid
İM	: İç Membran
kDa	: Kilodalton
Km	: Kanamisin
L	: Litre
LamB	: Maltoz ve Maltodekstrin Porin Proteini
LB	: Luria-Bertani

M	: Molar
MIK	: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
mM	: Milimolar
ml	: Mililitre
MOPS	: 3-(N-Morpholino) Propane Sulfonik Asit
ng	: Nanogram
nm	: Nanomol
NA	: Nalidiksik Asit
O.D	: Optik Dansite
Omp	: Dış Membran Protein
OmpA	: Dış Membran Protein A
OmpC	: Dış Membran Protein C
OmpF	: Dış Membran Protein F
OmpG	: Dış Membran Protein G
OmpT	: Dış Membran Protein T
Pdar	: pembe, kuru ve pürüzlü (pink, dry and rough)
PNAG	: β -1-6-N asetil glukozamin
pH	: Potansiyel Hidrojen İyonu
PhoE	: Fosfat Porini
r	: reverse (geri primer)
rdar	: kırmızı, kuru ve pürüzlü (red, dry and rough)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVC	: Polivinil Klorür
RNA	: Ribonükleik Asit
RpoS	: Alternatif Sigma Faktörü
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
saw	: Düz ve beyaz (smooth and white)
Sc	: Skandiyum
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
Sn	: Saniye
Taq	: Thermus Aquaticus
TBE	: Tris-Borat-EDTA

TE	: Tris-EDTA
UV	: Ultraviyole
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
QS	: Çekirdek Algılama (Quorum sensing)
SDS	: Sodyum Dedosil Sülfat
TCST	: İki bileşenli sinyal iletimi

1.GİRİŞ

Mikroorganizmalar, besin ihtiyaçlarını karşılayabildikleri pek çok ortamda yaşam faaliyetlerini sürdürebilmektedirler (Chilcott ve Hughes, 2000). Fakat, doğal ortamlarında ani pH değişimi, yüksek osmolarite, sıcaklığın kontrolsüz artması ya da besinlerin sınırlanması gibi yaşamlarını etkileyen veya sınırlandıran bir çok stres faktörüne maruz kalmaktadırlar (Grant ve Long, 1981). Bu zor şartlar altında hayatta kalabilmek için çeşitli yaşam stratejileri geliştirmektedirler. Biyofilm tabakası da, bu stres koşullarında bakterilerin geliştirdiği savunma mekanizmalarından birisidir (Poulsen, 1999). Bakteriler bu savunma mekanizmasıyla başka türler ve kendi türleri arasında kurdukları iletişim ile gen ifadelerini ayarlayabilirler, bu ortamda daha uzun süre hayatta kalabilmek için metabolizmalarını ve belirli yüzey proteinlerini aktifleştirerek yüzey özelliklerini değiştirebilmektedirler. Böylece savunma sistemi olarak kullandıkları biyofilm sayesinde çoğalmanın ve hayatta kalmanın zor olduğu ortamlarda dahi yaşamlarını sürdürmeye devam etmektedirler (Chilcott ve Hughes, 2000).

Biyofilm, mikroorganizmaların bir yüzeye yapışarak, kendilerinin ürettikleri polimerik yapıdaki jelsi bir tabaka içinde yaşayan küçük topluluklar olarak tanımlanır (Leone, vd., 2006; Hassan, vd., 2011). Bu mukus yapılı tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır. Terminolojide ise ekzopolisakkarit ya da ekzopolimer (EPS) adı verilmektedir (Fujishige, vd., 2006). Bu oluşan polisakkarit bazlı ağ yapısı, proteinler ve hücre dışı genomik DNA'yı içermektedir ve biyofilmlerin oluşumunda ve gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Hudson, vd., 1999; Los, vd., 2010; Gupta, vd., 2016). Bunlara ek olarak biyofilm tabakası içerisinde ekzopolisakkarit olan bir glikokalikte bulunmaktadır. Glikokaliks bakterinin canlı veya cansız yüzeylerde tutunmasını, çoğalmasını ve gelişmesini sağlayan ekstrasellüler polimerik bir maddedir. Aynı zamanda glikokaliks, gen transkripsiyonuna bağlı olarak da, farklı fenotipik özellikler gösterebilmektedir. Bu nedenle, mikroorganizmaların niçin fenotip değişikliğine gittiği ve biyofilm yaşam tarzının nasıl düzenlendiğini anlamak önemlidir (Poulsen, 1999; Gupta, vd., 2016).

Escherichia coli (*E. coli*) biyofilmlerinin farklı olarak ifade edilmesinde bir çok gen mevcuttur (Schembri, vd., 2003b; Beloin, vd., 2004; Ren, vd., 2004). Bu genlerin varlığından ve farklılığından dolayı, oluşan biyofilm yapılarında farklılık göstermektedir

(Beloin ve Ghigo, 2005). Yapılan çalışmalar sonucunda, biyofilm oluşumunun birbirini takip eden beş ardışık basamakta gerçekleştiği saptanmıştır. Aslında basit bir sistem olarak düşünülen biyofilm oluşumu, çok sayıda gen düzenleyici yolları içeren karmaşık bir olay olarak gerçekleşmektedir (Chevance ve Hughes, 2008). Öncelikle mikroorganizmalar aktif hücreleri ile yüzeye yakın mesafede etkileşime girerek yüzeye dönüşümlü olarak tutunurlar. Yüzeye dönüşümlü olarak tutunur iken o yüzeyde hayatta kalabilmelerini sağlayacak besin maddelerinin var olup olmadığını araştırırlar. Daha sonra, hücre organelleri ile kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen etkileşimleri sayesinde yüzeye dönüşümsüz olarak tutunmaktadır (Poulsen, 1999). Böylece, yüzeye tutunan bakteri burada gelişir ve üçüncü basamak olarak mikrokoloni oluşturmaya başlar. Mikrokoloniler zaman içinde büyür ve daha yüksek yapılara dönüşerek koloni oluşturur. Bu basamakta artık olgun biyofilm yapısı oluşmuştur (Srey, vd., 2013). Biyofilm gelişimi ve sürekliliği taze besiyeri sağlandıkça devam etmektedir. Ancak, ortamdaki besin maddeleri azalmaya başlayınca ya da tükenince son basamakta bakterilerin yüzey bağlantıları zayıflar ve hücreler planktonik modlarına geri dönerler (Gün ve Ekinci, 2009).

Escherichia coli, biyofilm oluşumunun genetik düzenlemelerinin araştırılması için de yararlı bir model olmuştur (Genevaux, vd., 1996; Danese, vd., 1998). *E. coli*'de biyofilm oluşumu, değişen şartlara adaptasyon, gen ekspresyonunun yeniden yönlendirilmesi yoluyla hücre morfolojisi, fizyolojisi ve metabolizmasını etkilemektedir (Sugawara ve Nikaido, 1992; Price, vd., 2004; Herzberg, vd., 2006; Sharma ve Casey, 2014). *E. coli*'de tanımlanmış farklı biyofilm türleri bulunmaktadır. Bu mekanizmaların farklı şekilde ifade edilmesinde biyofilmi tetikleyen genlerin farklı koşullarda etkileşime girmesi ve ekspresyonlarında ki değişim dolayısıyla biyofilm yapısının farklı şekilde oluştuğu tespit edilmiştir. Biyofilmin yapısının farklı şekilde oluşmasında temel olarak selüloz, curli ve amiloid lifleri de dahil olmak üzere PNAG (β -1-6-N asetil glukozamin) gibi eksopolisakkaritlerin farklılaşmasından kaynaklanmaktadır. Bu yapılar bakterilerin etrafında bir matris oluşturur (Wang, vd., 2004; Beloin, vd., 2008; Liu, vd., 2010). Curli yapısının oluşmasına kontrol eden genlerden biri olan *csgD*'nin *E. coli*'nin planktonik formdan biyofilm durumuna geçişini yönettiği belirlenmiştir (Barnhart ve Chapman, 2006; Gualdi, vd., 2007; Evans ve Chapman, 2014; Yaron ve Römling, 2014; Jain, vd., 2017). Yani *csgD*, curli oluşumuna müdahale ederek

mikroorganizmaların yüzeye tutunmasını ve orada birikmesini sağlamaktadır (Brombacher, vd., 2006; Serra, vd., 2013). Diğer hücre dışı matriks bileşeni de selülozdur (Römling, 2005). Bakterilerde selüloz üretimi, hava-sıvı ara yüzünde gerçekleşmektedir (Johnson, vd., 1988; Beloin, vd., 2008). Biyofilm bileşeni olarak önemli bir rol sergileyen selüloz, bakteriyel selüloz sentez operonu olan *bcsABZC* ve selüloz biyosentezinin aktivatörü olan *adrA* operonunun ifadeleriyle düzenlenmektedir. c-di-GMP'nin üretiminin uyarılması *adrA* tarafından gerçekleştirilir (Solano, vd., 2002, Römling, 2005). Ve son olarak diğer bir biyofilm yapısı olan poli-a-1,6-N-asetil-Dglukosaminde (PGA) hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlamaktadır. Bu polisakkaritler adezyon, bağlanma ve mikrokoloni formasyonunu düzenleyerek selüloz üretiminde yardımcı rol oynamaktadır (Pratt ve Kolter, 1998; Vidal, vd., 1998; Prigent-Combaret, vd., 2000; Zogaj, vd., 2001; Reisner, vd., 2003; Wang, vd., 2004; Da ve Ghigo, 2006). Ayrıca curli ve selülozun birlikte büyük biyofilm oluşturması da *csgD* regülatörü tarafından düzenlenmektedir (Hammar, vd., 1995; Römling, vd., 1998a; Römling, 2005; Evans ve Chapman, 2014; Hufnagel, vd., 2015). Bu genleri etkileyen çeşitli düzenleyici sistemler *E. coli* biyofilm oluşumunda etkilemektedir (Vidal, vd., 1998; Adams ve McLean, 1999; Dorel, vd., 1999; Prigent-Combaret, vd., 2001; Corona ve Membrillo, 2002; Jackson, vd., 2002a; Jackson, vd., 2002b). Örneğin; EnvZ / OmpR, H-NS, Cpx ve Rcs sistemlerinin sıcaklık, pH, ozmotik koşullara yanıt olarak curli fimbriaların üretimini düzenleyerek biyofilm oluşumunu etkilediği bilinmektedir (Prigent-Combaret, vd., 2001; Stanley ve Lazazzera, 2004; Jubelin, vd., 2005; Da ve Ghigo, 2006). *csgD*'nin transkripsiyonu ve curli ifadesinin düzenlenmesi de EnvZ/OmpR tarafından aktive edildiği bildirilmiştir (Vidal, vd., 1998; Prigent-Combaret, vd., 2001). Ayrıca CsgD promotörünün ekspresyonu pozitif veya negatif olarak, *rpoS*, *crl* ve *hns* gibi çeşitli transkripsiyon düzenleyicileri genler tarafından etkilenir (Römling, vd., 1998 ; Prigent-Combaret, vd., 2001; Brombacher, vd., 2003). Cpx sisteminde biyofilm oluşumunu aktive etmek için yüzey algılamaya aracılık edebilir (Otto ve Silhavy, 2002; Lejeune, 2003). Ayrıca QS (Quorum sensing) ifadesi de biyofilm oluşumunda pozitif olarak kontrol edilmektedir (Bougdour, vd., 2006; Gualdi, vd., 2007). Son olarak RpoS'inde *E. coli*'de biyofilm oluşumunun miktarının ve başlatılmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. RpoS'nin ifadesi ve aktivasyonu, *csgD*'nin aktivasyonuna da yol açmaktadır ve biyofilm

oluşumunu artırmakta ya da azaltmaktadır (Corona ve Membrillo, 2002; Mika ve Hengge, 2014).

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda *E. coli*'nin dış membranında bulunan porin proteinlerinin (OmpA,OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB, PhoE) çevre ve yüzey ile direkt ilişki içerisinde olması nedeniyle biyofilm oluşumunda herhangi bir rolünün olup olmadığına dair yeterli bir literatür bulunmaması nedeniyle bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

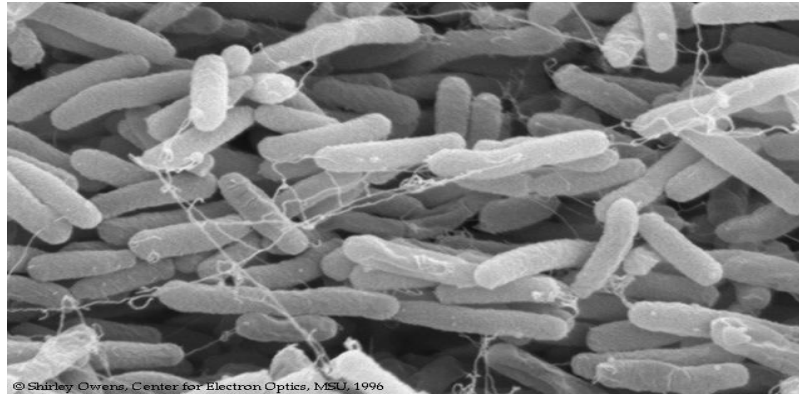
2.GENEL BİLGİLER

2.1 *Esheria coli* 'nin Genel Özellikleri

Esheria coli (*E. coli*), *Enterobacteriaceae* familyasına ait bir bakteri türüdür (Ünlütürk ve Turantaş, 1998). *E. coli* ilk olarak Alman bakteriyolog Theodor Escherich tarafından 1885 yılında insan kolonunda keşfedilmiştir (Feng, vd., 2002). İnsan ve çoğu sıcakkanlı hayvanların doğal bağırsak florasında bulunmaktadır (Berg, 1996; Gordon ve Cowling, 2003). Dr. Escherich, önemli bir halk sağlığı sorunu olan bebek ishalı ve gastroenteritten sorumlu suşların *Esheria coli* olduğunu göstermiştir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998; Feng, vd., 2002).

E. coli, üzerinde oldukça fazla çalışma yapılmış olan ve halen çalışmalara devam edilen bir model mikroorganizmadır. Genellikle bakteri biyolojisinin anlaşılması amacıyla sıkça kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda Gram negatif (-), spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob bir bakteri olarak litaretüre geçmiştir. *Enterobacteriaceae* familyasına ait olan *Escherichia coli*, basil (çubuk) şeklinde olup 2-6 µm boya ve 1-1,5 µm enine sahip bir bakteri türüdür. Koloni şekli yuvarlaktır ve S tipi koloniler yapar. Hareket organelleri olarak flagellalarını kullanır. Beslenme gereksinimi bakımından oldukça basit bir sisteme sahiptir. Şekerleri çeşitli ürünlere fermente edebilmektedir. İnsan ve hayvanların bağırsak kanalında ve dışkıda bulunmaktadır. Böylece *E. coli*'nin çevresel sularda varlığı dışkı kirlenmesinin bir belirtisidir (Madigan ve Matinko, 2010).

Escherichia coli K-12'nin DNA'sında 4,639,221 baz çifti dizisi bulunmaktadır. 4,288 gen içerdiği ve bunun 3.200 'ünün fonksiyonlarının belirlendiği öngörülmektedir. (Blattner, vd. 1997). 500'ün üzerinde operon tanımlanmıştır. Türün DNA'sının G+C içeriği % 48-52 arasında değişmektedir (Migula, vd., 1895; Posfai, vd., 1994). Gram negatif bir bakteri olan *E. coli* aynı zamanda bir dış membrana sahiptir (Achouak, vd., 2001).



Şekil 2.1. *Escherichia coli*'nin SEM'deki görüntüsü (Olsen, vd., 1989)

Çizelge 2.1. *E. coli*'nin taksonomisi (Escherich, 1885; Migula, 1895).

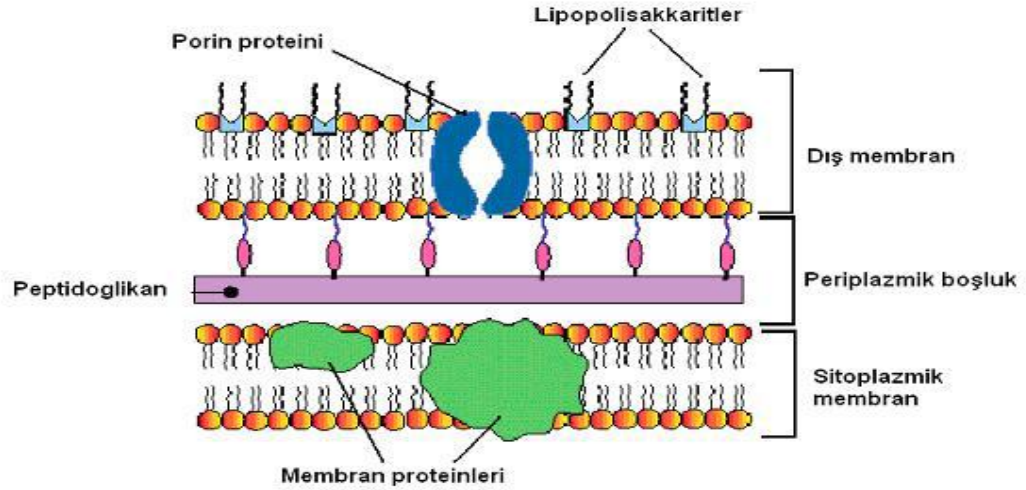
Alem	Eubacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Gamma proteobacteria
Takım	Enterobacteriales
Aile	Enterobacteriaceae
Cins	<i>Escherichia</i>
Tür	<i>Escherichia coli</i>

2.2 Dış Membranın Genel Özellikleri

Ökaryotik ve prokaryotik mikroorganizmalarda aktif ve seçici bariyer özelliği taşıyan membranlar bulunmaktadır (Achauak, vd., 2001). Bakteriler Gram negatif (-) ve Gram pozitif (+) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hücre duvar yapısında bazı temel farklılıklar mevcuttur. Gram + bakterilerin hücre duvarında, kalın peptidoglikan tabakası bulunur iken Gram negatif hücre duvarında, alttaki ince peptidoglikan tabakasına ek olarak seçici geçirgenlik bariyeri özelliği olan bir dış zar bulunmaktadır (Glauert ve Thornley, 1969; Freer ve Salton, 1970; Chevalier, vd., 2000). Dış membranın varlığı Gram negatif bakterileri Gram pozitif'lerden ayıran temel farklılıktır. Özellikle *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium*'un dış membran yapısı, son yıllarda yoğun olarak çalışılmıştır (Hiroshi ve Taiji, 1996). Dış membranın varlığı Gram negatif bakterileri olumsuz dış etkenlerden korumaktadır. Aynı zamanda, bu zar besin maddelerinin alınması ve atık ürünlerin uzaklaştırılması için küçük ve hidrofilik kanal oluşturan veya oluşturmayan proteinler

içerir (Nikaido ve Vaara, 1985). İç membrana gömülü olarak bulunan proteinler, bakteri hücresi için büyük önem taşıyan protein translokasyonu ve sinyal iletimi gibi bir takım görevleri yerine getirmektedir. *Escherichia coli* gibi gram negatif bakteriler, murein sakkuluslar içeren periplazmik boşlukla sınırlanmış ve iki konsentrik lipit çift katmanlı membran ile çevrilidir. Her iki membran da bilgi ve madde geçişine yardımcı olan proteinler içerir (Koebnik, vd., 2000).

Dış membran da bulunan ve önemli görevlere sahip birçok protein mevcuttur. Bu proteinlerden en bol bulunanı ise porin proteinleridir (Nikaido ve Vaara, 1985; Chevalier, vd., 2000; Schulz, 2002). Gram negatif bakterilerde bulunan porin proteinleri, dış membrandan küçük hidrofilik maddelerin geçişini sağlayan içi su dolu kanallardır (Koebnik, vd., 2000; Darcan, 2005).



Şekil 2.2. Gram negatif bakterilerde iç ve dış membranının şematik gösterimi (Miura ve Mizushima, 1968; Glauert ve Thornley, 1969 ; Osborn, vd., 1972).

2.3 Porin Proteinlerinin Genel Özellikleri

Porin proteinleri, hücrelere gerekli besinlerin seçici alımını sağlayan, çevresel değişimlere karşı uyarılan, sentez oranları değişebilen ve hücreyi olumsuz etkenlerden koruyan yapılar olarak adlandırılmaktadır (Nikaido, 1994; Koebnik, vd., 2000). Aynı zaman da küçük moleküllerin hücre içine pasif difüzyonunu sağlamaktadır (Raffa ve Raivio, 2002). İlk kez 1976 yılında dış membranda bu proteinlerin varlığı tanımlanmıştır ve porin ismi verilmiştir, ilk tanımlanan porinler ise *Escherichia coli*'deki OmpF ve OmpC porin proteinleri olmuştur (Nakae, 1976). *E. coli*'deki bu

proteinlerden OmpF'nin kristal yapısı ilk kez 1980 yılında, anatomik yapısı ise 1992 yılında ortaya konulmuştur (Garavito ve Rosenbusch, 1980; Cowan, vd., 1992).

Dış membran porin proteinleri (omp), membran permeabilitesinde rolü olan su dolu kanallardır. Çapları 0,6-2,3 nm arasında değişen, spesifik ya da spesifik olmayan geçirgenlik özelliği gösteren porin proteinleri, 600 kDa'dan küçük hidrofilik bileşiklerin alınımını ortalarında bulunan deliklerden sağlamaktadırlar (Achouak, vd., 2001). Bu proteinler dış mebranın alt kısmında bulunan peptidoglikan tabakaya kovalent olmayan bağlarla bağlanmışlardır. *E. coli* 'de yaklaşık 20'ye yakın dış membran porin proteini tanımlanmıştır. OmpA, OmpF, OmpC, LamB, PhoE, OmpN, OmpX, OmpG, OmpT, OmpL, OmpH, OmpD, TolC ve ScrY bunlardan bazılarıdır. Bu proteinler fonksiyonlarına göre (i) spesifik yani belirli çözünen maddelerin (örneğin demir şelatları, maltoz, maltodekstrinler, nükleositler) girişine aracılık eden özel porinler ve (ii) spesifik olmayan genel difüzyon kanalları içeren porinler olarak 2 gruba ayrılmıştır. *E. coli* için spesifik porinlere LamB ve PhoE, spesifik olmayan porinlere ise OmpC ve OmpF örnek olarak verilebilir (Koebnik, vd., 2000).

OmpA, *E. coli*'nin dış membranında en iyi karakterize edilmiş ve en bol bulunan proteinlerden biridir (Pautsch ve Schulz, 1998; Cierpicki, vd., 2006). 325 amino asit uzunluğundadır (Sugawara ve Nikaido, 1994; Arora, vd., 2001). OmpA'nın görevinin çeşitli küçük çözünen maddelerin dış membrandan geçmesine izin veren, nonspesifik bir difüzyon kanalı olduğu düşünülmektedir (Sugawara ve Nikaido, 1992). Ayrıca bir faj reseptörü (Datta, vd., 1977) ve F faktör bağımlı konjügasyonun aracısı olarak işlev gördüğü ve normal hücre morfolojisinin korunmasında rol oynadığı bilinmektedir (Van, vd., 1977; Koebnik, vd., 2000; Kleinschmidt, 2003). Hücrede monomerik yapıda bulunan OmpA (Arora, vd., 2000), yaklaşık otuz yıldır dış zar proteinlerinin biyogenezi çalışmaları için de bir model olarak hizmet etmiştir (Rosetta, 2012).

OmpC, Genel Bakteriyel Porin (GBP) ailesinin bir üyesidir (Basle, vd., 2006). Peptidoglikan tabakasıyla sıkı bağlantı içerisindedir. Ayrıca iyonların ve diğer hidrofilik çözünenlerin dış zarı geçmesine izin veren trimerik bir porin yapısındadır (Lambert, 1988). OmpC'nin 2.0 Å çözünürlüğüne göre belirlenen kristal yapısı, 16 iplikçikli bir β -varil yapısı ortaya koymaktadır (Basle, vd., 2006).

OmpF porini de Genel Bakteriyel Porin (GBP) ailesinin bir üyesidir. OmpF, peptidoglikan tabakasıyla sıkı bağlantı içerisindedir (Lambert, 1988) ve 600 kilo

daltonun altındaki şekerler, iyonlar ve amino asitler gibi çözünen maddelerin dış membrandan geçişini sağlar (Cowan, vd., 1992). OmpF'nin, iç zar boyunca taşınması Sec sistemine bağımlıdır (Baars, vd., 2006). OmpF porinide trimerik bir porin yapısındadır (Cowan, vd., 1992).

OmpG, spesifik olmayan bir dış zar kanalı olarak işlev görür. Klasik dış zar porinlerinden (OmpF ve OmpC) daha geniş bir kanal üretir ve monosakkaritlerin taşınmasında görevlidir. Ek olarak, OmpG disakkarit (sükroz) ve trisakkaridlerin (rafinoz) difüzyonunu kolaylaştırarak dış zar boyunca geçişini sağlar (Fajardo, vd., 1998). OmpG bir monomerik porindir (Conlan, vd., 2000, Behlau, vd., 2001, Conlan ve Bayley, 2003, Yıldız, vd., 2006; Subbara ve Van, 2006). OmpG, kısa periplazmik dönüşlere sahip ve yedi tane hücre dışı ilmeği olan, 14-iplikçikli β -varil porindir. İki farklı kristal biçimindeki yapıları nedeniyle, OmpG kanalının pH bağımlı olarak rol oynayabileceği gösterilmiştir (Yıldız, vd., 2006).

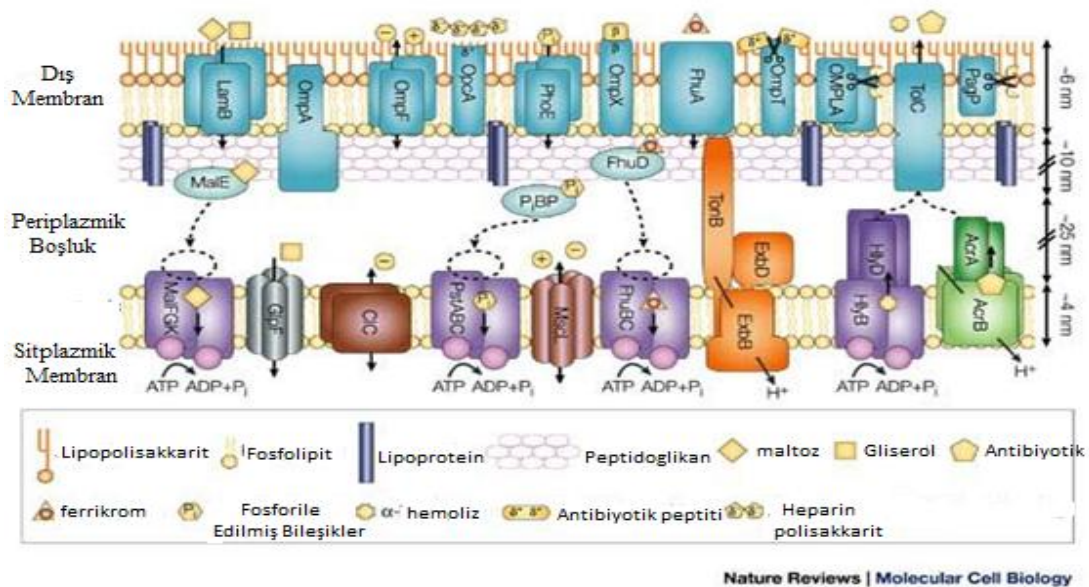
OmpT, spesifik olan bir dış membran proteazdır ve bakterinin karşılaştığı yabancı peptid maddelerini yok etmede görevlidir. Hücrel lokalizasyon çalışmaları, OmpT'nin hücrel kutuplarda lokalize olduğunu göstermiştir (Lai, vd., 2004). OmpT'nin, iç zar boyunca taşınması için Sec-translokaza hedeflemesi SecB'ye bağımlıdır (Baars, vd., 2006). Monomer bir porin olan OmpT'nin (Vandeputte-Rutten, vd., 2001), denatüre edici koşullar altında etkin olduğu bilinmektedir (White, vd., 1995). Yabancı peptidlerin hidrolizinden sorumlu olup (Stumpe, vd., 1998), idrar yolu enfeksiyonlarında bir virülans belirleyicisidir (Kanamaru, vd., 2003).

LamB, Şeker Porin (SP) ailesinin bir üyesidir. *E. coli*'de LamB porininin ortasındaki kanal maltoz ve maltodekstrinin dış zar boyunca difüzyonunu kolaylaştırır (Wang, vd., 1997). LamB aslen bakteriyofaj lambda için bir reseptör olarak keşfedilmiştir (Randall-Hazelbauer ve Schwartz, 1973). LamB porini, dış membranda trimer yapıda bulunmaktadır (Arora, vd., 2000).

Son olarak PhoE porini de, Genel Bakteriyel Porin (GBP) ailesinin bir üyesi olarak bilinmektedir. Bu proteinler, Gram negatif bakterilerin, mitokondriyanın ve plastidlerin dış membranlarında bulunur. Fosfat sınırlaması ile indüklenen PhoE, fosfat ve fosfor içeren bileşiklerin dış zardan verimli bir şekilde difüzyonunu kolaylaştırmaktadır (Korteland, vd., 1982). PhoE porinleri fosfat moleküllerini geçirdiği için spesifik kanal olarak kabul edilirler. PhoE kanalları özellikle negatif yüklü

moleküllerin geçişi ile de ilişkilidir (Koebnik, vd., 2000). PhoE'nin gözenek girişinin yakınında pozitif yüklü amino asitlerin bulunması nedeniyle küçük anyonların bu porinden geçmesini sağlamaktadır (Benz, vd., 1984; Phoenix, 1996). Dış membranda PhoE porini trimer yapıda olduğu tespit edilmiştir (Arora, vd., 2000).

Molekül ağırlıkları bakımından karşılaştırılacak olunursa OmpA 37.2 kDa, OmpC 40.3 kDa, OmpF porin proteini 39.3 kDa, OmpG 34.9 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. OmpT yaklaşık 35,5 kDa, LamB 49.9 kDa ve PhoE 38.9 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Profiling of *Escherichia coli* Chromosome database).

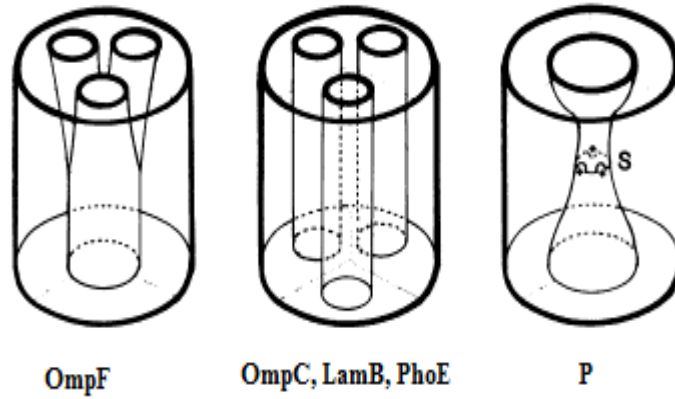


Şekil 2.3. Gram-negatif bakterilerin yapısal olarak karakterize edilmiş dış zar proteinlerinin biyolojik fonksiyonları (Beveridge ve Graham, 1991).

2.3.1 Porin proteinlerinin anatomik yapısı

Porin proteinlerinin orta kısmında bulunan deliklerin anatomik yapıları birbirinden farklılık göstermektedir. Porinler konformasyonel yapıları ve fizikokimyasal özelliklerine göre ya trimerik ya da monomerik organizasyona sahiptirler. Ortalarında tek kanal bulunan porinlere *P. aeruginosa*'nın protein P porini, 3 ayrı kanal bulunanlara ise OmpC, LamB ve PhoE porinleri örnek olarak verilebilir. Bazı porinlerde ise kanal dış yüzeyde 3 ayrı delikten orijin aldıktan sonra ortaya yakın bir noktada birleşir ve tek bir kanal olarak periplazmik boşluğa açılır, bu tip porinlere örnek olarak *E. coli*'de bulunan OmpF porini verilebilir (Koebnik, vd., 2000). OmpF porinin üç boyutlu yapısı

her bir monomeri 16 anti-paralel β zincirinden oluşan üçlü bir yapı olarak belirlenmiştir (Cowan, vd., 1992). 3 monomer ünitesi yüzeyde bulunan halkaların yakın ilişkileri ile birleşerek trimer yapıyı oluşturmaktadır. Yalnızca yüksek sıcaklıkta, SDS gibi deterjanların bulunduğu ortamlarda çözülebilen bu yapı, dış membran içine yerleşmiş yoğun bir molekül organizasyonu gerçekleştirir (Achouak, vd., 2001).



Şekil 2.4. Üç farklı porin proteini yapılarının şematik üç boyutlu gösterimleri (Engel, vd., 1985).

Dış membranda bulunan porin proteinleri çok sayıda β -levha yapıları içerir (Koebnik, vd., 2000). Porinler pseudosiklik β fiçli yapısı ortaya koyan antiparalel β ipliklerden oluşur (Cowan, vd., 1992; Schirmer, 1998). Spesifik porinler 18, spesifik olmayan porinler ise 16 iplikli β levhaya sahiptir (Koebnik, vd., 2000). Yapılan çalışmalar sonucunda porin proteinleri dahil dış membranda bulunan proteinlerin tamamının β plakalı tabakalı protein yapısına, sitoplazmik membranda bulunan proteinlerin ise α heliks protein yapısına sahip olduğu ifade edilmiştir (Koebnik, vd., 2000). Bu farklılığın dış membran proteinlerinin sentezinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Bernstein, 2000).

E. coli' de iyi incelenmiş dört porin arasından OmpF, OmpC ve PhoE'nin ortak kökenli olduğunu düşündüren nükleotid ve amino asit dizilerinde çarpıcı benzerlikler görülürken, LamB de daha az benzer olmakla birlikte çeşitli bölgelerde lokal homoloji tespit edilmiştir (Nikaido ve Wu, 1984). LamB, diğer üç porinle hemen hemen aynı fiziksel özelliklere sahiptir, ancak işlevsel olarak farklıdır (Nikaido ve Vaara, 1985).

2.4 Porinleri Etkileyen Çevresel Faktörler

2.4.1 Porin proteinlerinin pH stresindeki fonksiyonu

Bakterilerin sıklıkla maruz kaldığı çevresel streslerden birisi pH'dır ve etkileri karmaşıktır (Russell ve Diez, 1998; Foster, 2000; Slonczewski, 2000). Asidik ve bazik pH'ın *E. coli'* nin gen ekspresyonu üzerinde birçok etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Olson, 1993; Slonczewski ve Foster, 1996; Foster, 2000). Ayrıca, *E. coli* por çapını düzenleyerek farklı pH' daki değişikliklere cevap vermektedir (Todt, vd., 1992; Pratt, vd., 1996). *E. coli'* nin pH değişimine cevabında, dış membran (DM) proteinlerinin rolleride tanımlanmıştır. Bunlar; OstA, TolC, OmpT, OmpC, OmpX, Dps, LamB, Tsx, FadL, OmpW ve OmpF'dir. Bu DM proteinlerinden, TolC, OmpC, OmpX ve LamB, *E. coli'*de pH regülasyonunda kritik rol oynamaktadır. OmpC, LamB, FadL, OmpX, OmpW, OmpF'nin TolC'den bağımsız bir yolla işlediği bulunmuştur, Tsx' in ise TolC ile aynı yolu asit ve bazik koşullarda paylaştığı bildirilmiştir (Wu, vd., 2009). Heyde ve Portalier (1987) *ompF*, *ompC* ve *lamB* porin genlerinin nötral ve asidik pH ile düzenlendiğini bildirmişlerdir. Asidik pH'da *E. coli'* nin OmpF, LamB porininin ve 30 kDa'luk proteinlerinin sentezinde azalma, OmpC sentezinde ise artış olduğu gözlenmiştir. Çalışmalarında *ompF* ve *ompC* genlerinin sentezi üzerine hem transkripsiyonel hem de posttranskripsiyonel düzeyde pH'ya bağlı olarak regülatör etkinin EnvZ bağımlı olduğunu ortaya koymuşlar, bunun yanında *ompF* sentezi için ayrıca bir düzenlemenin de varlığını vurgulamışlardır. Heyde, vd., (1998) çalışmalarını zamanla geliştirmiş ve farklı porinlerin (OmpF, OmpC, PhoE) işlevini farklı pH değerlerinde analiz etmiş ve porinlerin gözenek çapı ile pH arasında doğrudan bir ilişki olduğunu gözlemlemiştir. Heyde, vd., (2000) *E. coli'*de pH 6.0'da OmpC, pH 7.8'de ise OmpF'nin daha fazla sentezlendiğini bildirmiştir bu poinlere ek olarak OmpG'nin de pH ile ilişkili bir porin olduğu bildirilmiştir, bu porinin kanalları nötr pH'ta açık ve asidik pH altında ise kapalı olduğu tespit edilmiştir (Yıldız, vd., 2006). *E. coli* farklı pH değerlerinde porin ekspresyonunda da farklı konformasyonel değişikliklere giderek, farklı şekillerde cevap vermektedir. Asidik ve alkali ortamlarda hücreler normal büyüme değerine göre daha yavaş büyüme gösterirler (Sakuma, vd., 1998). OmpF ve OmpC'nin pH'ya bağımlı değişimi iyi bilinmektedir (Pratt, vd., 1996; Heyde, vd., 2000; Sato, vd., 2000). OmpC ve OmpF'nin osmolarite ve pH'daki değişimi koordineli olarak gerçekleşmektedir (Pratt, vd., 1996; Sato, vd., 2000; Heyde, vd., 2000; Chagneau, vd.,

2001). Asidik pH'ta büyümede, OmpC'nin ekspresyonunda artış ve OmpF'nin ekspresyonunda azalma görülmektedir (Heyde ve Portalier, 1987; Thomas ve Booth, 1992). Bu düzenleme OmpR / EnvZ iki bileşenli sistem aracılığıyla gerçekleştirilir (Heyde ve Portalier, 1987; Thomas ve Booth, 1992; Sato, vd., 2000).

OmpF ve OmpC'nin ekspresyonu, alkali pH'ta *envZ*'ye ihtiyaç duyar, ancak her iki protein de *envZ* mutantında asidik pH'ta eksprese edilmektedir, bu da porin ekspresyonunun düşük pH'ta ozmolarite ile farklı bir şekilde düzenlendiğini göstermektedir (Sato, vd., 2000). Başka bir çalışmada ise, asidik pH'ın ve ortamda safra tuzları gibi kimyasalların varlığının OmpC'nin ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir (Begic ve Worobec, 2006). *lamB* porin geninin nötral ve asidik pH ile düzenlendiği de bilinmektedir (Heyde ve Portalier, 1987). Asidik pH'da indüklenemeyen OmpA'nın bazik pH'da indüklendiği, OmpX' in pH 7'ye göre asidik ya da bazik pH'da indüklendiği bildirilmiştir (Lauren, vd., 2002).

Darcan, (2009) yapmış olduğu çalışmada, üç pH'da da (5.5, 7.1, 8.3) OmpC porin protein sentezinde artışın olduğunu, OmpF'de ise sentezin azaldığını tespit etmiştir. Dolayısı ile dış membran porin proteinlerinin sentezindeki bu değişim hem asidik hemde alkalın stres altında büyüme için gereklidir. Sonuç olarak osmotik strese bağlı olarak EnvZ-OmpR iki bileşik fosforlama sistemi tarafından kontrol edilen 2 porinin pH bağımlı olarak da düzenlendiği görülmüştür (Saito ve Kobayashi, 2003). Ayrıca Darcan, (2005) çalışmasında OmpC'nin asidik pH'daki ifadesinde RpoS, H-NS, Acp'ın bir rolünün olmadığını tespit etmiştir.

Glukozlu LB'de, EnvZ'nin yokluğu, pH 7.8' de *ompF* ekspresyonunda azalmaya yol açmıştır. *ompF* ekspresyonu pH 6'da pH 7.8' den daha yüksek olmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda EnvZ'nin yokluğunda, *ompF* ekspresyonunun pH ve karbon kaynağı tarafından etkilendiğini göstermektedir. *ompC*'de ise daha düşük bir seviyede ifade edilmiştir. Bunun sonucunda, EnvZ'nin yokluğunda, *ompC* ekspresyonunun hem pH hem de karbon kaynağı tarafından etkilendiğini göstermektedir (Martine, vd., 2000). Thomas ve Booth, (1992) yaptıkları çalışmada, ortama glikoz ilavesinde OmpF'nin ekspresyonunun pH 6.0 değerinde inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Sato, vd., (2000) yaptıkları çalışmada glukozlu ortamda pH 5.5 değerinde büyüyen hücrelerde OmpF'nin eksprese edildiğini tespit etmiştir. Daha önceki çalışmalarda kompleks ortamlarda üreyen hücrelerde pH bağımlı porin düzenlenmesi ortaya konmuştur (Heyde ve

Portalier, 1987; Heyde, vd., 1988). Thomas ve Booth, (1992) sadece glukoz karbon kaynağı olarak kullanıldığı zamanda porin genlerinde pH bağımlı bir düzenlemenin olduğunu ifade etmişlerdir.

2.4.2 Porin proteinlerinin metal stresindeki fonksiyonu

Bakır (Cu^{+2}), demir (Fe^{+2}) ve çinko (Zn^{+2}) gibi bir çok ağır metal, bakteri büyümesi için eser miktarlarda da olsa gereklidir, ancak alımı fazla miktarda gerçekleştiğinde toksik etki yaratmaktadır. Ağır metaller serbest tiyol gruplarına bağlanarak, bakterilerin protein yapısını bozarak etki etmektedir (Connell ve Miller, 1984; George, 1991). Bakterilerin ağır metal stresi ile başa çıkmaya yönelik çeşitli mekanizmaları vardır (Outten, vd., 2000; Roane ve Pepper, 2000; Von, vd., 2002). Bu mekanizmalara örnek, biyofilm oluşumu ve dışa atım pompasıdır. Bakteriyel dirençte bu sistemler anahtar rol oynamaktadırlar. Dışa atım pompası, metalleri sitoplazmadan ve iç membrandan geçişini sağlayarak periplazmik boşluğa nakil etmeyi sağlamaktadır (Nies, 2003; Rensing ve Grass, 2003).

Escherichia coli, değişen çevre koşulları altında bakır kullanımını sağlamak ve bakır toksisitesinden korunmak için çoklu koruyucu sisteme sahiptir. Dış membran boyunca metallerin taşınımı demir-sidereför kompleksleri ya da porin proteinlerinden kolaylaştırılmış difüzyonla olabileceği düşünülmektedir (Stenberg, vd., 2005). Gram negatif bakterilerde OmpF ve OmpC porinleri periplazmaya metal katyonların taşınmasından sorumlu olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada *E. coli ompC* mutant suşunda bakıra karşı duyarlılığın arttığı belirlenmiştir (Egler, vd., 2005). Bununla birlikte, *E. coli*'nin *ompF* ve *ompC* eksik mutantları, bakır ve gümüş direncinde hemen hemen aynı etkiyi göstermektedir (Li, vd., 1997). Bu porinlerin eksikliğinin, dış zarın geçirgenliğini azaltmanın yanı sıra, hücrelerin bakır veya gümüş alımında akış pompasının miktarını arttırmasına neden olur (Outten, vd., 2001).

Bir kofaktör olarak hizmet eden çinko (Zn), çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli rol oynayan mikro bir besindir (Failla,1977; Beyersmann ve Schmidt, 1999; Hartwig, vd., 1999). Zn ve diğer geçiş metali iyonları, canlı hücreler için kimyasal bilgi sunar (Vallee ve Auld, 1990). Aşırı Zn (II), varlığı toksisite gösterir ve biyolojik sistemlerin güçlü bir bozucusu olarak hareket edebilir. Prokaryotik organizmalar, ökaryotlarda bulunan bir çok hücreden yoksun olduklarından, mikroorganizmaları Zn^{+2} dan koruyan başlıca mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmalar Zn metalini

içe alımı, metal iyonu emilimini ve sitoplazmik zar boyunca Zn taşınmasıdır (Rosen, 1999). *E. coli*'de çinko transportunda görevli en az 4 çinko transport pompası bulunmaktadır. Bunlardan 2 tanesi ZnuABC ve zupT diğer ikisi ise ZntA ve ZitB'dir. Çinko varlığında, bu çinko transport sistemlerinin porin protein seviyelerinin düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir (Hausinger ve Zamble, 2007). Yüksek Zn^{+2} konsantrasyonlarına *Escherichia coli*'de direnç gösterdiği bildirilmiştir (Robinson, vd., 1998). Kadmiyum klorid etkisine maruz kalmış *E. coli*'de OmpF sentez düzeyinde bir azalma olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Faber, vd., 1993). Başka bir çalışmada kadmiyum metali varlığında *ompA* ve *ompC* mutantlarının duyarlılık kazandığı bildirilmiştir (Darcan, vd., 2016 (sözlü görüşme)).

2.4.3 Porin proteinlerinin diğer çevresel şartlardaki fonksiyonları

Yetersiz besin alımı ve sınırlaması bakterilerde büyüme oranının azalmasına neden olmaktadır. Bu olay, porinlerde fizyolojik ve biyokimyasal düzenlemeleri içeren geniş bir adaptasyon sağlayan stres şartlarından birisidir. Besin yetersizliğinde ki bu düzenlemelerin sonucunda oluşan porin sentezinin değişmesinin bakterilerin yaşamı için önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Özkanca, 1993; Liu ve Ferenci, 1998). Açlık stresinde porinlerin düzenleme mekanizmaları ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen mekanizma henüz tam olarak çözülememiştir (Orruno, vd., 2017). *E. coli*'de glukoz alımının sınırlanmasında OmpF'nin daha fazla sentezlendiği, azot sınırlanmasında ise OmpC'nin daha fazla sentezlendiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, açlık stresi altında porin sentezinin OmpR'ye bağımlı olduğu ifade edilmiştir (Liu ve Ferenci, 2001). Porin proteinlerinin madde transferindeki rolleri incelendiğinde, açlık koşulları altında oluşan streste bakterilerin besin maddelerinin alımını arttırmak için membran permeabilitesini porinler ile değiştirdiği ifade edilmiştir (Ferenci, 1999). Özkanca'nın (1993, 2002) yaptığı çalışmalarda da açlık stresinde porin sentezinin düzenlendiği ortaya konulmuştur. Göl suyunda yapılan çalışmalarda *E. coli*'nin 25 °C ve 37 °C'de 38 gün açlık stresine maruz bırakılmasıyla OmpF porin protein sentez düzeyinin artış gösterdiği bildirilmiştir. OmpC sentez düzeyinde ise fazla bir değişiklik olmadığı OmpA'nın miktarında azalma olduğu belirlenmiştir (Özkanca ve Flint, 2002). *E. coli*'de OmpF ve LamB gibi porinler şeker alımı için önemlidir. 10^{-6} ve

10^{-7} M glukoz konsantrasyonlarında yaklaşık 20 katlık bir artış gösterdiği belirtilmiştir (Liu ve Ferenci, 1998).

Yapay deniz suyu ile yapılan çalışmalarda, dezenfektan özellikli formaldehit ve sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi kimyasalların *E. coli* ve *Salmonella typhimurium*'un OmpC ve OmpF porin proteinlerinin sentez düzeyini azalttığı tespit edilmiştir (Darcan, vd., 2001; Darcan ve Yılmaz, 2018). Yine bir başka çalışmada göl suyu içerisinde SDS gibi deterjan özellikli kimyasallara maruz kalmış *E. coli*'de OmpC ve OmpF porin proteinlerinin yok olma derecesinde azaldığı bulunmuştur (Özkanca, 1993). Darcan ve Yılmaz, (2018) çalışmalarında çamaşır suyu ve klor ilavesinde de OmpF sentezinin SDS'den daha az azaldığını ve H₂O₂ ilave edildiği zaman ise değişmediğini bildirmişlerdir. OmpC sentezinde ise klor, formaldehit gibi kimyasalların yanında H₂O₂ ilave edildiği zaman da %50 oranında azaldığı bildirilmiş ve çamaşır suyunda OmpC sentezinde yaklaşık 2 kat ve SDS ilavesinde ise 1.5 katlık bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. *E. coli ompA* mutanı (delesyon) ile yapılan çalışmada, SDS, kolin, asidik ortam ve yüksek ozmolarite de bu suşun duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir. Bu porinin mutant hale getirilmesi ile *E. coli*'nin çevresel streslere karşı direnci azalmıştır (Wang, 2002). Fakat *E. coli*'nin büyüme ortamına salisilat veya etanol katıldığında OmpF sentezi arttığına dair çalışmalarda bulunmaktadır (Andersen, vd., 1989; Rosner, vd., 1991).

Porin proteinlerinin sentez düzeylerinin büyüme sıcaklığına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Lugtenberg, vd., 1975; Özkanca, 1993). Özkanca (1993) yaptığı bir çalışmada OmpF sentezinin 37 °C'de düşük sıcaklıklara göre daha fazla azaldığı, OmpC sentezinin ise 5 ve 15 °C'de daha fazla azalma gösterdiğini bulmuştur. Başka bir çalışma, OmpC'nin 37 °C'de hayvan bağırsağında yüksek ozmolarite koşulları altında eksprese edildiğini göstermiştir (Pratt, vd., 1996).

EnvZ / OmpR sistemi ozmolarite değişikliklerine verilen yanıtın bir parçası olarak keşfedilmiştir. Bu değişiklikler, sensör kinaz EnvZ tarafından saptanır ve korunmuş bir His 'de oto-fosforilasyona yol açar (Forst, vd., 1989; Kato vd., 1989). Ortaya çıkan OmpR-P, dış zar porinleri OmpF ve OmpC'nin karşılıklı sentezini modüle eder (Hall ve Silhavy, 1981; Aiba ve Mizuno, 1990). Ortam osmolaritesi arttığı zaman *E. coli*'nin OmpC sentezi artarken, OmpF sentezi azalmaktadır. OmpC'deki artışın

nedeni olarak, OmpF'ye göre daha küçük çaplı olması nedeniyle hücrenin daha az su kaybetmesini sağladığı düşünülmektedir (Sleator ve Hill, 2001).

Matsubara, vd., (2000) *E. coli*'nin porinlerinin sentez düzeyinin oksijen miktarı ile de kontrol edildiğini göstermişlerdir. Yazarlar çalışmalarında *E. coli* hücrelerini OmpC ve OmpF porinlerinin aerobik koşullar altında sentezinin azaldığını bildirmişlerdir. Anaerobik büyüme koşulları altında, ortamın ozmolaritesine bakılmaksızın $\Delta envZ$ hücrelerinde önemli sayıda OmpC miktarı tespit edilmiştir.

OmpF, OmpC ve PhoE porin proteinleri, birçok farklı antibiyotiğin hücre içi girişinde ana kapı olarak görev yapmaktadır (Nikaido, 2003; Pages, vd., 2008; Delcour, 2009). OmpF'nin kaybının *E. coli*'de β -laktam antibiyotiklerine (Martinez-Martinez, vd., 2000) ve fluorokinolonlara karşı direnç mekanizması geliştirdiği bildirilmiştir (Tavio, vd., 1999). Başka bir çalışmada ise; OmpF'nin, β -laktam antibiyotikler için ana yol olduğu bulunmuştur (Nikaido, 1989).

Proteomik çalışmalar, OmpC'nin *E. coli*'de tetrasiklin direnci için önemli bir dış zar proteini olduğunu göstermektedir (Zhang, vd., 2008). Başka bir çalışmada ise yine *ompB*'de (dış zar porin proteinleri *ompF* ve *ompC*'yi kodlayan genlerin bir düzenleyicisi) ve *ompF*'de ki mutasyonların *E. coli*'nin β -laktam antibiyotiğine direncinin arttırdığını göstermektedir (Jaffe, vd., 1982). *ompF* mutant *E. coli*'nin kloramfenikol ve tetrasikline daha dirençli olduğu da gösterilmiştir (Pugsley ve Schnaitman, 1978). *E. coli* biyofilminde *ompR* ve *ompX* genleri daha fazla eksprese edilmektedir. Dış zar proteini OmpX genellikle bakteriyel adezyonda yer alırken, aşırı ekspresyonunun aynı zaman da beta-laktamlara karşı direnç gelişiminde rol oynadığı tespit edilmiştir (Stoorvogel, vd., 1987). Öte yandan OmpR, OmpC ve OmpF'nin ifadesini kontrol eden iki bileşenli düzenleyici sistemin bir parçasıdır. Böylece, *ompR* ve *ompX*'in indüklenmesin, *ompF* ve *ompC* ekspresyonunun daha az olabileceği düşünülmektedir (Yuan, vd., 2011). OmpC ve OmpF'ye ek olarak, diğer iki önemli porin proteini, LamB ve FadL de daha az eksprese edilmektedir. *lamB* geni, lambda faj reseptörü olan dış zar proteini LamB'yi kodlamaktadır. Farklı antibiyotiklere dirençli birçok *E. coli* suşunda, LamB'nin daha az eksprese edildiği bildirilmiştir (Xu, vd., 2006; Li vd., 2007; Lin, vd., 2010). *Klebsiella pneumoniae*'da da LamB'nin antimikrobiyallerin penetrasyonuna katkıda bulunduğu bulunmuştur ve eksikliği karbapenem direncine yol açmıştır (Garcia-Sureda, vd., 2011). Bu veriler birlikte

incelendiğinde, LamB'nin antibiyotiklerin alımı için bir porin olarak hizmet ettiği ileri sürülmektedir (Lin, vd., 2014). *fadL* geni ise, uzun zincirli yağ asitlerinin alınması için gerekli bir porin proteinini kodlar. Bu porinlerin ilaç alımına katılımı için doğrudan bir kanıt olmamasına rağmen, streptomisin, nalidiksik asit, klorotetrasiklin, kloramfenikol ve kanamisine dirençli *E. coli* hücrelerinde ekspresyonunun az olduğu bildirilmiştir (Li, vd., 2007; Lin, vd., 2008, 2010; Zhang, vd., 2015). Nalidiksik asit (NA) direncinde *E. coli* dış membran proteinlerinin rolünü karakterize etmek için proteomik metodlar kullanılarak elde edilen sonuçlara göre; TolC, OmpT, OmpC ve OmpW'nin daha fazla eksprese edildiği ve FadL' nin ise daha az eksprese edildiği bulunmuştur. TolC ve OmpC'nin, NA direncinin kontrolünde, tanımlanan diğer dış membran proteinlerine göre daha önemli rol oynayabileceği yine aynı çalışmada vurgulanmıştır (Xiang, vd., 2008).

2.5 Biyofilm

Mikroorganizmalar, doğal ortamlarında pH, osmolarite, sıcaklık, açlık gibi yaşamlarını etkileyen veya sınırlandıran bir çok stres faktörüne maruz kalmaktadırlar (Grant ve Long, 1981). Bu zor şartlar altında hayatta kalabilmek için çeşitli yaşam stratejileri geliştirmektedirler. Bu stratejilerden birkaçı endospor, dormansi, kist oluşumudur. Biyofilm tabakasında, bu stres koşullarında bakterilerin geliştirdiği bir korunma mekanizmasıdır (Poulsen, 1999 ; Nadell, vd., 2008; Singer, vd., 2010).

Biyofilm, mikroorganizmaların sabit bir yüzeye (haraketsiz) tutunarak, yapışması ve orada kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içine gömülerek topluluk oluşturması olarak tanımlanabilir (Sutherland, 2001 ; Starkey, vd., 2004; Leone, vd., 2006). Bir başka tanımlamaya göre ise, bakterilerin birbirine ya da nemli bir yüzeye yapışık organik bir polimer matriks içine gömülmesi olarak tanımlanmaktadır (Poulsen, 1999). Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından stres, açlık ve üreme amaçlı üretilmektedir. Terminolojide “hücre dışı polimerik yapı” ya da “ekzopolisakarit (EPS)” adı verilen, polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır (Fujishige, vd., 2006).

Biyofilm tabakası in vivo olarak canlı hücrelerde veya in vitro olarak cansız yüzeylerde meydana gelebilmektedir. Bu oluşan mikrobiyel biyofilmler aletlerin üzerinde oluşturdukları hasarlar, ürün kontaminasyonları, enerji kayıpları ve neden oldukları enfeksiyon hastalıkları ile hastanelerde çok fazla kayıpların oluşmasına neden olmaktadır (Fujishige, vd., 2006). Dolayısıyla oluşan enfeksiyon hastalıkları ile

biyofilm oluşturan mikroorganizmalar arasında da kuvvetli bir bağlantı bulunmaktadır. Çünkü bu mikroorganizmalar kalp iç zarı iltihabı, periodontit, implant ve platin üzerinde biyofilm oluşturmalarıyla da tehit oluşturmaktadır (Donlan ve Costerton, 2002). Bugüne kadar yoğun bir şekilde araştırılan biyofilm tabakası sadece sağlık sektörü için sorun olmamaktadır. Aynı zamanda endüstriyel ve evsel su sistemlerinde, su ileten borularda, su arıtma sistemlerinde, süt işleme ve dağıtım tesislerinde istenmeyen tortu ve tabakalaşmalara neden olarak önemli derecede ekonomik kayıplara yol açtığı bilinmektedir (Hallam, vd., 2001; Hall-Stoodley, vd., 2004). Oluşan istenmeyen tortu süt, su ve diğer gıda sanayilerinde, ısının yüzeyden geçişini geciktirmesi veya engellemesi, yüzeyde oluşarak sıvının sürtünme direncinin artması ve yüzeydeki kimyasal sürtünme oranının artması gibi ciddi sorunlar yaratmaktadır (Kumar ve Anand, 1998). Ayrıca boru hatlarında oluşan biyofilm ürüne tutunarak ürünü kontamine edebilmektedir (Poulsen, 1999) ve oluşan bakteriyel biyofilm içindeki asit oluşumu nedeniyle borular korozyona uğrayabilmektedir (Jayaraman, vd., 1997).

Biyofilm tabakası gelişmiş canlılar için her ne kadar olumsuzluklar ve sağlık problemleri yaratsa da bakterileri nem kaybı, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel faktörlerin değişimlerinden ve ultraviyole (UV) ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan, mutasyon ve ölümlerden korumaktadır (Hall-Stoodley, vd., 2004). Besinlerin belirli bir süre depolanmasının ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması da bakteriler için biyofilm oluşumunun getirdiği diğer bir avantajdır. Başka bir avantajı ise bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit (EPS) matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşerek de hümmoral immün sistem bileşenlerinin, antibiyotik gibi ilaçların bakterilere ulaşmaları engellenmiş olmaktadır (Hall-Stoodley, vd., 2004; Çiftçi, 2005).

Biyofilm yapısının oluşumu, bakterilerin sabit ve akışkan yüzeylere bağlanma düzeyi, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, bakteri türü, bakteri hücre duvarının yapısı (Gram pozitif ya da Gram negatif oluşu), bakteri sayısı, bağlandığı yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin maddeleri içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok faktör ile değişebilmektedir (Arnold ve Silvers, 2000; Lindsay ve Von Holy, 2006).

2.6 Biyofilmin Yapısı

Biyofilm kütlelerinin yaklaşık %97'lik kısmını su oluşturmaktadır. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir (Ghannoum ve O'Toole, 2001; Flemming ve Wingender, 2010). Yani % 3'lük kısmını suda çözünebilen jel yapıdaki selüloz, fimbriya, pili flagella ve amiloidler oluşmaktadır (Flemming, 2016). Ancak bu verilen oranlar mevcut organizmaların türüne, morfolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, içinde bulunduğu akışkanın tipine, genel özelliklere göre değişebilmektedir (Allison, 2003; Patel, 2005).

Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlamaktadır. Sabit yüzeye sıkıca tutunan bakteriler burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokolonilerde büyüyerek kolonileri ve koloniler genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi ve miktarı, mikroorganizmaların yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir (Flemming ve Wingender, 2010). Gelişmiş bir biyofilmin kütlelerinin %75–90'ını ise EPS oluşturmaktadır (Padera, 2006). EPS, mukus, jel ya da viskoelastik davranış sergileyebilmektedir. Böylece oluşan biyofilmin yapısı protein, Ca^{+2} iyonları ve polisakkaritler ile daha da sağlamlaşmaktadır (Hussain, vd., 1993). Bununla birlikte, hidrolaz, liyaz, glikozidaz, esteraz ve diğer enzimler biyofilmin bileşimine ve fiziksel özelliklerine etki edebilmektedir. Biyofilm yapısındaki bu enzimlerin bir çoğu düşük molekül ağırlıklı parçalanma ürünlerinin oluşumuna neden olmakta, bunlar da biyofilm içinde tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir (Allison, 2003).

Biyofilmin yapısı, saf kültürler için türe odaklı, çoklu kültürler için substrata özgü olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (Poulsen, 1999). Heterojenik biyofilm yapısı genellikle düzensizdir. Biyofilmin yapısı, etrafındaki akış hızı ve oranı, farklı türlerin sayısı ve türüne bağlı olarak değişmektedir. Biyofilmin kalınlığı durgun ve çalkantılı akış durumları arasında maksimum seviyededir. Biyofilm kalınlığı ve oluşumu, durgun alandaki kalınlık substrata, çalkantılı akışta ise akış hızının aşındırmasına bağlı olarak değişmektedir (Poulsen, 1999). Biyofilm yapısında oluşan su kanalları mikrokolonilerin hem altında hem de arasında bulunmakla birlikte besinlerin mikroorganizmalara ve biyofilm tabanına taşınması için kullanılır. Hücresel atıklar ise biyofilmin yüzeyindeki

kanallarla sağlanmaktadır. Taşıma işlemi, su yardımıyla ya da pasif difüzyonla kolaylaştırılarak yapılmaktadır. Su kanallarının kolaylaştırılmış difüzyon ile biyofilm içerisine molekül taşınmasına yardımcı olduğu gibi, içteki alanlara oksijen taşıdığı da gösterilmiştir (Costerton, vd., 1995). Bakteriyel tutunmada, proteinler gibi organik moleküllerin yüzeye tutunmasının biyofilmde önemli bir rolü vardır. Yüzey proteinleri, biyofilm matriksi içinde düzenli bir şekilde oluşur (Lasa ve Penadés, 2006). Bu proteinlerin bazıları, EPS varlığında biyofilm oluşumunu teşvik edebilmektedir. Biyofilm oluşumunda, Biyofilm İlişkili Protein (BAP-Biofilm Associated Protein), organizmanın yüzeye kolonize olması ve burada sürekli kalmasının sağlanması açısından önemlidir (Tormo, vd., 2005).

2.7 EPS'nin Genel Özellikleri

Ekzopolisakkarit (EPS)'ler mikroorganizmalar tarafından üretilen ve hücre dışına sentezlenen polisakkaritlerdir. EPS'ler, D-glikoz, D-galaktoz, L-ramnoz veya nadir olarak N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin ve glukoronik asit içeren birimlerin tekrarlanması sonucu açığa çıkan yapılardan oluşmaktadır (Duboc ve Mollet, 2001). Ayrıca hücre duvarına bağlanan EPS'ler kapsüler ekzopolisakkarit, ortamda serbest halde bulunanlar ise mukoz ekzopolisakkarit olarak adlandırılmaktadır (Soyuçok, vd., 2016). EPSlerin içerdiği bileşenler incelenecek olursa, çok çeşitli proteinler, glikoproteinler ve glikolipitler ve bazı durumlarda DNA da içermektedirler (Frølund, vd., 1996; Sutherland, 2001; Starkey, vd., 2004; Branda, vd., 2005). EPS'lerin molekül büyüklükleri genel olarak 10 kDa ile 200 kDa arasında değişmektedir, bazen de biyofilm tabakasının büyüklüğüne göre 1000 kDa'a çıkabilmektedirler (Vanningelgem, vd., 2004).

EPS'lerin mikroorganizmaların çevresini saran polimer yapılar olduğu bilinmektedir (Cerning, 1995; Frølund, vd., 1996). EPS'lerin büyük bir kısmı, düzenli olarak dizilmiş oligosakkaritlerin tekrarlanan birimlerinden oluşan heteropolisakkarit yapıda ya da tek tip şekerden oluşan homopolisakkarit yapıdan meydana gelmektedir (Sutherland, 1990; Lee, vd., 2003). Biyofilmler içerisinde en çok bulunan ve en kapsamlı biçimde incelenen ekzopolisakkaritler aljinat, selüloz ve poli-N-asetil glukozamindir (Gacesa, 1998; Zogaj, vd., 2001; Izano, vd., 2008; Lembre, vd., 2012). EPS'ler mikroorganizmayı su yetersizliği ya da eksikliği durumunda kurumaya,

fagositoza, faj saldırılarına, antibiyotiklere, toksik bileşiklere ve ozmotik strese karşı korurlar (Ruas-Madiedo, vd., 2002).

EPS'ler o çevrede yaşayan biyofilm hücrelerinin gözeneklilik, yoğunluk, su içeriği, yük, hidrofobiklik ve mekanik stabiliteyi etkileyerek anlık yaşam koşullarını da belirlemektedir (Flemming ve Wingender, 2002). EPS üreten mikroorganizmaların geliştiği ortam ve optimum şartlar EPS'nin kalitesini ve verimini etkilemektedir (Nicolaus, vd., 2010). Hücre dışında bulunan karbonhidratlar, proteinler, peptitler EPS'lerin ortamdan zor ayrılmasına neden olur (Cerning, 1995). Mikrobiyal EPS'ler doğada iyonik veya iyonik olmayan formlarda bulunabilir iken farklı su şiddetlerinde çözünebilmektedirler ve böylece buldukları yerden uzaklaşırlar (Liang ve Wang, 2015). EPS'nin önemli görevlerinden birisi hücrenin katı yüzeylere tutunmasında etkili olmasıdır (De Vuyst ve Degeest, 1999). Ayrıca oluşan kompleks yapı antimikrobiyal maddelerin difüzyonunu sınırlandırmaktadır (Poli, vd., 2011).

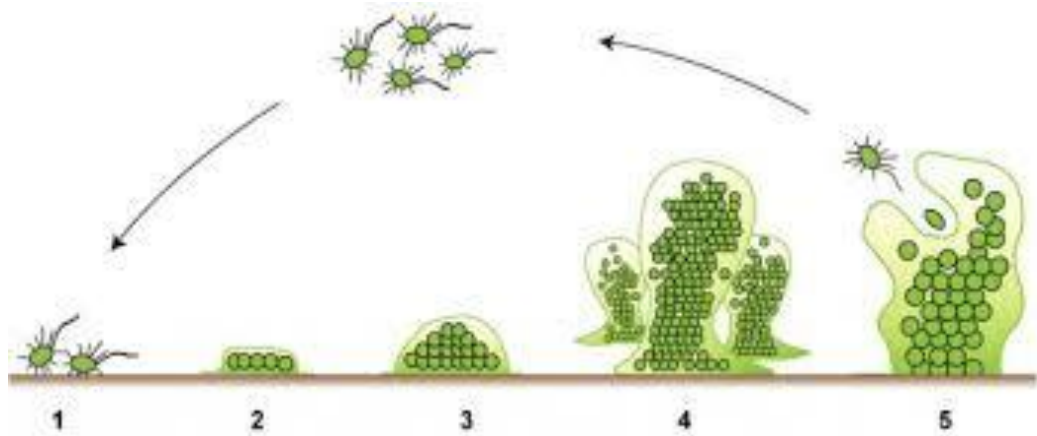
EPS üretimi için en çok kullanılan karbon kaynakları glikoz ve sakkarozdur (Liu, vd., 2009; Rafigh, vd., 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalarda sakkarozun karbon kaynağı olarak kullanılmasının levan tipi EPS verimini artırdığı rapor edilmiştir. Bakteriyel EPS üretimi genellikle aerobik koşullar altında gerçekleşmektedir (Liu, vd., 2010).

EPS üretimi ve miktarı, bakteriyel üreme ile de yakından ilişkilidir. EPS üretim miktarının optimum koşullar altında yüksek seviyeye ulaştığı bilinmektedir. Bakteriyel gelişim ve EPS üretimi, besiyerine karbonhidrat, azot kaynağı, vitamin, tuz gibi maddelerin ilavesi (Gerstel ve Römling, 2001; Donlan, 2002) ayrıca inkübasyon sıcaklığı ve süresi (Nilsson, vd., 2011), oksijen seviyesi (Shankar, vd., 1995; De Vuyst ve Degeest, 1999; Ahimou, vd., 2007; Grosu-Tudor ve Zamfir, 2014), kültür ortamının pH'sından etkilenmektedir (De Vuyst ve Degeest, 1999; Shu ve Lung, 2004; Nilsson, vd., 2011). Aynı zamanda basınç ve ışık yoğunluğu gibi çevresel baskılara yanıt olarak EPS üretimi değişiklik göstermektedir (Bragadeeswaran, vd., 2011; Donot, vd., 2012). Bunlara ek olarak oksidatif stres, UV ışını, hiperosmolarite ve etanol gibi kimyasallara maruz kalmakta EPS üretimini etkilemektedir (Hengge ve Aronis, 2002). Katı yüzeylerdeki mikrobiyal kolonizasyonun çeşitli parametrelerden etkilenebileceği bildirilmiştir. Örneğin, belirli yüzeylerin kolonizasyon derecesinin yüzey pürüzlülüğü ile arttığı bulunmuştur (Donlan, 2002). Ayrıca, mikroorganizmaların hidrofilik

yüzeyle göre hidrofobik ve polar olmayan yüzeyle daha hızlı bağlandığı bulunmuştur (Flemming ve Wingender, 2001; Donlan, 2002). Hücre yüzeyi hidrofobikliği, fimbria ve flagella varlığı ve EPS üretiminin derecesi, mikroorganizmaların farklı yüzeyle tutunma oranını ve derecesini etkilediği bilinmektedir (Donlan, 2002). Bu sürece katılan güçler, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarıdır (Mayer, vd., 1999; Fleming ve Wingender, 2001).

2.8 Biyofilm Oluşum Mekanizması

Biyofilm tabakası çok farklı çevrelerde oluşabilirken, en basit biyofilm tabakası bile karmaşık bir dinamiğe sahiptir. Yapılan birçok çalışmada, biyofilmlerin sabit noktalarda biyolojik dönüşümlerini tamamladıkları gösterilmiştir (O'Toole, vd., 2000). Bakterilerde biyofilm gelişiminin başlaması, besinlerin var olup olmaması gibi spesifik çevresel etmenlere bağlı olarak değişmektedir. Biyofilm gelişimi taze besiyeri sağlandıkça devam eder. Ancak ortamdaki besin maddeleri tükenince yüzey bağlantıları zayıflar ve planktonik (serbest yüzen) modlarına geri dönerler. Açlık durumu hücrelerin yeni taze besin kaynakları aramalarını, ortamlara daha iyi adapte olmalarını ve yayılmalarını sağlar (Kolter ve Tormo, 1993). Bu nedenle O'Toole, vd., (2000), açlık durumunda kullanılan metabolik yolun bütün biyofilm gelişim döngüsünü kapsayabileceğini belirtmişlerdir. Diğer yandan biyofilm oluşumunda yüzey koşullarının özelliklerinin bilinmesi de son derece önemlidir. Bakteriler yüzeye tutunarak koloni oluştururlar ve ileri aşamada eksopolisakkarit matriks içinde, mikroorganizma topluluğu şeklinde biyofilmler oluşmaktadır (O'Toole, vd., 2000). Bu olaylar beş basamakta incelenmektedir (Watnick ve Kolter , 2000; Lindsay ve Von Holy , 2006).



Şekil 2.5. Biyofilm oluşum aşamaları (1.Dönüşümlü tutunma 2.Geri dönüşümsüz tutunma 3.Koloni gelişimi 4.Biyofilm olgunlaşması 5.Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması) (Dagostino, vd., 1991; Stoodley, vd., 2002; Monroe, 2007 ; Srey, vd., 2013).

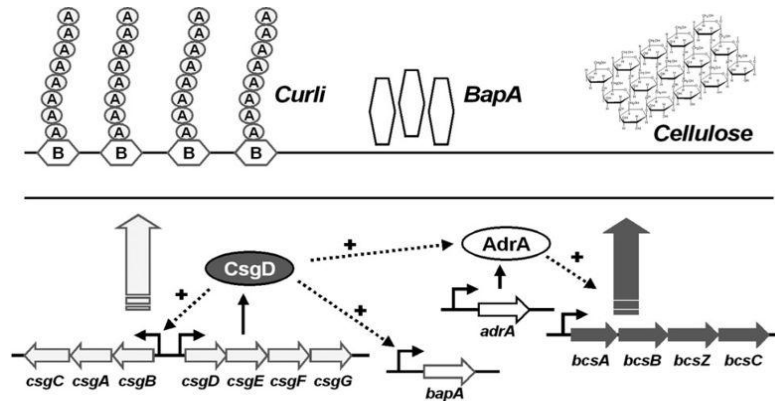
2.8.1 Dönüşümlü tutunma

Dönüşümlü basamakta, bakteri hücresi yüzey ile tam olarak temas etmemekte, ancak bakteri hücresi ile yüzey arasında uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Mikrobiyal hücrelerin bir yüzeye tutunması adezyon olarak adlandırılırken, mikrobiyal hücreler arasındaki tutunma kohezyon olarak adlandırılır. Bakterilerin yüzeylere adezyonu sırasındaki etkileşimler elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçleri olup zayıf etkileşimlerdir. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir, çünkü bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklüdür (Poulsen, 1999; Costerton, vd., 1995; Garrett, vd., 2008). Yüzeyle ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin katkısı büyüktür (Costerton, vd., 1995). Hücreler bu fazda, durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler. Dönüşümlü tutunma durumu, yapışan ve durgun haldeki hücreler arasındaki dengeli dağılımın bir sonucu olabilir. Burada mikroorganizma yüzeyin yakınındadır ama henüz yüzeyle temas etmemiştir (Lindsay ve Von Holy, 2006). Bakterilerle yüzey arasındaki kuvvetlerin çekilmesi ve itilmesi, bakterilerin yüzeye geri dönebilir bir şekilde bağlanmasına yol açmaktadır (Dunne, 2002). Bakterilerin tutunacakları biyotik ya da abiyotik yüzeyin sıcaklık, pH, basınç, besin olarak kullanılacak organik ve inorganik bileşikler bakımından elverişli olması gerekmektedir (Maric ve Vranes, 2007).

2.8.2 Dönüşümsüz tutunma

Biyofilm oluşumunda ikinci aşaması olan dönüşümsüz tutunmada ilk tutunmayı sağlayan flagella, fimbriya ve pili gibi uzantıların, yüzeyin elektriksel tabakasının fiziksel itici kuvvetlerinden daha güçlü duruma geldiği ve bakteriler ile yüzey arasındaki etkileşimi güçlendirdiği bilinmektedir. Dönüşümsüz tutunmada, başlangıçta hücre ve yüzey arasında meydana gelen zayıf etkileşimler gibi dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri oluşmaktadır (Kumar ve Anand, 1998). Mikroorganizmalar dönüşümlü olarak bağlanırken, yüzeyde yaşamak için yeterli besin maddesinin olup olmadığını da araştırır (Poulsen, 1999; Lejeune, 2003). Yani dönüşümlü tutunmadan dönüşümsüz tutunmaya geçiş EPS varlığında bakterinin yapmış olduğu zayıf bağların kalıcıya dönüşmesidir (Stoodley, vd., 2002). Tutunan bakterilerin merkezi biyofilm regülatörü, curli kodlayan operon *csgAB* ve *csgDEFG*'yi kontrol eden *CsgD*'dir (Römling, vd., 1998b). Curli altbirimleri *CsgA* ve *CsgB*, global regülatör *CsgD* tarafından pozitif olarak düzenlenen *csgBA* geni ile kodlanır (Römling, vd., 2000). *CsgD*, selüloz sentezinin aktivasyonunda yer alan GDEF protein ailesinin bir üyesi olan *AdrA*'nın ekspresyonu yoluyla selüloz üretimini de etkinleştirir (Zogaj, vd., 2001; Simm, vd., 2004). Ayrıca, *BapA*'nın hava-sıvı ara yüzünde pelikül oluşumu için gerekli olduğu ve onun sentezlenmesinin, *CsgD* vasıtasıyla curli ve selülozu kodlayan genlerle koordine olduğu gösterilmiştir (Römling, vd., 2000).

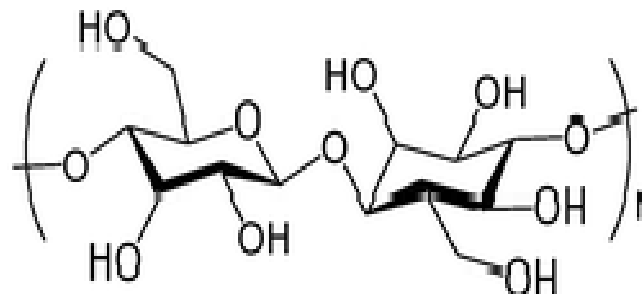
Dönüşümsüz tutunma aşamasından sonra biyofilm hücrelerini yüzeyden uzaklaştırabilmek için güçlü mekanik kuvvetlere, enzimlere, dezenfektanlara, deterjanlara, (Sinde ve Carballo, 2000) ve yüksek ısı işlemlere ihtiyaç vardır (Sinde ve Carballo, 2000; Maukonen, vd., 2003; Augustin, vd., 2004).



Şekil 2.6. Biyofilm oluşumu için gerekli hücre dışı matris bileşenlerinin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici ağın güncel modeli (Zogaj, vd., 2001; Latasa, vd., 2005).

2.8.2.1 Mikrobiyal selüloz

Mikrobiyal selüloz (MS), nanometre boyutlarında ki liflerle birlikte, bitki selülozu ile aynı kimyasal formülü sunar (Donini, vd., 2010). Şekil 2.7’de görüldüğü gibi kapalı formülü $(C_6H_{10}O_5)_n$ olan glikozidik β (1-4) bağlarıyla bağlanan glikoz monomerlerinden oluşan bir eksopolisakkarit tipidir (Römling, 2002; Nishiyama, vd., 2003; Phisalaphong, vd., 2008; Sheykhnazari, vd., 2011). Mikrobiyal selülozlar şerit oluşturmak üzere demetleri tutan mikrofibriller halinde toplanırlar. Üretim çoğunlukla sıvı ve hava ara yüzünde gerçekleşir (Johnson, vd., 1988; Beloin, vd., 2008). Bu özellikler bakteri suşları, yüzey özellikleri ve çevresel koşullara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Zogaj, vd., 2001; Solano, vd., 2002; Römling, vd., 2003; Zogaj, vd., 2003; Römling, 2005; Da Re ve Ghigo 2006; Uhlich, vd., 2006).



Şekil 2.7. Mikrobiyal selülozun kimyasal yapısı (Brown, 1987; Delmer, 1995).

Bakteriyel selülozun fonksiyonu ve lokalizasyonu hakkında çok az şey bilinmektedir. Bakteriyel selüloz sentazın (Bcs) işlem döngüsü, büyüyen bir selüloz zincirinin ucuna tek bir glikoz parçasının eklenmesini ve bunu takiben ortaya çıkan zincirin plazma membranı boyunca translokasyonunu içermektedir (Knott, vd., 2016). Bcs kompleksinin ilk kristal yapısı, fotosentetik bakteri *Rhodobacter sphaeroides*'den 2013 yılında yayınlanmıştır (Morgan, vd., 2013). Bcs, bir nükleotit bağlı donörden, UDP-glukozdan, büyüyen bir selüloz zincirinin sonuna tek bir glukoz bağlanmasını sağlar. Bcs, selüloz üretmek için siklik-di-GMP'ye ihtiyaç duyar (Omadjela, vd., 2013). Bcs, en az üç alt birimden (BcsA, -B ve -C) oluşan bir protein kompleksi aracılığıyla selüloz üretir ve salgılar (Römling, 2002; Re ve Ghigo 2006). BcsA, selüloz sentaz aktivitesi, sırasıyla diguanilat siklaz ve fosfodiesterazlar tarafından üretilen ve ayrıştırılan, her yerde bulunan ikinci bir mesajcı olan siklik-di-GMP (c-di-GMP) adlı küçük bir molekülün bağlanması üzerine allosterik olarak kontrol edilen bir sitoplazmik zar proteindir (Mayer, vd., 1991; Cantarel, vd., 2009). c-di-GMP'nin, bir yandan planktonik hücrelerin hareketliliğini ve virülansını, diğer yandan da çok hücreli toplulukların hücre yapışması ve kalıcılığını kontrol ettiği bilinmektedir (Jenal ve Malone, 2006 ; Römling ve Amikam, 2006). BcsA, selülozu sentezleyen ve iç zardaki transmembran (TM) gözeneğini oluşturan ve BcsB' ye bağlanmış büyük bir periplazmik protein olan katalitik alt birimdir. BcsB, tek bir C-terminali TM-heliksi vasıtasıyla iç membrana bağlanan periplazmik bir proteindir (Saxena, vd., 1994). BcsB polimeri, periplazma boyunca dış membrana doğru BcsA tarafından yönlendirebilir (Morgan, vd., 2013). BcsA ve BcsB, bazı türlerde tek bir polipeptid zincirine kaynaştırılır (Saxena, vd., 1994; Keiski, vd., 2010). BcsC'nin ise, in vitro değil, in vivo olarak selüloz sentezi için gerekli olduğu bilinmektedir (Römling, 2002; Hu, vd., 2010).

2.8.2.2 Curli

Curli gen ifadesi, hem hücresel düzeyde hem de bir biyofilm topluluğunda yüksek düzeyde düzenlenmiş ve koordineli bir olaydır (McCrate, vd., 2013; Depas, vd., 2013). Curli, ekstraselüler lif, ince agregatif fimbria olarak da bilinmektedir (Chapman, vd., 2002). İlk olarak *E. coli*'de gözlenmiş olan *csgD* genleri Pseudomonadaceae, Shewanellaceae ve Vibrionaceae familyalarında da mevcuttur (Jensen, vd., 2009) ve CsgD'nin adhezyon, kolonizasyon ve biyofilm oluşumuna aracılık ettiği bildirilmiştir (Olsen, vd., 1989, 1993a; Römling, vd., 1998a; Chapman, vd., 2002; Zogaj, vd., 2003).

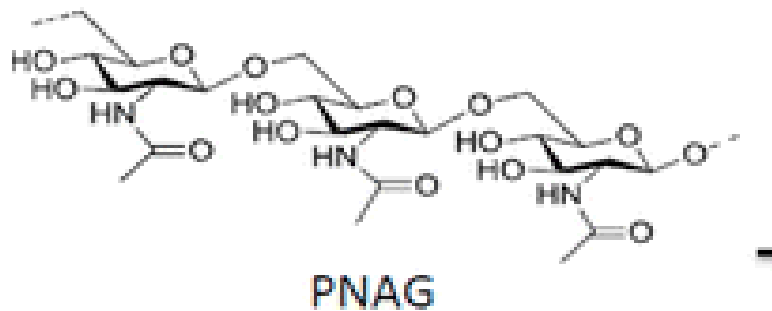
Bu lifler 5–12 nm çapında ve değişen uzunluklardadır (Olsén, vd., 1989; Ben, vd., 1996). *E. coli* 'de, curli hem başlangıç yapışmasını hem de hücre-hücre etkileşimini teşvik etmektedir (Prigent-Combaret, vd., 2000; Ryu, vd., 2005; Uhlich, vd., 2006). *E. coli*'nin çeşitli çevresel izolatları curli eksprese etme yeteneklerine göre biyofilmler oluşturmaktadırlar (Castonguay, vd., 2006; Barnhart ve Chapman, 2006; Larsen, vd., 2007). Curli lifleri patogeneizde rol oynayarak konakçı hücre adezyonuna ve immün sistem aktivasyonuna yardımcı olur (Gophna, vd., 2001; Bian, vd., 2000; Wang, vd., 2006).

Curli spesifik genleri (csg), CsgDEFG ve CsgBAC olmak üzere iki farklı operonda bulunur (Hammar, vd., 1995; Collinson, vd., 1997; Rudd, 2000; Wang, vd., 2008; Evans ve Chapman, 2014). CsgD ana biyofilm düzenleyicisidir ve CsgBAC operonunun transkripsiyonu için gereklidir (Hammar, vd., 1995; Römling, vd., 1998a). *csgD* geni, *csgBAC* operonunu aktive etmesinin yanı sıra, biyofilm oluşumu ve hücre yüzeyi ile ilişkili yapıların üretiminde yer alan bir takım genleride düzenler. (Latasa, vd., 2005; Gibson, vd., 2006). CsgA ana alt birimi, sitoplazmada sentezlenir ve hücre yüzeyine, katlanmamış bir protein olarak nakledilir, burada CsgB ile etkileşime girdikten sonra hücre dışı amiloid polimerler oluşturmak üzere toplanır (Hammar, vd., 1996; Chapman, vd., 2002; Hammer, vd., 2007). CsgA amiloid oluşumu CsgB'ye bağlı olmasına rağmen, CsgA yokluğunda da amiloid lifleri oluşabilmektedir (Hammer, vd., 2012). Son zamanlarda, periplazmik protein CsgC ise, CsgA amiloid oluşumunun güçlü ve spesifik bir inhibitörü olarak kabul edilmiştir yani amiloid oluşumunu engeller (Hammar, vd., 1995; Gibson, vd., 2007; Taylor, vd., 2011; Evans, vd., 2015). Aynı zaman da CsgDEFG promotörü *E. coli*'deki en karmaşık düzenlenmiş promoterlerden biri olarak kabul edilmektedir (Ishihama, 2010). Csg proteinlerinin dış yüzeye aktarılması CsgG, CsgE ve CsgF proteinleri tarafından yönlendirilir (Nenninger, vd., 2009; Goyal, vd., 2014). CsgD, CsgB'yi kodlayan *csgBA* operonunun, CsgB'nin bir lif halinde indüklendiği hücre dışında salgılanan yapısal alt biriminden sentezlenir (Barnhart ve Chapman, 2006). CsgE, CsgA'nın periplazmaya dönmesini bloke ederek CsgG'nin kapağını oluşturur (Shu, vd., 2016). CsgF'nin CsgG ile etkileştiği ve işlevine yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Robinson, vd., 2006; Epstein, vd., 2009; Nenninger, vd., 2011).

Curli'nin ifadesi, düşük sıcaklık koşulları altında aktive edilmektedir. Düşük azot, fosfat ve demir alımı, düşük ozmolarite, beslenme yetersizliği, yavaş büyüme, çevresel sinyaller ve kimyasallar tarafından kontrol edilir (Olsen, vd., 1993a, 1993b; Maurer, vd., 1998; Prigent-Combaret, vd., 1999; Gerstel ve Römling, 2001; Gerstel, vd., 2003; Barnhart ve Chapman, 2006). Yapılan araştırmalar sonucunda curlinin ifadesinin düşük sıcaklıklar (20° C ve 30° C arasında) altında aktif olduğu tespit edilmiştir (Olsen, vd., 1989; Arnqvist, vd., 1992; Olsen, vd., 1993a; Römling, vd., 1998a; Zogaj, vd., 2000; Gerstel, vd., 2003). Fakat bazı çalışmalarda *E. coli*'nin üreme sıcaklığı 37°C' de biyofilm de curli fimbriaların eksprese edilebileceği gösterilmiştir (Kikuchi, vd., 2005).

2.8.2.3 Poli- β -1,6-N-asetil-glukosamin (PGA/ PNAG)

Biyofilm oluşumunda önem arz eden bir diğer ekzopolisakkarit PGA ya da PNAG olarak adlandırılan, β -1,6- N – asetilglukozamin (β -1,6-GlcNAc) dir. İlk olarak *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*'te tespit edilmiştir (Mack, vd., 1996 ; McKenny, vd., 1999; Rupp, vd., 2001 , Gotz, 2002 ; Maira, vd., 2002; Izano vd. 2007, 2008). Yakın zamanda da , *E. coli* K-12'de de tanımlanmıştır (Wang, vd., 2004). PGA ekzopolisakkarit polimeri hem hücre-hücre yapışmasında hem de yüzeylere tutunmada rol oynar (Wang, vd., 2004; Itoh, vd., 2005; Agladze, vd., 2005; Lopez, vd., 2010, Flemming ve Wingender, 2010).



Şekil 2.8.Bakteriyal biyofilm matrislerinin bir bileşeni PNAG (Pokrovskaya, vd., 2013).

PGA üretimi *pgaABCD* lokusuna bağlıdır. Tüm PGA genleri, çeşitli büyüme koşulları altında optimal biyofilm oluşumu için gereklidir (Wang, vd., 2004; Itoh, vd., 2008). *E. coli* *pgaABCD* operonu, ihracatı ve lokalizasyonunda yer alan proteinleri

kodlar. Bu nedenle, PGA'nin *E. coli'* nin biyofilmlerini stabilize eden bir yapışma sistemi olarak görev aldığı bilinmektedir. PGA, bakterileri doğal konakçı savunmaya karşı koruduğu içinde önemli bir virülans faktörüdür (Vuong, vd., 2004; Kropec, vd., 2005). PgaA'nın, protein-protein etkileşimlerine aracılık ettiği ve dış membran yapısını oluşturmak için tetratrikopeptid tekrarlarını içerdiği bilinmektedir (Itoh, vd., 2008). PgaB'nin, bir dış zar lipoprotein olduğu tahmin edilmektedir (Wang, vd., 2004). PgaB aynı zaman da hücre duvarı ile ilişkili bir proteindir (Vuong, vd., 2004). PgaC, polimerizasyon için gerekli olan sitoplazmik zar proteinleridir (Gerke, vd., 1998; Itoh, vd., 2008). Yapılan çalışmalar doğrultusunda PGA sentezi için PgaC'nin gerekli olduğu, *E. coli* veya diğer gram-negatif bakterilerdeki diğer *pga* genlerine olan bağımlılığı daha belirlenmemiştir (Itoh, vd., 2008).

2.8.3 Koloni oluşumu

Biyofilm oluşumunun en önemli aşaması yüzey kolonizasyonudur. Yani mikrokoloni oluşumudur (Chmielewski ve Frank, 2003). Mikrokoloni oluşumu, yüzeye ilk bağlanmadan sonra oluşan biyofilmin üç boyutlu büyümesine karşılık gelmektedir. Tutunan bakteriler gelişir ve daha sonra bölünür. Çoğunlukla hücre-hücre etkileşimleri nedeniyle, bu süreç bakterileri, homojen planktonikten ayırarak, karakteristik ve fizyolojik özellikler sergilediği heterojen bir ortamın oluşmasına yol açar (Christophe, vd., 2008). EPS ile diğer planktonik hücrelerin yakalanması da sağlanır. Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), aynı yüzeye diğer bakteriler de koloni oluşturur (ikincil koloni). Biyofilm büyüdükçe, EPS içinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür (Poulsen, 1999).

2.8.4 Olgun biyofilm oluşumu

Bu basamakta ise, mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler (Chmielewski ve Frank, 2003; Klausen, vd., 2003). Konfokal lazer mikroskopisi ile yapılan çalışmalar bakterilerin, kompleks ekzopolisakkarid ile çevrilmiş mikrokoloniler içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuşlardır. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için ilkel bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (Poulsen, 1999; Kumar ve Anand, 1998; Karatan ve Watnick, 2009).

Biyofilm oluşumunun son safhasında yüzeye yapışmada rolü olduğu keşfedilen ve bir çok *E. coli* suşu tarafından üretilen bir otoagregasyon faktörü olan Antigen 43 bakteri toplanmasına neden olmaktadır (Klemm, vd., 2006). Antijen 43 (Ag43), iç zar boyunca aktarım için bir sinyal peptidi olan ve kendiliğinden oluşan ototransporter protein grubunun bir üyesidir (Kjaergaard, vd., 2000). Bu proteinler doğrudan dış membrana bağlanır ve yüzeyden sadece yaklaşık 10 nm dışarı çıkıntı yapmaktadırlar bu da curli veya diğer fimbrialarla görülenlerden daha yakın hücre-hücre etkileşimleri ile sonuçlanır ve biyofilm oluşum basamaklarına dahil olur (Klemm, vd., 2006). Sıvı kültürde bu özellik hızla topaklaşma ve kümelenme oluşumuna yol açarken bakteriyel sedimentasyona neden olur, ayrıca bakteri-bakteri yapışmasını kolaylaştırır ve biyofilmin üç boyutlu gelişmesine yol açar (Owen, vd., 1996; Henderson, vd., 1997; Hasman, vd., 1999; Kjaergaard, vd., 2000; Schembri, vd., 2003a; Verstraete, vd., 2013).

2.8.5 Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması

Biyofilm oluşumunda son aşama biyofilm hücrelerinin koparak ayrılmasıdır. Hücreler bu aşamada planktonik fazlarına geri dönerler (Sauer, vd., 2002). Artan akış kuvveti (Stoodley, vd., 2002), iç enzimatik bozulma, EPS ya da yüzey bağlantısı sağlayan proteinlerin açığa çıkması gibi hücre içinde görülen işlemler biyofilm hücrelerinin ayrılmasında önemli rol üstlenir (Boyd ve Chakrabarty, 1994; Watnick ve Kolter, 2000; Kaplan, vd., 2004a). Ayrıca ortamda besin maddelerinin tükenmesi de hücrelerin ayrılmasının önemli bir nedeni olabilmektedir (O'Toole ve Kaplan, 2000). Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum basamağının bir parçası olarak tek bir hücrenin veya çoklu hücrelerin kopmasının bir sonucu da olabilir (Poulsen, 1999).

2.9 Yüzey Koşulları

Bakteriler için yüzeylerde mevcut olan çevresel koşullar, normal ortamdakilerden farklıdır. Yüzeylerin üzerindeki besin konsantrasyonları, oksijenlenme, yüzey ozmolaritesi, pH'sı ve fizikokimyasal özellikleri birbirinden farklı olabilmektedir. Patojen olan veya bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar paslanmaz çelik üzerinde hafif girintili alanlarda, alüminyum malzemedeki yapılmış pürüzsüz yüzeylerde, yine cam gibi pürüzsüz alanlarda, ahşap gibi tırtıklı yüzeylerde, teflon ve

plastik materyaller gibi farklı yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturdıkları belirlenmiştir (Barnes, vd., 1999; Trachoo, 2003; Padera, 2006; Lindsay ve Von Holy , 2006; Kim, vd., 2006; Planchon, vd., 2006; Perrin, vd., 2009). Naylon ve teflon yüzeyler düz olduğundan mikroorganizmaların bu alanlara da yapışma ihtimali yüksektir. *E. coli* hücrelerinin abiyotik yüzeylere yapışması yüzey algılaması denilen bir süreçle başlamaktadır (Otto ve Silhavy, 2002). Bununla birlikte paslanmaz çelik yüzeyler, çatlak ve yarılmalar nedeniyle pürüzlü bir yüzeye sahip olabilirler. Alüminyum yüzeylerin geniş çatlakları sünger gibi görünüm sağladığından bu tür yüzeylerde mekanik yöntemlerle uygulanan temizlik işlemlerinde bile bakterilerin yüzeyden uzaklaştırılmadığı belirlenmiştir (Barnes, vd., 1999; Trachoo, 2003; Padera, 2006; Lindsay ve Von Holy , 2006; Kim, vd., 2006; Planchon, vd., 2006).

Çizelge 2.2. Yüzeye tutunma ve biyofilm oluşumunda etkili faktörler (Kumar ve Anand, 1998).

Kategoriler	Faktörler
Yüzey	Pürüzlü Yapı Hidrofobitesi
Hücre	Fimbria Bulundurması EPS Yapısı Hidrofobitesi Flagella Bulundurması
Sıvı Ortam	pH Sıcaklık Akış Hızı Katyonlar

2.10 Sinyal Molekülüyle İletişim (Quorum Sensing)

Biyofilm oluşumu, bakterilerin sadece bir araya gelerek belirli bir yüzeye tutunduktan sonra oraya yapışması ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam ettikleri şeklinde gerçekleşen rastgele bir olay değildir. Birçok organizma aktivitelerini koordine etmek için birbirlerine sinyal verirken küçük yayılabilir molekülleri kullanırlar. Biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizma olan ve “Quorum Sensing (QS)” olarak adlandırılan bu işlem ile bakteriler ürettikleri sinyal

moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmekte ve bu verileri diğerlerine iletmesine imkân sağlamaktadır (Camara, 2007). Başka bir ifadeyle, QS ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama ‘Ben buradayım’ mesajı veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artar. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani, biyofilm içerisindeki bakteriler interselüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedirler (Arnold ve Silvers, 2000). Bu hücreler arası iletişimi sağlayan mekanizma, kendiliğinden sinyal üretebilen ve “Oto-Endükleyici [Auto-inducer (AI)]” adı verilen moleküllerden oluşur. QS moleküllerinin oto-endükleyici olarak da ifade edilmelerinin nedeni, üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermeleridir (Novick ve Muir, 1999; Donabedian, 2003).

Gram negatif bakterilerde QS mekanizmasında oto-endükleyici olarak N-acyl homoserin lakton (AHL, AHLs, acyl-HSL veya HSL), gram pozitif bakterilerde ise çoğunlukla oligopeptidlerdir (autoinducering peptitler) (Wong, 1998). Otoendüktörler (AI) biyofilm oluşumu üzerinde çalışılan ve en çok araştırılan sinyallerden biridir. Şu ana kadar AI, üç sınıfta karakterize edilmiştir; AI-1, AI-2 ve AI-3 (Reading, vd., 2009; Papenfort ve Bassler, 2016). Her sinyal sisteminin belirli bir otoendüktör sentaz ve reseptörü bulunmaktadır (Reading, vd., 2009; Papenfort ve Bassler, 2016). Hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler ortak olarak oto-endükleyici 2’yi de (AI-2’s) kullanmaktadır (Raffa, vd., 2005). Bu nedenle hem tür içi hem de türler arası iletişimde aracılık edebilen "evrensel" bir bakteri sinyali olarak önerilmiştir (Surette, vd., 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *E. coli* ve *Salmonella enterica*’nın hücreden hücreye sinyalinde AI-2 sinyalleriyle gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu sinyal moleküllerinin üstel gelişim süresince üretildiği ve bakteri membranına serbestçe geçebildiği ifade edilmektedir (Ahmer, 2004). *E. coli*’de ise, AI-2 membranda pasif olarak dağılabilmektedir (Zhu ve Pei, 2008).

2.11 Biyofilm Oluşumunun Düzenlenmesi Karışan Diğer Faktörler

Biyofilm belirleyicileri için gen ekspresyonunun düzenlenmesi, genellikle karmaşık düzenleyici ağların veya hem spesifik hem de global düzenleyicinin aktivitesini modüle edebilen farklı çevresel sinyallerin bir kombinasyonunu gerektirir (Ghigò, 2003; Landini, 2009). Çevresel faktörlerin etkisi, çevresel koşullardaki değişiklikleri algılayabilen ve belirli bir hücrel yanıtı tetikleyebilen iki bileşenli düzenleyici sistemler tarafından gerçekleştirilebilir. İki bileşenli düzenleyici sistemler, genellikle membranda bulunan bir sensör protein ve DNA üzerindeki belirli dizilere bağlanabilen düzenleyici bir protein tarafından oluşturulur. Transkripsiyon düzenlenmesi, sensör proteini tarafından gerçekleştirilen inaktif bir düzenleyici proteinin (genellikle fosforilasyon) kimyasal modifikasyonu ile tetiklenir (Otto ve Silhavy, 2002). *E. coli*'de büyüme ortamındaki değişikliklerin algılanması ve yanıtlanması için 30'dan fazla iki bileşenli sinyal iletimi (TCST) yolu kodlanmaktadır (Gerstel, vd., 2006). Bazı iki bileşenli düzenleyici sistemler doğrudan biyofilm oluşumuna dahil olmaktadır. Örneğin, curli biyosentezinin kontrolünde yer alan CpxA / CpxR sistemi. Bir sensör kinaz ve fosfataz olan CpxA ve bir yanıt regülatörü olan CpxR' den oluşur. Bu genler, periplazmik bölgedeki genel stres koşullarıyla indüklenir. Böylece Cpx sistemi yüzey algılamasında ve yapışmayı teşvik eder (Otto ve Silhavy, 2002). Ayrıca CpxRA iki bileşenli sistemi, yüksek pH ve hücre zarfı proteinlerinin aşırı üretimine ve yanlış katlanmasına tepki olarak aktive edilir (Pogliano J, vd., 1997; Otto ve Silhavy, 2002). Bununla birlikte, CpxA'nın işlevini engelleyen faktörler *E. coli*'de biyofilm oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Dorel, vd., 1999)

Çoklu TCST yolları normalde, spesifik bir stres sinyali ile başa çıkmak için uygun gen ekspresyonunda global değişiklikleri kapsayan karmaşık bir cevaba yol açan tek veya çoklu stres sinyallerine tepki olarak aktive edilir. EnvZ-OmpR sisteminde, bir yüzey ile temasın hissedilmesiyle düzenlenen stabil hücre-yüzey etkileşimlerine ilaveten, bu etkileşimler özellikle ozmolariteyi arttıran çevresel koşullar tarafından da düzenlenebilir. Bunun sonucunda *csgD* ekspresyonu aktive edilmektedir, bu da besin sınırlayıcı ortamlarla karşılaşan bakteriler için bir işaret görevi görür (Vidal, vd., 1998; Gerstel, vd., 2006). EnvZ / OmpR sistemi, iki bileşenli bir sinyal yolunun, artan ozmolariteye yanıt olarak stabil hücre-yüzey etkileşimlerini desteklemede bir rol oynadığı da görülmektedir (Otto ve Silhavy, 2002; Kuhn, vd., 2014). *E. coli* OmpR

proteininde, curli-kodlayan operonların hiperaktivasyonundan sorumlu bir mutasyon, artan adezyona yol açar (Vidal, vd., 1998; Prigent-Combaret, vd., 2001; Gerstel, vd., 2006; Brzostek, vd., 2012; Samanta, vd., 2013; Kuhn, vd., 2014).

Biyofilm oluşumunda birçok küresel düzenleyici protein de bulunmaktadır. Birçok küresel düzenleyici, DNA bağlanmasında düşük düzeyde özgülük gösterir ve düzenleyici bölgelerinin mimarisini değiştirerek birçok genin transkripsiyonunu düzenler. Çevre koşullarına verilen yanıtlarla ilişkili olan H-NS ve RpoS, biyofilm oluşumunu modüle etmede rol oynar. *E. coli*'de H-NS, çok sayıda hücre zarfı bileşeni de dahil olmak üzere çok sayıda genin (*E. coli* K-12 genomunun yaklaşık% 5'i) düzenlenmesinde görev alan bir proteindir (Soutourina, vd., 1999). Flagella, tip I fimbriae, LPS ve kolanik asit gibi birçok hücre zarfı bileşeni dahil olmak üzere, bunların çoğu, pH, oksijen, sıcaklık ve ozmolariteyi içeren çevresel uyarılarla bağlantılıdır (Dorman ve Bhriain, 1992; Olsen, vd., 1998; Hommais, vd., 2001; Dorman, 2004). H-NS proteininin biyofilm formasyonu ile doğrudan bir ilişkisi olduğu görülmektedir: H-NS, promotörler ve $\sigma 70$ -RNA polimeraz arasındaki komplekslerin oluşumunu inhibe edebilir. H-NS proteininin bu etkisi gen susturma olarak adlandırılır ve aynı zamanda csgBA promotöründe de gerçekleşir, böylece büyümenin üssel fazı sırasında curli alt birimlerinin yapısal birimlerinin transkripsiyonunu önler (Arnqvist, vd., 1994). Böylece, H-NS biyofilm oluşumu için negatif bir belirleyici olarak görülmektedir (Landini ve Zehnder, 2002).

RNA polimerazın alternatif σ alt birimi (RpoS proteini olarak da adlandırılır) genel stres cevabının ana düzenleyicisidir ve rolü hala tartışmalı olsa da biyofilm oluşumunu doğrudan etkilemektedir. Büyümenin durağan fazı sırasında indüklenen birçok genin ekspresyonunu yönetmektedir. Böylece, RpoS'un birçok bakteri türünde biyofilm oluşumunda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. *E. coli*'de RpoS, büyüme sınırlayıcı koşullara ve diğer streslere yanıt olarak csgBAC operonunun transkripsiyonunu doğrudan aktive etmektedir (Arnqvist, vd., 1994; Gualdi, vd., 2007). Yapılan çalışmalar sonucu, *E. coli*'nin *rpoS* mutantları sürekli kültürlerde büyürken daha ince biyofilm oluşturduğu görülmüştür (Adams ve McLean, 1999). RpoS'ye bağlı genlerin % 46'sının biyofilmlerde ve *rpoS*'nin delesyonunda farklı şekilde ifade edildiğini saptamış ve *E. coli*'nin topluluk oluşturmayı başaramadığını göstermiştir (Schembri, vd., 2003b). Aksine, diğer araştırmacılar, *P. aeruginosa*'daki RpoS

ifadesinin biyofilmlerde baskılanmış olduğunu ve *rpoS* eksik mutantların yabani tip hücrelerden daha iyi biyofilm oluşturduğunu, fakat antimikrobiyal tedaviye daha dirençli olduğunu bildirmiştir (Whiteley, vd., 2000). Bu bulgular ile uyumlu olarak, RpoS, *E. coli*'de tip I fimbriaların ekspresyonunu olumsuz olarak etkilemektedir ve bu da biyofilm oluşumuna aracılık edebilir. Böylece RpoS'nin biyofilm oluşumunda hem negatif hem de pozitif bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Dove, vd., 1999).

2.12 Çalışmanın Amacı

Biyofilm oluşumu günümüzde insan sağlığı açısından çok önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu yüzden biyofilm sağlık sektöründe ve gıda sanayisinde önemli bir sorun halinde olduğundan önlenmesi önem arz etmektedir. Bakteriler onları öldürmek ya da üremeleri durdurmak için kullanılan antibiyotiklere karşı bile biyofilm direnç mekanizmasını kullanmaktadırlar. Biyofilm mekanizmasının ortaya konması ve özelliklerinin açığa çıkarılması, birçok hastalığın patogenezinin ve buna bağlı olarak tedavi yöntemlerindeki başarısızlıkların anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı, *E. coli* 'nin dış membranın çevre ile direkt ilişki içerisinde olması ve porin proteinlerinin (OmpA, OmpC, OmpF, OmpG, OmpT, LamB ve PhoE) birçok çevre faktörlerine karşı rolü olması dolayısıyla biyofilm ile ilişkisini araştırmaktır. Transdüksiyon yöntemiyle genlerin nakat edilmesi ardından porin proteinleri mutant *E. coli* suşları farklı pH'a sahip besi ortamlarında 24 saat inkübasyona bırakılarak biyofilm oluşumları gözlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda biyofilm oluşumunda metallerin etkiside araştırılmıştır. Rolü olduğu tespit edilen mutantların gen ekspresyonları, biyofilm oluşumuna katılan genler ile gerçek zamanlı PZR ile kontrol edilmiştir ve biyofilmin moleküler mekanizmasının çıkartılması hedeflenilmiştir.

3. MATERYAL METOD

3.1 *Escherichia coli* Suşları

Bu çalışmada kullanılan mutant suşları Hiroshi Kobayashi laboratuvarından temin edilmiş ve aşağıda bulunan çizelge 3.1’de özellikleri verilmiştir. Komplement hücreler ise transformasyon yöntemi kullanılarak bu çalışmada yapılmıştır. Bakterilerin %50 gliserol (Merck) içeren Luria-Bertani (LB) broth’da stokları hazırlanmış ve derin dondurucuda -80 °C’de (Panasonic) saklanmıştır. Yapılan çalışmalar sırasında Luria-Bertani agar besiyerine ekilmiş ve taze kültür olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar.

Genotip	Kaynak
W3110 Yabani tip	Lab. stok
W3110 <i>ompA</i> ::km	Kobayashi Lab. stok
W3110 <i>ompC</i> ::km	Kobayashi Lab. stok
W3110 <i>ompF</i> ::km	Kobayashi Lab. stok
W3110 <i>ompG</i> ::km	Kobayashi Lab. stok
W3110 <i>ompT</i> ::km	Kobayashi Lab. stok
W3110 <i>lamB</i> ::km	Kobayashi Lab. stok
W3110 <i>phoE</i> ::km	Kobayashi Lab. stok
W3110 pLATE51:: <i>ompA</i>	Bu çalışmada yapıldı
W3110 pLATE51:: <i>ompC</i>	Bu çalışmada yapıldı
W3110 pLATE51:: <i>ompF</i>	Bu çalışmada yapıldı
W3110 pLATE51:: <i>ompG</i>	Bu çalışmada yapıldı
W3110 pLATE51:: <i>ompT</i>	Bu çalışmada yapıldı
W3110 pLATE51:: <i>lamB</i>	Bu çalışmada yapıldı
W3110 pLATE51:: <i>phoE</i>	Bu çalışmada yapıldı

3.2 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar

3.2.1 Luria-Bertani brot besiyeri

Bakteri suşlarının büyütülmesi için üreme ortamı olarak kullanılmıştır. 25 gr Luria-Bertani brot (Merck) tartılarak 1 L distile suda çözündürülerek 121 °C’de 15 dakika (dk) otoklavda (Nüve) steril edilmiştir.

3.2.2 Luria-Bertani agar besiyeri

Bakterilerin stok olarak buzdolabında +4 °C’de saklanmasında kullanılmıştır. 15 gr Agar-Agar (Merck) ve 25 gr Luria-Bertani brot (Merck) tartılarak 1 L distile suda çözündürülerek otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edilerek ve 55°C sıcaklığa gelince aseptik teknikler uygulanarak petrilere dökülmüştür.

3.2.3 SOB medium

Transformasyon aşamasında kullanılmıştır. 4 gr bacto tryptone (BD), 1 gr yeast extract (Merck), 0,4 ml 5M NaCl (Emsure), 0,25 ml 2M KCl (Emsure) 200 ml distile suda çözündürülerek pH metre (Mettler Toledo) yardımı ile pH’ sı 7’ye ayarlanmıştır. Daha sonra 121 °C’de 15 dk otoklavla steril edilmiştir.

3.2.4 SOC medium

Transformasyon aşamasında kullanılmıştır. 1,96 ml SOB medium, 20 µl 2M Mg⁺² (Merck) çözeltisi karıştırılarak 121°C’de 15 dk otoklavla steril edilmiştir. Soğuduktan sonra 14,4 µl %50’lik glukoz (Reidel-de Haen) eklenmiştir.

3.2.5 Kongo kırmızılı agar

Kongo kırmızılı agar besiyeri litrede 10 gr agar, 50 gr sukroz, 37 gr beyin-kalp infüzyon buyyonu ve 0.8 gr kongo kırmızısı içerecek şekilde hazırlanmış ve otoklavda 121°C’de steril edilmiştir ve 55°C sıcaklığa gelince aseptik teknikler uygulanarak petrilere dökülmüştür.

3.2.6 TBE hazırlama

54 gr TRİS (Ultrapure), 20 ml 0,5 M pH:8 EDTA (Merck), 27,5 gr borik asit (Merck) üzerine 500 ml saf su eklenerek 10X TBE hazırlanmıştır.

3.2.7 TE hazırlama

1 M Tris-HCl'den final konsantrasyonu 10 mM Tris-HCl olacak şekilde 2 ml 0,5 M EDTA'dan final konsantrasyonu 1 mM EDTA olacak şekilde 400 µl konuldu ve üzerine 200 ml saf su eklenmiştir.

3.2.8 IPTG (Izopropil β-D-1-tiogalaktopironasid) hazırlama

0,1 M IPTG için; 0,238 gr IPTG (Thermo Scientific) 9,9 ml saf suda çözüldürülmüştür. Daha sonra filtre ile steril edilip, 1,5 ml'lik ependorflara 1'er ml konularak -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.9 Tamponların hazırlanması

1,5 M MOPS (morfolinpropansülfonik asit) (Amresco) ve 1,5 M TRIS (hidroksimetil) (Serva) moleküler ağırlıklarına göre tartılarak 50 ml saf su içinde çözdürülmüştür ve koyu renkli şişelere konularak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2.10 Kullanılan metallerin hazırlanması

CuSO₄, NiSO₄ ve ZnSO₄ metalleri final konsantrasyonları 0,2 M olacak şekilde moleküler ağırlıklarına göre hazırlanarak filtre yardımı ile steril edilmişir ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.11 pH değerleri

Bakterilerin büyütülmesi için üreme ortamı olarak kullanılan Luria-Bertani Brot besiyeri asidik ortam denemeleri için hazırlanan MOPS tamponu ile pH ortamı 5.5, 6.0 ve 6.5 olarak ayarlanmış ve otoklavlanmıştır. Bazik ortam denemelerinde kullanılan 7.5 ve 8.0 pH ortamında TRIS tamponu kullanılmıştır.

3.3 Koloni PZR

Yabanil tip ve mutant suşların gen bölgelerini ve kanamisin kasetlerini kontrol etmek için aynı zamanda transformasyon işlemi sonrasında elde ettiğimiz mutantların doğrulamasında koloni PZR yöntemi kullanılmıştır.

Tek bakteri kolonilerinden seçilen her bir örnek, 20 µl distile su içerisinde dilüe edilmiş ve 0,2 ml'lik PZR tüpleri içine 1µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Her bir genin doğrulaması için uygun primerler de Çizelge 3.4' de gösterilmiştir. PZR reaksiyonu hazırlandıktan sonra Çizelge 3.3' deki reaksiyon döngü koşullarına göre PZR yapıldı.

Çizelge 3.2. Bir örneklik koloni PZR reaksiyon karışımı

Solüsyonlar	Miktar
10X ThermoPol Reaksiyon Buffer (Biolab)	1,0 µl
10 mM dNTP Mix	0,25 µl
10 µM ileri primer (İnvitrogen)	0,5 µl
10 µM geri primer (İnvitrogen)	0,5 µl
2 mM Mg ²⁺ içeren MgCl ₂ (Biolab)	0,6 µl
0,25U Taq DNA Polimeraz (Biolab)	0,05 µl
dH ₂ O	6,15 µl
Total	10 µl

Çizelge 3.3. PZR (Thermo) döngü koşulları.

94 °C	3 dk	1 döngü
94 °C	1 dk	30 döngü
56 °C	1,5dk	
72 °C	5 dk	
4 °C	10 dk	1 döngü

Çizelge 3.4. Kullanılan Primerler.

Primerler	Dizi
Evrensel K1 geri primeri	5' CAGTCATAGCCGAATAGCCT3'
W3110:: <i>ompA</i> ileri primeri	5' TATGCCTGACGGAGTTCACA3'
W3110:: <i>ompA</i> geri primeri	5'GGCATTGCTGGGTAAGGAAT3'
W3110:: <i>ompC</i> ileri primeri	5'TTTGGGGAGAATGGACTTGC3'
W3110:: <i>ompC</i> geri primeri	5'CGCAACCAACAAAGAAGAGC3'
W3110:: <i>ompF</i> ileri primeri	5'TGTAGCACTTTCACGGTA3'
W3110:: <i>ompF</i> geri primeri	5'ATGACGAGGTTCCATTAT3'
W3110:: <i>ompG</i> ileri primeri	5'TATGCTCTACACCACGGTTG3'
W3110:: <i>ompG</i> geri primeri	5'ACGCAGGAGTTAGGTCAACA3'
W3110:: <i>ompT</i> ileri primeri	5'TATGCCTCTAAAGGCATGGC3'

W3110:: <i>ompT</i> geri primeri	5'TGTAATTGGGTTGCTGTCGC3'
W3110:: <i>lamB</i> ileri primeri	5'ATGTCGTCGACTGCATAAGG3'
W3110:: <i>lamB</i> geri primeri	5'AGCCGTTGTAGGCCTGATAA3'
W3110:: <i>phoE</i> ileri primeri	5'AAGCATGGCGTTTTGTTGCG3'
W3110:: <i>phoE</i> geri primeri	5'TTTCACGAGAAGCTGCGTGA3'
plate51:: <i>ompA</i> ileri primeri	5'GGTGATGATGATGATGACAAGATGAAAAAGACAGC TATCGCG3'
plate51:: <i>ompA</i> geri primeri	5'GGAGATGGGAAGTTAAGCCCTGCCCTGGCGG3'
plate51:: <i>ompC</i> ileri primeri	5'GTGATGATGATGACGAAAGTTAAAGTACTGTC CCTCC3'
plate51:: <i>ompC</i> geri primeri	5'GGAGATGGGAAGTCATTAGAAGTGGTAAACCA GACCCAGA 3'
plate51:: <i>ompF</i> ileri primeri	5'GGTGATGATGATGACAAGATGATGAAGCGCAA TATTCTGG3'
plate51:: <i>ompF</i> geri primeri	5'GGAGTGGGAAGTCATTAGAAGTGGTAAACGATA CCCACAG3'
plate51:: <i>ompG</i> ileri primeri	5'GGTGATGATGATGACAAGATGAAAAAGTTATT TACCCTGTACCGC3'
plate51:: <i>ompG</i> geri primeri	5'GGAGATGGGAAGTCATTACGCATCTCTTATCCG GCCTACA3'
plate51:: <i>ompT</i> ileri primeri	5'GGTGATGATGATGAAAAGATGCGGGCGAAACT TCTGGG3'
plate51:: <i>ompT</i> geri primeri	5'GGAGATGGGAGTCATTAATGGCTAGTTATTCCC CGGG3'
plate51:: <i>lamB</i> ileri primeri	5'GGTGATGATGATGACAAGATGATGATTACTCG AAACTTCC3'
plate51:: <i>lamB</i> geri primeri	5'GGAGATGGGAAGTCATTACCACCAGATTTCT CTGGGCAC3'
plate51:: <i>phoE</i> ileri primeri	5'GGTGATGATGATGACAAGATGAAAAAGAGCAC TCTGGC3'
plate51:: <i>phoE</i> geri primeri	5'GGAGATGGGAAGTCATTAGGTGAAGTTAACGG CGGCGTGAG3'

3.3.1 Agaroz jel elektroforezi

1 gr agaroz (Sigma) üzerine 100 ml 1X TBE eklenerek mikro dalgada tamamen çözünmesi sağlanmıştır. 100 ml'lik agaroz uygun sıcaklığa geldiğinde içerisine 1 µl EtBr (Sigma) eklenmiştir. Tanka taraklar yerleştirilmiş ve hazırlanan jel dökülmüştür.

Donduktan sonra 5 µl DNA örneği 1 µl Loading Dye (Sigma) ile karıştırılarak jele yüklenmiş ve 90 mV 45 dk yürütülmüştür.

3.4 Rollerini Olduğu Belirlenen Mutantların Tamamlama Testleri İle Doğrulanmasının Yapılması

Çalışmada biyofilm oluşumunda rolleri olan mutantlara, ilgili gen bölgeleri içeren primerler ile ligasyon işlemi gerçekleştirilerek transformasyonu yapıldı. Bu şekilde ana kromozomda mutant olan gen bölgesi ligasyon ile eksprese edilerek tamamlanmış oldu. Daha sonra bu bakteriler ile deneyler tekrarlanarak genlerin rollerinin doğrulanması yapılmıştır.

3.5 Komplementasyon Deneyi

3.5.1 Primer tasarımı

aLICator™ LIC Klonalama ve Ekspresyon Set (Fermentas Vilnius, Lithuania Kat. No: 1271) kitinin içerisindeki pLATE51 vektörüne uygun olarak çalışmada kullanılan genlerin ORF'una göre ilk ATG ve sonlandırma kodonu TAA'ya göre primerler Çizelge 3.4'de görüldüğü gibi PRIMER3 programı ile dizayn edilmiştir.

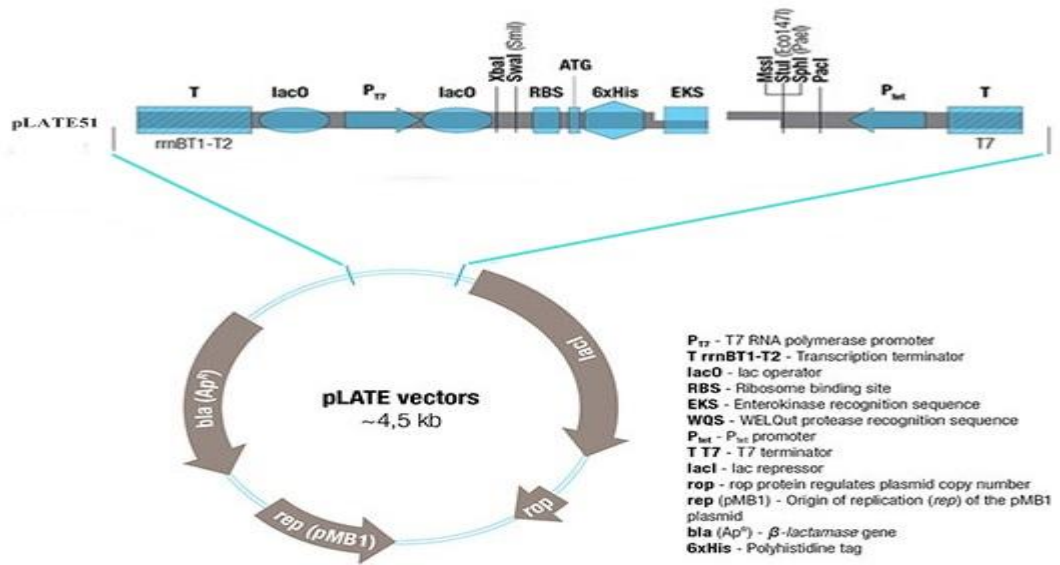
3.5.2 Primer sulandırma

10 mM Tris-HCl (Merck) 1 mM EDTA (Sigma) ile pH:7,5 TE hazırlanmıştır. -20 °C'den çıkarılan primerler pH:7,5 TE ile 10 kat sulandırılmıştır. 15-20 dk tamamen çözüldükten sonra vortekslenerek ve 10 µl'si ependorfa alınmıştır. Üzerine 90 µl 10 mM pH:7,5 Tris-HCl eklenerek ve -20 °C'de dondurucuda saklanmıştır.

3.5.3 Ligasyon

E.coli W3110 bakterisinin DNA'sı kullanılarak genlerin Aligatör pLATE51 vektörüne uygun dizayn edilen Çizelge 3.4'de belirtilen primerler kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan PZR ürünü kullanılarak ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Alicator pLATE51 vektörüne ligasyon basamağı şu şekilde yapılmıştır; 2 µL 5X LIC tamponu, T4 DNA polimeraz (1u / µL), 1 µL saf su, 6 µL PZR ürünü oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Daha sonra 0.5 M EDTA'dan 0.6 µL eklendi. Ardından 1 µL pLATE51 vektörü eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.



Şekil 3.1. pLATE 51 vektör haritası

3.5.4 PZR ürünlerinin saflaştırılması

100 µl olarak hazırlanan PZR reaksiyonu karışımı üzerine 50 µl TE doyurulmuş fenol ve 50 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek vortekslenmiştir. Ardından 12000 rpm 'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüje tabi tutulmuştur. Üst faz alınarak tekrar 100 µl kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenmiş ve vortekslenerek 12000 rpm'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Üst faz alınarak 4 µl 5M NaCl ve 200 µl etanol (%100) eklenerek -80 °C 30 dk bekletilmiştir. Ardından 12000 rpm de 20 dk 0 °C' de santrifüj edilmiştir. Pellet üzerine % 70'lik alkol eklenerek hafifçe çalkalanmış ve 12000 rpm'de 5 dk 0 °C'de santrifüj edilmiştir. Süpernantant dökülerek alkol uçurulmuş ve pellet üzerine 50 µl TE eklenmiş ve -20 °C'de saklanmıştır.

3.5.5 Transformasyon

2 ml LB brot içerisine 25 mg/ml Km' den 2 µl eklenerek çalışmada yapmış olduğumuz Çizelge 3.1 ' de verilen *E. coli* W3110 mutantlarının bu besiyerine ayrı ayrı ekimi yapılmıştır. 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakılarak transformasyon için ön kültür hazırlanmıştır.

Ertesi gün steril 9.9 ml SOB medium üzerine steril 100 µl 2 M Mg⁺², 10 µl 25 mg/ml Km antibiyotiği ve hazırlanan ön kültürden 50 µl eklenerek O.D₆₀₀ değeri 0,3' e gelene kadar 37 °C' de çalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır.

Aseptik koşullarda hücreler steril 6 adet santrifüj tüpüne aktararak 5 dk buzda soğutulmuştur. 12000 rpm' de 5 dk 4°C' de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar uzaklaştırılarak pellet üzerine 1 ml 0,1 M soğuk CaCl₂ eklenerek 6 ayrı santrifüj tüpündeki peletler 2 ayrı santrifüj tüpüne toplanmıştır ve yeniden homojenize edilerek 10 dk buzda bekletilmiştir. Tekrar 12000 rpm' de 5 dk 4 °C' de santrifüje tabi tutulmuştur. Süpernatant yeniden uzaklaştırılarak tüp başına 0,1 M soğuk 200 µl CaCl₂ eklenmiştir. Daha sonra yeniden homojenize edilmiştir. 30 dk buzda bekletilmiştir.

1,5 ml 2 adet steril santrifüj tüpünde bulunan 200 µl kompetent hücre üzerine 10-100 ng olacak şekilde 2 farklı konsantrasyonda PZR ürünü eklenerek 30 dakikadan fazla buzda bekletme işlemi uygulanmıştır. Daha sonra hücre süspansiyonları cam tüplere aktararak 42 °C'de 2 dk ısı şoku uygulanarak sonrasında 2 dk buzda bekletilmiştir. Ardından 0,8 ml SOC medium ekleyip 37 °C' de 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Transfer hücrelerinin 0,5 ml'si 1,5 ml' lik ependorflara alınmıştır. 5000 rpm 1 dk 4 °C' de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak 100 µl SOC medium eklenerek yeniden süspanse edilerek uygun amfisilin antibiyotik içeren LB agar üzerine yayılmış ve bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ardından koloniler seğilip PZR yapılmış ve doğru bant büyüklüğü verenler ęalıřmada kullanılmıştır.

3.6 Yabani Tip ve Mutantların Normal şartlarda Büyüme Grafiğinin Belirlenmesi

Yabanil tip W3110 ve kanamisin direnęli mutantların büyümelerini kontrol etmek için büyüme grafikleri oluşturulmuştur. Yabanil tip *E. coli* W3110 ve mutantlar 5 ml LB Brot besiyerinde 160 rpm, 37 °C'de 18 saat ęalkalamalı inkübasyona bırakılarak ön kültür hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında bakterilerin yoğunluğu OD₆₀₀ nm dalga boyunda 0,1' e ayarlanarak 100 µl'si 15 ml nutrient brot besiyerine aktararak tekrar 37 °C'de 8 saat ęalkalamalı inkübasyona bırakıldı ve her 2 saatte bir örnek alınarak büyüme grafikleri çizilmiştir. Komplement hücrelerinin büyümelerini kontrol etmek için aynı metod kullanılmıştır. Fakat ortama protein ekspresyonunu indüklemek için IPTG ilavesi yapılmıştır. Deneyler en az 3 tekrarlı olacak şekilde geręekleřtirilmiřtir.

3.7 Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Metallerin MİK değerlerinin belirlenmesi için tek bir bakteri kolonisi 5 ml LB broth besiyerinde 37 °C'de 18 saat ęalkalamalı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında bakterilerin OD₆₀₀ nm dalga boyunda 0,1' e ayarlanmıştır. Daha sonra 60

ml'de 400 µl olacak şekilde stok bakteri kültürü hazırlanmıştır. Bu kültürden 96 kuyucuklu mikro plakaya ilk kuyucukda 180 µl diğer kuyucuklarda 100 µl olacak şekilde kültür eklenmiştir. 180 µl' lik kuyucuğa çalışmada yer alan antibiyotik ve metallere 20 µl eklenerek seri sulandırma yapılmıştır. Plakalar 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiş ve MİK değerleri belirlenmiştir. Deneyler en az 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8 Biyofilm Testi

5 ml LB broth besiyerine tek koloni bakterisinden ekim yapılarak 37°C de 160 rpm çalkalama hızında 18 saat inkübe edilen bakteriler OD₆₀₀ 0,05 olacak şekilde LB broth besiyerinde seyreltilmiştir. Ardından steril LB Broth besiyerlerine 100 µl aktarılmıştır. Ardından 37°C de 160 rpm'de 24 saat inkübe edilerek biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir. İnkubasyon sonrasında besiyeri uzaklaştırılarak tüpler üç kez saf su ile nazikçe yıkanmıştır. Oluşan biyofilm yapısının %1'lik kristal viyole ile 20 dk boyanması beklenilmiştir. Boyama sonrasında kristal viyole 3 kez saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve tüpler kurutulmuştur. Kuruyan tüplere 95:5 etanol-asetik asit çözeltisi eklenmiş ve oluşan kristal viyole halkasının çözünmesi sağlanmış, çözülmüş boyanın 1 ml'si OD₅₄₀ nm'de spektrofotometrede (AgileSpec) okutulularak biyofilm oluşum (kuvvetli-zayıf) seviyeleri tespit edilmiştir. Komplement hücrelerinin büyümelerini kontrol etmek için aynı metod kullanılmıştır. Fakat ortama protein ekspresyonunu indüklemek için IPTG ilavesi yapılmıştır. Deneyler en az 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Tüpte biyofilm oluşumu, kristal viyole ile boyama sonrasında absorbans ölçümü yapılarak tüm suşların biyofilm üretimi değerlendirilmiştir.

E. coli ve mutant suşların tutunma dereceleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmış ve değerlendirilmiştir (Stepanovic, vd., 2000; Nasr, vd., 2012).

$OD \leq OD_c$	Negatif
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	Zayıf
$2 \times OD_n \leq OD < 4 \times OD_c$	Orta
$4 \times OD_c < OD$	Kuvvetli

($OD_c = \text{Negatif kontrolün OD ortalaması} + 3 \times \text{negatif kontrolün standart sapması}$)

3.9 Mikrotitrasyon Plağı Yöntemi (Kantitatif Yöntem)

Mikrotiter plakalardaki biyofilm kalınlığının belirlenmesi, O'Toole ve Kolter tarafından yazılan şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir (O'Toole ve Kolter, 1998).

5 ml LB broth besiyerine ekilen bakteriler 37°C de 160 rpm çalkalama hızında 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 1:100 oranında LB broth besiyerinde seyreltildi ve 96'lık düz tabanlı platelere 150 µl aktarıldı ardından plağın kapağı kapatılarak buharlaşmanın engellenmesi için etrafı parafilm ile kaplandı ve 37°C de 48 saat boyunca tekrar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırılarak plateler dH₂O ile 3 kez dikkatli bir şekilde yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra plate kuyularına 150 µl %0,1'lik kristal viyole konularak 20 dk boyunca biyofilm katmanının kristal viyole ile boyanması beklenilmiştir. Boyama sonrasında platelerden kristal viyole 3 kez saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve plate kurutulmuştur. Kuruyan plateler üzerine 95:5 etanol-asetik asit çözeltisi eklenerek oluşan kristal viyole halkasının çözünmesi sağlanmış ve çözülmüş boyanın 100 µl'si yeni platelere aktarılmıştır. Ardından plateler dalga boyu 540 nm olan filtre ile optik ELISA okuyucu ile okutulup biyofilm oluşum (kuvvetli-zayıf) seviyeleri tespit edilmiştir. Bu metod cam tüp denemeleri ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması için yapılmıştır.

3.10 Koloni Morfolojisi Tayini

10 g pepton (kazein) (Merck), 5 g maya ekstraktı (Merck), % 0,004 kongo kırmızı (Alfa Aesar), % 0,002 coomasie brilant blue G 250 (Thermo) ve 15 g agar (Merck) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Sterilizasyondan önce pH 7.0 ± 0.2'ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir. Katı besiyerleri 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra petrilere dökülmüştür.

5 ml LB broth besiyerine ekilen bakteriler 37°C de 160 rpm çalkalama hızında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. "İnkübasyon sonrası bakteri yoğunluğu göze alınmaksızın 10 µl alınarak kongo kırmızılı agar besiyerine damlatılmış ve ardından 37 °C de, 24 saat tekrar inkübasyona alınmıştır. 24 saat sonunda petrilere oda sıcaklığına alınarak 48 veya 72 saat sonrasında gözlemlenmiştir. Oluşan renk değişimleri stereo mikroskopta tespit edilerek fotoğraflanmıştır.

3.11 Biyofilm Oluşumun Kongo Kırmızılı Agarda Tespiti

Kongo kırmızılı agar besiyerlerine tek koloni düşecek şekilde yapılan ekimler 37°C'de bir gece inkübe edilmiş ve takiben kültürler oda ısısında 48 saat bekletilmiştir. Besiyerinde kırmızımsı siyah, pürüzlü, kuru, seffaf koloniler biyofilm (slime) pozitif, pembemsi-kırmızı, düz ve merkezi koyu (öküz gözü görünümü) koloniler yapanlar biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.12 Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)

Örnekler 24 saat LB Brot besiyerinde büyütülmüştür. Ön kültürler LB Brot besiyerinde yoğunlukları OD₆₀₀ de 0,5 değerine ayarlanmıştır. Ardından 1 ml örnek 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1 ml PBS (pH:7) eklenerek 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. İşlem ard arda iki kere tekrarlanmıştır. Pellet PBS ile iyice yıkandıktan sonra, örnekler bir dizi etanol çözeltisinde (% 20, %50, % 70 ve % 100) dehidre edilmiştir. Örnekler iletken karbon bantlar üzerine damlatılarak 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra altın-paladyum bir filmle kaplanarak numuneler 15 kV'da yüksek vakum modunda taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Supra 40VP) kullanılarak gözlenmiştir.

3.13 RNA İzolasyonu

Toplam hücresel RNA, MasterPure RNA saflaştırma kiti (Epicenter, Madison, WI) kullanılarak hazırlanmıştır. Agaroz jel üzerinde total RNA bütünlüğü değerlendirilmiştir.

3.13.1 Ters Transkripsiyonlu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT - PZR)

RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kiti (Fermentas) kullanılarak ters transkripsiyon (RT - PZR) ile izole edilen total RNA'lardan cDNA elde etmek için kit protokolü takip edilmiştir.

3.13.2 Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR)

Örneklerden ters transkripsiyon PZR ile elde edilen cDNA örnekleri real-time PZR için kalıp olarak kullanılmıştır. Gerçek Zamanlı PZR, Agilent marka SYBR green qPZR kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerçek Zamanlı PZR için gerekli malzemeler kitin kullanma kılavuzunda belirtildiği şekilde ilave edilmiştir.

Çizelge 3.6. Gerçek Zamanlı PZR de kullanılan primer listesi

Genler	Gen Fonksiyonu	Primer Dizileri	
<i>nhaR</i>	Transkripsiyonel aktivatör protein	İleri Primeri	5'GACTCTACGCAGCAGGAAGG3'
		Geri Primeri	5'TAAGCAATTTGCGCCCTAAC3'
<i>csgD</i>	csgAB operon transkripsiyonel düzenleyici protein	İleri Primeri	5'CCTCATATCAACGGCGTTTT3'
		Geri Primeri	5'GGCTGATTCCGTGCTGTTAT3'
<i>ygiU</i>	quorum-sensing düzenleyici	İleri Primeri	5'TGCCCTGTAAATGCAGATG3'
		Geri Primeri	5'CCTGTAACAAGCCTGGGTCT3'

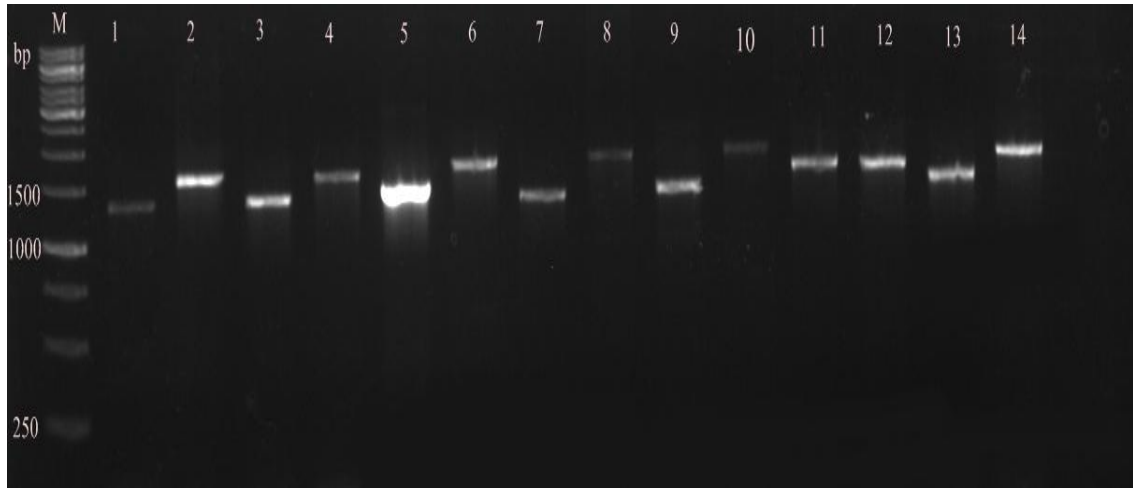
3.14 İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada yapılan 3 tekrarlı çalışmaların sonucunda oluşturulan grafiklerin istatistiksel analizler IBM SPSS 21 testine göre yapılmıştır ve $P \leq 0.05$ sistemine göre önem dereceleri belirlenmiştir. Grafikteki * işaretleri önemlilikleri ve hata çubukları standart sapmaları göstermektedir.

4. BULGULAR

4.1 Yabani Tip ve Mutant Suşların PZR Görüntüleri

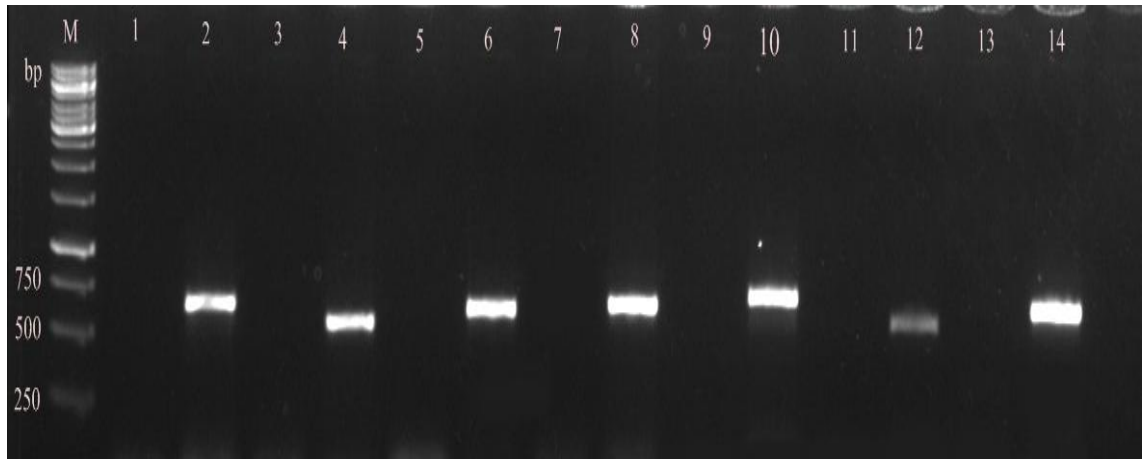
Çalışmada kullanılan yabani tip ve mutantlar Çizelge 3.1’de verilen ileri primer ve geri primerleri kullanılarak PZR yapılmıştır. *ompA*’nın f-r primeri kullanılarak yapılan PZR sonucu 1-2 nolu kuyucuklarda verilmiş olup beklenen baz çifti *E. coli* W3110 için 1328 bç iken, *ompA* mutanı 1501 bç büyüklüğündedir. Aynı şekilde *ompC*’nin f-r primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucu 3-4. kuyucuklarda verilmiş olup beklenen bç büyüklüğü *E. coli* W3110 1373 iken , *ompC* mutanında ise 1483 bç dir. Bir diğer mutan olan *ompF* mutanının f-r primerleri kullanılarak elde edilmiş bantlarda 5-6 kuyucuklarda verilmiştir. *E. coli* W3110 1436 bç, *ompF* mutanı 1561 bç büyüklüğündedir, 7-8. kuyularda *ompG*’nin f-r ile *E. coli* W3110 1312 bç, mutan suşu 1620 bç’dir, *ompT*’nin f-r ile yapılan PZR ise *E. coli* W3110 1360 bç, *ompT* mutanı 1620 bç büyüklüğünde ve 9-10. kuyularda gösterilmiştir. 11-12. kuyularda ise *lamB*’nin f-r ile çalışılmış ve *E. coli* W3110 1539 bç, mutan suşu 1412 bç olarak beklenmektedir. Son olarak *phoE* f-r ile yapılan çalışmada *E. coli* W3110 1393 bç, *phoE* mutanı 1551 bç büyüklüğünde bant beklenmektedir ve 13-14. kuyularda verilmiştir.



Şekil 4.1. Yabani tip *E. coli* ve mutantlarının f-r primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.

(1-W3110, 2- W3110 *ompA*::km, 3-W3110, 4- W3110 *ompC*::km, 5-W3110, 6-W3110 *ompF*::km, 7-W3110, 8- W3110 *ompG*::km, 9-W3110, 10- W3110 *ompT*::km, 11-W3110, 12-W3110 *lamB*::km, 13-W3110, 14- W3110 *phoE*::km)

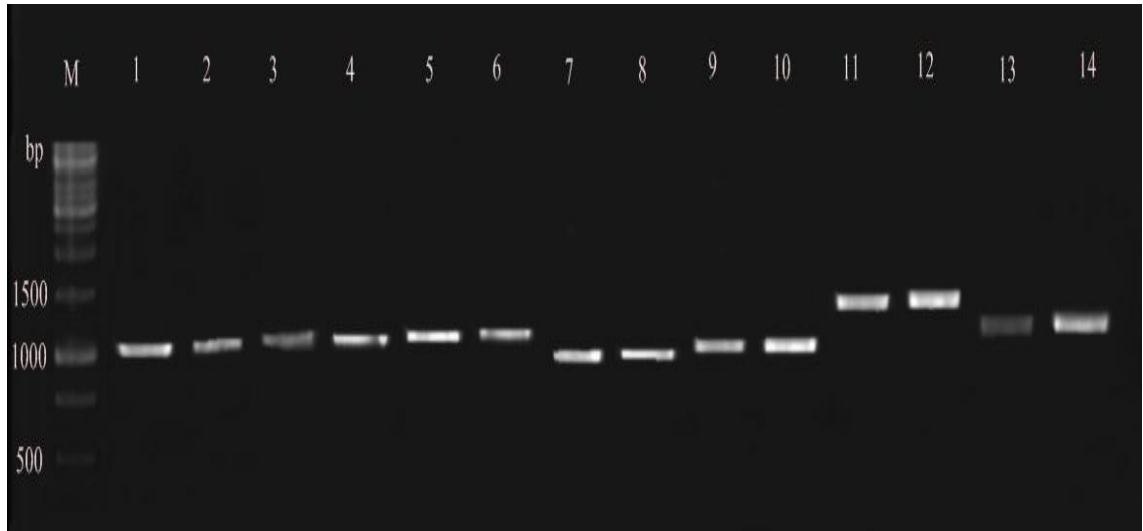
Yabani tip ve mutant suşların kanamisin direnç genlerini kontrol etmek için ileri primer ve k1 geri primerleri kullanılarak PZR yapılmıştır. Elde edilen mutantların PZR görüntüleri Şekil 4.2’ de verilmiştir. Görüldüğü gibi 1-2’e kadar olan kuyucuklarda f-k1 primerleri ile elde edilen *ompA::km* mutantının PZR bantı bulunmaktadır ve 689 bç büyüklüğüne sahip PZR ürünü elde edilmiştir. Aynı şekilde 3-4’e kadar olan kuyucuklar da 597 bç büyüklüğünde *ompC::km*, 5-6. kuyucuklar da 661 bç büyüklüğünde *ompF::km*, 7-8. kuyucuklar da 691 bç büyüklüğünde *ompG::km*, 9-10. kuyucuklar da 740 bç büyüklüğünde *ompT::km*, 11-12. kuyucuklar da 605 bç büyüklüğünde *lamB::km* ve 13-14. kuyucuklar da 701 bç büyüklüğünde *phoE::km* mutantları bulunmaktadır. Dolayısıyla elde ettiğimiz mutantların k1 primerleri ile doğrulamasıda yapılmış olmaktadır.



Şekil 4.2. Yabani tip *E. coli* ve mutantlarının f-k1 primerleri ile jel elektroforezi görüntüsü.

(1-W3110, 2-W3110 *ompA::km*, 3-W3110, 4-W3110 *ompC::km*, 5-W3110, 6-W3110 *ompF::km*, 7-W3110, 8- W3110 *ompG::km*, 9-W3110, 10- W3110 *ompT::km*, 11- W3110, 12- W3110 *lamB::km*, 13-W3110, 14- W3110 *phoE::km*)

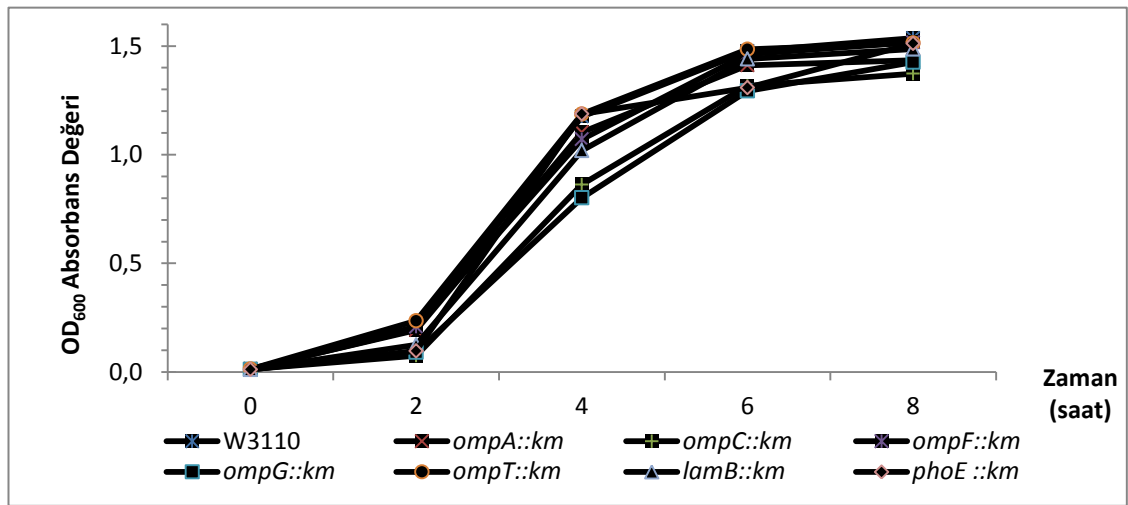
Yukarıda elde edilen mutantların silinen gen bölgelerinin çalışılan şartlar altında rolleri çıkması durumunda sağlamasını yapmak adına silinen genler plazmitler ile geri verilerek komplement hücreler elde edilmiştir. Bunun için Aligatör primerleri kullanılarak aLICator™ LIC Klonlama ve Ekspresyon Set 1 (Fermentas Vilnius, Lithuania Kat. No: 1271) kitinin belirlediği şekilde her biri için ayrı ayrı ilgili genleri içeren pLATE51 vektörü elde edildi. Elde edilen plazmitler izole edilip ilgili olan mutantlara transforme edildi. Transformasyon sonrasında oluşan koloniler uygun antibiyotik (ampisilin) kontrolünün ardından PZR ile doğrulandı. Seçilen kolonilerden her bir gen için kendisine ait olan ileri ve geri primerleri kullanılarak PZR ile doğrulama yapıldı. Elde edilen mutantların plazmidinin PZR görüntüleri Şekil 4-3' de verilmiştir. Elde ettiğimiz komplement hücrelerden plate51::*ompA* mutantı 1194 bç, plate51::*ompC* mutantı 1254 bç, plate51::*ompF* mutantı 1206 bç, plate51::*ompG* mutantı 1006 bç, plate51::*ompT* mutantı 1054 bç, plate51::*lamB* mutantı 1498 bç, plate51::*phoE* mutantı 1156 bç uzunluğuna sahiptir. Sonuç olarak kullanılacak olan tamamlanmış mutantlarda elde edilmiştir.



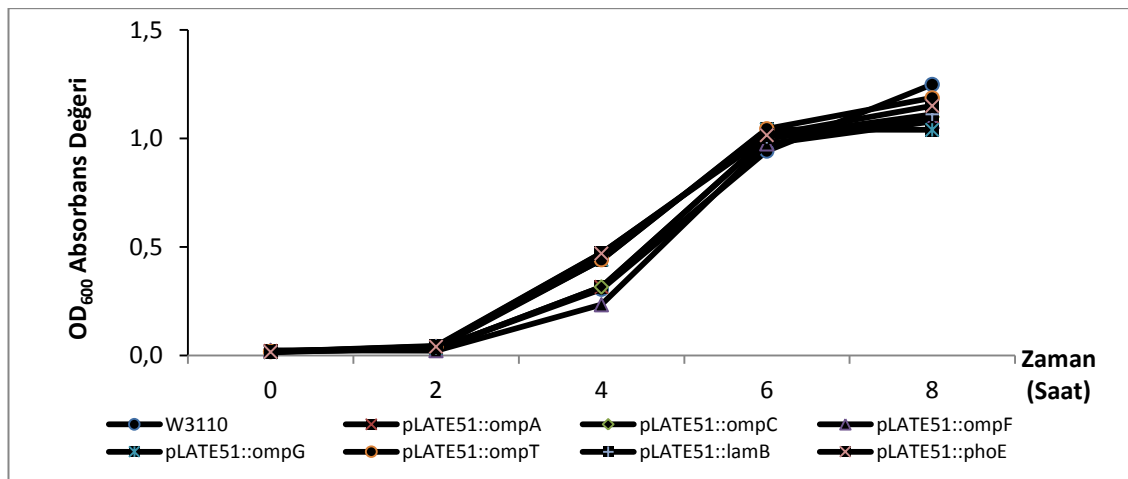
Şekil 4.3. *E.coli* ve plate51 mutantlarının jel elektroforezi görüntüsü. (1- W3110, 2- pLATE51::*ompA*, 3-W3110, 4- pLATE51::*ompC*, 5-W3110, 6- pLATE51::*ompF*, 7-W3110, 8- pLATE51::*ompG*, 9-W3110, 10- pLATE51::*ompT*, 11-W3110, 12- pLATE51::*lamB*, 13-W3110, 14- pLATE51::*phoE*)

4.2 *E. coli* W3110, Mutantların ve Komplementlerin Büyüme Grafikleri

Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutant suşların LB broth besiyerinde 37°C' de 8 saat büyütülerek elde edilen büyüme grafiği Şekil 4.4'de verilmiştir. Bu verilere göre genlerin nakavt edilmesinin (genlerin yokluğunun) yabani tip ile karşılaştırıldığında büyüme açısından bir farklılık oluşturmadığı görülmektedir. Bu genlerin komplementleri yapılmış olup büyüme grafiği de Şekil 4.5 'de verilmiştir. Komplement hücrelerde de büyüme açısından bir fark gözlenmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda yabani tip, mutant ve komplement hücreler ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir.



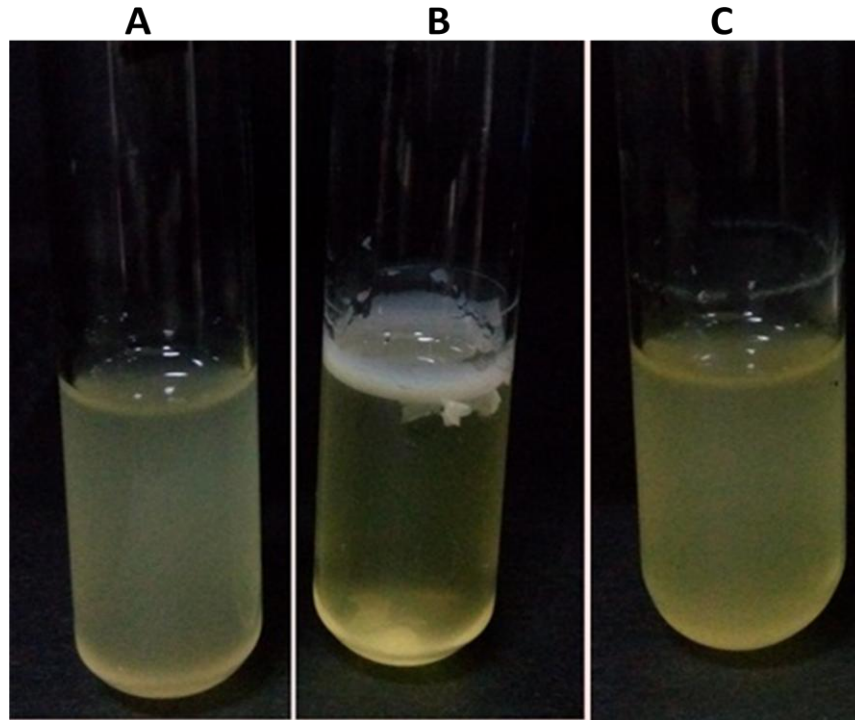
Şekil 4.4. Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantların büyüme grafiği



Şekil 4.5. Komplement hücrelerin büyüme grafiği

4.3 *E. coli* W3110'nun Biyofilm Oluşturma Durumunun Belirlenmesi

E. coli ile yapılan çalışmalarda birçok izolatta, in vivo ve in vitro olarak biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında kullanılan *E. coli* W3110 suşunun biyofilm oluşumunun araştırılmasına yönelik yapılan testlerde *E. coli* ATCC 35218 (biyofilm oluşumunun pozitif olduğu bilinen) suşu referans olarak kullanılmıştır. Çalışmamızın tamamında kullanılan LB brot besiyerinde (A) *E. coli* W3110 suşu biyofilm oluşturmazken, (B) pozitif kontrol olarak kullandığımız *E. coli* 35218 biyofilm oluşturmuştur. *E. coli* W3110'nun biyofilm oluşturup oluşturmadığı veya bu mekanizmaya sahip olup olmadığı sorusunu cevaplamak için ortama putresin ilave edilmesi durumunda Şekil 4.6 (C)' de görüldüğü üzere biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Bu sonuç *E. coli* W3110'nun biyofilm oluşturma mekanizmasına sahip olduğunu göstermektedir.

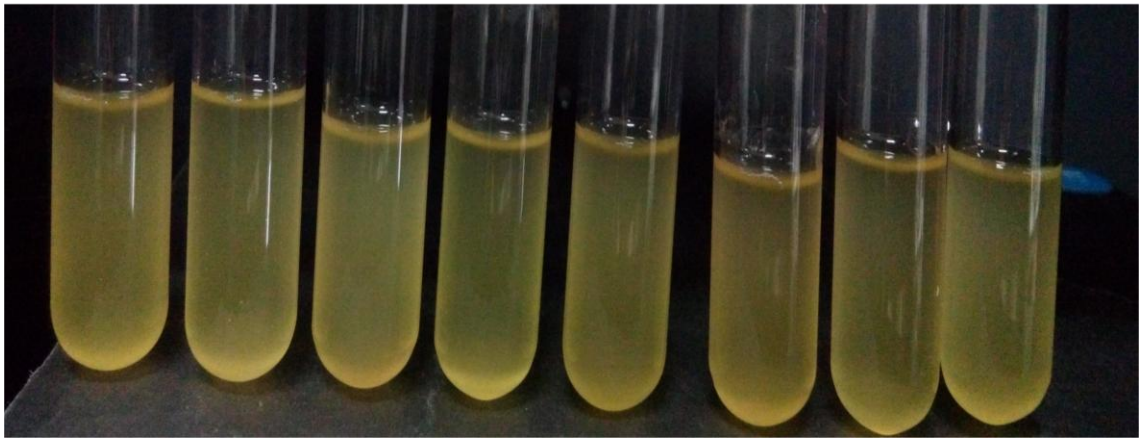


Şekil 4.6. *E. coli* suşlarının pH:7.0 ortamında biyofilm oluşumu (A: *E. coli* W3110, B: *E. coli* 35218, C: *E. coli* W3110 putresin ilaveli)

4. 4 Porin Proteinlerinin Biyofilm Oluşumundaki Rollerinin Belirlenmesi

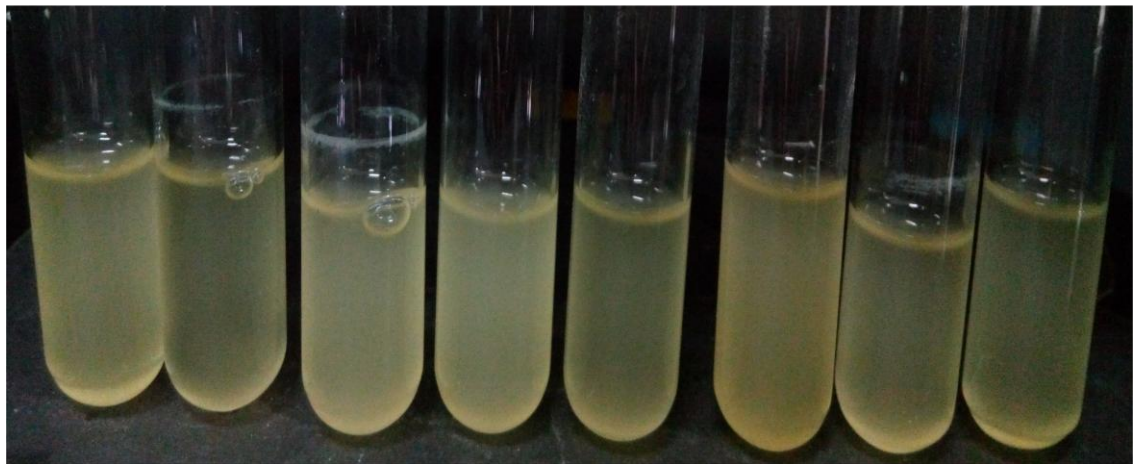
Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutant suşlar 37°C de 160 rpm çalkalama hızında 18 ve 24 saatlik inkübasyon ardından büyüme olarak farklılık göstermemiştir. 18. saatlik inkübasyonda yabani tip W3110 ve porin mutantlarında tüp yüzeyinde farklılık tespit edilmemiştir. 24 saatlik inkübasyonda ise, LB broth besiyerinde *E. coli* W3110'dan farklı olarak *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutant *E. coli* suşlarında katı ve sıvı ara yüzünde zayıf biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Bu oluşum *ompF*, *ompG*, *ompT* ve *phoE* mutant *E. coli* suşlarında gözlenmemiştir.

W3110 *ompA::km* *ompC::km* *ompF::km* *ompG::km* *ompT::km* *lamB::km* *phoE::km*



Şekil 4.7. Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantların inkübasyonunun 18. saatinde biyofilm durumu

W3110 *ompA::km* *ompC::km* *ompF::km* *ompG::km* *ompT::km* *lam:B:km* *phoE::km*

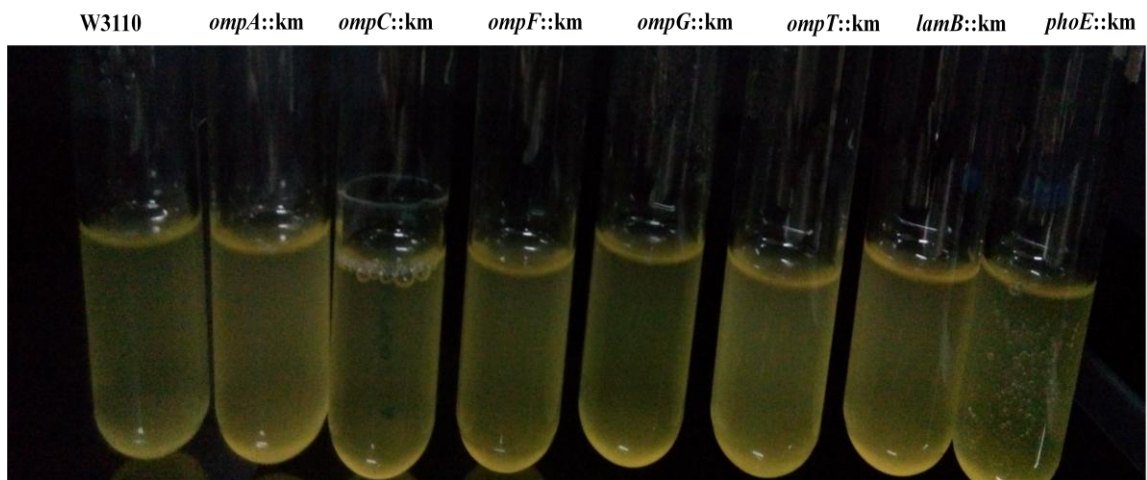


Şekil 4.8. Yabani tip *E. coli* W3110 ve mutantların inkübasyonunun 24. saatinde biyofilm durumu

4.5 Biyofilm Oluşumu Üzerine pH Etkisi ve Mutantlarla İlişkisi

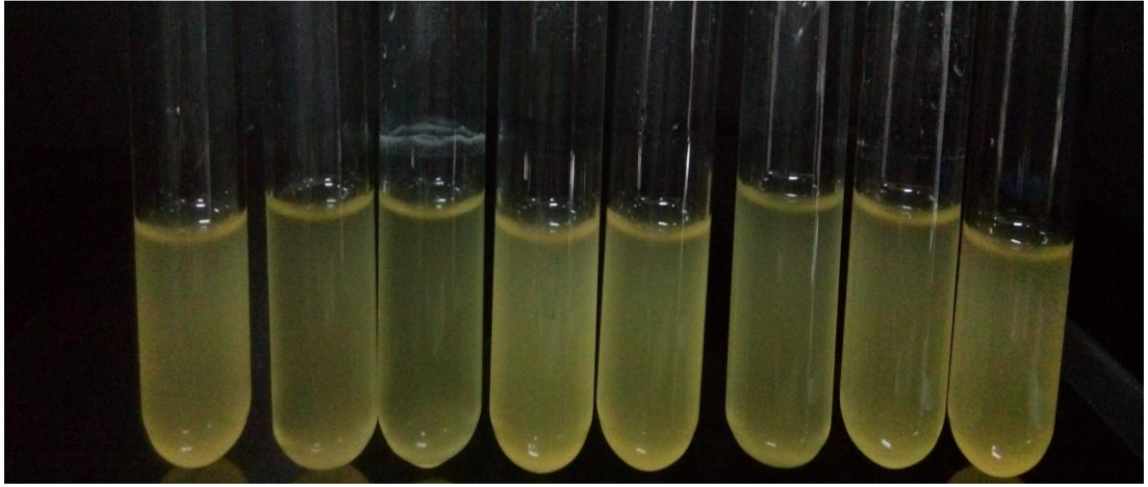
Farklı pH değerleri, mikroorganizmaların yaşamlarını etkilemektedir. Bu çalışmada, pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0)'ın biyofilm oluşumu üzerine etkisinin araştırılması amacıyla yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.9 - 4.12' de verilmiştir.

Bu veriler sonucunda *ompC* mutanı ortam pH'sı 5.5 olduğunda zayıf biyofilm oluşturmuştur. Yabani tip *E. coli* W3110 suşu ve diğer mutanlarda ise biyofilm oluşumu tespit edilmemiştir. Ortam pH'sı 6.0 olduğunda ise *ompC* mutanında yine zayıf seviyede biyofilm oluşumu gözlenmiştir. pH 6.0 değerinde biyofilm oluşumu diğer mutanlarda gözlenmemiştir. Ortamın pH değeri 6.5 olduğunda ise, *ompC* mutanı yanı sıra *ompA* mutanında da ilk biyofilm oluşumu gözlenmiştir ve orta seviyededir. Kullanılan diğer ortam pH değerlerinde de *ompA* mutanında aynı seviyenin korunduğu gözlenmiştir. pH 6.5 değerinde *ompC* mutanındaki biyofilm oluşumu orta seviye olarak gözlenmiştir. *E. coli* W3110 ve diğer şuşlarda pH (5.5, 6.0, 6.5) değerlerinde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Nötr pH değeri olan 7.0 de ise *ompC* mutanında ki biyofilm oluşumu zayıf biyofilme dönüşmüş ve pH 7.5 ve 8.0'da da zayıf biyofilm olarak gözlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda en güçlü biyofilm oluşumu *ompC* için ortam pH'sı 6.5 değerinde gözlenmiştir. *lamB* mutanında biyofilm oluşumu ortam pH'ları 7.0 ve 7.5 değerlerinde zayıf biyofilm olarak gözlenmiştir. *ompF*, *ompG*, *ompT* ve *phoE* mutanlarında *E. coli* W3110 gibi çalışılan pH değerlerinde biyofilm tespit edilmemiştir.



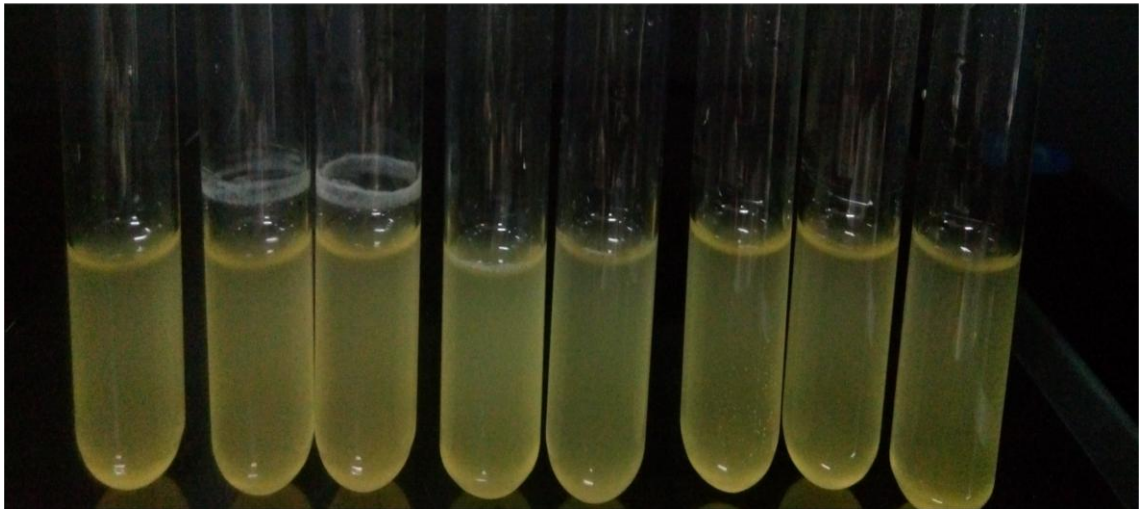
Şekil 4.9. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 5.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.

W3110 *ompA::km* *ompC::km* *ompF::km* *ompG::km* *ompT::km* *lamB::km* *phoE::km*



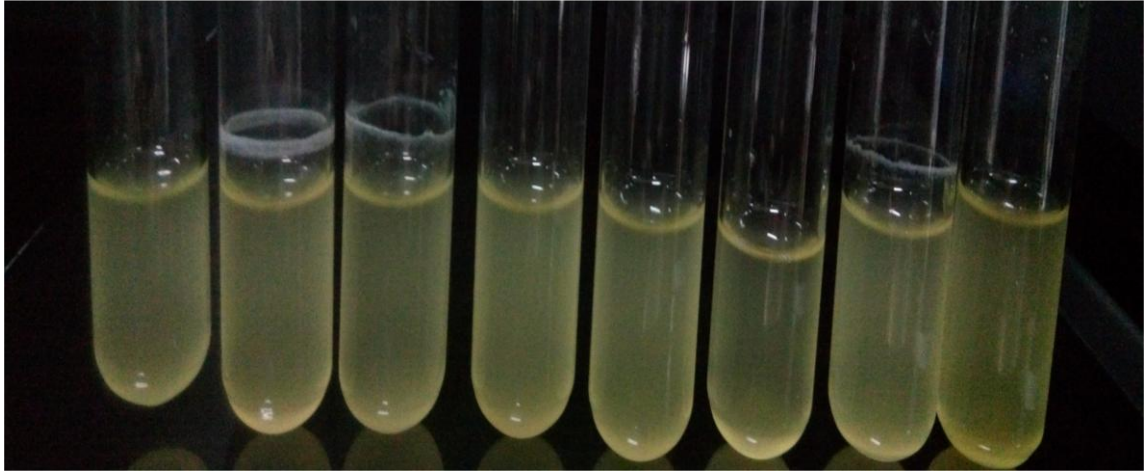
Şekil 4.10. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 6.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.

W3110 *ompA::km* *ompC::km* *ompF::km* *ompG::km* *ompT::km* *lamB::km* *phoE::km*



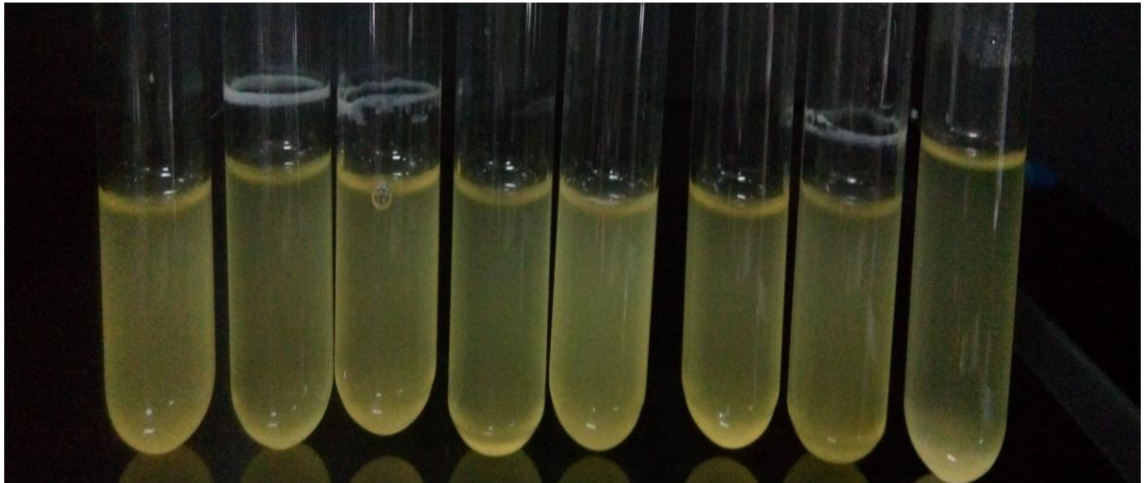
Şekil 4.11. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 6.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.

W3110 *ompA::km* *ompC::km* *ompF::km* *ompG::km* *ompT::km* *lamB::km* *phoE::km*



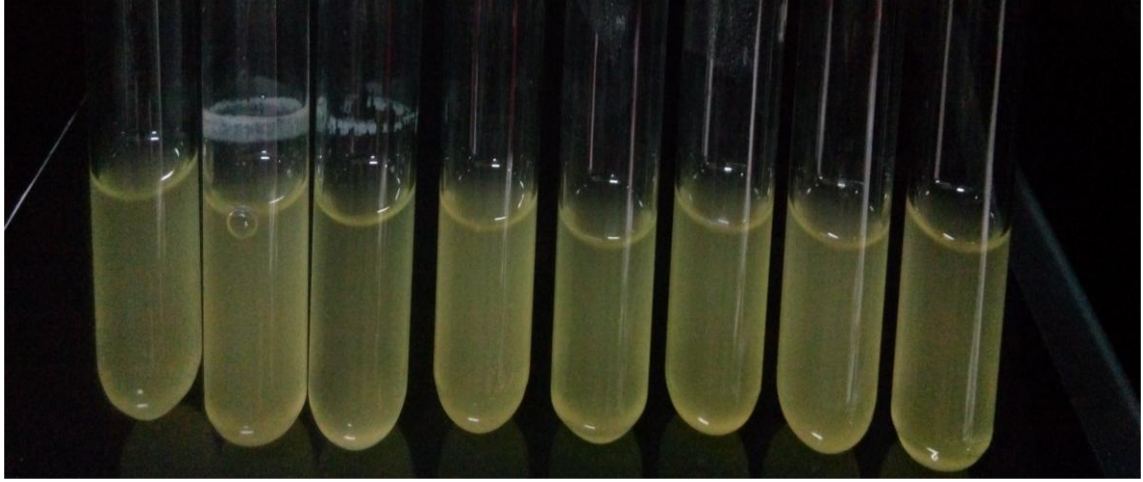
Şekil 4.12. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 7.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.

W3110 *ompA::km* *ompC::km* *ompF::km* *ompG::km* *ompT::km* *lamB::km* *phoE::km*



Şekil 4.13. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 7.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.

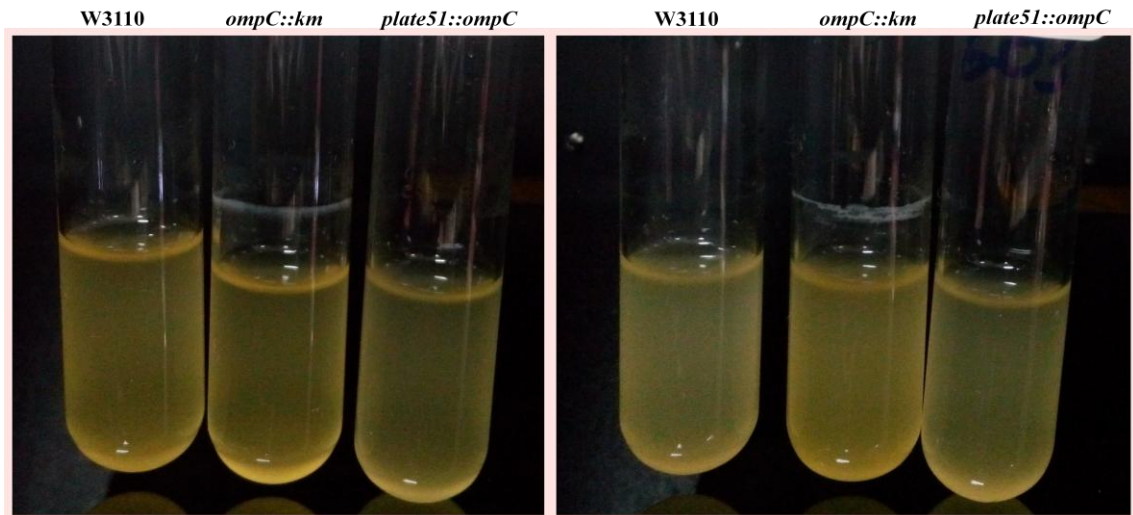
W3110 *ompA::km* *ompC::km* *ompF::km* *ompG::km* *ompT::km* *lamB::km* *phoE::km*



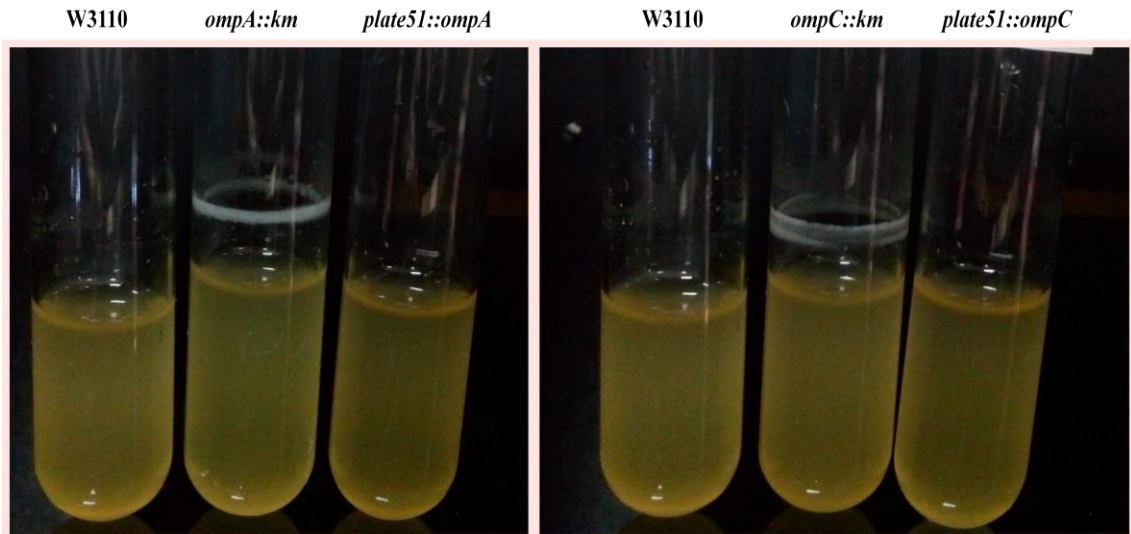
Şekil 4.14. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 8.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.

Elde edilen veriler sonucunda biyofilm oluşumunda rolünün olduğu tespit edilen genlerin doğrulaması komplementasyon testleriyle yapılmıştır. Mutant ve komplement hücreler ile aynı şartlarda deneyler doğrulama amacıyla tekrarlanmıştır.

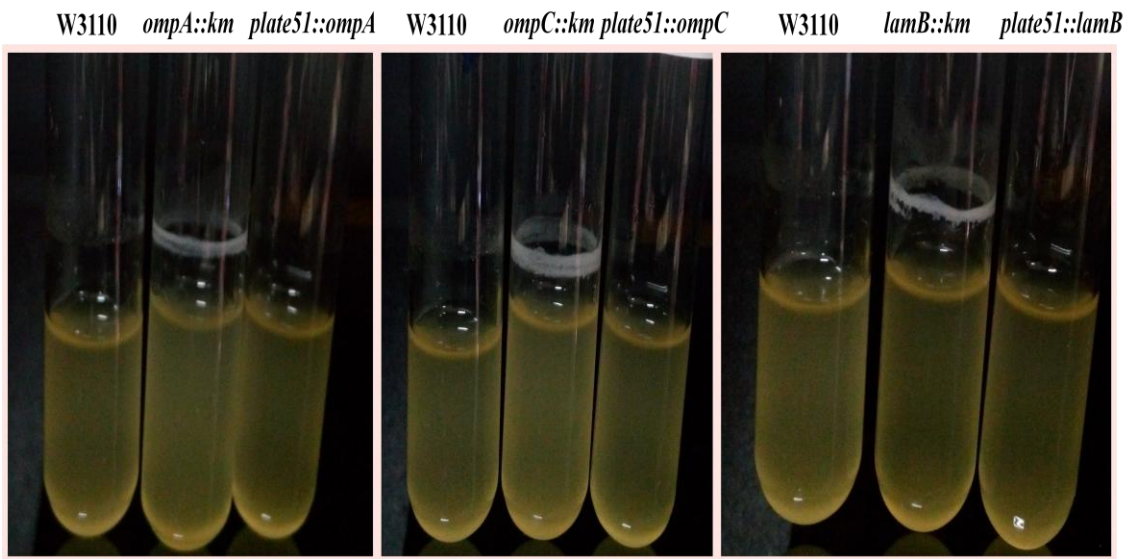
Bunun sonucunda *E. coli* W3110 yabani tip gibi *pLATE51::ompA*, *pLATE51::ompC* ve *pLATE51::lamB* komplement hücrelerinde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.



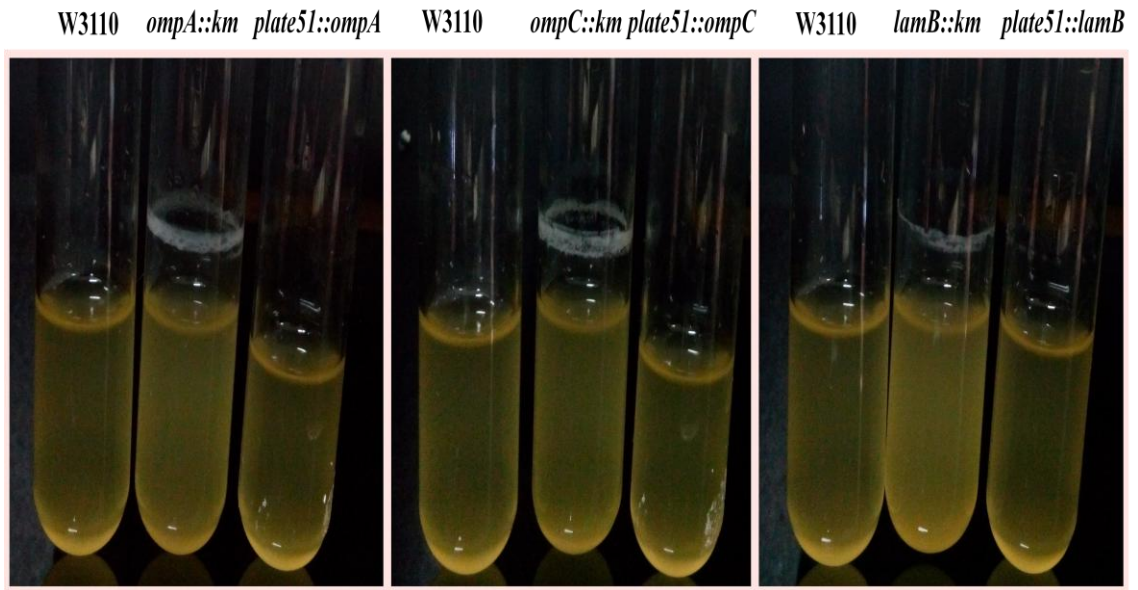
Şekil 4.15. pH 5.5 ve 6.0 değerinde *E. coli* W3110, *ompC* mutantı ve komplement hücrenin doğrulama testi



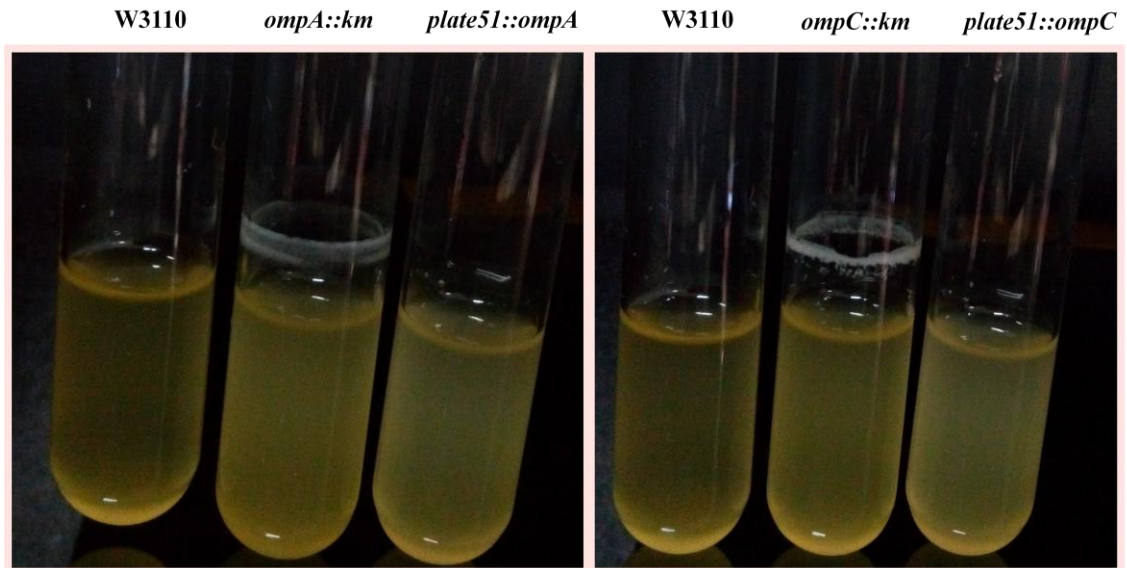
Şekil 4.16. pH 6.5 değerinde *E. coli* W3110, *ompA*, *ompC* mutantları ve komplement hücrelerin doğrulama testi



Şekil 4.17. pH 7.0 değerinde *E. coli* W3110, *ompA*, *ompC*, *lamB* mutantları ve komplement hücrelerin doğrulama testi

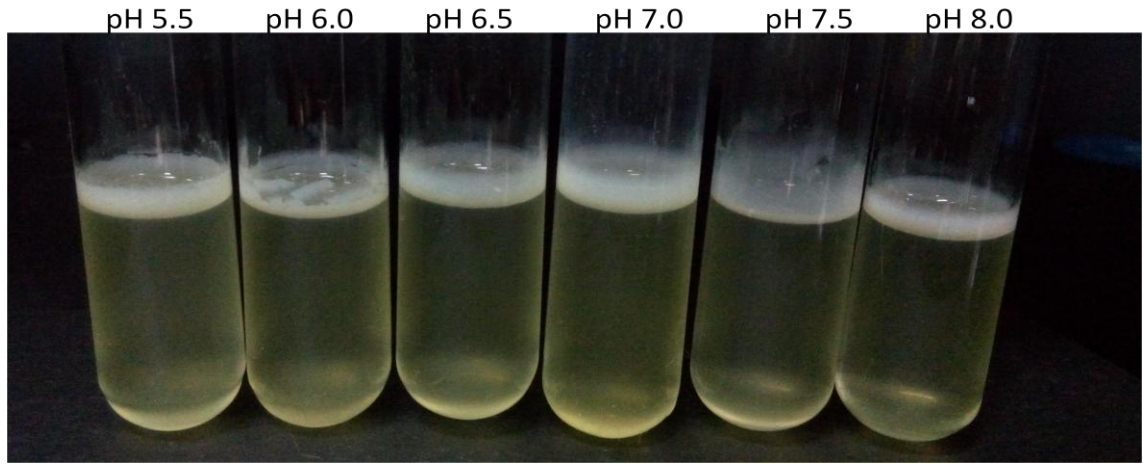


Şekil 4.18. pH 7.5 değerinde *E. coli* W3110, *ompA*, *ompC*, *lamB* mutantları ve komplement hücrelerin doğrulama testi



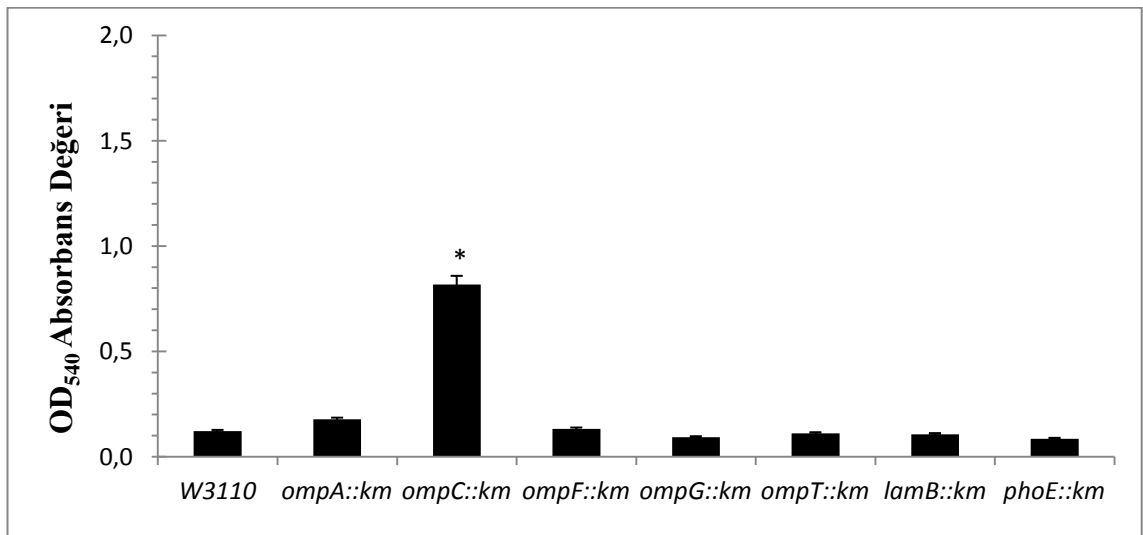
Şekil 4.19. pH 8.0 değerinde *E. coli* W3110, *ompA*, *ompC* mutantları ve komplement hücrelerin doğrulama testi

Biyofilm oluşumunun pozitif olduğu bilinen *E. coli* ATCC 35218 suşu pH deneylerinde referans olarak kullanılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda *E. coli* 35218’de biyofilm oluşumu pH 5.5 ve 8.0 arası değerlerde kuvvetli biyofilm oluşumu gözlenmiştir.

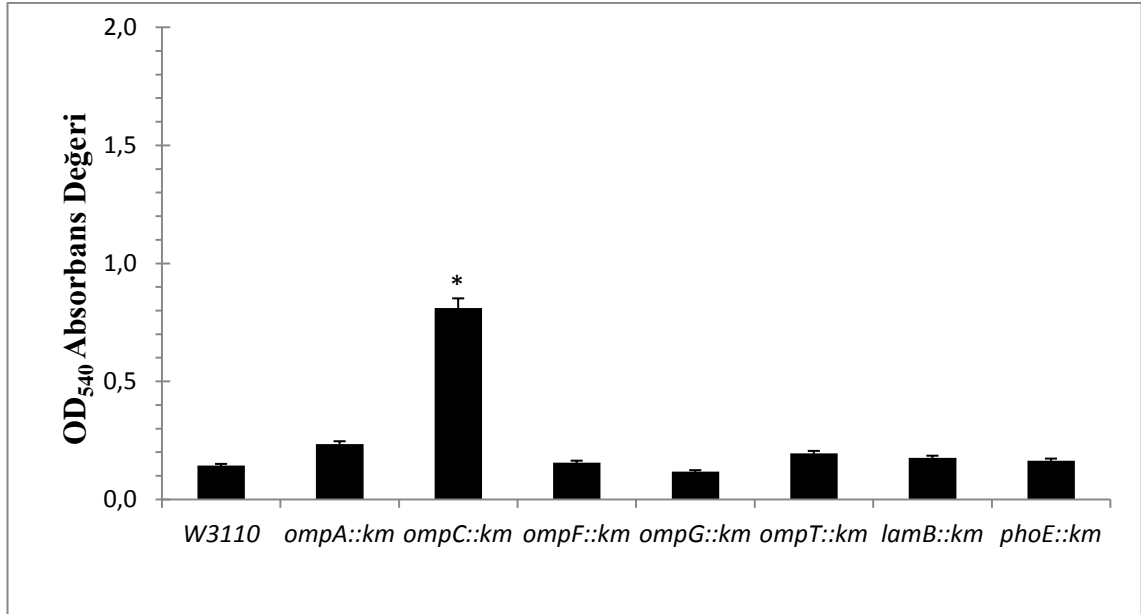


Şekil 4.20. *E. coli* ATCC 35218 suşunun farklı pH değerlerine sahip ortamda biyofilm oluşumu

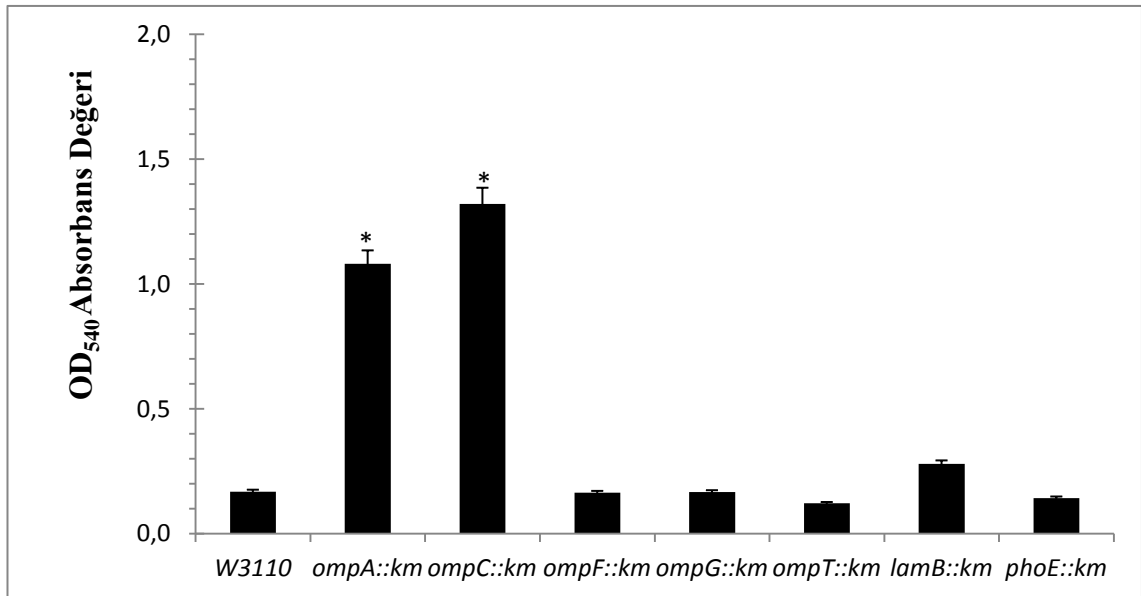
Biyofilm tespitinde en sık kullanılan yöntemlerden biri olan, oluşan biyofilmin kristal viyole ile boyanması ve ardından optik yoğunlukları okunarak elde edilen veriler grafiklere dönüştürülmüştür. Bu değerler sonucunda veriler değerlendirilerek Bulgular 4.4 kısmında kapsamlı olarak anlatılmıştır.



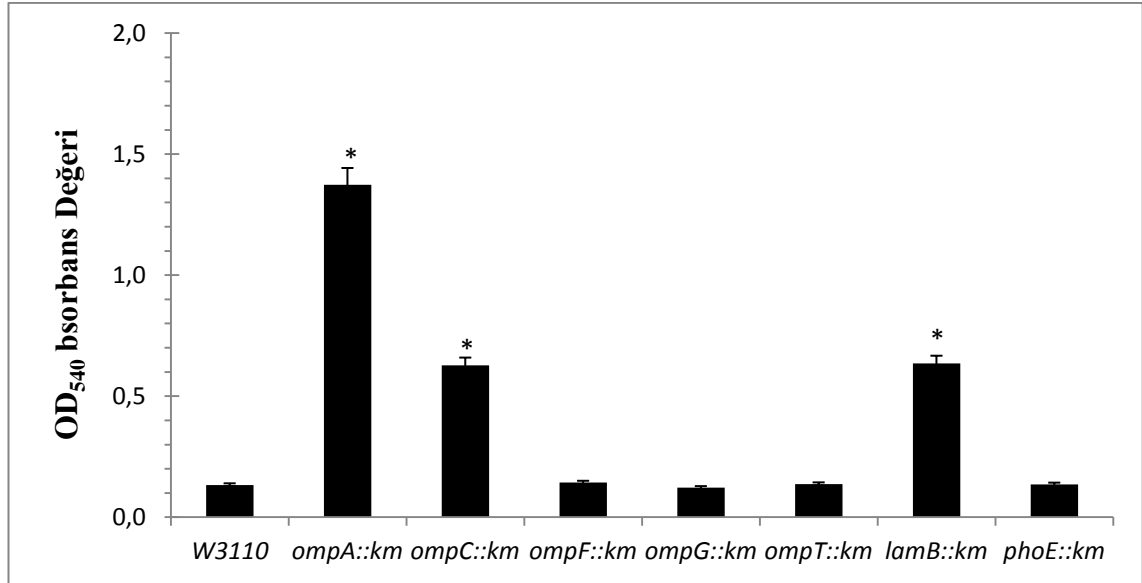
Şekil 4.21. *E. coli* W3110 ve porin mutantlarının pH 5.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği. (*) işaretli olan barlar *E. coli* W3110’a göre önemlidir ($p \leq 0.05$).



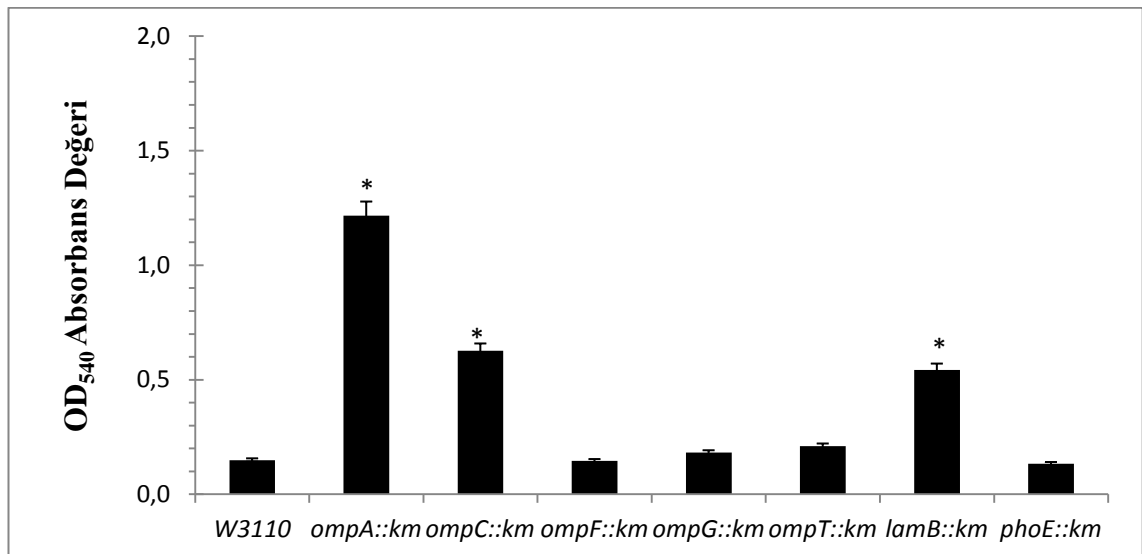
Şekil 4.22. *E. coli* W3110 ve porin mutantların pH 6.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği. (*) işaretli olan barlar *E. coli* W3110'a göre önemlidir ($p \leq 0.05$).



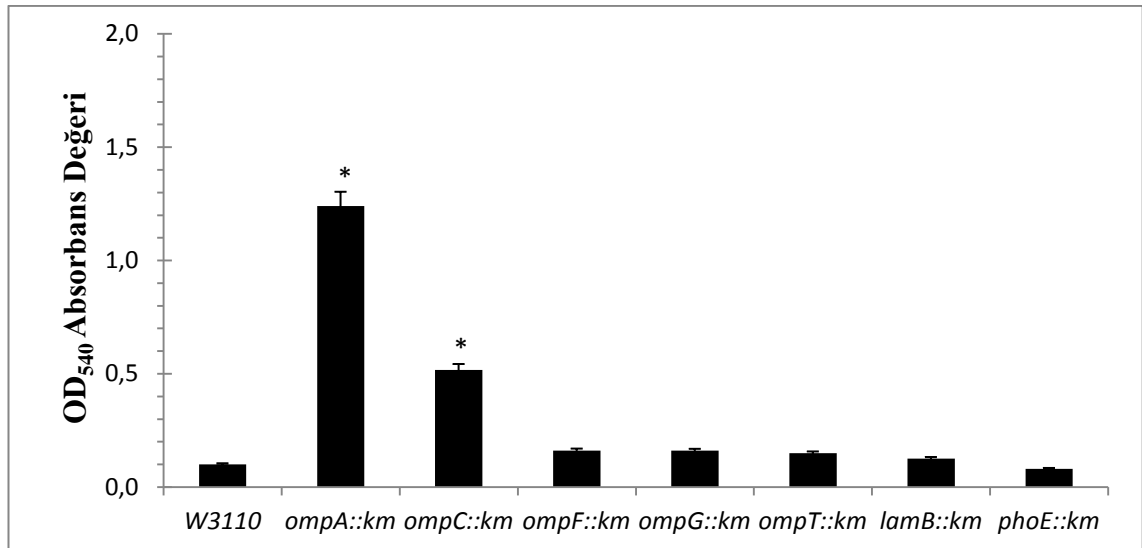
Şekil 4.23. *E. coli* W3110 ve porin mutantların pH 6.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu grafiği. (*) işaretli olan barlar *E. coli* W3110'a göre önemlidir ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.24. *E. coli* W3110 ve porin mutantların pH 7.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği. (*) işaretli olan barlar *E. coli* W3110'a göre önemlidir ($p \leq 0.05$).

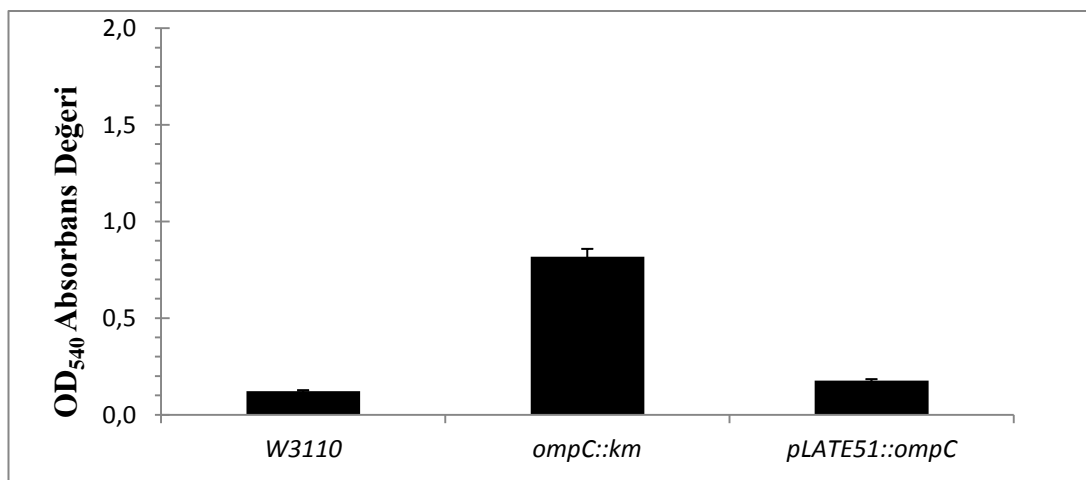


Şekil 4.25. *E. coli* W3110 ve porin mutantların pH 7.5 LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği. (*) işaretli olan barlar *E. coli* W3110'a göre önemlidir ($p \leq 0.05$).

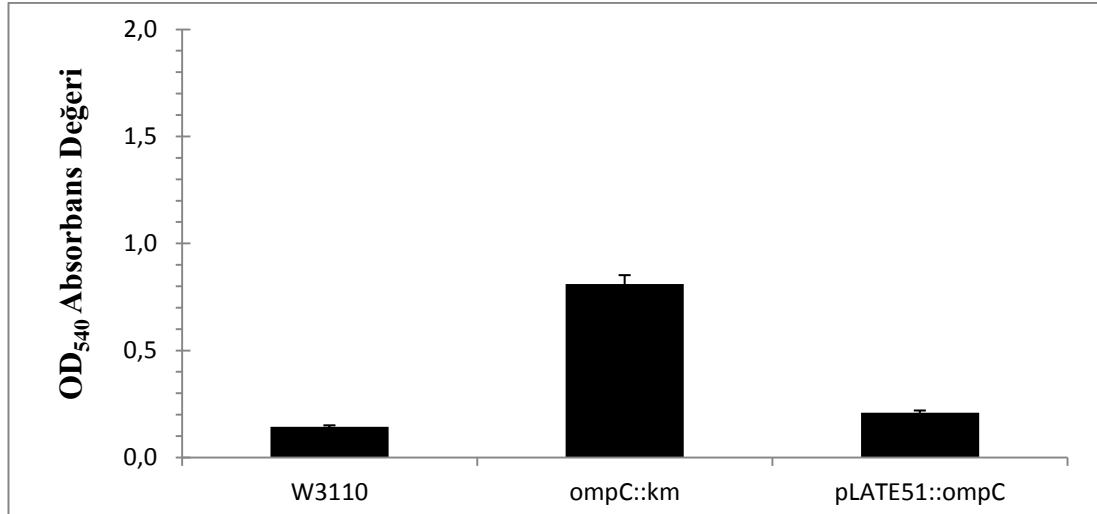


Şekil 4.26. *E. coli* W3110 ve porin mutantların pH 8.0 LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği. (*) işaretli olan barlar *E. coli* W3110'a göre önemlidir ($p \leq 0.05$).

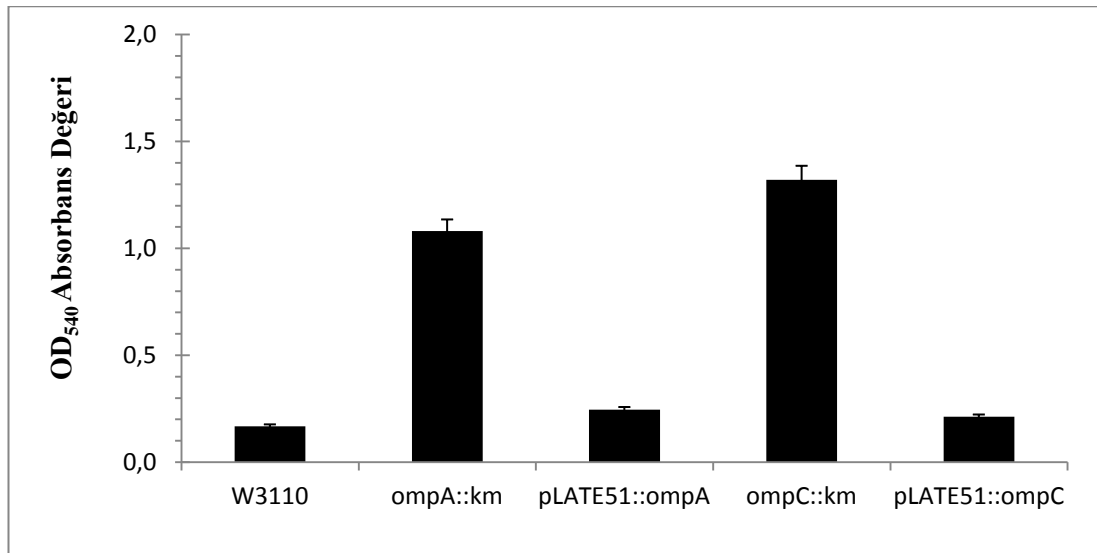
Çalışma sonucunda pH etkeni altında biyofilm oluşumunda rolünün olduğu tespit edilen genlerin doğrulaması komplementasyon testleriyle yapılmıştır. Komplement hücreler ile aynı şartlarda doğrulama amacıyla deneyler tekrarlanmıştır. Bunun sonucunda *E. coli* W3110 yabancı tip gibi komplement hücrelerde de biyofilm oluşumu gözlenmemiştir ve veriler grafiklerle görselleştirilmiştir. Burada elde edilen veriler bize nakavt edilen genin biyofilm oluşturmada rolünün olup olmadığını ispatlamıştır. Sonuç olarak *ompA*, *ompC* ve *lamB* genleri tamamlanarak yapılan deneylerde *E. coli* W3110 ile aynı sonucu vermiştir.



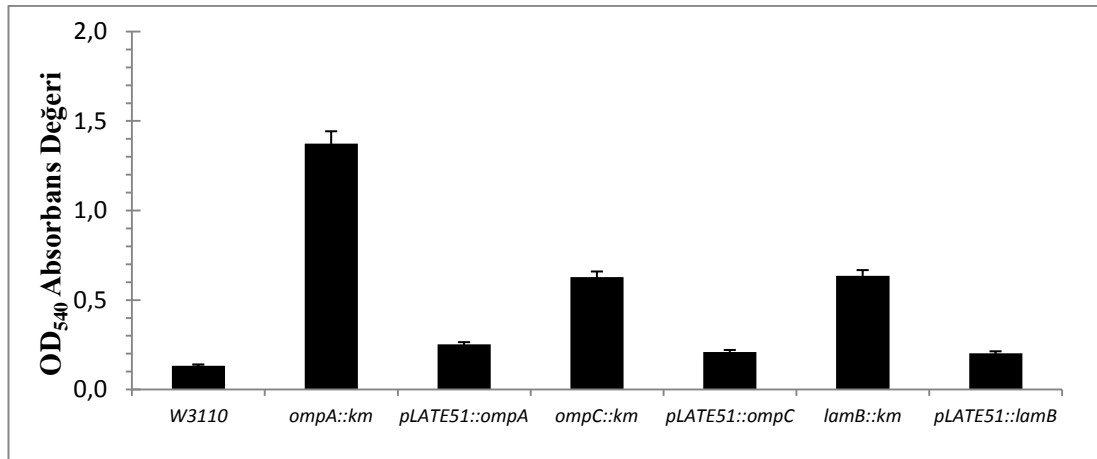
Şekil 4.27. pH 5.5 LB broth ortamında *E. coli* W3110, *ompC* mutant *E. coli* ve komplement hücre *plate51::ompC* biyofilm sonucu.



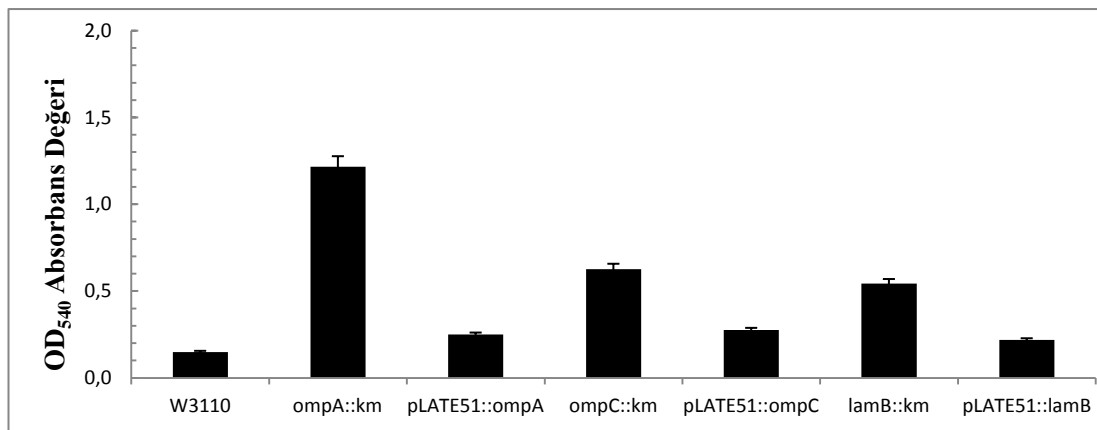
Şekil 4.28. pH 6.0 LB broth ortamında *E. coli* W3110, *ompC* mutant *E. coli* ve komplement hücre *plate51::ompC* biyofilm sonucu



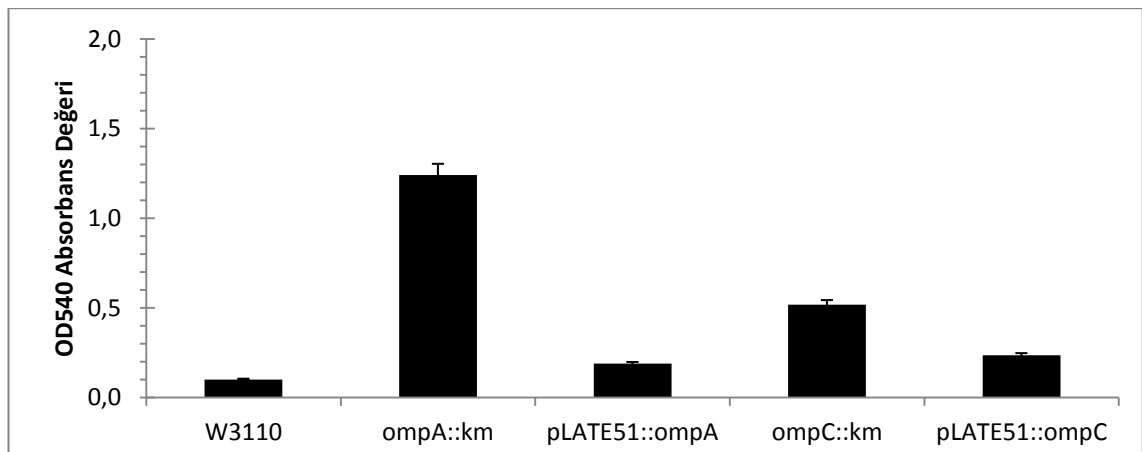
Şekil 4.29. pH 6.5 LB broth ortamında *E. coli* W3110, *ompA* mutant *E. coli*, *ompC* mutant *E. coli* ve komplement hücrelerin biyofilm sonucu



Şekil 4.30. pH 7.0 LB broth ortamında *E. coli* W3110, *ompA* mutant *E. coli*, *ompC* mutant *E. coli*, *lamB* mutant *E. coli* ve komplement hücrelerin biyofilm sonucu



Şekil 4.31. pH 7.5 LB broth ortamında *E. coli* W3110, *ompA* mutant *E. coli*, *ompC* mutant *E. coli*, *lamB* mutant *E. coli* ve komplement hücrelerin biyofilm sonucu



Şekil 4.32. pH 8.0 LB broth ortamında *E. coli* W3110, *ompA* mutant *E. coli*, *ompC* mutant *E. coli* ve komplement hücrelerin biyofilm doğrulaması sonucu

Bu çalışma kapsamında çalışılan tüm veriler değerlendirilerek kuvvet ilişkisi bakımından derecelendirilmiştir. Bu tablo tüpte biyofilm oluşumları ve kristal viyole ile boyama sonrası optik yoğunluklar baz alınarak hazırlanmıştır. Sonuçlar tablo olarak aşağıda sunulmaktadır. Kuvvet derecelendirmeleri, Biyofilm pozitif= +, biyofilm negatif= -; Kuvvetli biyofilm= +++, orta biyofilm = ++, zayıf biyofilm = + şeklinde yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı pH'lardaki LB Brot besiyerinde 24 saatlik biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi

	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0
W3110	-	-	-	-	-	-
<i>ompA::km</i>	-	-	++	++	++	++
<i>pLATE51::ompA</i>	-	-	-	-	-	-
<i>ompC::km</i>	+	+	++	+	+	+
<i>pLATE51::ompC</i>	-	-	-	-	-	-
<i>ompF::km</i>	-	-	-	-	-	-
<i>ompG::km</i>	-	-	-	-	-	-
<i>ompT::km</i>	-	-	-	-	-	-
<i>lamB::km</i>	-	-	-	+	+	-
<i>pLATE51::lamB</i>	-	-	-	-	-	-
<i>phoE::km</i>	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.2’de ise LB brot ortamında *E. coli* W3110, porin mutantları ve komplement hücrelerin inkübasyon başlangıç pH değerleri ve 24 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen pH değerleri verilmiştir. Bu veriler değerlendirildiğinde ise *E. coli* W3110, porin mutantları ve komplement hücrelerde 24 saatlik inkübasyon sonrası kullanılan tüm pH değerlerinde ortamın alkalileştiği tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumunda rolü olan *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutantlarında pH’ın alkali seviyesinde daha fazla artış olduğu belirlenmiştir. Biyofilmin bir göstergesi olan EPS’lerin oluşumu diğer mutantlara oranla daha fazla alkalileşmeye yol açmaktadır.

Çizelge 4.2. Farklı pH’lardaki LB Brot besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonrası biyofilm oluşumundaki pH değişiminin değerlendirilmesi

SUŞLAR	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0
W3110	7,23 ±0,02	7,31 ±0,04	7,40 ±0,1	7,56 ±0,06	8,00 ±0,01	8,16 ±0,1
<i>ompA::km</i>	7,65 ±0,13	7,60 ±0,04	7,81 ±0,05	7,78 ±0,1	8,19 ±0,04	8,36 ±0,01
<i>pLATE51::ompA</i>	7,16 ±0,07	7,21 ±0,1	7,50 ±0,04	7,61 ±0,1	7,98 ±0,04	8,09 ±0,01
<i>ompC::km</i>	7,71 ±0,3	7,78 ±0,08	8,01 ±0,03	8,13 ±0,01	8,18 ±0,04	8,46 ±0,05
<i>pLATE51::ompC</i>	7,22 ±0,01	7,29 ±0,05	7,52 ±0,09	7,51 ±0,04	7,82 ±0,04	8,10 ±0,05
<i>ompF::km</i>	7,56 ±0,1	7,44 ±0,1	7,30 ±0,1	7,28 ±0,08	8,04 ±0,1	8,15 ±0,05
<i>pLATE51::ompF</i>	7,25 ±0,06	7,30 ±0,08	7,45 ±0,1	7,65 ±0,1	7,94 ±0,07	8,16±0,07
<i>ompG::km</i>	7,41 ±0,1	7,41 ±0,06	7,42 ±0,09	7,69 ±0,05	7,98 ±0,04	8,14±0,02
<i>pLATE51::ompG</i>	7,19 ±0,06	7,27 ±0,1	7,22 ±0,06	7,52 ±0,4	7,98 ±0,04	8,13±0,06
<i>ompT::km</i>	7,29 ±0,06	7,42 ±0,05	7,47 ±0,08	7,61 ±0,1	7,94 ±0,09	8,09 ±0,04
<i>pLATE51::ompT</i>	7,25 ±0,02	7,31 ±0,06	7,54 ±0,03	7,72 ±0,1	8,03 ±0,01	8,03 ±0,01
<i>lamB::km</i>	7,45 ±0,04	7,38 ±0,04	7,42 ±0,04	8,08 ±0,01	8,11 ±0,02	8,29 ±0,04
<i>pLATE51::lamB</i>	7,31 ±0,1	7,36 ±0,2	7,40 ±0,1	7,64 ±0,2	7,97 ±0,02	8,13 ±0,1
<i>phoE::km</i>	7,28 ±0,08	7,38 ±0,09	7,47 ±0,2	7,66 ±0,06	7,91 ±0,06	8,04 ±0,04
<i>pLATE51::phoE</i>	7,22 ±0,06	7,35 ±0,1	7,75 ±0,09	7,61 ±0,1	8,01 ±0,03	8,08 ±0,05

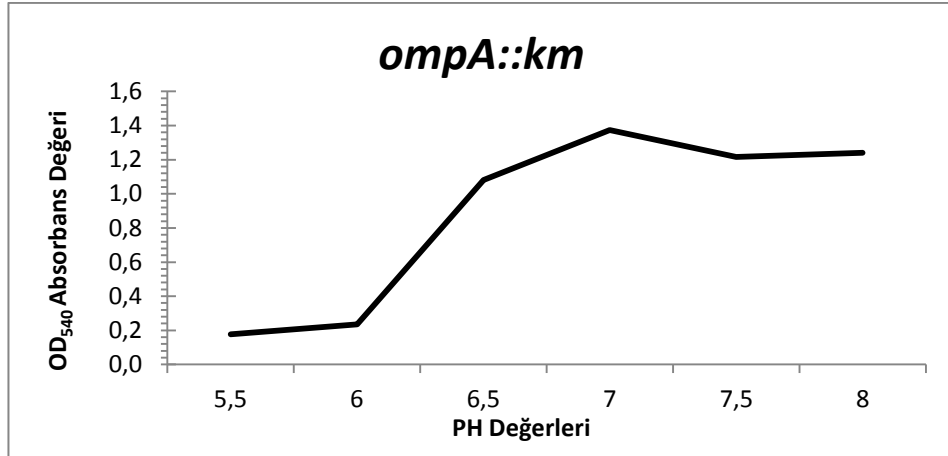
Çizelge 4.3’de LB brot ortamında referans suş olarak kullanılan *E. coli* 35218’un inkübasyon öncesi ve 24 saatlik inkübasyon sonrasında pH değerleri verilmiştir. Bu veriler değerlendirildiğinde ortamda başlangıç değerine göre 24 saat sonrasında ortamın pH’sında değişim (pH artışı) tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu gözlemlenen bu suşta 24 saatlik inkübasyon sonrası ortamın alkalileştiği görülmektedir.

Çizelge 4.3. Farklı pH’lardaki LB Brot besiyerinde *E. coli* 35218 suşunun 24 saatlik inkübasyon sonrası biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi

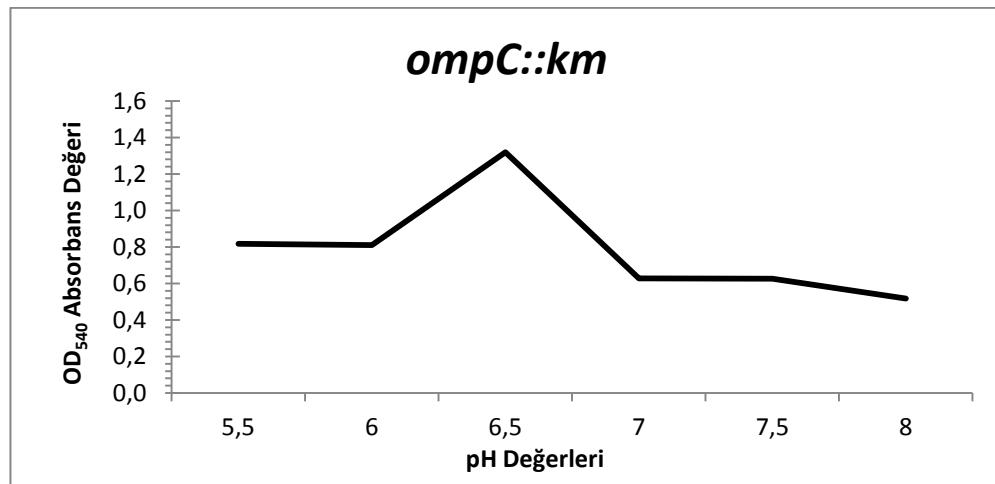
SUŞ	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5	pH 8.0
<i>E. coli</i> 35218	6,97±0,02	7,05±0,03	7,12±0,01	7,44±0,02	7,78±0,02	8,11±0,04

4.6 pH’ın Bakteriyal Yapışmaya Etkisi

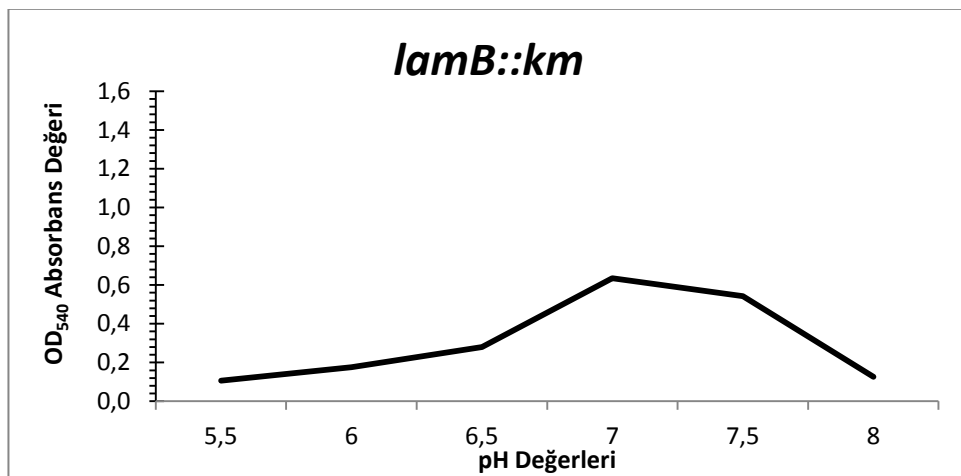
pH’ın bakteriyal tutunma üzerine etkisi değerlendirildiğinde; pH 5.5 ve 6.5 değerine kadar biyofilm negatif olan *ompA::km* mutantında bu değerden sonra biyofilm oluşumu gözlenmektedir ve tutunma 6.5 pH değerinden sonra başlamaktadır. En fazla tutunmayı pH 7.0 ve 7.5 değerlerinde göstermektedir. Şekil 4.33’de görüldüğü üzere alkali pH *ompA::km* mutantında biyofilm oluşumunu destekleyerek bakteriyal yapışmayı arttırmıştır. Bu durum pH 8.0 değerine kadar devam etmektedir. Bu değerde *ompA* mutantında zayıf yapışma görülmektedir ve özelliğini git gide kaybetmektedir. Biyofilm oluşumu pozitif olan diğer mutantlarda aynı yorumu yapmak güçtür çünkü *ompC::km* mutantı pH 5.5 değerinde dahi biyofilm pozitif sonuç vermiştir. Yani yapışma pH 5.5 değerinde başlamaktadır. pH 6.5 değeri ise yapışmanın en fazla olduğu değerdir. Bu değerden sonra yani alkali pH değerinde yapışma kademeli olarak azalmaktadır. Sonuç olarak biyofilm zayıflamakta ve yapışma oranı azalmaktadır. *lamB::km* mutantının ise; zayıf biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. Bakteriyal yapışma sadece pH 7.0 ve 7.5 değerinde kaydedilmiştir. Asidik ve alkali pH etkisinde tutunma özelliği nötr pH değerine göre daha azdır. Sonuç olarak, asidik ve alkali ortam tutunmayı azaltmaktadır ve biyofilm oluşumunu negatif etkilemektedir.



Şekil 4.33. *ompA* mutant *E. coli* suşunun farklı pH değerlerindeki adezyon durumu



Şekil 4.34. *ompC* mutant *E. coli* suşunun farklı pH değerlerindeki adezyon durumu



Şekil 4.35. *lamB* mutant *E. coli* suşunun farklı pH değerlerindeki adezyon durumu

4.7 Biyofilm Oluşumu Üzerine Metal Etkisi ve Mutantlarla İlişkisi

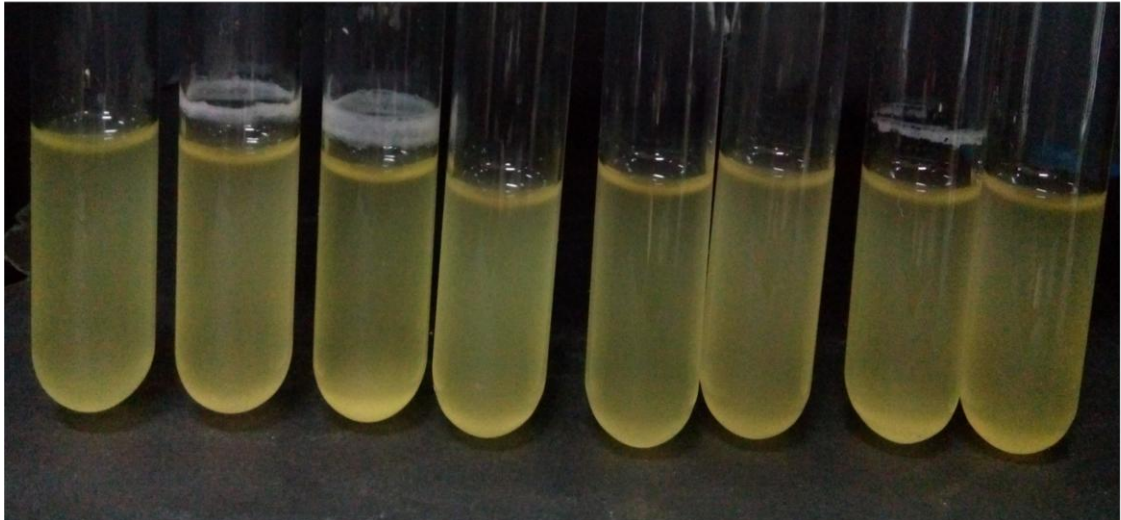
E. coli W3110 ile 3 farklı metalin minimal inhibisyon konsantrasyon değerleri pH 7 LB Brot besiyerinde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Yabani tip *E. coli* W3110 suşunda metallerin minimal inhibisyon değeri.

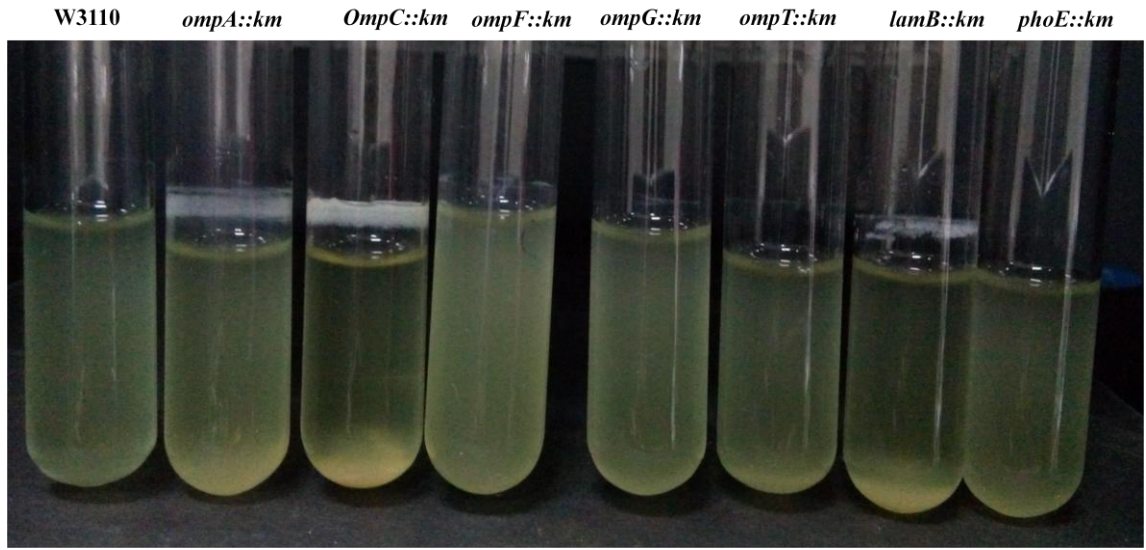
Metaller	MİK değerleri
NiSO ₄	492,8 µg/ml
CuSO ₄	468,0 µg/ml
ZnSO ₄	134,7 µg/ml

Biyofilm oluşumunda metallerin etkisini araştırmak amacıyla bakır (Cu), nikel (Ni) ve çinko (Zn) metalleri kullanılarak yapılan çalışmada *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutantlarında Ni ve Cu ilave edildiğinde tüplerin katı-sıvı ara fazında biyofilm yapısı gözlenmiştir. Zn metali varlığında ise *E. coli* W3110 ve mutantlarda biyofilm oluşumu tespit edilmemiştir.

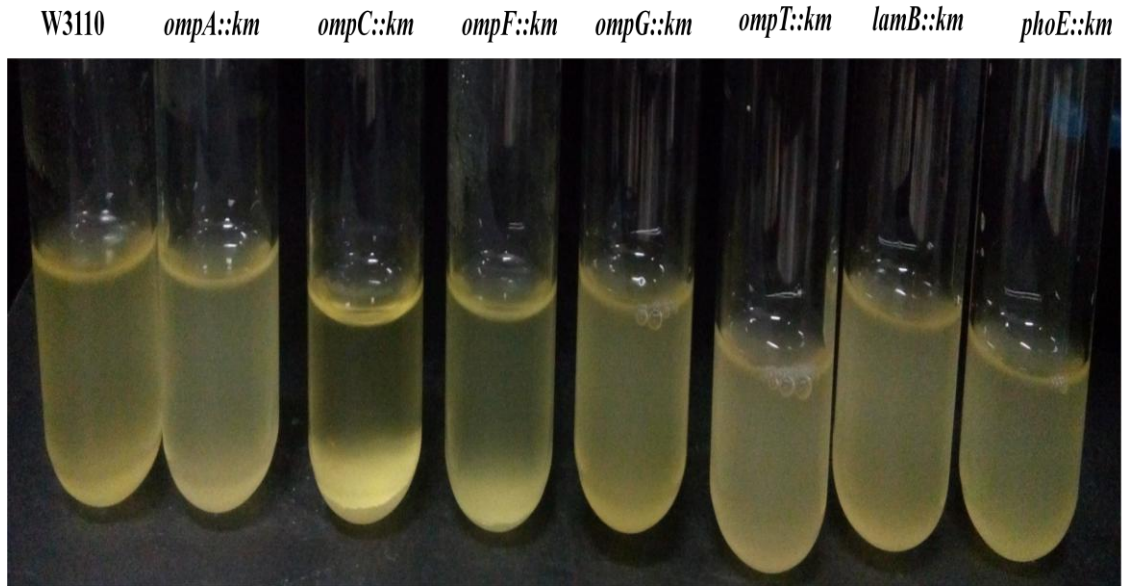
W3110 *ompA::km* *ompC::km* *ompF::km* *ompG::km* *ompT::km* *lamB::km* *phoE::km*



Şekil 4.36. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantların Nikel metali bulunan LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.

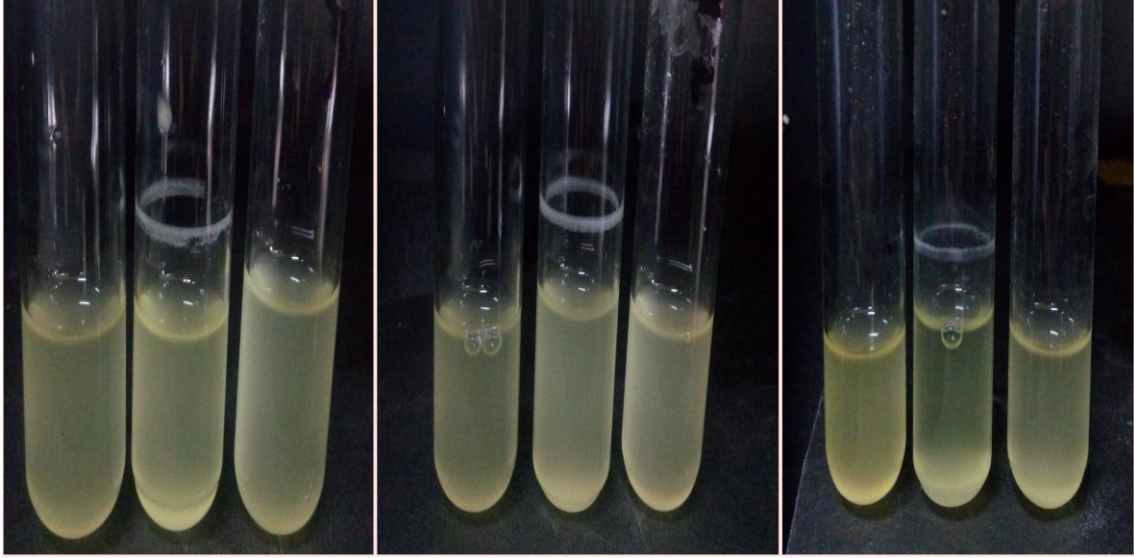


Şekil 4.37. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantların Bakır metali bulunan LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu.

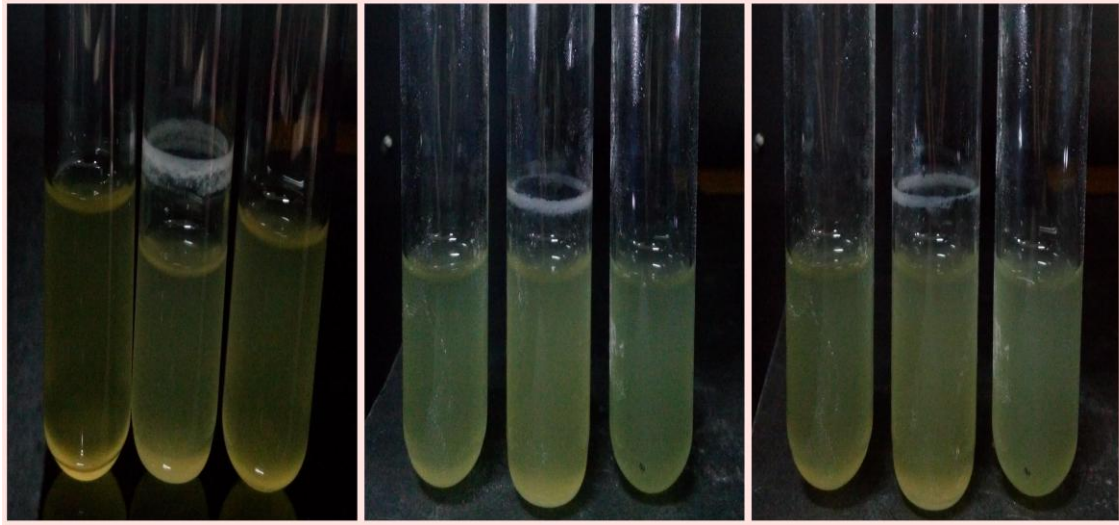


Şekil 4.38. Yabani tip *E. coli* W3110 ve porin mutantların Çinko metali bulunan LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu

Bulunan veriler sonucunda metal ilave edildiğinde biyofilm oluşumunda rolünün olduğu tespit edilen genlerin doğrulaması komplementasyon testleriyle yapılmıştır. Mutant ve komplement hücreler aynı şartlarda doğrulama amacıyla deneyler tekrarlanmıştır. Bunun sonucunda *E. coli* W3110 yabancı tip gibi komplement hücrelerde de biyofilm oluşumu Ni, Cu ve Zn varlığında gözlenmemiştir.

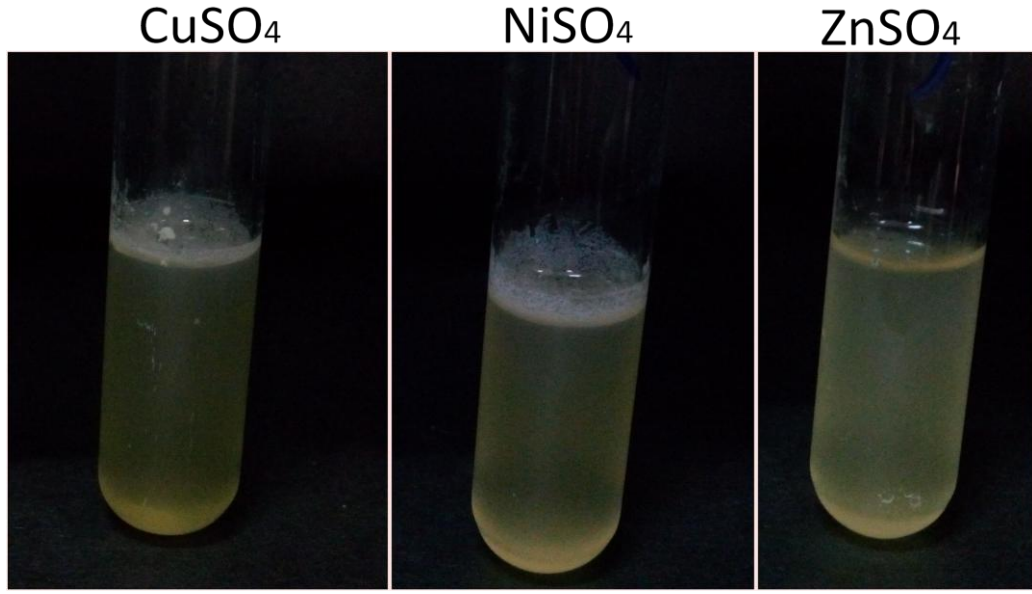
W3110 *ompA::km plate51::ompA*W3110 *ompC::km plate51::ompC*W3110 *lamB::km plate51::lamB*

Şekil 4.39. Nikel metali varlığında biyofilmde rolü olduğu tespit edilen suşların komplement testleri

W3110 *ompA::km plate51::ompA*W3110 *ompC::km plate51::ompC*W3110 *lamB::km plate51::lamB*

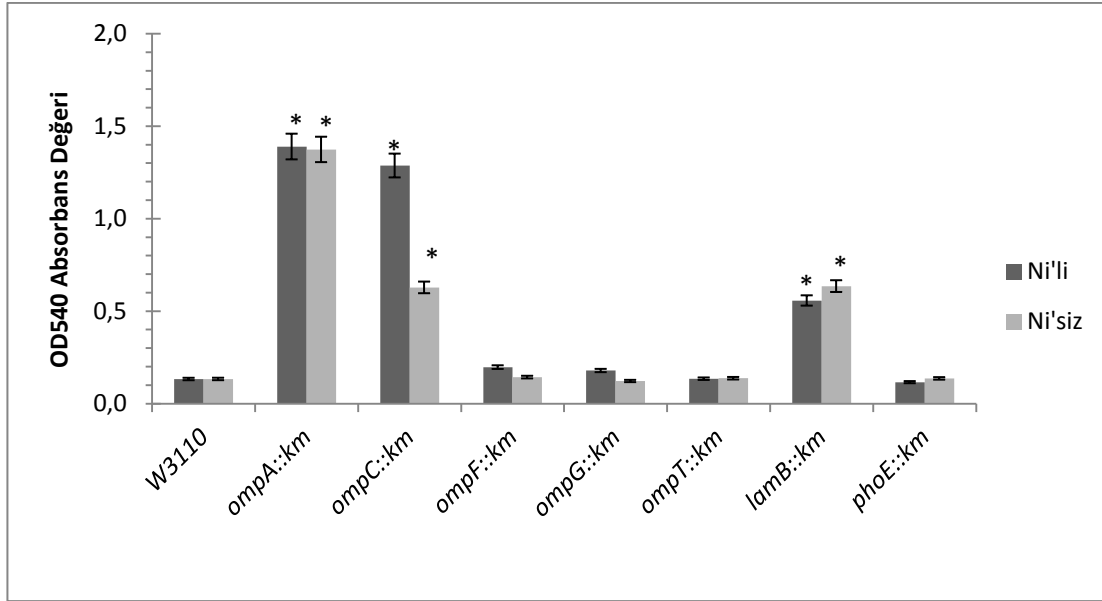
Şekil 4.40. Bakır metali varlığında biyofilmde rolü olduğu tespit edilen suşların komplement testleri

Biyofilm oluşumunun pozitif olduğu bilinen *E. coli* ATCC 35218 suşu metal deneylerinde referans olarak kullanılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda *E. coli* 35218'de biyofilm oluşumu Cu ve Ni metalleri varlığında biyofilm oluştururken, Zn metali varlığında biyofilm gözlenmemiştir. Dolayısıyla mutantlardan bağımsız olarak Zn ve biyofilm arasında bir ilişki bulunmaktadır.

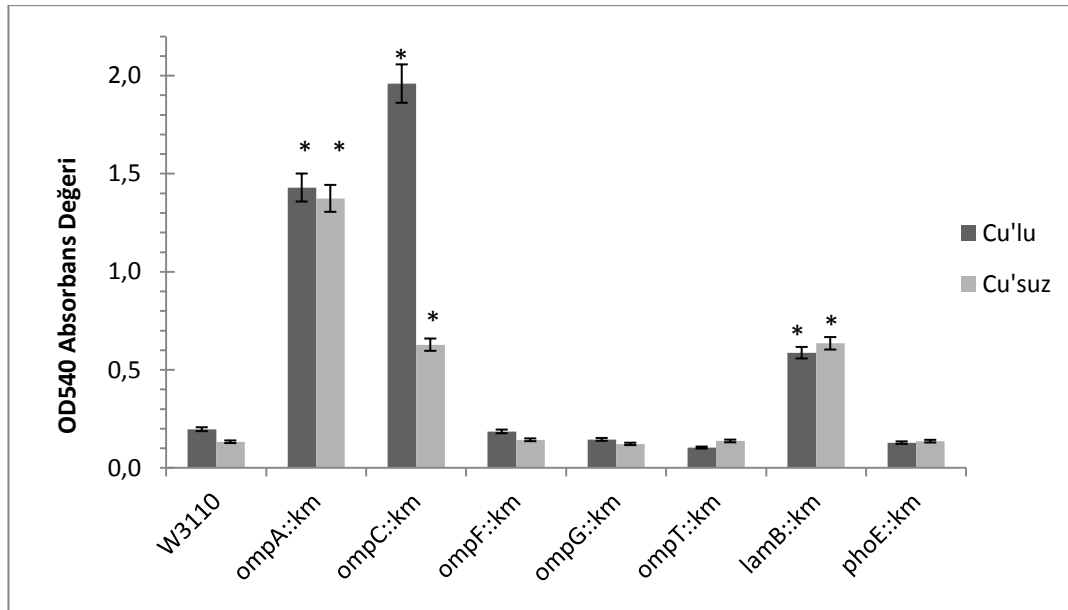


Şekil 4.41. *E. coli* ATCC 35218 suşunun farklı metallerin varlığında biyofilm oluşumları

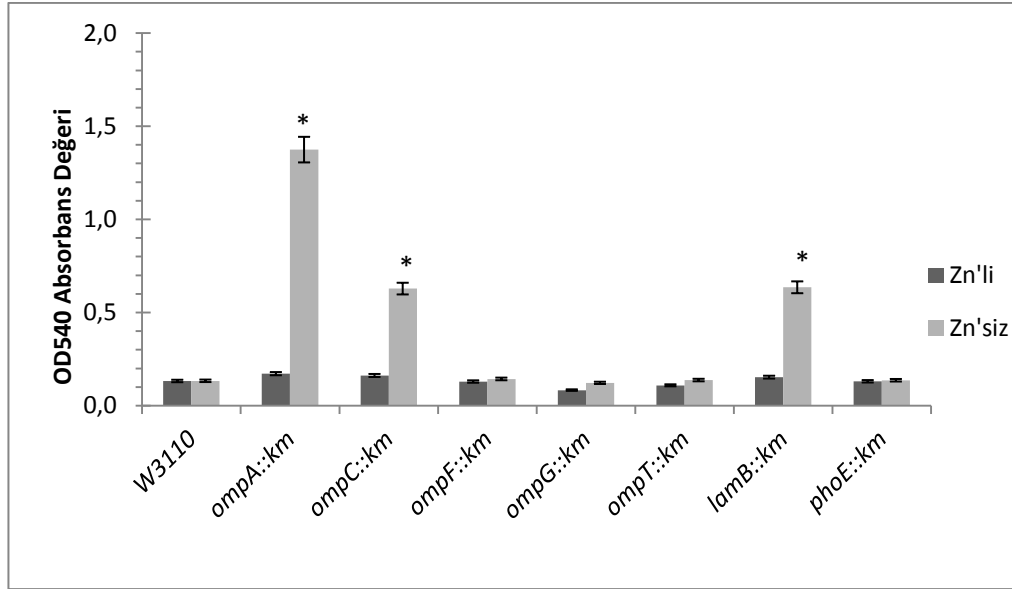
Metal ilave edilmiş ve metal ilave edilmemiş olarak yapılan biyofilm çalışmaları sonucunda, Ni varlığında *ompA* ve *lamB* mutant *E. coli* suşlarında anlamlı bir fark görünmemektedir. Fakat *ompC* mutant *E. coli* suşunda metalsiz ortama oranla metali ortamda fark mevcuttur. Aynı değerlendirmeyi Cu varlığında biyofilm değerlendirmesinde de yapmak mümkündür. *ompA* ve *lamB* mutant *E. coli* suşları Cu'lu ve Cu'suz ortam denemelerinde aynı kuvvetli biyofilm oluşturmuşlardır. Fakat *ompC* mutantında Cu varlığında bu fark oldukça yüksektir. Bu çalışma sonucunda *ompC* mutant *E. coli* suşunun Ni ve Cu varlığında daha fazla biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir. Zn yokluğunda oluşan biyofilm ise Zn varlığında engellenmiştir. Çinkonun biyofilmi inhibe edici etkisi görülmektedir.



Şekil 4.42. Nikel varlığında ve yokluğunda LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği. (*) işaretli olan barlar *E. coli* W3110'a göre önemlidir ($p \leq 0.05$).

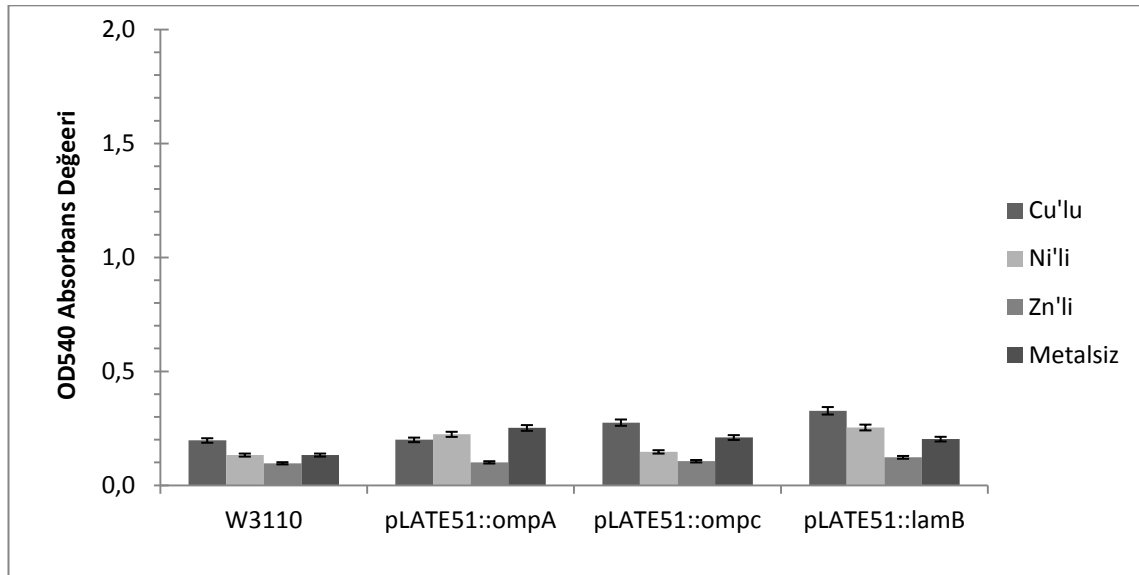


Şekil 4.43. Bakır varlığında ve yokluğunda LB broth besiyerinde biyofilm oluşumu grafiği. (*) işaretli olan barlar *E. coli* W3110'a göre önemlidir ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.44. Çinko varlığında ve yokluğunda LB broth besiyerinde biyofilm oluşum grafiği. (*) işaretli olan barlar *E. coli* W3110'a göre önemlidir ($p \leq 0,05$).

Sonuçlara göre, metal varlığında komplemet hücrelerde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Zn varlığında inhibe olan biyofilm oluşumu, komplemet hücrelerde metalsiz ortamda olduğu gibi Cu ve Ni ilavesinde de oluşmamıştır.



Şekil 4.45. Nikel, Bakır ve Çinko varlığında *ompA*, *ompC*, *lamB* ve komplemet hücrelerin biyofilm doğrulaması

Bu çalışma kapsamında çalışılan tüm veriler değerlendirilerek kuvvet ilişkisi bakımından derecelendirilmiştir. Bu tablo tüpte biyofilm oluşumları ve kristal viyole ile boyama sonrası optik yoğunluklar baz alınarak hazırlanmıştır. Sonuçlar tablo olarak aşağıda sunulmaktadır. Kuvvet derecelendirilmeleri, Biyofilm pozitif= +, biyofilm negatif= -; Kuvvetli biyofilm= +++, orta biyofilm = ++, zayıf biyofilm = + şeklinde yapılmıştır.

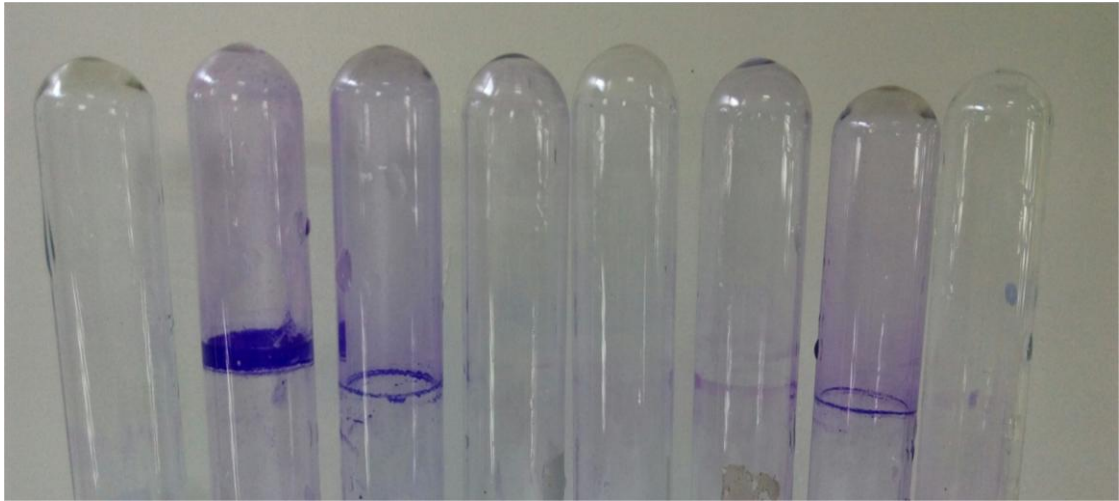
Çizelge 4.5. Farklı metaller bulunan LB Brot besiyerinde 24 saatlik biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi

	CuSO₄	NiSO₄	ZnSO₄
W3110	-	-	-
<i>ompA::km</i>	++	++	-
<i>pLATE51::ompA</i>	-	-	-
<i>ompC::km</i>	+++	++	-
<i>pLATE51::ompC</i>	-	-	-
<i>ompF::km</i>	-	-	-
<i>ompG::km</i>	-	-	-
<i>ompT::km</i>	-	-	-
<i>lamB::km</i>	+	+	-
<i>pLATE51::lamB</i>	-	-	-
<i>phoE::km</i>	-	-	-

4.8 Kullanılan Malzemenin Biyofilm Oluşumu Üzerine Etkisinin Araştırılması ve Mutantlarla İlişkisi

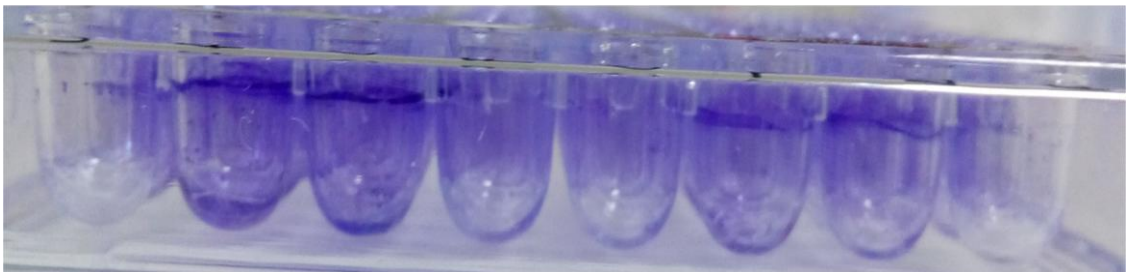
E. coli'nin cam tüpte ve polivinil klorür (PVC) malzemelerde biyofilm oluşum durumu incelendiğinde; 24 saatlik inkübasyonu takiben %1 'lik kristal viyole ile boyama sonrasında absorbans ölçümü yapılarak tüm suşların biyofilm üretimi değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan hidrofobik cam malzeme ve hidrofilik PVC'den yapılmış malzeme bileşenlerinin farklılığından dolayı biyofilm oluşumunda bir farklılık oluşturma durumu kontrol edilmiş ve bir fark tespit edilmemiştir. Biyofilm oluşturan suşlar camda da PVCde de aynı oranda biyofilm oluşturmuştur.

W3110 *ompA::km* *ompC::km* *ompF::km* *ompG::km* *ompT::km* *lamB::km* *phoE::km*



Şekil 4.46. Cam malzeme olan deney tüplerinde biyofilm oluşumu.

W3110 *ompA::km* *ompC::km* *ompF::km* *ompG::km* *ompT::km* *lamB::km* *phoE::km*



Şekil 4.47. Polivinil klorür (PVC) üzerindeki biyofilm oluşumu

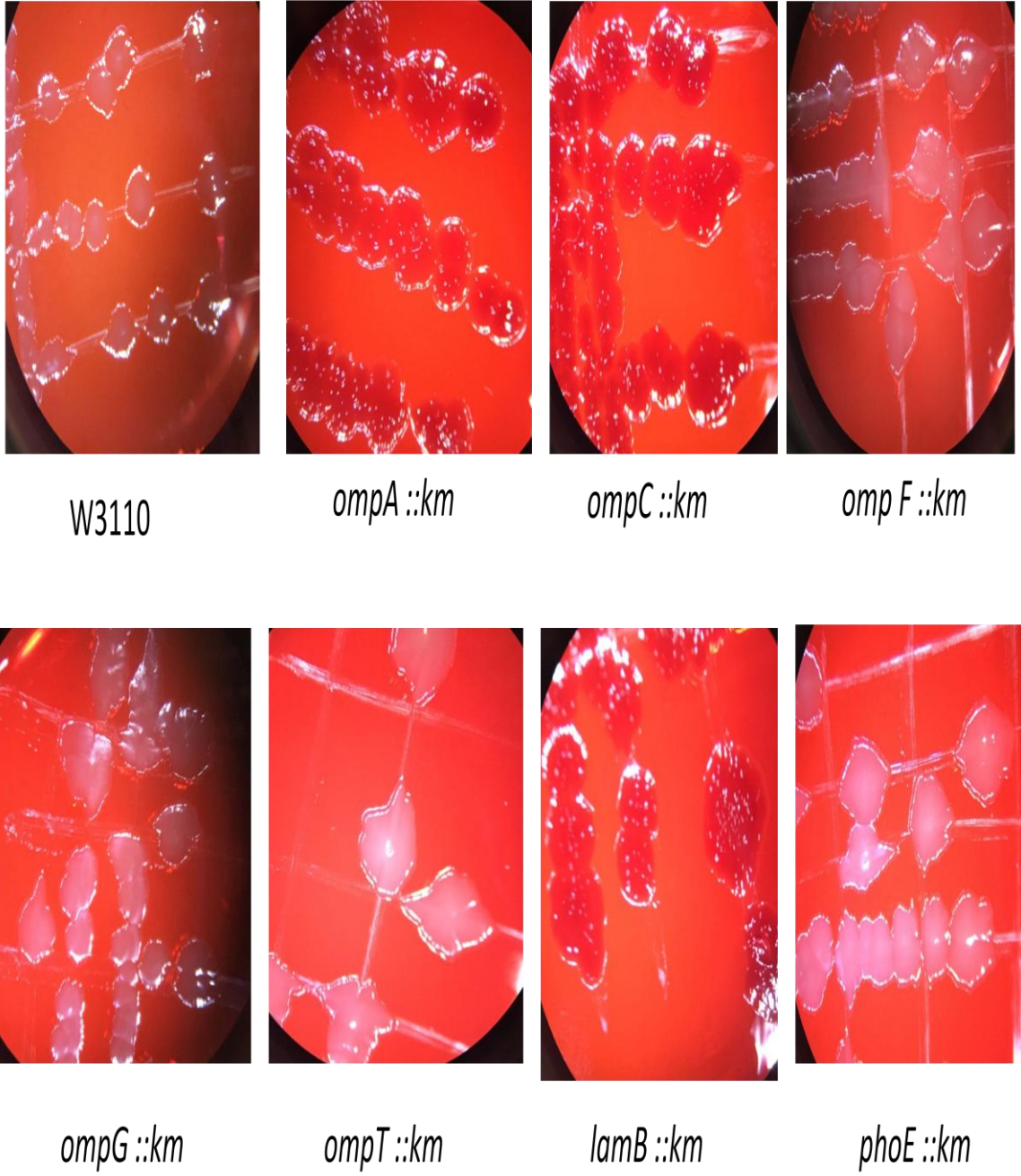
4. 9 Kongo Kırmızı Bağlama İle Biyofilm Tayini

E. coli W3110 üzerinde çalışılan suşların biyofilm oluşturma durumları kongo kırmızılı agar besiyerinde de araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda kongo kırmızılı agar besiyerine tek koloni olarak ekilen kültürlerin 37°C’de bir gece ve ardından oda ısısında 48 saat inkübasyonu sonrasındaki sonuçları değerlendirilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda kuru, kaba, kırmızımsı görüntüler biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir. Beyaz, parlak koloniler ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir (Freeman, vd., 1989; Atshan, vd., 2012). Yani, kongo kırmızısı besiyerinde suşlar büyütüldüğünde, daha yoğun bir şekilde lekelenmiş suşlar (daha koyu renkle ifadesi sağlanan), biyofilm üretimini göstermektedir (Olsen, vd., 1993a; Kart, vd., 2011).

Bu çalışmada referans suş olarak kullanılan *E. coli* 35218’ nun beyin kalp infüzyon buyyonu ile desteklenmiş kongo kırmızılı agar besiyerinde kongo kırmızı bağlama ile biyofilm tayini sonucu Şekil 4. 48’de görüldüğü üzere siyah görünüm almaktadır. Fakat bizim çalışmamızda da görüldüğü gibi biyofilm testlerinde negatif sonuç veren W3110 mutant hale getirilince biyofilm oluşumu gözlenen porin mutant suşlar yoğun bir şekilde lekelenmiş olarak gözlemlenmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda; *ompA* mutant *E. coli*, *ompC* mutant *E. coli* ve *lamB* mutant *E. coli* suşları biyofilm pozitif, yabani tip *E. coli* W3110, *ompF* mutant *E. coli*, *ompG* mutant *E. coli*, *ompT* mutant *E. coli* ve *phoE* mutant *E. coli* suşları biyofilm negatif sonuç vermiştir.



Şekil 4.48. *E. coli* 35218 referans suşunun kongo kırmızılı agar besiyerinde kongo kırmızı bağlama ile biyofilm tayini

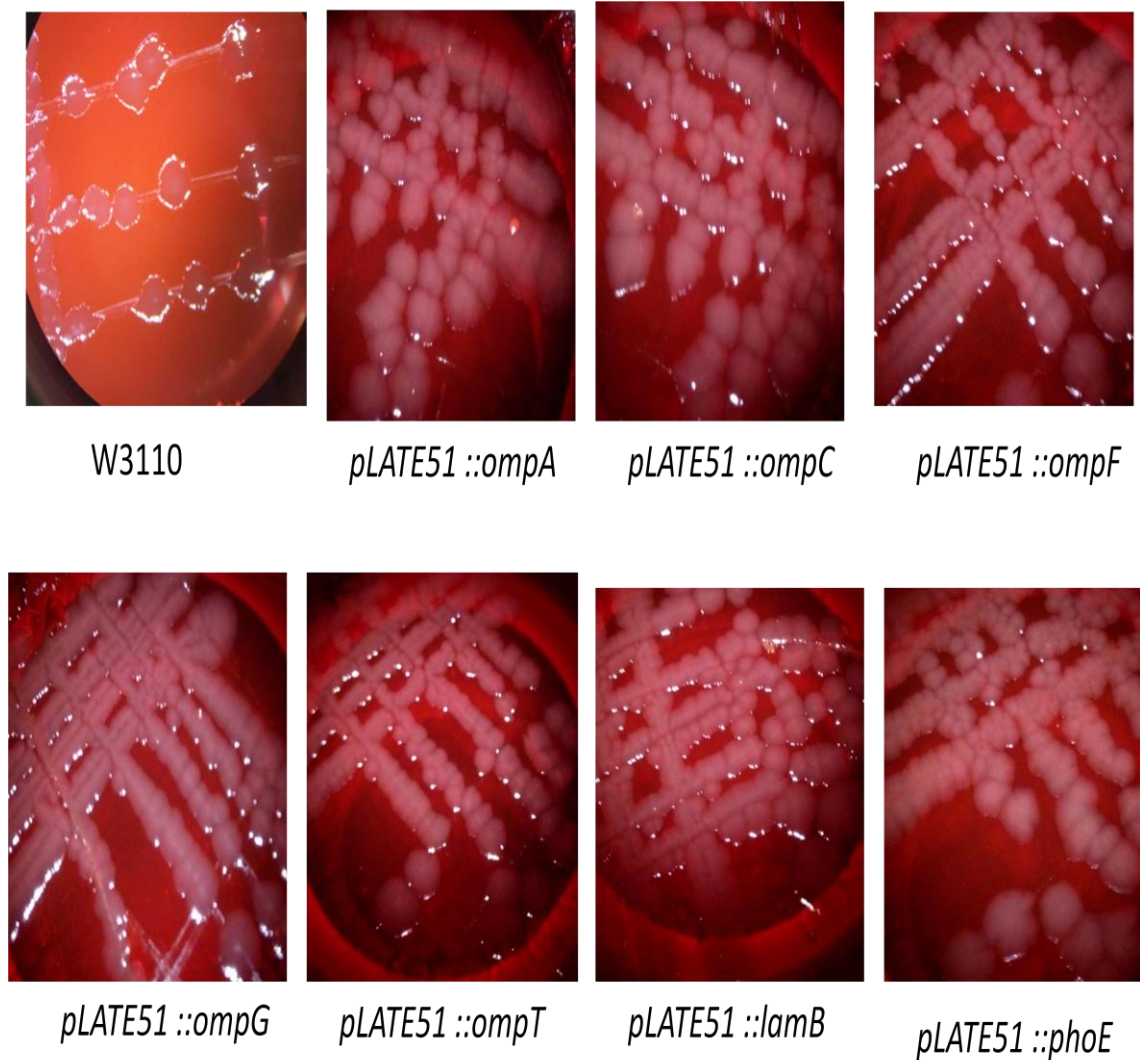


Şekil 4.49. *E. coli* W3110 ve mutant porinlerin kongo kırmızı bağlama ile biyofilm tayini

Çalışmada yapılan deneyler doğrultusunda biyofilm oluşumunda rolü olduğu tespit edilen suşların komplementasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Rolü olduğu düşünülen ve diğer suşlarda beyin kalp infüzyon buyyonu ile desteklenmiş kongo kırmızılı agar besiyerindeki sonuçları Şekil 4. 50’da verilmiştir.

Bu testler sonucunda *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutant *E. coli* suşları biyofilm pozitif sonuç verirken, komplement hücreleri olan pLATE51::*ompA*, pLATE51::*ompC* ve pLATE51::*lamB* sonuçları biyofilm negatiftir.

Diğer mutantlarında komplementleri gerçekleştirilmiş ve kongo kırmızılı agar besiyerinde görselleştirilmiştir.



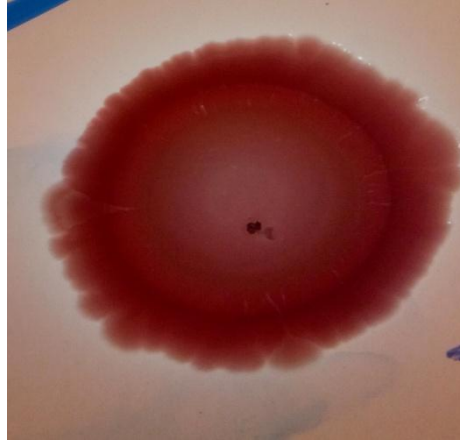
Şekil 4.50. Komplement hücrelerin kongo kırmızı bağlama ile biyofilm tayini

4. 10 Morfoloji Tayini

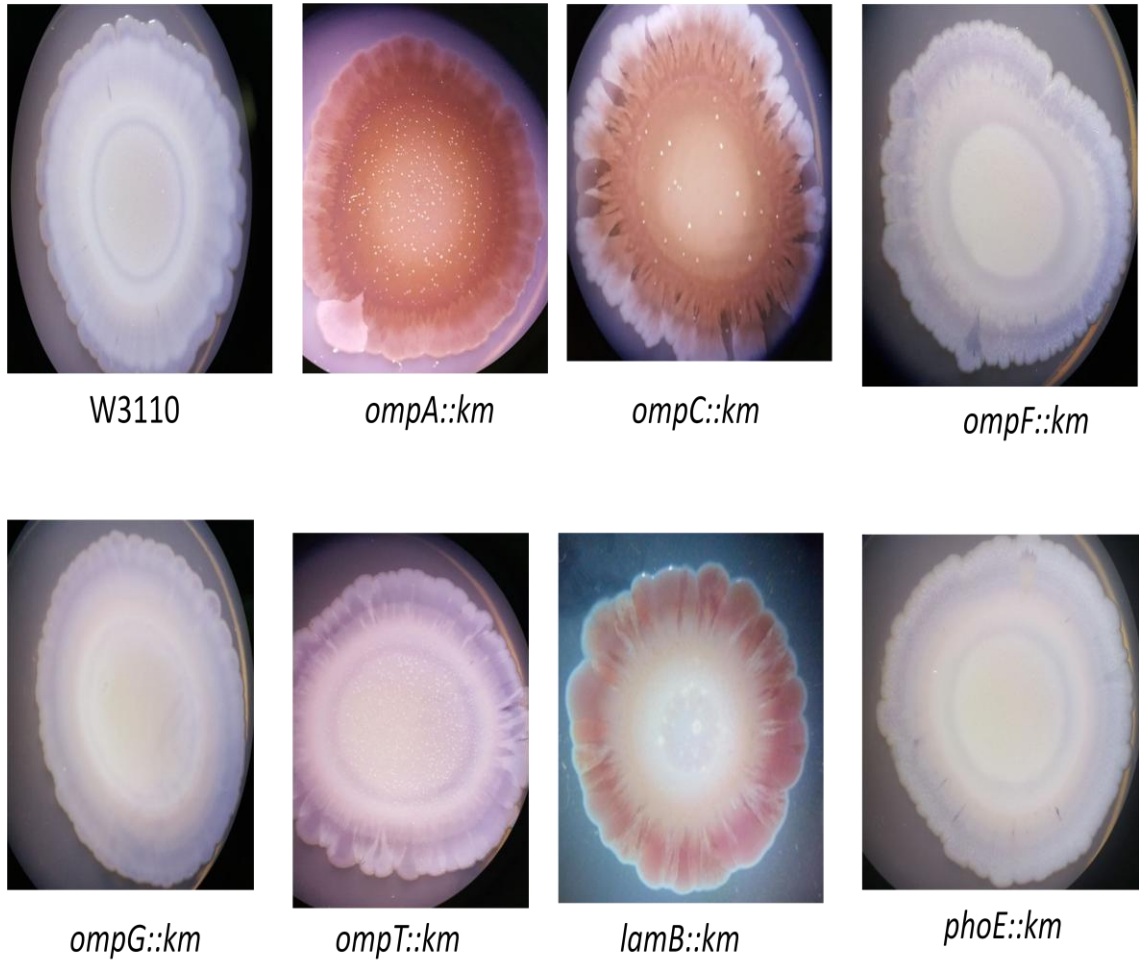
E. coli'nin katı besiyerinde biyofilm oluşumunu test etmede kullanılan morfortipler mevcuttur. Morfoloji tayininde geniş çaplı olarak kullanılan, rdar (kırmızı, kuru ve pürüzlü), bdar (kahverengi, kuru ve pürüzlü), pdar (pembe, kuru ve pürüzlü) ve saw (düz ve beyaz) koloni morfortipleri mevcuttur (Römmling, 2005). rdar selüloz ve curli üretimi gösterirken, bdar curli üretimini ve pdar sadece selüloz üretimi ve saw biyofilm oluşumu olmadığını göstermektedir (Latasa, vd., 2005).

Çalışma sonucunda kolonilerin 24 saatlik inkübasyonu takiben oda ısısında bekletilmesi sonucu renk farklılıklarına göre değerlendirilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, yabani tip *E. coli* W3110, *ompF* mutant *E.coli*, *ompG* mutant *E.coli*, ve *phoE* mutant *E.coli* suşları beyaz renkli, mukus yapıları nedeniyle saw morfortipine sahip olduğu tespit edilmiştir. *ompA* mutant *E. coli*, kırmızıya yakın, görünüşte mukus yapısını kaybetmiş ve pürüzlü görünümü nedeniyle rdar morfortipine sahiptir. *ompC* mutant *E. coli* ve *lamB* mutant *E.coli* ise kahverengi görünüşleriyle ve petride oluşumlarında mukus yapıyı yitirip pürüzlü görünüm almalarından dolayı bdar morfortipine sahip olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Ayrıca cam tüp üzerinde çok net olarak biyofilm yapısı gözlenmeyen fakat CV ile boyaması sonrası biyofilm oluşumu tespit edilen *ompT* mutant *E. coli* suşu da pdar morfortipine ait görünüm elde etmiştir.

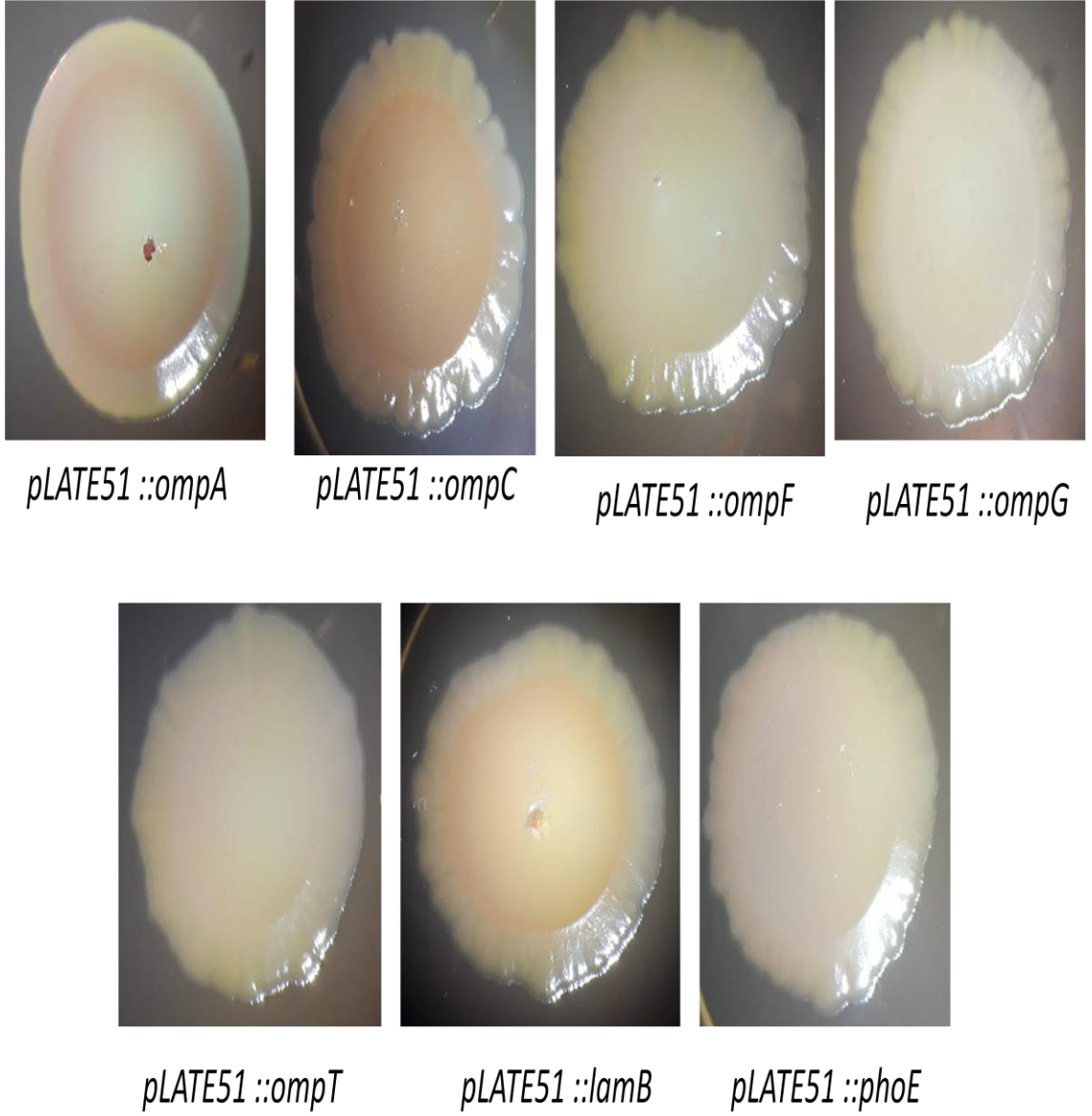
Çalışmada doğrulama sağlamak amacıyla hazırlanmış olan komplement hücrelerde de deneyler tekrarlanmıştır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde; rdar morfortipine sahip olan *ompA* mutant *E.coli*, komplement suşu mukus yapılı, kırmızı rengini kaybetmekte ve saw morfortipine benzer özellik göstermektedir. *ompC* mutant *E.coli* ve *lamB* mutant *E.coli* suşları, bdar morfortipine sahip iken komplement suşları yine mukus yapılı ve mutanta ait kahverengi görünümünden farklılaşarak saw morfortipine yakın görünüm elde etmiştir. *ompT* mutant suşunun komplementi de saw morfortipine ait sonuç vermiştir. Uygulanan stresler sonucunda biyofilmde rolü olmadığı düşünülen diğer mutantlarında komplement suşlarındaki sonuçlara bakıldığında *ompF*, *ompG* ve *phoE* mutantlarda olduğu gibi saw morfortipinde gözlenmektedir. Ayrıca çalışma verileri *E. coli* 35218 biyofilm pozitif suşu referans alınarakta değerlendirilmiştir.



Şekil 4.51. *E. coli* 35218 referans suşunun kongo kırmızılı agar besiyerinde fenotipi



Şekil 4. 52. Kongo kırmızılı agar besiyerinde yabani tip ve mutantların fenotipik farklılıkları



Şekil 4.53. Kongo kırmızılı agar besiyerinde komplement hücrelerin fenotipik farklılıkları

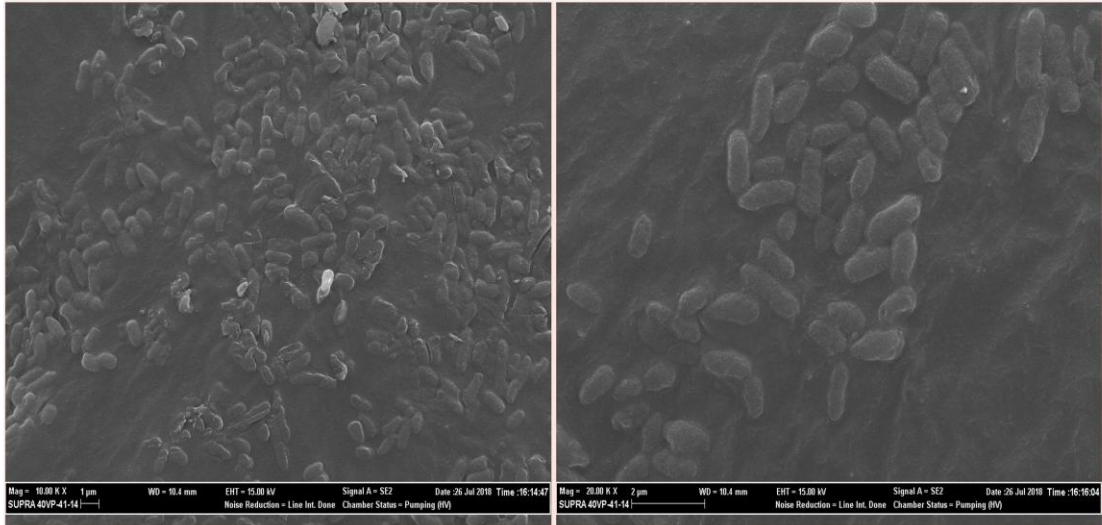
Çizelge 4.6. İlgili suşlar ve morfortip farklılıkları

Genotip veya yapı	Morfotip	İlgili özellikler
W3110 Yabani tip	saw	Selüloz - ; Curli -
W3110 <i>ompA</i> ::km	rdar	Selüloz + ; Curli +
W3110 <i>ompC</i> ::km	bdar	Selüloz - ; Curli +
W3110 <i>ompF</i> ::km	saw	Selüloz - ; Curli -
W3110 <i>ompG</i> ::km	saw	Selüloz - ; Curli -
W3110 <i>ompT</i> ::km	pdar	Selüloz + ; Curli -
W3110 <i>lamB</i> ::km	bdar	Selüloz - ; Curli +
W3110 <i>phoE</i> ::km	saw	Selüloz - ; Curli -

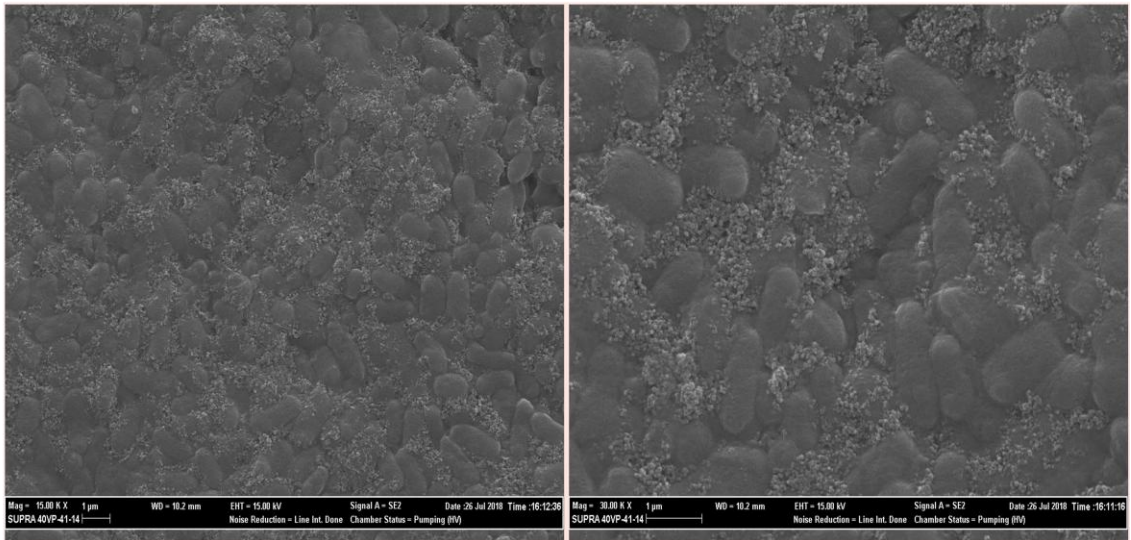
4.11 Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleri (Scanning Electron Microscopy)

Biyofilm yapılarını ve hücre morfolojilerini görselleştirmek için taramalı elektron mikroskobu kullanılarak alınan görüntüler Şekil 4.54' te verilmiştir. 24 saat inkübasyon sonucunda *E. coli* W3110 suşu, *E. coli* 35218 ile karşılaştırıldığında aralarındaki farklılık göze çarpmaktadır. *E. coli* W3110 suşu SEM görüntüsünde hücreler arasında bir değişim gözlenmezken, *E. coli* 35218 suşunda hücreler arasında oluşan EPS maddeleri mevcuttur. Elde edilen mutantlar *E. coli* W3110 ile karşılaştırıldığında *ompA*, *ompC* ve *lamB* suşlarında hücreler arasında zincir şeklinde birbirine tutunmuş yapılar gözlemlenmiştir. *E. coli* W3110 da ise bu yapılar gözlenmemiştir.

A)

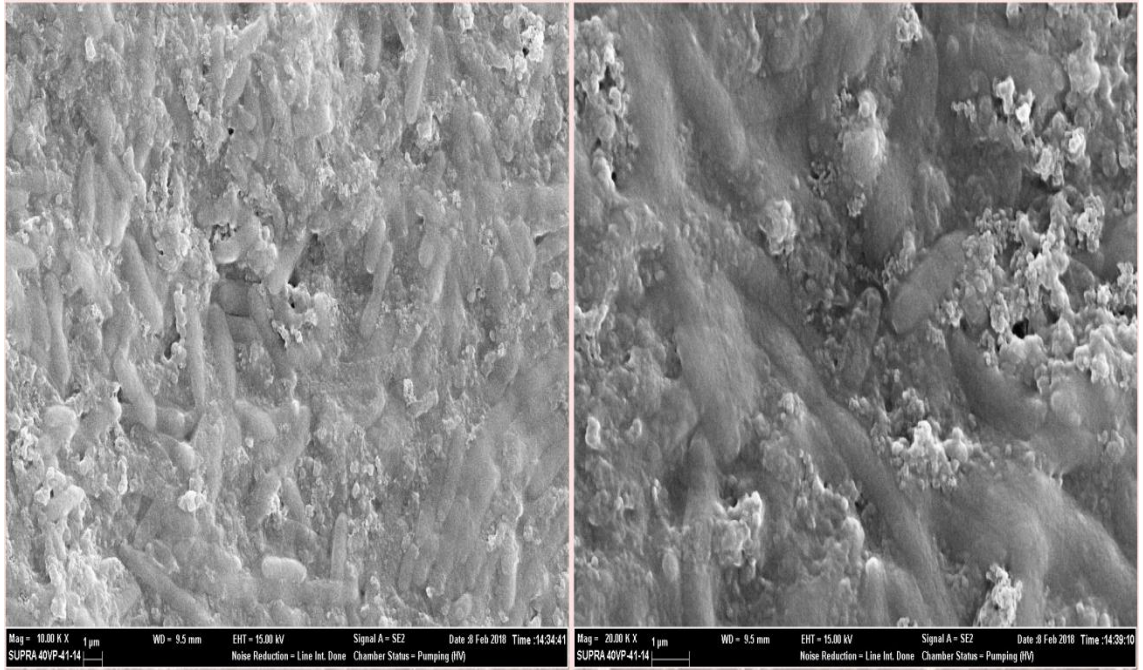


B)

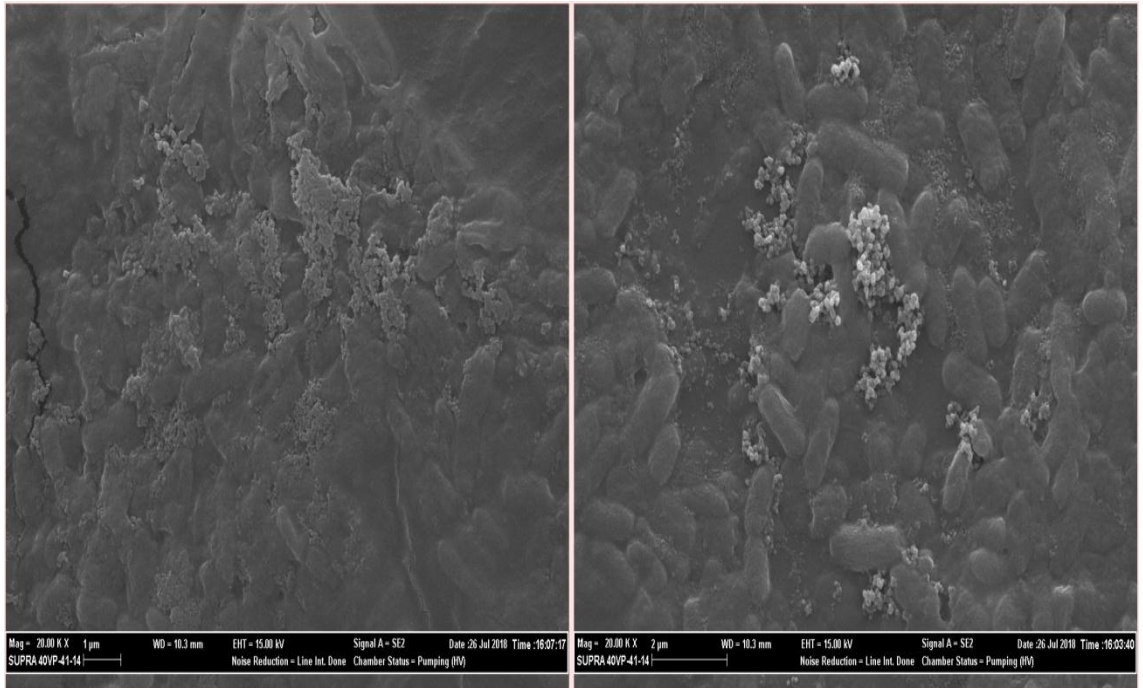


Şekil 4. 54. *E. coli* W3110 ve *E. coli* 35218 taramalı elektron mikroskop görüntüleri.

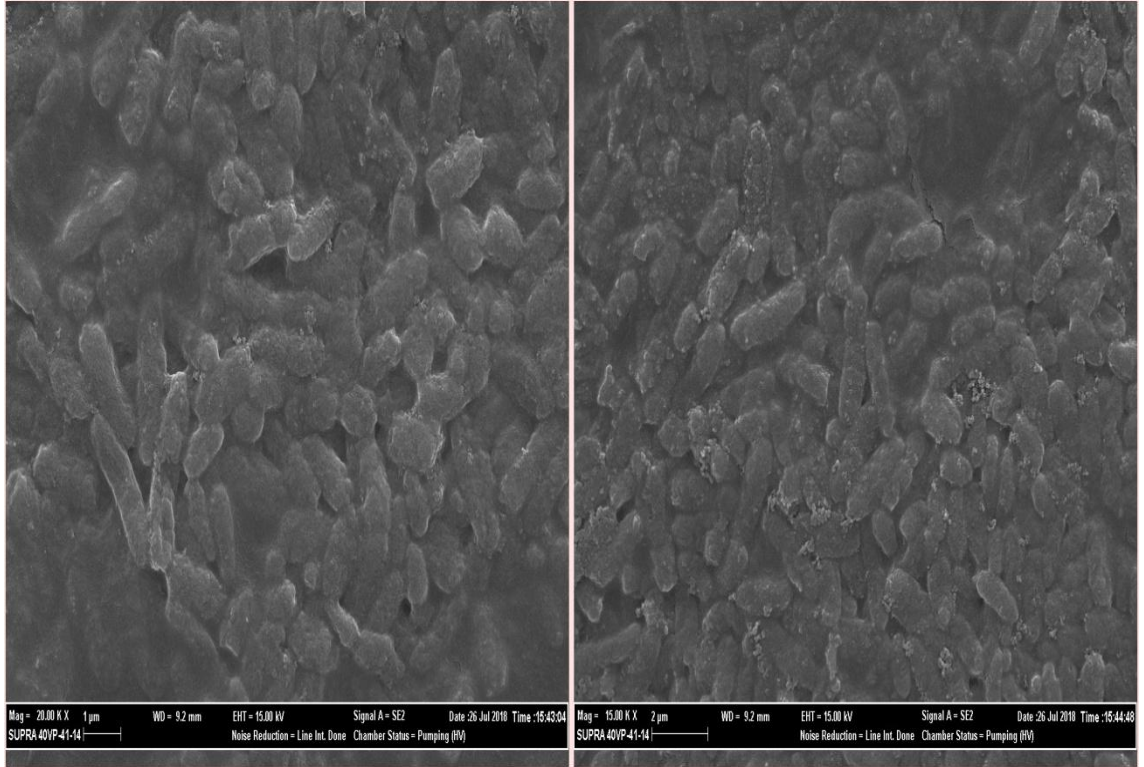
(A: *E. coli* W3110 suşunun 24 saat pH 7 LB ortamında görüntüsü. Büyütme, X10.000-20.000. B: *E. coli* 35218 suşunun 24 saat sonra pH 7 LB ortamında biyofilm görüntüsü. Büyütme, X 15.000-30.000)



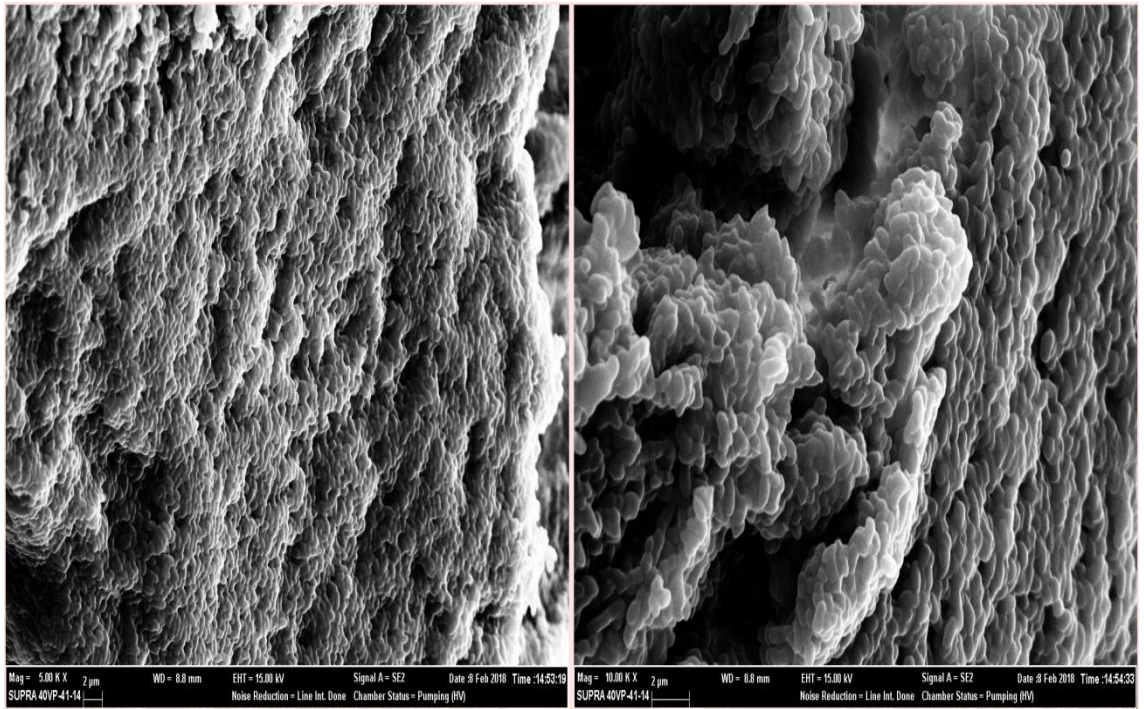
Şekil 4. 55. *ompA* mutant *E. coli* suşunun 24 saatlik inkübasyonu sonrası sıvı ortamdan alınan bakterilerin SEM görüntüsü. (Büyütme, X10.000, 20.000).



Şekil 4. 56. *ompC* mutant *E. coli* suşunun 24 saatlik inkübasyonu sonrası sıvı ortamdan alınan bakterilerin SEM görüntüsü. (Büyütme, X10.000, 20.000).



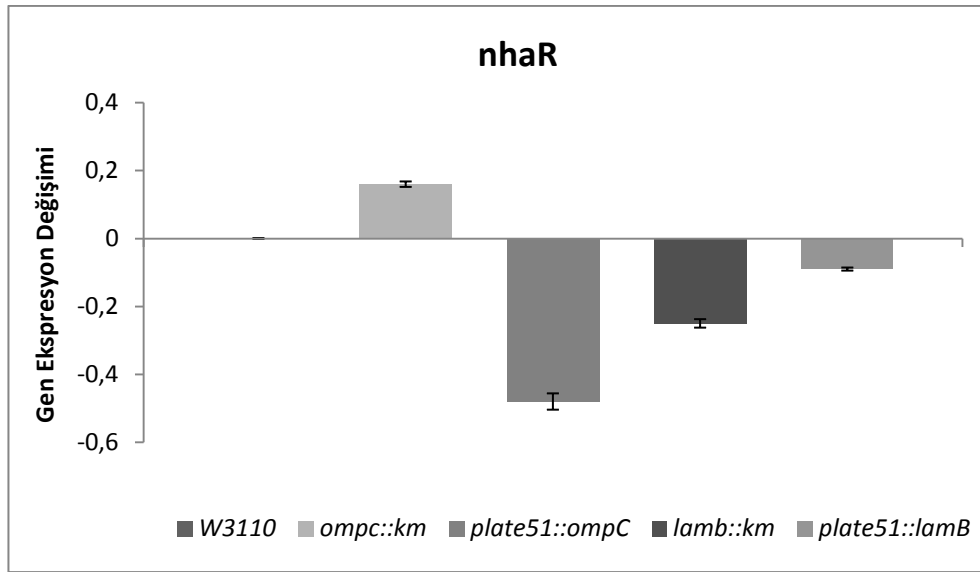
Şekil 4. 57. *lamB* mutant *E. coli* suşunun 24 saatlik inkübasyonu sonrası sıvı ortamdan alınan bakterilerin SEM görüntüsü. (Büyütme, X15.000, 20.000).



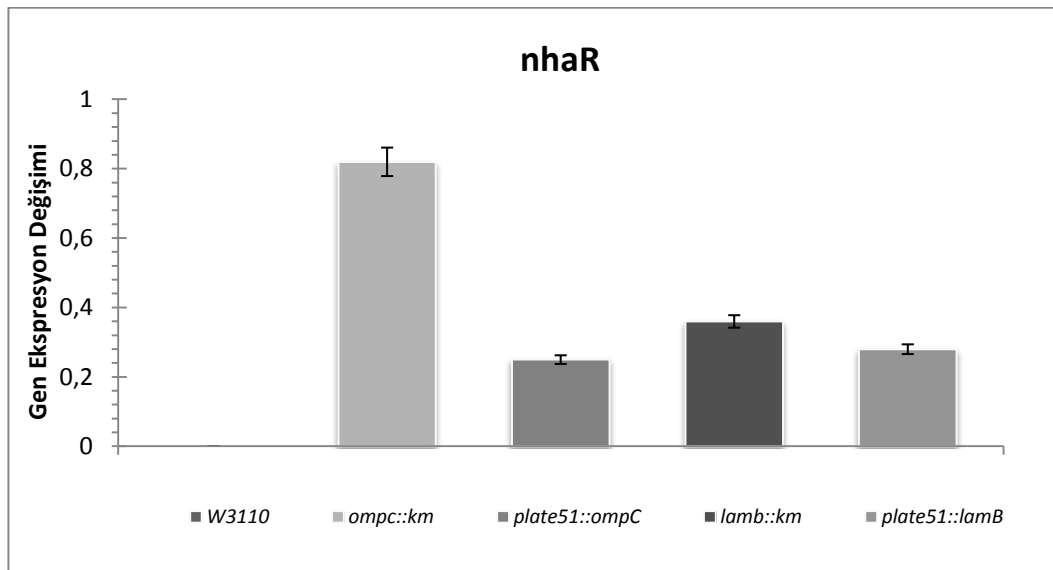
Şekil 4. 58. *ompA* ve *ompC* mutantlarına ait 24 saatlik biyofilm kütesinin SEM görüntüsü. (Büyütme, X5.000, 10.000).

4.12 Gerçek zamanlı PZR (Real-Time PCR) Sonuçları

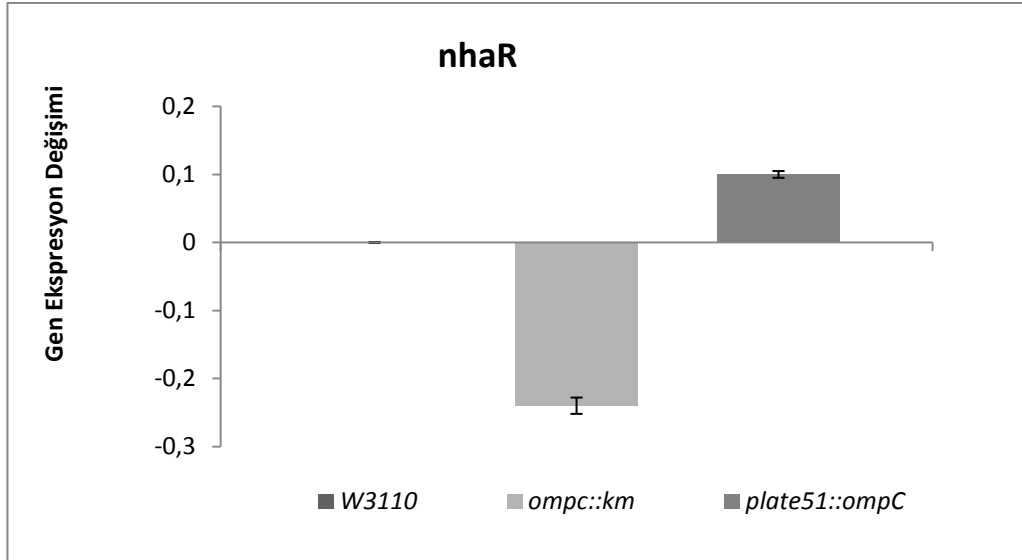
Biyofilm de rolü olduğu düşünülen genlerin ekspresyon seviyelerini incelemek için gerçek zamanlı PZR kullanılmıştır. *nhaR* ve *ygiU* genlerinin ekspresyon seviyeleri, gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. pH 6, 7 ve 8 değerlerinde ve *ompA* için pH 7.5 ortamında her birini temsil eden iki bağımsız kültürden izole edilmiş RNA kullanılarak yapılan çalışma sonucunda, gözlemlenen gen ekspresyonu katları *nhaR* için, asidik pH ortamında ekspresyonunda artış mevcuttur, alkali pH değerinde ise daha az eksprese edildiği tespit edilmiştir. pH 6'da W3110'a göre *ompC::km* mutantında *nhaR* ekspresyonu daha fazla görülürken komplementte bu ekspresyon W3110'a göre daha az olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla *ompC* geni mutant olduğunda *nhaR* miktarı artmaktadır. Aynı şekilde pH 6'da biyofilm oluşturmayan *lamB* mutantının *nhaR* ekspresyonu W3110'dan daha az olduğu belirlenmiştir. Komplementinde ekspresyon seviyesi W3110'dan daha az olduğu görülmektedir. pH 7 ortamında ise iki suşta da biyofilm üretimi gözlemlenmiştir ve *ompC* ve *lamB* mutantlarında *nhaR* geninin ekspresyonunda *E. coli* W3110'a oranla artış tespit edilmiştir. Fakat biyofilm oluşumu tespit edilmeyen komplement hücrelerde de *nhaR* ekspresyon seviyesinde artış görülmektedir. Bu sonuçlara göre iki mutantın iki farklı pH değerindeki *nhaR* ekspresyon seviyesindeki farklılık nedeniyle biyofilm oluşumunun *nhaR* ekspresyon artışıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Biyofilm oluşumu gözlemlenen pH 8 ortamında ise *ompC* mutantında *nhaR* geninin ekspresyonunda azalma görülmektedir. Ve pH 7.5 değerinde yapılan çalışmada da biyofilm üretimi pozitif olan *ompA* mutantında da *nhaR* geninin ekspresyon seviyesinde W3110'a göre azalma tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumunda rolü olduğu düşünülen *nhaR* geninin ekspresyonunun asidik ve alkali ortam değerlerinde biyofilm oluşturan suşlarda değiştiği gözlemlenmiştir. Bu veriler sonucunda *nhaR* geninin ekspresyon seviyesinin değişiminin biyofilm oluşumunda rolü olabileceği, fakat tek başına yeterli olmadığı ifade edilebilir.



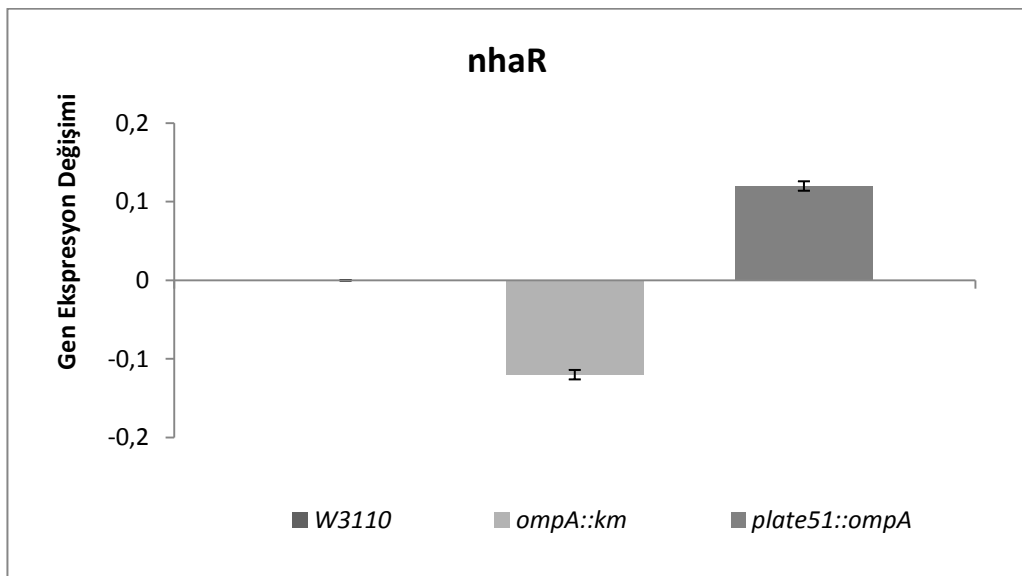
Şekil 4. 59. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *nhaR* geninin ekspresyon seviyesi.



Şekil 4. 60. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *nhaR* geninin ekspresyon seviyesi



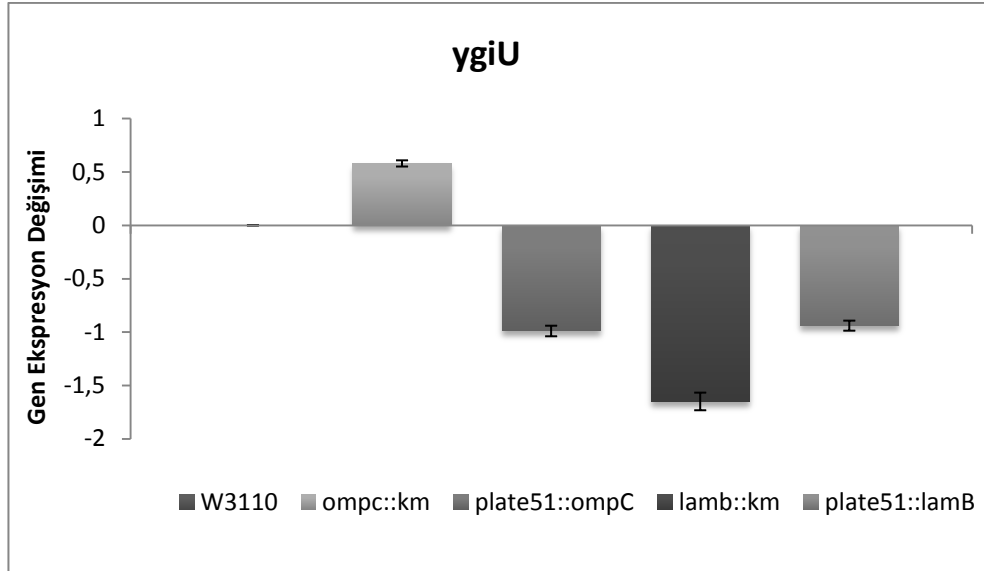
Şekil 4. 61. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *nhaR* geninin ekspresyon seviyesi



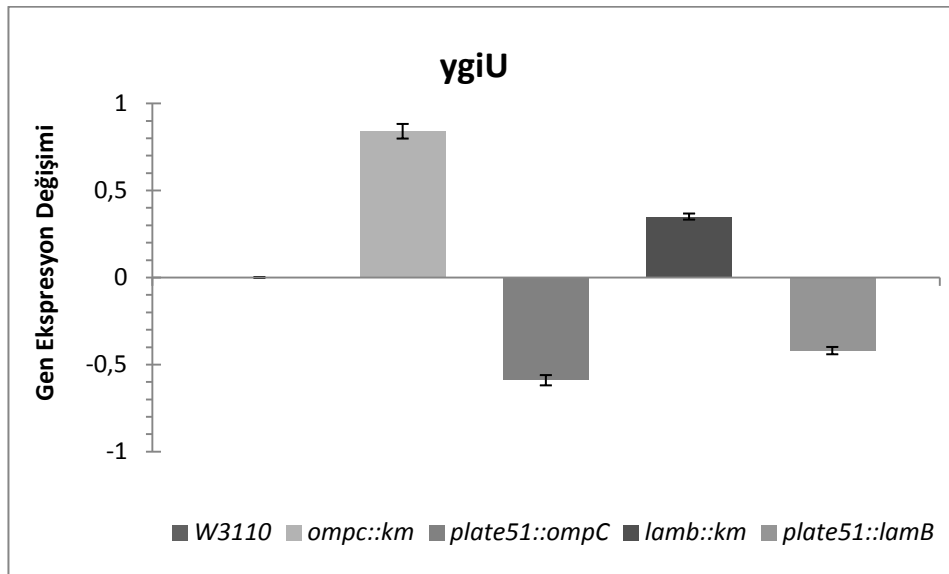
Şekil 4. 62. pH 7.5 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *nhaR* geninin ekspresyon seviyesi

Biyofilm oluşumu gözlenen *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutantlarında gerçek zamanlı PZR ile *ygiU* ekspresyonunun seviyesi kontrol edildiğinde, biyofilm oluşumu gözlemlenen pH 6 ortamında *ompC* mutantında *ygiU* geninin *E. coli* W3110'a oranla daha fazla eksprese edildiği, bu pH değerinde biyofilm oluşumu gözlemlenmeyen *lamB* mutantında ise *ygiU*'nun ekspresyonunun W3110'a oranla daha az olduğu belirlenmiştir. Komplement hücrelerde *ygiU* geni tüm pH değerlerinde yabancı tipe oranla daha az eksprese edilmiştir. Bu sonuç biyofilm oluşumunda *ygiU*'nu rolünü kısmen açıklamaktadır. pH 7 ortamında biyofilm oluşumu tespit edilen *ompC* ve *lamB* mutantlarında *ygiU*'nun ekspresyon seviyesinde W3110'a oranla artış gözlenmektedir. Ve bu değerde iki mutantta da biyofilm oluşumu pozitif olmasının, fakat komplement hücrelerde bu olgunun görülmemesinden dolayı bu hücrelerde *ygiU* geninin ekspresyon seviyesinde azalma tespit edilmiştir. *ompC* mutantında pH 8 ortamında biyofilm gözlemlenmiştir ve *ygiU* ekspresyon seviyesinde de artış tespit edilmiştir. pH 8 ortamında *lamB* mutantında biyofilm oluşumu gözlenmemiştir bu yüzden sonuçun pH 6 değerine benzer çıkması beklenmektedir. Biyofilm oluşumu gözlenen ortamlarda *ygiU* ekspresyon seviyesinin *E. coli* W3110'a oranla daha fazla olduğu, biyofilm oluşturmayan ortamlarda mutantlardaki ekspresyon seviyesi W3110'na oranla azaldığı yapılan çalışmalarla gözlemlenmiştir. Komplement suşlarda ise tüm pH ortamlarında *ygiU* geninin ekspresyonunda ise azalma tespit edilmiştir. Ve biyofilm oluşumunda porinlerin görevinde haberleşme sisteminin etkin olduğu düşünülmektedir.

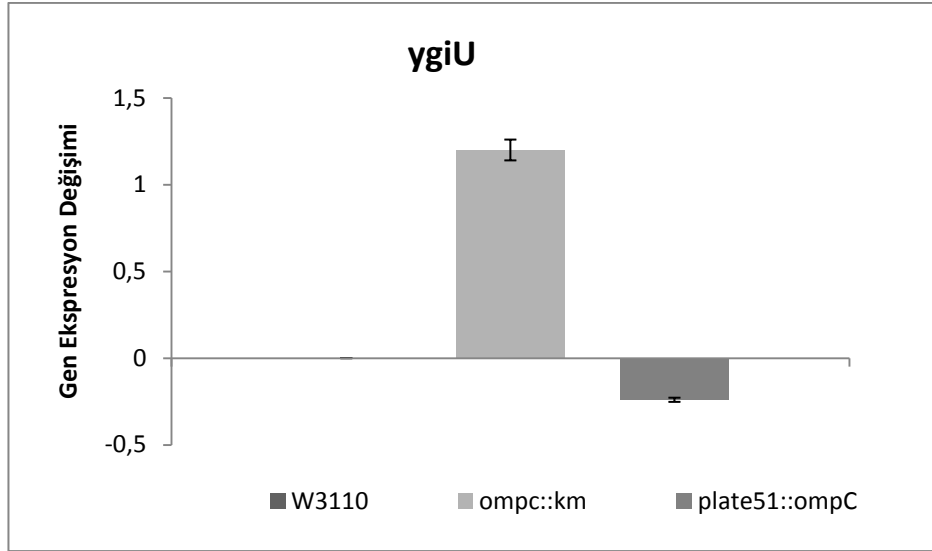
Bu veriler beraber değerlendirildiğinde asidik ortamlarda *nhaR* geninin ekspresyonunda artış, alkali ortamlarda ise *nhaR* geninin ekspresyonundaki azalma tespit edilmesi ve bu eşitsizliğe rağmen aynı suşların biyofilm oluşturabilmesi göz önüne alındığında sadece *nhaR* ve biyofilm oluşumu ile ilgili yorum yapmak mümkün değildir fakat *ygiU* geninin kullanılan ortam değerlerinde biyofilm üretimi pozitif olan suşlarda ekspresyonunun artması ve biyofilm oluşumu gözlemlenmeyen ortamlardaki mutantlarda ise *ygiU* geninin ekspresyon seviyesindeki azalmanın tespit edilmesiyle porin proteinlerinin QS mekanizması kontrolünde biyofilm oluşturabileceği ve yüzey proteinlerinin etkinleştirerek yüzeyde sağ kalımı sağlayabileceği önerilmektedir.



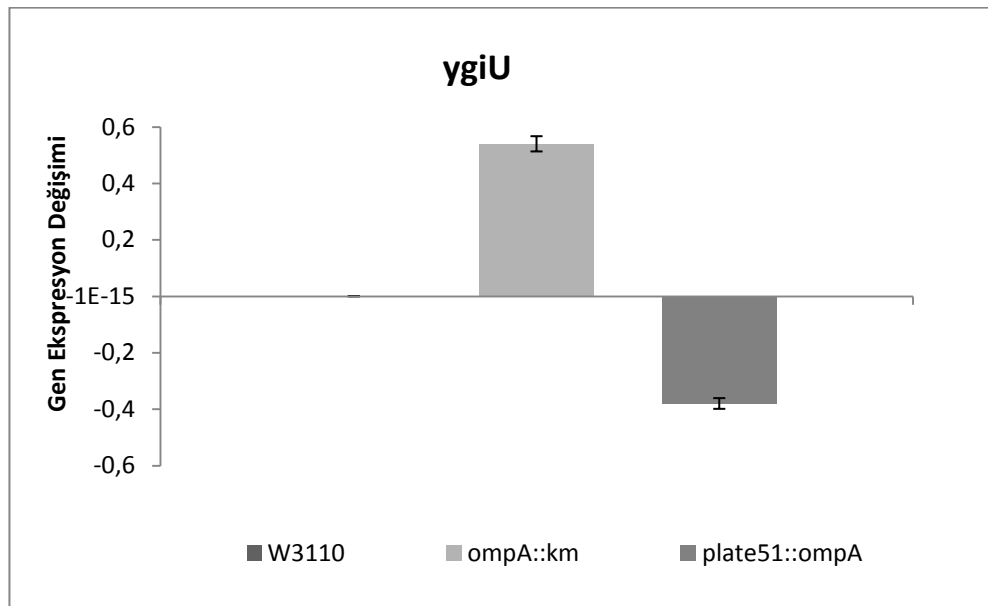
Şekil 4. 63. pH 6 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *ygiU* geninin ekspresyon seviyesi



Şekil 4. 64. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *ygiU* geninin ekspresyon seviyesi

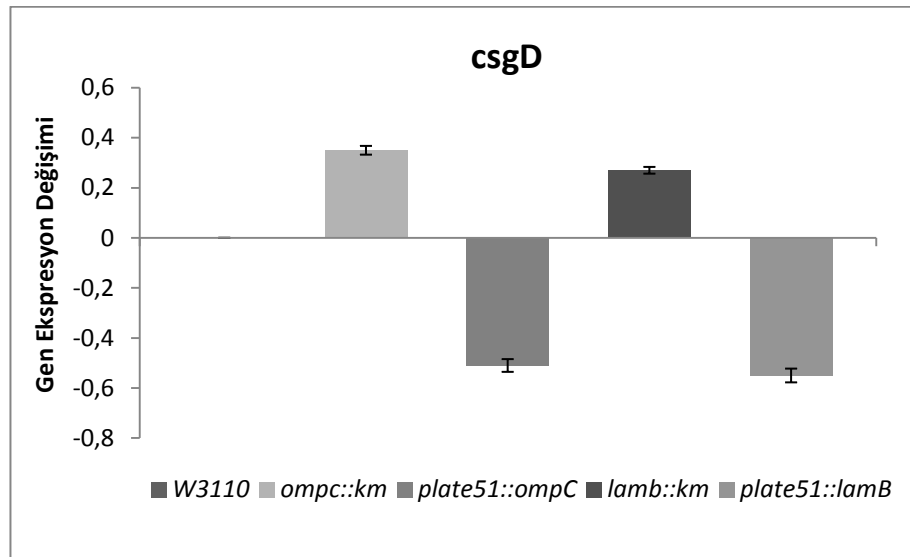


Şekil 4. 65. pH 8 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *ygiU* geninin ekspresyon seviyesi



Şekil 4. 66. pH 7.5 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *ygiU* geninin ekspresyon seviyesi

Curli oluşumunu ve biyofilmdeki rolünü test etmek için kongo kırmızılı agar besiyerinde yapılan çalışmalarda *ompC* ve *lamB* mutantlarının curliyi ifade ettiği tespit edilmiştir. Kongo kırmızıya bağlanma özelliğini ve biyofilm oluşumuyla ilişkisi doğrulama amacıyla yapılan gerçek zamanlı PZR sonuçlarında pH 7 ortamında büyütülen hücrelerde 24 saatlik inkübasyon ardında *ompC* mutant *E. coli* ve *lamB* mutant *E. coli*'de *csgD* geninin ekspresyon seviyesinde *E. coli* W3110 yabani tipe oranla daha fazla eksprese edildiği tespit edilmiştir. Komplement hücrelerde ise W3110'dan daha az ekspresyon mevcuttur ve biyofilm oluşumu komplement hücrelerde mevcut değildir. Bu sonuç Şekil 4. 52'de verilen morfoloji farklılıklarındaki *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutant suşlarında curli oluşumunun biyofilme katkısını açıklamaktadır.



Şekil 4. 67. pH 7 ortamında gerçek zamanlı PZR ile *csgD* geninin ekspresyon seviyesi

5. TARTIŞMA-SONUÇ

Mikroorganizmalar, doğal ortamlarında hayatlarını devam ettirebilmek için ve çevresel uyaranlara karşı koyabilmek için çeşitli savunma veya direnç sistemleri geliştirmek zorundadırlar. Biyofilm oluşumu bu savunma sistemlerinin en önemlilerindedir. Her ne kadar mikroorganizmalar için avantaj olsa da insan ve diğer canlılar için büyük bir tehittir. Bir çok çevresel etkenlere maruz kalan ve bu stresler altında biyofilm oluşturan *E. coli*, insan yaşamı için de sorun haline gelmektedir. *E. coli*, insan vücudunun dışında, oligotrofik su ve toprakta da gelişebilmektedir (Gordon ve Cowling, 2003). Tatlı sulara ve içme suyu kaynaklarında *E. coli* içeren biyofilmler tespit edilmiştir (Moreira, vd., 2012; Ahmed, vd., 2013). Tıbbi, endüstriyel ve çevresel ortamlardaki olumsuz etkilerinden dolayı bakteriyel biyofilmlerin önemi açıkça görülmektedir. Biyofilm oluşumunun çevresel koşullar, düşük sıcaklık, pH ve besin varlığı veya yokluğu gibi fiziksel faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (Arnold ve Silvers, 2000; Lindsay, vd., 2002; Çiftçi, 2005). Bu nedenle biyofilm oluşumunun altında yatan moleküler mekanizmaların açığa kavuşturulması hem bakteriyel yaşamı öğrenme ve anlama açısından hemde onlarla mücadele etmede oldukça önemlidir.

Yüze tutunan veya serbest yüzen bakterilerin direnç mekanizmalarının biyokimyası ve moleküler mekanizmasının anlaşılmasına yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Prigent-Combaret, vd., 2000; Ma ve Wood, 2009). Bununla birlikte, biyofilm oluşumu ve bu oluşumun moleküler mekanizması veya etkileyen faktörler hakkında çok az şey bilinmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda pH, açlık ve osmotik stresin bakteri yaşamına etkileri olduğu açıkça görülmektedir (Booth, 1985; Fletcher, 1988; Danese, vd., 2000; Stancik, vd., 2002; Jackson, vd., 2002b; Sauer, vd., 2004; Gjermansen, vd., 2005; Thormann, vd., 2005; Hostacka ve Ciznar, 2007; Hostacka, vd., 2010). Dış membran proteinleri (omp); birçok çevresel şart altında membrandaki oranları değişebilen ve besin alımında rol oynayan pasif diffüzyon kanalları olarak görev yapmaktadır. Porinlerin yokluğunda *E. coli*'nin ve diğer bakterilerin yaşamında ciddi sorunlar meydana geldiği, doğada farklı stres şartları altındaki yaşam oranının azaldığı belirlenmiştir (Özkanca, 1993; Liu ve Ferenci, 1998; Darcan, vd., 2001). Bu nedenle porinlerin bakterilerin biyofilm oluşumundaki rolleri, varsa bu roldeki bazı çevresel faktörlerin etkileri bu çalışmada araştırılmıştır.

E. coli'nin bir çok farklı suşu bulunmaktadır. ML30, W3110, ATCC 35218, MG1655, EPEC (İntestinal Patojenik *E. coli*), EHEC (Enterohemorajik *E. coli*), BW25113, EAEC (Entero agregativ *E. coli*) bunlardan bazılarıdır. Aynı şartlar altında bu suşlardan bazıları biyofilm oluştururken, bazılarının biyofilm oluşturmadığı bilinmektedir (Somorin, vd., 2018). *E. coli* BW25113 suşlarında kolanik asitin fazla sentezlenmesinden dolayı biyofilm oluşumunun inhibe edildiği bildirilmiştir (Zhang, vd., 2008). Ma ve Wood, (2009) çalışmalarında *E. coli* BW25113 yabancı tipin cam yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturmadığını bildirmişlerdir. *Escherichia coli*'nin MG1655 laboratuvar suşunun ise sadece sınırlı miktarlarda curli ve selüloz ürettiği bildirilmiştir. Fakat MG1655'in *csgD*' yi aşırı eksprese eden suşunda selüloz üretimini olumsuz yönde etkileyerek biyofilm oluşumunu engellediği de aynı çalışmada tespit edilmiştir (Gualdi, vd., 2008). Enteroagregative *E. coli*'nin (EAEC) hücre yüzey organelleri vasıtasıyla belirli koşullar altında biyofilm oluşturabildiği bildirilmiştir (Sheikh, vd., 2001). Başka bir çalışmada ise *E. coli* K-12'nin hareketliliğinin, sıvı veya yarı sıvı ortam içinde yüzmeleri için flagellar aparata bağımlı olduğunu ayrıca flagella'nın sadece yüzme amacıyla değil bakterilerin yüzeye yayılmasına da izin verebildiği gösterilmiştir (Pratt ve Kolter, 1998). Son zamanlarda, *E. coli* K-12'de hareketlilik ile ilgili bazı genler mutant yapıldığında biyofilm oluşturma kapasiteleri elde ettiği bildirilmiştir (Wood, vd., 2006). Çalışmamızda kullandığımız *E. coli* W3110 suşu, kullanılan şartlar altında biyofilm oluşturmamıştır. Ancak kullanılan bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu, ortama ilave edilen poliamin (putresin) vasıtasıyla gösterilmiştir (Şekil 4.6). *E. coli* K-12 laboratuvar suşları, biyofilm oluşum genleri taşımalarına rağmen her ortamda curli veya selülozu ifade etmemektedir (Collinson, vd., 1991; Olsen, vd., 1993a; Hammar, vd., 1995; Dorel, vd., 1999; Prigent-Combaret, vd., 2000). Ancak, *E. coli*'nin bazı laboratuvar suşları, inert yüzeyleri kolonize edemezken, bazı suşları ise endüstriyel süreçler için sürekli kültürde muhafaza edildiğinde kültür aparatının duvarında çıplak gözle görülebilen, kalın bir biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Hidrofilik ve hidrofobik yüzeyleri kolonize etme ve kümeleniği yine aynı çalışmalarda bildirilmiştir (Dykhuizen ve Hartl, 1983; Vidal, vd., 1998). Ayrıca, selüloz üretiminin enterobacteriaceae'nin bazı morfotiplerinde biyofilm oluşumu için gerekli olduğu da bildirilmiştir (Solano, vd., 2002; Zogaj, vd., 2003). Fakat bazı araştırmacılar çalışmalarında *E. coli* K-12'nin bazı suşlarında selüloz ve

biyosentetik genler mevcut olmasına rağmen, bu suşun çevresel koşullar altında biyofilm oluşturmadığı bildirmiştir (Zogaj, vd., 2000; Dyer, vd., 2007; Truhlar, vd., 2015).

Plazmit gibi sonradan kazanılabilen özellikler ile *Escherichia coli* suşları biyofilm oluşturma yeteneği kazanmaktadır. Örneğin, *E. coli* K-12'nin doğal bakteri popülasyonlarında kendiliğinden biyofilm oluşturmadığı, ancak pili sentezlenmesine sahip konjugatif plazmitler vasıtasıyla kalın, olgun biyofilmlerin gelişimini sağladığı gösterilmiştir (Pratt ve Kolter, 1998; Ghigo, 2001; Sheikh, vd., 2001; Reisner, vd., 2003; Yang, vd., 2008). Lacqua, vd., (2006) yaptıkları bir çalışmada, *E. coli* K-12 MG1655'in P1 *vir* veya λ fajları ile karıştırıldığında, 24 saat içinde biyofilm oluşum kapasitesine sahip olduğunu göstermişlerdir. *E. coli* MG1655 suşları tarafından abiyotik biyofilm oluşumunun, bakteriyofaj saldırısından kaçmak için bir strateji oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Ek olarak, dış zar proteini Antijen 43, biyofilm oluşumunu fimbriadan bağımsız şekilde arttırır ve biyofilm oluşumunu kolaylaştırır (Danese, vd., 2000). İnce agregatif fimbrialar olarak adlandırılan curli ise biyofilm oluşumunu arttıran başka bir dış yüzey eklentisidir (Smyth, vd., 1996; Vidal, vd., 1998). Bazı *E. coli* suşları her ortamda biyofilm oluşturabilirken, bazı suşların biyofilm oluşturması için olması gereken şartlar bulunmaktadır. Çalışmamızda kullanılan biyofilm pozitif olduğu bilinen referans *E. coli* 35218 suşu Zn hariç çalışılan tüm deneysel şartlarda biyofilm oluşturduğu görülürken, W3110 suşu sadece poliamin ilave edildiği zaman biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. *E. coli* türlerinin farklılığında biyofilm oluşum kapasitesinin değiştiği, aynı cinsin iki suşunun aynı ortam şartlarında farklı etkilendiği ifade edilebilir.

E. coli'nin biyofilm oluşumunu çeşitli genler kontrol etmektedir (Vidal, vd., 1998; Adams ve McLean, 1999; Dorel, vd., 1999; Prigent-Combaret, vd., 2001; Corona ve Membrillo, 2002; Jackson, vd., 2002a, 2002b). Biyofilm gelişimi sırasında, planktonik büyüme ile karşılaştırıldığında *E. coli* genomunun % 1.84'ünü temsil eden 79 genin ekspresyonunun önemli ölçüde değiştiği bildirilmiştir (Prigent-Combaret, vd., 1999; Otto, vd., 2001). Bu genlerden *csgBA* ve *csgDEF* genlerinin *E. coli*'de curli oluşumunda rol oynadığı bilinmektedir. Bu genlerin genetik organizasyonu ve transkripsiyonel regülasyonu *E. coli* ve *Salmonella enterica serovar Typhimurium* suşlarında yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Farklı çevresel sinyaller biyofilm

oluşumunda bu genlerin ekspresyonunu etkilemektedir (Römling, vd., 1998). Fakat *E. coli*'nin MC4100 ve MG1655 suşlarında, *csgBA* genlerinin varlığında biyofilm oluşumu gerçekleşmediğini bildirmiştir. Çünkü *csgD* aşırı eksprese eden suşunda selüloz üretimi, hidrofobik polipropilen (PP) mikrotitre plakaları üzerinde curli aracılı yüzey yapışmasını ve agregasyonu olumsuz yönde etkilemektedir (Prigent-Combaret, vd., 2001; Gualdi, vd., 2008).

pH'in Biyofilm Oluşumuna Etkisi: Dünya yüzeyi üzerinde oldukça farklı pH değerlerine sahip birçok ortam bulunmaktadır (Saito ve Kobayashi, 2003). Çoğu mikroorganizma en iyi, pH 6.5, 7.0 değerlerinde büyümektedir. Fakat bazıları çok asidik (örn., *Acetobacter*) veya alkali koşullarda da (örn., *Candida*) büyüebilmektedir (Sokollek, vd., 1998; Cleenwerck, vd., 2002). Bilindiği üzere *E. coli de*, geniş bir pH aralığında (pH 4.4 ila 9.2) büyüebilmektedir (Stancik, vd., 2002). Çalışmamızda kullanılan yabancı tip ve porin mutantları asidik ortam ya da alkali ortamda büyüme açısından farklılık sergilemektedirler. Elde edilen sonuçlara göre, büyüme açısından 5.5, 7 ve 8 pH değerlerinde fark mevcuttur (veriler verilmemiştir). En iyi büyümeyi pH 7 ortamında sağlayan *E. coli* W3110 ve porin mutant suşları asidik ortam olan 5.5 değerinde gelişimi sınırlanmaktadır. Alkali ortamda ise asidik ortamdaki büyüme oranları yine daha azdır. Yapılan araştırmalarda, pH değerindeki değişikliklerin, bakteriyel büyüme üzerinde belirgin bir etkiye sahip olabildiği bildirilmiştir (Rowland, 2003). Bu bilgiyi doğrulayan veriler çalışmamızla uyumludur. Başka bir çalışmada pH'daki değişikliklerin, mikroorganizmalar üzerinde biyosidal etkiye neden olmasından dolayı bakterileri öldürmek için kullanılabilmesi vurgulanmıştır (Olson, 1993; Rowland, 2003).

Bakterilerin insan vücudu ya da çevresel ekosistemlerde hayatta kalabilmek ve büyümelerini devam ettirebilmek için, dış ortamın pH'sındaki ekstrem değişikliklere karşı koymaları gerektiği bilinmektedir (Foster, 2000; Slonczewski, 2000; Stancik, vd., 2002; Hostacka, vd., 2010). Bu yüzden bakterilerde, pH stresine karşı hücrenin korunmasında görev alan mekanizmalar bulunmaktadır (Olson, 1993; Slonczewsk, vd., 1996; Foster, 2000). Ve bu nedenle bakterilerin, yaşaması ve üremeleri zor olan şartlarda nasıl hayatta kaldığına dair mekanizmaların açıklanması için birçok çalışma yapılmıştır ve hala çalışmalar devam etmektedir (Hostacka ve Ciznar, 2007; Hostacka, vd., 2010). Bu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilen yaşam stratejilerinden biri

biyofilm tabakasının varlığıdır ve bu mikroorganizmalar için avantajdır. Biyofilm oluşumu bakterilerin kendilerine dış ortam değişkenlerinden korumak için kullandığı sistemdir. Kendini bu güvenilir sistem içine hapseden bakteri hem hayatta kalmak için uygun ortam oluşturur. Ayrıca antibiyotik veya metallerin hücrelere etkisini azaltır hem de değişen pH'dan etkilenmeyerek yaşamsal faaliyetlerini devam ettirdiği bilinen bir gerçektir. Aynı zamanda pH değişiklikleri bakterilerin çeşitli metabolik süreçlerini bozarak biyofilm gelişimini de desteklediği bilinmektedir (Garrett, vd., 2008). Birçok çalışmada, sıcaklık ve pH'ın biyofilm oluşumuna sebep olduğu bildirilmektedir (Del, vd., 2015; Di Bonaventura vd., 2007; Marsh, 2009; Hostacká, vd., 2010; Nostro, vd., 2012). Bu araştırmalar sonucunda polisakkarit üretimi için optimum pH'ın bireysel türlere bağlı olduğu gösterilmiştir. Ancak çoğu bakteri için pH 7 civarında en iyi EPS üretiminin gerçekleştiğine dair çalışmalar mevcuttur (Oliveira, vd., 1994; Hostacká, vd., 2010). Fakat bu durumdan kesin ve genel bir sonuç çıkarılamaz, çünkü çevresel faktörlere karşı etki yine türlere bağımlı olarak değişmektedir. Heyde, vd., (1987) yüksek pH'ta bakteri hücre duvarının dış zarındaki porinlerin genişlemesinin, karbon birikmesine ve dolayısıyla daha yüksek bir yapışmaya katkıda bulunabileceğini belirtmiştir. Çalışmamız sonucunda; *E. coli* W3110 porin proteinlerinin varlığına rağmen asidik, nötr ve alkali pH değerlerinde biyofilm oluşturmamıştır. Fakat *ompA*, *ompC* ve *lamB* porin mutant asidik, nötr ve alkali pH değerlerinde biyofilm oluşturmuş ve bu oluşum oranlarında farklılık gözlenmiştir. *lamB* mutant *E. coli*'de pH 7 ve 7.5 değerlerinde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Ve oluşan biyofilm zayıf biyofilm olarak nitelendirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilerde, *ompC* mutant *E. coli*'de pH 7'ye göre zayıf olsa da hem asidik ortam hem de alkali ortamlarda biyofilm oluşumu gözlenmiştir. *ompA* mutant *E. coli* suşunda ise, biyofilm oluşumu pH 6.5 ortamında başlayarak daha yüksek pH değerlerinde biyofilm oluşumunun aynı seviyede devam ettiği gözlenmiştir. Yine çalışmamızda referans suş olarak kullanılan *E. coli* 35218 suşu da kullanılan pH değerlerinde (5.5, 6.0, 6.5, 7, 7.5 ve 8) biyofilm oluşumları karşılaştırıldığında tüm değerlerde kuvvetli biyofilm oluşumu sergilemektedir. *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* gibi farklı mikroorganizmalarla yapılan pH denemelerinde artan pH ile biyofilm üretiminde artış gözlendiği bildirilmiştir. pH 5.5, 7.5 ve 8.5 ortamlarında yapılan çalışmalarda en fazla biyofilm oluşumunun pH 8.5 değerinde gözlenmiştir (Hostacka, vd., 2010). Artan pH ve biyofilm üretimi arasındaki

benzer ilişki de *Stenotrophomonas maltophilia*'da gösterilmiştir (Di, vd., 2007). Yani, ortamının pH değeri ile biyofilm oluşumu arasındaki bir korelasyon bulunmaktadır. Fakat bu durumun türlere bağlı olarak değişebileceği unutulmamalıdır. *E. coli*'nin bu kadar farklı pH ortamlarında biyofilm oluşturma veya oluşturmama yeteneği olmasına karşın moleküler mekanizma incelemelerinde bu değişimin *nhaR* ekspresyonu sebebiyle olabileceğine dair bulgular bulunmaktadır. Ve bu bulgularda PgaABCD operonunun transkripsiyonu için NhaR'nin gerekli olduğu bildirilmiştir (Goller, vd., 2006). *E. coli*'de PgaABCD operonunun, yüksek pH veya yüksek Na⁺'ya yanıt olarak NhaR'nin bağlanmasıyla aktive edildiği de bilinmektedir. *E. coli*'de *nhaAR*'in transkripsiyonunun, ortamın pH'sının 6.5'ten 8.5'e çıkarılmasıyla arttığı yapılan çalışmada gösterilmiştir (Dover, vd., 1996; Dover ve Padan; 2001). Çalışmamızda da, asidik ve alkali değerler karşılaştırıldığında *ompC* mutant *E. coli*'de *nhaR*'nin asidik ortam denemelerinde ekspresyon seviyesinde artış gözleendiği, alkali ortamda ise ekspresyon seviyesinde azalma olduğu ve pH değerinin 6.0'dan 7.78 değerine çıktığı gösterilmiştir. Yine aynı mutantta azalan *nhaR* ekspresyonu seviyesinde pH 8 ile başlayan ortam değerinin 8.10 ile sonlandığı gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise, yüksek tuz konsantrasyonlarının ve alkalın pH'ın biyofilm oluşumunu arttırdığı ve bu etkinin katyon-duyarlı düzenleyici protein NhaR'ye bağlı olduğunda gösterilmiştir (Goller, vd., 2006). Ayrıca *Shewanella oneidensis*'in alkali pH'ya maruz kalması *nhaA* ve *nhaR*'nin artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Leaphart, vd., 2006). Çalışmamızda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, pH 6'da biyofilm oluşumu ile *nhaR* korelasyonu ve pH 7'deki biyofilm oluşumu ve *nhaR* korelasyonu karşılaştırıldığında biyofilm oluşumunun daha fazla olduğu pH ortamında *nhaR* geninin ekspresyonunda da artış olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.57- Şekil 4.58). Fakat asidik ortamda görülen bu korelasyon alkali ortamda olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.59). *E. coli* porin mutantlarında alkalın pH'da biyofilm oluşumu azalmaktadır. Asidik pH değerinde de mutant suşların bağlanma oranlarında azalma gözlenmiştir. Aynı şekilde Nostro, vd., (2012) gerçekleştirdiği bir çalışmada alkali pH'ın bakteriyel adezyon üzerine etkisi *S. aureus* ve *S. epidermidis*'de çalışılmıştır ve alkalın pH değerinin bu mikroorganizmalar üzerinde bağlanma yeteneklerinin inhibisyonu ile sonuçlandığı tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada da, *S. aureus*'un nötr pH koşulları ile karşılaştırıldığında çok asitli (pH 3) ve çok alkali (pH 12) koşullarda, biyofilm

oluşturma yeteneğine sahip olmadığı gösterilmiştir (Zmantar, vd., 2010). Alkalin pH'ın bakterilerin yüzeye tutunmasını engelleyerek biyofilmi inhibe edici etkisi olduğu bulunmuştur. Fakat Goller, 2006'da yaptığı çalışmasında alkalin pH'ın biyofilm oluşumunu arttırdığını vurgulamıştır bunun NhaR'ye bağlı olduğunu söylemiştir. Literatür araştırmaları sonucu alkalin pH etkisinde biyofilm oluşumu değişkenlik göstermektedir. Bu veriler sonucunda bakteri hücrelerinin fizyolojik durumu ve çevredeki ortamın pH'sının dönüşümsüz tutunma (bağlanma) sürecinde çok önemli bir rol oynadığı gösterilmektedir. Fakat bu öncelikle türe bağlıdır farklı tür mikroorganizmalar benzer pH değerlerinde ki ortamlarda dahi olsalar aynı sonucu vermeyebilirler. Aynı türün farklı suşlarında dahi biyofilm oluşumu değişkenlik gösterebilmektedir. Çalışmamızda *E. coli* 35218 ile yapılan çalışmalarda kullanılan tüm pH değerlerinde bağlanma yeteneklerinin aktif olduğu ve yüzey kolonizasyonu sağlayarak tutunma gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir.

Bu çalışmaya farklı bir açıdan bakıldığında, eski zamanlardan beri insanlar için sorun haline gelen biyofilm, içinde bulunduğu ortamda asit oluşumu nedeniyle borularda korozyona neden olduğu bilinmektedir (Jayaraman, vd., 1997). Bu yüzden yüzeylerde aşınma sıklıkla karşılaşılan ve istenmeyen bir durumdur. Gıda sektöründe bu sorun maliyet açısından kayıplarla sonuçlanmaktadır. Fakat asıl soru her biyofilm oluşumu sonucunda asit oluşumu mevcut mudur? Çalışmamızda, pH denemelerinde deney koşulu olarak başlanılan tüm değerlerde (pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0) ortamın alkalileşmesine yol açmıştır. Bahl, vd., (1982) yaptıkları çalışma sonucunda da, *Escherichia coli*'nin asidik substratlar üzerindeki büyümesi, ortamın alkalileşmesine yol açtığını ve bunun karbon kaynağının metabolizmasının protonların tüketimi ile sonuçlandığını düşünmüşlerdir. Biyofilmin içinde bulunduğu ortam farklı yüzeylerde dahi gerçekleşmiş olsa her zaman asit üretimiyle sonuçlanmamaktadır. Bu çalışma sonucunda *E. coli* 35218 suşunda biyofilm oluşumu gözlemlenen 5.5 ortamında inkübasyon sonrası değer 6.97 ile sonlandığı gözlemlenmiştir.

Metallerin (Cu, Ni, Zn) Biyofilm Oluşumuna Etkisi: Metaller, çeşitli endüstriyel atık kaynakları, sanayi dumanları, kimyasal maddelerin bilinçsizce doğaya salınması ve atık çöplerden çevreye sokulan kalıcı çevresel kirleticilerdir. Aynı zaman da içme suyu depolarını ve tatlı su habitatlarını kirletir ve makro ve mikrobiyolojik toplulukları değiştirebilir (Ivorra, vd., 2000; Lefcort, vd., 2002). Ağır metal

toksitesinin bilinen mekanizmaları arasında oksidatif stresi indüklemeyi ve protein katlanma fonksiyonunu etkilemek bulunmaktadır (Nies, 1999). Ayrıca bakterilerde dış membran boyunca metallerin taşınımı porin proteinleri ile kolaylaştırılmış difüzyonla olmaktadır (Stenberg, vd., 2005). Bakteriler ağır metal stresini azaltmak için çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Bu mekanizmalar, ağır metallerin alınımını azaltılması, bir metalin daha az toksik bir türe indirgenmesini ve metalin hücrenin dışına doğrudan aktarılmasını içerir (Nies ve Silver, 1995; Nies, 1999; Outten, vd., 2000).

Ortamda var olan metaller aynı zamanda biyofilm oluşumunu etkilemektedir. Metaller tarafından indüklenen biyofilm oluşumunun, curli kodlayan genlerin transkripsiyonel indüksiyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir. Ayrıca metallerin varlığında aderans (yapışma) yapılarını kodlayan genler üzerindeki transkripsiyonel bir etki oluşturmasından dolayı biyofilm oluştuğu bildirilmiştir (Perrin, vd., 2009) Çalışmamızda kullanılan metallerden Ni ve Cu metalinin biyofilm oluşumuna bir etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Çünkü nikel ve bakır ilave edilmemiş pH 7 değerinde ki 24 saatlik inkübasyondan sonra da *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutantları biyofilm oluşturmuştur. *ompA* ve *lamB* porin mutantları metalle ve metalsiz ortamlarda birbirine yakın derecede biyofilm oluşturmuştur (Şekil 4.42, Şekil 4.43). Dolayısı ile çalışmamızda Ni ve Cu varlığının bir etkisine rastlanılmamıştır. Fakat *ompC* porin mutantında metalli ve metalsiz biyofilm denemelerinde önemli derecede fark mevcuttur (Şekil 4.42, Şekil 4.43). *E. coli* 35218 suşu ile yapılan çalışmada da metalsiz ortamda oluşan biyofilm, Cu ve Ni varlığında da gözlenmiştir. Perrin, vd., (2009) çalışmasında nikelin varlığında biyofilm oluşumunun indüklendiğini tespit etmişlerdir. Yazar çalışmasında nikelin biyofilm oluşumuna etkisinin curlinin ekspresyonunun artmasından kaynaklandığını bildirmiştir. Yine aynı çalışmada artan nikel konsantrasyonunun *Escherichia coli*'nin, yaşam tarzlarını değiştirerek, serbest yüzen hücreler olarak büyümek yerine biyofilm yapıları geliştirdiklerini göstermiştir. Başka bir çalışmada *Desulfovibrio desulfurican*'ların nikel varlığında adezyonun daha fazla olduğu bildirilmiştir (Lopes, vd., 2005). Argueta-Figueroa, vd., (2014) çalışmalarında nikel ve bakırın *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitesini araştırdıklarında bu metallerin varlığında biyofilm oluşumunun inhibe olmadığını tespit etmişlerdir. *Burkholderia cepacia* biyofilm oluşumunun, nikel nanopartikül varlığında azalma gösterdiği başka bir çalışmada

gösterilmiştir (Habibi, vd., 2017). 2013 yılında Mamonova, çalışmasında nikelin bakterisidal aktiviteye sahip olduğunu bu yüzden biyofilm oluşumunu engellediğini ve antibakteriyal olarak kullanılabilirliği üzerine çalışma gerçekleştirmişlerdir. Literatür araştırmaları sonucunda nikelin biyofilm oluşumu üzerine etkisinin mikroorganizmadan mikroorganizmaya farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla nikelin biyofilm oluşumunu arttırdığına yönelik çalışmalar bulunurken biyofilm oluşumunu engellediğine yönelik çalışmalarda olduğu görülmektedir. Baker, vd., (2010) çalışmasında, *Staphylococcus aureus* suşunda bakır varlığının biyofilm oluşumunun pozitif düzenleyicilerinin ifadesini bastırıldığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda metalsiz besi ortamında büyütülen *ompA*, *ompC* ve *lamB* mutant *E. coli* suşlarında 24 saat sonra görülen biyofilm oluşumunun, Cu ve Ni metallerinin aksine, Zn metali varlığında oluşmadığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla Zn metali varlığında biyofilm oluşumunun inhibe olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde referans suş olan *E. coli* 35218 tüm pH değerlerinde biyofilm oluştururken, ortama Zn ilave edildiğinde biyofilm oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu metalin varlığında hücreler normal seyirinde büyümeye devam etmiştir. Metal konsantrasyonu artırıldığında ise hücrelerde azalma gözlenmiştir. Shakerimoghaddam, vd., (2017) çalışmalarında üropatojenik *Escherichia coli* izolatları için kullanılan besi ortamlarında zayıf biyofilm üretimi gerçekleşirken, ortama Zn ilavesi sonrasında biyofilm oluşumunun tamamen inhibe edildiğini tespit etmişlerdir. Bu inhibisyonun izolatların % 30'unda biyofilm oluşumunun optik yoğunluğunu orta veya güçlü seviyeden zayıf seviyeye düşmesi olarak ifade etmişlerdir. Buna benzer başka çalışmalarda da ortama çinko eklendiğinde, *E. coli* için biyofilm oluşumunda önemli bir azalma olduğu bildirilmiştir (Wu, vd., 2013; Musarrat, vd., 2015). *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella typhimurium* ve *Haemophilus parasuis* gibi *E. coli* haricinde başka mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda çinko'nun biyofilmi zayıf bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Wu, vd., 2013). Bunları destekleyen başka bir çalışmada, Lee, vd., (2014) yılında gerçekleştirdiği deneyde, *P. aeruginosa* bakterisinde Zn'nin de içinde bulunduğu Ag^+ , Cd^{+2} , Co^{+2} , CrO_4^{2-} , Fe^{+2} ve Sc^{3+} metallerinin biyofilm oluşumunu belirgin bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Polistiren malzeme ile kurulan deneyde çinkonun % 95'ten fazla biyofilm oluşumunun inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Zn'nin biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi için, biyofilm oluşumu sırasında ortaya çıkan genler, ağır

metallere, oksijeni sınırlı koşullara ve transfer ve oksidoredüktaz proteinlerine direnç için genler içerebileceği düşünülmektedir (Schembri, vd., 2003b). Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda çinkonun, Gram-pozitif organizma *Streptococcus suis*'de biyofilm oluşumunu engellediği de gösterilmiştir (Wu, vd., 2013). Yapılan literatür çalışmaları sonucunda Zn varlığında biyofilm oluşumuna inhibisyon etkisi görülmektedir. Çalışmamızda ayrıca Zn etkisinin porin genlerinden ve bunların biyofilmle ilişkili mekanizmalarından bağımsız olarak, direkt biyofilm oluşum mekanizması ile ilgili bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.

OmpA Dış Membran Proteinin Biyofilmde Rolü: Bakterilerin insan vücudu veya dış ortamlarda büyümeleri için, dış pH'daki ekstrem değişikliklere karşı koymaları gerekmektedir (Stancik, vd., 2002). Birçok bakteriyel patojen, virulans faktörlerinin ekspresyonunu indüklemek, dokuları istila etmek ve bağışıklık sisteminden kaçmak, konak ortamı ile etkileşime girmek için dış zar proteinlerini kullanırlar (Kuen ve Kesty, 2005; Rasko ve Sperandio, 2010). Bu patojenler, diğerlerinin yanı sıra, konakçı hücrelere bağlanmak ve bakterinin girişine aracılık etmek için OmpA porinini kullanır. OmpA, özellikle Gram negatif basil şeklindeki bakteriyel türler arasında yüksek oranda korunan bir beta-varil porindir (Mortensen ve Skaar, 2013). OmpA yapışmada da rol oynamaktadır (Smith, vd., 2007). Ayrıca OmpA'nın mutasyonunun *E. coli*'nin konakçı hücrelerle etkileşimini ve patojenitesini etkilediği iyi bilinmektedir (Pascal, vd., 2010; Maruvada ve Kim, 2011).

Çalışmamızda *ompA*'nın yokluğu genellikle, asidik pH değeri olan 6,5 ortamında, alkali pH'da, nikel ve bakır metali varlığında LB Broth besiyerinde kültür aparatının duvarında, çıplak gözle görülebilen (sıvı ve hava ara faz arasınca) kalın bir biyofilm tabakası oluşturduğu görülmüştür. Aynı zaman da *ompA* mutant *E. coli* suşunda cam yüzeyde hava-sıvı ara fazda selüloz üretimi de gözlenmiştir (Şekil 4.12). Yani yabani tip *E. coli*'nin biyofilm üretmeme özelliğinin aksine, *ompA* geni mutant hale getirildiğinde *E. coli*'nin biyofilm ürettiği belirlenmiştir. Dolayısı ile *ompA* yokluğu biyofilm oluşturma mekanizmasını tetikleyen bir sonuç ortaya koymuştur. Aynı şekilde Ma ve Wood, (2009) yaptıkları çalışmada *E. coli* BW25113 yabani tipin farklı iki ortamda (cam ve pvc) yüzeyler üzerinde biyofilm üretmediğini fakat *ompA* mutant *E. coli*'nin cam ortamlarda daha fazla biyofilm oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ancak aynı mutantların pvc ortamında ise daha az biyofilm meydana getirdiğini

göstermişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız tüpün cam olduğu düşünüldüğünde elde ettiğimiz sonucun desteklendiği görülmektedir. Biyofilm oluşumunda *ompA* tarafından etkilenen yolları tanımlamak için de aynı çalışmada transkriptom analizleri yapılmıştır. Bunun sonucunda, Cpx sisteminin *ompA* tarafından aktive edildiği tespit edilmiştir. Başka çalışmalarda, *ompA*'nın eksikliğinde bir adhezin ve invazinin olarak işlev gördüğü ve biyofilm oluşumuna katıldığı bildirilmiştir (Gaddy, vd., 2009; Hatfaludi, vd., 2010). Ancak literatür araştırmalarında *ompA*'nın biyofilm oluşumunu desteklediğine dair çalışmalarda rastlanmaktadır. OmpA'nın abiyotik yüzeylere bağlanmayı sağladığı bildirilmiştir (Lower, vd., 2005). *Escherichia coli*'de *ompA*'nın biyofilm oluşumu sırasında aşırı eksprese edildiğini ve bunun sonucunda biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir (Orme, vd., 2006). *Escherichia coli* K12'den *ompA* geninin silinmesi hem LB ortamında hem de glikozlu LB ortamında biyofilmi % 80 azalttığı bildirilmiştir (González, vd., 2006). Başka bakteri örnekleri ile yapılan çalışmalarda da *ompA*'nın adezyonu arttırdığına dair bilgiler sunulmaktadır. Örneğin; *Acinetobacter baumannii*'de OmpA'nın plastik yüzeyde biyofilm oluşumunun bakteriyel bağlanma aşamasında rol oynadığı bildirilmiştir (Choi, vd., 2008; Choi, vd., 2009; Gaddy, vd., 2009). Bu yüzden OmpA'nın biyofilm oluşumundaki moleküler mekanizmaya yönelik henüz net bir sonuç bilinmemektedir. Ancak Ma ve Wood, (2009) çalışmalarında *ompA*'nın olmadığı durumda cpxAR sistemini indükleyebildiği ve bu sisteminde biyofilm üretimi için gerekli olan *csgD* ve *adrA*'yı aktive ettiğini belirtmiştir. *adrA* geninin biyofilm oluşumunda rolü ile ilgili, Römling vd., (2000) yaptıkları çalışmada cam yüzeylerde *Salmonella typhimurium* ile yapılan denemede yapışma için *adrA* geninin aktivasyonunun gerekli olduğu bildirilmiştir. Biz de, çalışmamızda elde edilen sonuçlardan benzer bir mekanizmanın olabileceğini, ayrıca elde ettiğimiz farklı pH değerlerindeki biyofilm farklılıklarına göre *nhaR* ve *ygiU* genlerinde *ompA* bağımlı henüz tespit edilemeyen bir mekanizma ile biyofilm oluşumunu indüklediğini ifade edebiliriz. *ygiU* geni bir QS düzenleyici olarak görev yapmaktadır. QS ise davranış değişikliklerini tetikleyen bir popülasyon yoğunluğuna bağlı hücre-hücre sinyal iletim türüdür (Waters ve Bassler, 2005; Shrouf ve Nerenberg, 2012). Bakteriler stres altına düşük konsantrasyonda başlayan sinyaller üretmeye başlar ve bu sinyaller popülasyon yoğunluğu arttıkça şiddetlenir (Waters ve Bassler, 2005). Birçok çalışma, biyofilm oluşumunun QS yolları tarafından büyük ölçüde kontrol edildiğini bildirmiştir (An,

vd., 2006; Kolter ve O'Toole, 1998; Sauer, vd., 2002; Weibel, vd., 2011). QS'de, biyofilm oluşumunu kontrol etmek için hücre dışı polimerik maddelerin salgısının arttığı bildirilmiştir(Fuqua, vd., 2001; Marketon, vd., 2003). Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz gerçek zamanlı PZR sonuçları doğrultusunda, *ompA*'nın *ygiU* genin ekspresyon seviyesinin *E. coli* W3110 suşuna oranla asidik ve alkali pH değerlerinde önemli derece artması ve komplement hücrelerde bu oranın W3110 'a kıyasla azalması hücreler arası etkileşim dolayısıyla biyofilm oluşumuna sebep olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonucu doğrulayan bir veride çalışmamızda *lamB* mutantında biyofilm oluşumu tespit edilen pH 7 ortamında ve biyofilm oluşumu gözlemlenmeyen pH 6 ortamında *ygiU* genin ekspresyon seviyesindeki farklılığı *E. coli* W3110 ile oranlanarak elde edilmiştir. *ompA* eksik *E. coli* suşu *ygiU* geninin ekspresyonundaki artış sonucu cam yüzeylerde adezyona sebep olmakta ve biyofilm oluşumu gözlenmektedir. Ayrıca SEM görüntülerinde *ompA* mutant suşlarında hücreler arasında hücre dışı maddelerin (EPS) varlığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda bu mutant suşların sinyal iletimini kullandığı hem gerçek zamanlı PZR hem de SEM sonuçlarıyla birbirini doğrulamaktadır.

NhaR, *E. coli* K-12'deki biyofilm oluşumu için önemlidir (Goller, vd., 2006), çünkü biyofilm adhezin PGA'nın sentezi ve sekresyonu için gerekli olan *pgaABCD* genlerinin transkripsiyonunu aktive ettiği bildirilmiştir (Wang, vd., 2004; Irie ve Parsek, 2008). Fakat bu çalışma sonucunda, *E. coli nhaR* genini içeren W3110 yabani tipinde biyofilm oluşumu gözlenmemişken, dış membran proteini olan *ompA* geninin yokluğunda biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Bunun sonucu olarak; *nhaR* geninin *ompA* porin proteinin yokluğunda *E. coli* W3110'a oranla ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Ayrıca, *Pga* gen ürünlerinin tahmin edilen lokalizasyonu ve biyolojik fonksiyonları baz alındığında PGA'nın, iç membran tarafında sentezlendiği ve *Pga* proteinlerinin bir zarf kompleksi ile hücre yüzeyinden taşındığı böylece *ompA* porin proteinin yokluğunda dış membranın uyarılmasını sağlayarak biyofilm oluşumunda rol oynadığı önerilmektedir.

OmpC Dış Membran Proteinin Biyofilmde Rolü: Biyofilm oluşumunda rolü olduğu düşünülen diğer porin proteini *ompC*'dir. Bunu destekleyen kanıtlar şunlardır: (i) *E. coli* W3110 yabani tipi kullanılan pH değerlerinde (5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0) biyofilm oluşturmazken *ompC* mutant *E. coli* suşları tüm ortamlarda katı-sıvı ara

fazında biyofilm oluşturmuştur. (ii) Kullanılan metallere Ni ve Cu varlığında da biyofilm oluşturmaya devam etmektedir. (iii) Kongo kırmızılı agar ile yapılan çalışmalarda (Şekil 4. 47) lekelenme göstermiştir. (iv) Morfoloji tayininde (Şekil 4. 50) bdar morfortipi göstererek selüloz üretiminin olmadığı, curli oluşumunun pozitif olduğu tespit edilmiştir. (v) SEM görüntülerinde (Şekil 4. 54) hücreler arasında EPS'ler görülmektedir. (vi) Gerçek zamanlı PZR sonucunda elde edilen verilerde pH 7 değerinde *ompC* mutant *E. coli*'de *csgD* ekspresyon seviyesinde yabancı tipe oranla artış olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısı ile *ompC*'nin yokluğunda da biyofilm oluşturma mekanizmasını tetikleyen bir sonuç ortaya çıkmıştır.

Curli oluşumunun *csgD* tarafından regüle edildiği ve biyofilm oluşumuna sebep olduğu bildirilmiştir (Römling, vd., 2000). Son zamanlarda *ompC*'nin abiyotik yüzeyler üzerinde *E. coli* biyofilm oluşumunun başlangıç basamakları ile ilişkilendirilmiştir (Prigent-Combaret, vd., 1999; Otto, vd., 2001). Yapılan araştırmalarda, *E. coli* biyofilm oluşturmada OmpC, OmpF ve OmpT genlerinin ekspresyonunda artış olduğu bu yüzden adezyon ve otoagregasyonunun gerçekleştiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada da *ompA*, *ompC*, *ompX* ve *osmB* genlerinin *E. coli* biyofilm oluşumuna katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Herman, vd., 2016).

Gerçek zamanlı PZR sonuçları, *ompC* mutantında pH 6 ve 7 ortamında *nhaR* geninin *E. coli* W3110'dan daha fazla eksprese edildiği ve alkali ortam değerinde pH 8'de ekspresyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir. Buna istinaden *ompC* mutantı kullanılan tüm ortamlarda biyofilm oluştururken *ygiU* geninin ekspresyon seviyesinde de artış olduğu çalışmamızda gösterilmiş ve bu porinin yokluğunda *ygiU* geninin ekspresyon seviyesinin arttığı bu sebeplede biyofilm oluşumunda rol oynayabileceği önerilmektedir. Yani çekirdek algılayıcı moleküller ve diğer polisakkaritler biyofilmlerin daha fazla olgunlaşmasını etkiler. Asidik ve alkali pH koşullarına yanıt veren *nhaR* geni porin mutantlarda düzenlenerek biyofilm oluşumu için önemli rol oynamaktadır. Otto ve Silhavy, (2002) çalışmalarında Cpx sisteminin, pH etkisinde salgılanan proteinlerin aşırı üretilmesi ve hücrelerin yüzeylere tutunmasına yanıt verdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu sonuçlar, çevre koşullarına yanıt olarak biyofilm oluşumunun düzenlenmesi için yeni bir mekanizma tanımlamakta ve bakteriyel sağkalımı desteklemede *nhaR* ve *ygiU*'nun rolünün olabileceğini önermektedir.

LamB Dış Membran Proteininin Biyofilmde Rolü: Çalışmamızda *lamB* mutant *E. coli* suşunda da kullanılan pH ortamlarından sadece pH 7 ve 7.5 değerinde biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Bu mutant *ompA* ve *ompC* gibi Ni ve Cu metali varlığında biyofilm oluşumu pozitifdir. *lamB* geninin biyofilm oluşumu hakkında literatürde bilgi mevcut değildir. Çalışmamız sonucunda dış zar porini olan bu mutantın biyofilm oluşumunda rol oynamasında *ygiU* geninin ekspresyon seviyesindeki artışla orantılı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan deneylerde pH 6 biyofilm oluşumu gözlenmeyen bu mutantın *ygiU* geninin ekspresyonunun yabani tip *E. coli* W3110'a oranla daha az olması, ancak pH 7 de bu genin ekspresyonundaki artışı yabani tipe göre daha fazla olması zayıf biyofilmi açıklamaktadır. Ayrıca *lamB*'nin mutant olmasının yüzey ile ilişkili proteinleri aktifleştirerek bağlanmaya aracılık edebileceği, böylece hücre-hücre agregasyonunu sağlayarak ve hücreler arası sinyal iletiminin aktif olması ile biyofilm oluşumunda rol oynadığı önerilmektedir.

Çalışmamızda pH ve metal ile yapılan deneylerde; *ompF*, *ompG*, *ompT* ve *phoE* mutantlarındaki değişimler yabani tip W3110 ile karşılaştırıldığında sonuçlar benzer olmuştur. Böylece farklı şartlar altında bu porinlerin biyofilm oluşumunda rol oynamadığı tespit edilmiştir.

6. ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar sonucunda Zn'nin biyofilmi inhibe edici etkisi belirlenmiştir. Mutantlardan bağımsız olarak *E. coli* 35218 suşunda da bu etki görülmektedir. Dolayısıyla Zn ve biyofilm arasında bir ilişki bulunmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda Zn'nin biyofilm oluşum genleri ile mi bir ilişkisi olduğu yoksa Zn'nin biyofilm oluşumunda temel rol oynayan EPS, selüloz veya curli ile kimyasal bir ilişki nedeniyle mi biyofilmi engellediği araştırılmalıdır.

NhaR'nin yapışma ve biyofilm oluşumunda düzenleyici rolü birkaç çalışmada vurgulanmıştır (Goller, vd., 2006). Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda NaCl, alkali pH ve bazı oksidatif stresler altında sağkalımı sağlamak için NhaR'nin gerekli olduğu tespit edilmiştir (Padan ve Schuldiner, 1994; Toesca, vd., 2001). Bizim çalışmamızda yabancı tip *E. coli* W3110 göre, *ompC* mutant *E. coli* suşunda *nhaR* daha az eksprese edilmektedir. Buna rağmen bu suşta biyofilm oluşumu mevcuttur. Referans suş *E. coli* 35218 alkali pH ortamında biyofilm oluşturmaktadır. Bu yüzden yabancı tipi biyofilm oluşturan suşta *nhaR* ekspresyonu kontrol edilmeli hatta *E. coli* diğer türlerinin *nhaR* kullanıp kullanmadıklarını belirlemek içinde ek araştırmalar gerekli olacaktır.

Escherichia coli'nin biyofilm oluşumunda yüzey bağlantıları ile koordineli olarak çalıştığı ve tip I, tip IV ve pili üretimine bağlı olarak adhezyonun başladığı bir çok çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmada iki farklı malzeme üzerinde çalışılmış ve en fazla biyofilm oluşumu cam yüzey üzerinde gözlenmiştir. Bu yüzden FimH, FimF, FimD, FimC ve FimG gibi proteinlerin ekspresyon seviyelerine bakılarak yüzeyler arası sentezlenme oranı değerlendirilebilir.

Porin proteinlerinin biyofilm oluşumundaki rolü literatür bilgisinde yetersizdir. Çalışmalarımız sonucunda ortaya koyduğumuz, *ompA*, *ompC* ve *lamB* genleri sessizleştirildiğinde mutant olan *E. coli* suşlarının biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir. Fakat moleküler mekanizmaları hakkında veriler yeterli düzeyde elde edilememiştir. Bu aşamadan sonra mutant hücrelerin sergilediği curli, selüloz, kolonik asit ve pga ekzopolisakkaritlerin oluşmasında görevli olan genler bilinmesinden dolayı nokta atışları ile sadece tek bir porin proteinine odaklanılmalıdır. Örneğin curli oluşumunda görevli olduğu bilinen CsgBAC ve CsgDEFG operonlarına ait her gen *csgA*, *csgB*, *csgC*, *csgD*, *csgE*, *csgF*, *csgG* bölgesi ayrı ayrı incelenmelidir.

Selüloz üretiminde görevli olduğu bilinen *bscABZC* gen bölgesi ve selüloz üretimini etkinleştirdiği bilinen *adrA* geni biyofilmde rolü olduğu tespit edilen porin mutantlarda pH koşulları değişikliğinde yine ayrı ayrı ekspresyon seviyeleri incelenmelidir.

Son olarak biyofilm oluşumuna katıldığı bilinen polisakkaritt polimer yapısından oluşan PGA'nın üretiminde görev alan *pgaABCD* lokusuna ait gen bölgelerinin (*pgaA*, *pgaB*, *pgaC*, *pgaD*) *E. coli* W3110 ve biyofilm oluşumunda görevli olan porin mutantlarının kontrolünün yapılması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Achouak, W., Heulin, T. and Pages, J. M., Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol. Letters*, 199: 1-7 (2001).
- Adams, J.L., McLean, R.J. Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 65(9): 4285-42847 (1999).
- Agladze K, Wang X, Romeo T. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K- 12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *J. Bacteriol*, 187:8237–8246 (2005).
- Ahimou, F.; Semmens, M.J.; Haugstad, G.; Novak, P.J. Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Appl. Environ. Microbiol*, 73(9): 2905–2910 (2007).
- Ahmed D, Islam M.S, Begum Y.A, Janzon A, Qadri F, Sjöling A. Presence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in biofilms formed in water containers in poor households coincides with epidemic seasons in Dhaka. *J Appl Microbiol*, 114: 1223–1229 (2013).
- Ahmer B.M.M. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, 52: 933-945 (2004).
- Aiba H, Mizuno T. Phosphorylation of a bacterial activator protein, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, stimulates the transcription of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 261: 19-22 (1990).
- Allison D.G. The biofilm matrix. *Biofouling*, 19 (2): 139-150 (2003).
- An, D.D., Danhorn, T., Fuqua, C. and Parsek, M.R. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(10): 3828-3833 (2006).
- Andersen, J., Forst, S. A., Zhao, K., Inouye, M. and Delihias, N., The function of micF RNA: micF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, 264: 17961-17970 (1989).
- Argueta-Figueroa L, Morales-Luckie RA, Scougall-Vilchis RJ, Olea-Mejia OF. Synthesis, characterization and antibacterial activity of copper, nickel and bimetallic Cu-Ni nanoparticles for potential use in dental materials. *Materials International*, 24: 321–328 (2014).
- Arnold J.W, Silvers S, Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation, *Poultry Science*, 79: 1215-1221 (2000).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Arnqvist, A., Olsén, A., Normark, S. Sigma S-dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved *in vivo* by sigma 70 in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol*, 13(6): 1021-32 (1994).
- Arnqvist A., Olsen A, Pfeifer J, Russell D.G, Normark S, The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101, *Mol Microbiol*, 6 (17): 2443-2452 (1992).
- Arora A., Abildgaard F., Bushweller J.H, Tamm L.K. Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol*, 8: 334–338 (2001).
- Arora A, Rinehart D, Szabo G, Tamm L.K. Refolded outer membrane protein A of *Escherichia coli* forms channels with two conductance states in planar lipid bilayers. *J Biol Chem*, 275: 1594–1600 (2000).
- Atshan S.S, Shamsudin M.N, Lung L.T, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei C.P. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. *J Biomed Biotechnol*, 417247 (2012).
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T., & Atroshi, F .Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences*, 7(1): 55-64 (2004).
- Baars L, Ytterberg A.J, Drew D, Wagner S, Thilo C, van Wijk K.J, de Gier J.W Defining the role of the *Escherichia coli* chaperone SecB using comparative proteomics." *J. Biol. Chem*, 281(15): 10024-10034 (2006).
- Bahl, H., W. Andersch, K. Braun, and G. Gottschalk. Effect of pH and butyrate concentration on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* grown in continuous culture. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 14: 17-20 (1982).
- Baker J, Sutthirat S, Mrittika S, Miranda J, Jayaswal R. K. and Julie A. Morrissey 1. Copper Stress Induces a Global Stress Response in *Staphylococcus aureus* and Represses *sae* and *agr* Expression and Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol*, 76(1): 150–160 (2010).
- Barnes L.M, Lo M.F, Adams M.R, Chamberlain AHL. Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol*, 65 (10): 4543-4548 (1999).
- Barnhart M.M, Chapman. M.R Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol*, 60: 131-147 (2006).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Basle A, Rummel G, Storici P, Rosenbusch J.P, Schirmer T "Crystal structure of osmoporin OmpC from *E. coli* at 2.0 Å." *J Mol Biol*, 362(5): 933-942. (2006).
- Begic S, Worobec E.A. Regulation of *Serratia marcescens ompF* and *ompC* porin genes in response to osmotic stress, salicylate, temperature and pH. *Microbiol*, 152: 485–491 (2006)
- Behlau et al., Projection structure of the monomeric porin OmpG at 6 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 305(1): 71-77 (2001).
- Beloin, C., and Ghigo J.M.. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol*, 13: 16–19 (2005).
- Beloin, C., Valle J., Latour-Lambert P., Faure P., Kzreminski M., Balestrino D., Haagensen J. A. J., Molin S., Prensier G., Arbeille B., and Ghigo J.M.. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol*, 51: 659–674 (2004).
- Ben Nasr A, Olsen A, Sjobring U, Muller-Esterl W, Bjorck L. Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 20: 927-935 (1996).
- Benz R, Darveau R.P, Hancock R.E. "Outer-membrane protein PhoE from *Escherichia coli* forms anion-selective pores in lipid-bilayer membranes. *Eur J Biochem*, 140(2): 319-324 (1984).
- Berg R. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*, 4: 430–435 (1996).
- Bernstein, H. D., The biogenesis and assembly of bacterial membrane proteins. *Curr. Opinion Microbiol*, 3: 203-209 (2000).
- Beyersmann, D. and Schmidt C. Zinc and metallothionein in mammalian cell cycle regulation. In: *Metals and Genetics*, New York, 145-158 (1999).
- Beveridge T.J, Graham L.L. Surface layers of bacteria. *Microbiol Rev*, 55: 684–705 (1991).
- Bian, Z.; Brauner, A.; Li, Y.; Normark, S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 602–612 (2000).
- Boyd, A. and Chakrabarty, A.M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol*, 60(7): 2355–2359 (1994).
- Booth I.R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev*, 49: 359–378 (1985).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Bougdour A, Wickner S, Gottesman S. "Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of sigma(S) stability in *Escherichia coli*." **Genes Dev**, 20(7): 884-897 (2006).
- Bragadeeswaran S., Jeevapriya R., Prabhu K., Rani S.S., Priyadharsini S., Balasubramanian T., "Exopolysaccharide production by *Bacillus cereus* GU812900, a fouling marine bacterium," **Afr J Microbiol Res**, 5(24): 4124-4132 (2011).
- Branda, S. S., Vik S., Friedman, L., and Kolter R.. Biofilms: the matrix revisited. **Trends Microbiol**, 13: 20–26 (2005).
- Brombacher E, Baratto A, Dorel C, Landini P "Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion." **J. Bacteriol**, 188(6): 2027-2037 (2006).
- Brombacher E, Dorel C, Zehnder AJ, Landini P . "The curli biosynthesis regulator CsgD coordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*." **Microbiol**, 149(10): 2847-2857 (2003).
- Brown ,Jr. R.M "The biosynthesis of cellulose". **Food Hydrocollodis**, (5-6): 345-351 (1987).
- Brzostek, K., Skorek, K. & Raczkowska, A. OmpR, a central integrator of several cellular responses in *Yersinia enterocolitica*. **Adv. Exp. Med. Biol**, 954: 325–334 (2012).
- Cai S.J, Inouye M . EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem**, 277: 24155-24161 (2002).
- Camara M. Quorum sensing: A cell-cell signalling mechanism used to coordinate behavioural changes in bacterial populations **International Workshop on Membrane Computing**, 4361: 42-48 (2007).
- Castonguay M.H, Van der S, Koester W, Krooneman J, Van der M.W, Harmsen H, Landini P. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. **Res Microbiol**, 157: 471-478 (2006).
- Cerning J., "Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria" **Le Lait**, 75(4-5): 463-472 (1995).
- Chagneau, C., M. Heyde, S. Alonso, R. Portalier, and P. Laloï. External-pH-dependent expression of the maltose regulon and *ompF* gene in *Escherichia coli* is affected by the level of glycerol kinase, encoded by *glpK*. **J. Bacteriol**, 183: 5675-5683 (2001).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Chapman, M.R.; Robinson, L.S.; Pinkner, J.S.; Roth, R.; Heuser, J.; Hammar, M.; Normark, S.; Hultgren, S.J. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*, 295: 851–855 (2002).
- Chevalier, J., Pages J.M., Eyraud, A., and Mallea, M., Membrane permeability modifications are involved in antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 274: 496-499 (2000).
- Chevance, F.F.V. & K.T. Hughes, Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol*, 6: 455-465 (2008)
- Chilcott G.S, Hughes K.T. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 64: 694–708 (2000).
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1): 22-32 (2003).
- Choi A.H., Slamti L., Avci F.Y., Pier G.B., Maira-Litrán T. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J. Bacteriol*, 191: 5953-5963 (2009).
- Choi C.H., Lee J.S., Lee Y.C., Park T.I., Lee J.C. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC. Microbiol*, 8: 216 (2008).
- Christophe B, Agnès R, and Jean-Marc G. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322: 249–289 (2008).
- Cierpicki, T., Liang, B., Tamm, L. K. & Bushweller, J. H. Increasing the accuracy of solution NMR structures of membrane proteins by application of residual dipolar couplings. High-resolution structure of outer membrane protein A. *J. Am. Chem. Soc*, 128: 6947–6951 (2006).
- Cleenwerck I; Vandemeulebroecke D; Janssens D; Swings J "Re-examination of the genus *Acetobacter* , with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov" . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1551–1558 (2002).
- Collinson S.K, Clouthier S.C., Doran J.L. , Baner P.A. , Kay W.W., Characterization of the agfBA fimbrial operon encoding thin aggregative fimbriae of *Salmonella enteritidis*, *Adv. Exp. Med. Biol*, 412: 247-248 (1997).
- Conlan S, Bayley H. Folding of a monomeric porin, OmpG, in detergent solution. *Biochemistry*, 42(31): 9453-9465 (2003).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Conlan S, Zhang Y, Cheley S, and Hagan B. Biochemical and Biophysical Characterization of OmpG: A Monomeric Porin. *Biochemistry*, 39 (39): 11845–11854 (2000).
- Connell, D. W., and Miller G. J.. Chemistry and ecotoxicology of pollution. *John Wiley & Sons*, New York, N.Y, 138-145 (1984).
- Corona-Izquierdo, F. P., and Membrillo-Hernandez J. A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett*, 211: 105–110 (2002).
- Cosma C.L, Danese P.N, Carlson J.H, Silhavy T.J, Snyder W.B. Mutational activation of the Cpx signal transduction pathway of *Escherichia coli* suppresses the toxicity conferred by certain envelope-associated stresses. *Mol Microbiol*, 18: 491-505 (1995).
- Costerton, J. W, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49: 711-745 (1995).
- Costerton, J. W., Stewart P. S., and Greenberg E. P.. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318–1322 (1999).
- Cowan S. W., Schirman T., Rummel G., Steiert M., Ghash R., et al., Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. *Nature*, 358: 727-733 (1992).
- Çiftçi Z. Kronik tonsillitte biofilmin rolü, *T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi*, 69 sayfa, Basılmamıştır (2005).
- Da Re S, Ghigo J.M . A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli* . *J. Bacteriol* , 188: 3073-308 (2006).
- Dagostino L, Goodman A.E, Marshall K.C: Physiological responses induced in bacteria adhering to surfaces. *Biofouling*, 4: 113-119 (1991).
- Danese, P. N., Oliver G. R., Barr K., Bowman G. D., Rick P. D., and Silhavy T. J. Accumulation of the enterobacterial common antigen lipid II biosynthetic intermediate stimulates *degP* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 180: 5875–5884 (1998).
- Danese P. N, Pratt L. A, Dove S. L, Kolter R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol*, 37: 424–432 (2000).
- Darcan, C., Çetin G, Kaygusuz Ö., *Escherichia coli*'deki Porin Proteinlerinin Metal Direncindeki Rollerinin Belirlenmesi. *Bilimsel Araştırma Projesi*. Basılmamıştır (2016).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Darcan, C., “ Karadeniz suyunda pH, osmolarite ve açlık stresinin *E. coli*’ nin dış membran porin protein sentez düzeyine etkisinin araştırılması”, Doktora Tezi, **Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Samsun (2005).
- Darcan, C., Özkanca R. and İdil Ö., “The role of RpoS, H-NS and AcP on the pH-dependent OmpC and OmpF porin expressions of *Escherichia coli* at different pH”, **African Journal of Biotechnology**, 8 (9): 1845-1854 (2009).
- Darcan, C., Özkanca, R., Şahin, N., Işık, K., ve Kariptaş, E., Dezenfektan özellikteki bazı kimyasal maddelerin deniz suyundaki *Escherichia coli* ML30 ve *Salmonella typhimurium* LT2’nin dış membran protein sentezine etkisi. **Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi**, 25 (2): 57-66 (2001).
- Darcan C., Yılmaz H. The Role of EnvZ, RpoS, H-NS, AcP and Synthesis of OmpC-OmpF Porin Proteins of *Escherichia coli* Under Effect of Some Chemicals. **Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 11(2): 285-299 (2018).
- Datta D.B, Arden B, Henning U “Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors.” **J. Biol. Chem**, 131 (3): 812-819 (1977).
- De Vuyst L., Degeest B., “Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria” **FEMS Microbiology Reviews**, 23: 153-177 (1999).
- Del Carpio-Perochena A, Bramante C.M, de Andrade F.B, Maliza A.G, Cavenago B.C, Marciano M.A, Amoroso-Silva P, Duarte M.H. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. **Clin Oral Investig**, 19(8): 2067-2073 (2015).
- Delcour A.H . Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochim Biophys Acta**, 1794: 808–816 (2009).
- Delmer, D.P.; Amor, Y. "Cellulose biosynthesis". **Plant Cell**, 7 (7): 987–1000. (1995).
- DePas W.H., Hufnagel D.A., Lee J.S., Blanco L.P., Bernstein H.C., Fisher S.T., James G.A., Stewart P.S., Chapman M.R., Iron induces bimodal population development by *Escherichia coli*, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110 (7): 2629-2634 (2013).
- Di Bonaventura G, Stepanović S, Picciani C, Pompilio A, Piccolomini R. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. **Folia Microbiol**, 52(1): 86-90 (2007).
- Donabedian H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. **J Infect**, 46: 207-214 (2003).
- Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L. and Kolter, R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. **Mol Microbiol**, 37: 424-432. (2000).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Donini Í, De Salvi DTB, Fukumoto FK, Lustrì WR, Barud HS, Marchetto R, Messaddeq Y, Ribeiro SJL. Biossintese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Eclat. Quím*, 35(4): 35-44 (2010).
- Donlan R.M, Costerton JW. Biofilms : Survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiol*, 15 (2): 167-193 (2002).
- Donlan, RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infect. Dis*, 8(9): 881-890. (2002).
- Donot F., Fontana A., Baccou J.C., Galindo S.S., “Main Examples Of Synthesis, Excretion, Genetics And Extraction,” *Carbohydr Polym*, 87: 951– 962 (2012).
- Dorel C, Vidal O, Prigent-Combaret C, Vallet I, Lejeune P. Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiolgy Letters*, 178(1): 169-175 (1999).
- Dorman, C.J. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5): 391-400 (2004).
- Dorman, C.J., Ní Bhriain, N. Thermal regulation of *fimA*, the *Escherichia coli* gene coding for the type 1 fimbrial subunit protein. *FEMS Microbiol Lett*, 78(2-3): 125-130 (1992).
- Dove, S.L., Smith, S.G., Dorman, C.J. Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS. *Mol Gen Genet*, 254(1): 13-20 (1997).
- Dover, N., Higgins C. F., Carmel O., Rimón A., Pinner E., and Padan E.. Na⁺-induced transcription of *nhaA*, which encodes an Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*, is positively regulated by *nhaR* and affected by *hns*. *J. Bacteriol*, 178: 6508-6517 (1996).
- Dover, N., and Padan E.. Transcription of *nhaA*, the main Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*, is regulated by Na⁺ and growth phase. *J. Bacteriol*, 183: 644-653 (2001).
- Duboc P., Mollet B., “Applications of exopolysaccharides in the dairy industry” *International Dairy Journal*, 11: 759-768 (2001).
- Dunne W.M., Jr Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiol*, 15: 155–166 (2002).
- Dyer J. G., Sriranganathan N., Nickerson S. C., Elvinger F. Curli production and genetic relationships among *Escherichia coli* from cases of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90: 193–201 (2007).
- Dykhuisen, D. E., and D. L. Hartl. Selection in chemostats. *Microbiol Rev*, 47: 150–168 (1983).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Egler, M., Grosse C., Grass G., and Nies D. H.. Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**, 187: 2297–2307 (2005).
- Engel A, Massalski A, Schindler H , Dorset D.L. Porin channel triplets merge into single outlets in *Escherichia coli* outer membranes. **Nature**, 17-23: 317 (1985).
- Epstein, E.A.; Reizian, M.A.; Chapman, M.R. Spatial clustering of the curlin secretion lipoprotein requires curli fiber assembly. **J. Bacteriol** , 191: 608–615 (2009).
- Escherich T "Die Darmbakterien des Neugeborenen ve Säuglinge" . **Fortschr. Med**, 3: 515-522 (1885).
- Escherichia coli* SEM Images, <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlcme/zoo/Pf07002.jpg> (2014).
- Evans, M.L., and Chapman, M.R. Curli biogenesis: orderout of disorder. **Biochim Biophys Acta**, 1843: 1551–1558 (2014).
- Evans M.L, et al. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. **Molecular Cell**, 57: 445–455 (2015).
- Faber, F., Egli, T. and Harder, W., Transient repression of the synthesis of OmpF and aspartate transcarbamoylase in *Escherichia coli* K12 as a response to pollutant stress. **FEMS Microbiol. Letters**, 111: 189-196 (1993).
- Failla, M.L. Zinc: Functions and transport in micro-organisms. In: Microorganisms and Minerals (Weinberg, E.D., Ed.). **Marcel Dekker**, 3: 151-214 (1977).
- Feng P, Stephen D. W, Michael A. G “Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria,” in **Bacteriological Analytical Manual**, 4: 4 (2002).
- Ferenci, T., Regulation by nutrient limitation. **Curr. Opinion Microbiol**, 2: 208-213 (1999).
- Flemming, H.C. EPS—Then and Now, **Microorganisms**, 1–18 (2016).
- Flemming, H.C and J. Wingender. Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance. **Encyclopedia of Environ. Microbiol**, 3: 1223–1231 (2002).
- Flemming, H.C and Wingender, J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. **Water Sci. Technol**, 43: 1-8 (2001).
- Flemming, H.C., and Wingender, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, 8 : 623–633 (2010).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Fletcher M. Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J. Bacteriol*, 170: 2027–2030 (1988).
- Forst S, Delgado J, Inouye M. Phosphorylation of OmpR by the osmosensor EnvZ modulates expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 6052-6056 (1989).
- Foster, J. W. Bacterial stress responses . Microbial responses to acid stress. *ASM Press*, 99–115 (2000).
- Freer ve Salton, The Bacterial Membrane. *Biomembranes*, 1. Cilt. (1970).
- Freeman, J., Falkiner, F.R., Keane, C.T., New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci, *Journal of Clinical Pathology*, 42: 872-874 (1989).
- Blattner F.R, Plunkett G, Bloch C.A, Perna N.T, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner J.D, Rode C.K, Mayhew G.F, Gregor J, Davis N.W, Kirkpatrick H.A, Goeden M.A, Rose D.J, Mau B, Shao Y. Kirkpatrick, Michael A. Goeden, Debra J. Rose, Bob Mau, Ying Shao. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *SCIENCE* 277(5331): 1453-62 (1997).
- Frølund, B., R. Palmgren, K. Keiding, and P. H. Nielsen. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res*, 30: 1749–1758 (1996).
- Fuqua, WC., Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics*, 35(1): 439-468 (2001).
- Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM. A feeling for the microorganism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. *Bot J Linnean Soc*, 150 (1): 79- 88 (2006).
- Gacesa, P. Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. *Microbiol*, 144: 1133 (1998).
- Gaddy, J. A., Tomaras, A. P. & Actis, L. A. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect. Immun*, 77: 3150–3160 (2009).
- Garavito, R. M. and Rosenbusch J. P., Three dimensional crystals of an integral membrane proteins an initial X ray analysis. *J. Cell Biol*, 86: 327-329 (1980).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Garcia-Sureda L, Juan C, Domenech-Sanchez A, Alberti S. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 1803–1805 (2011).
- Garretta Trevor Roger , Manmohan Bhakoob, Zhibing Zha. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9): 1049-1056 (2008).
- Genevaux, P., Muller, S. and Bauda, P. A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol. Letters*, 142: 27-30 (1996).
- George, S. G. Cell biochemistry and transmembrane transport of some metals. In E. Merian (ed.), *Metals and their compounds in the environment*. **VCH Publishers, Inc.**, New York, N.Y. (1991).
- Gerstel U, Kolb A, Romling U. Regulatory components at the *csgD* promoter additional roles for OmpR and integration host factor and role of the 5' untranslated region. *FEMS Microbiol Lett*, 261(1): 109-17 (2006).
- Gerstel U, Park C, Römling U . Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol Microbiol*, 49: 639-654 (2003).
- Gerstel U, Römling U, Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Microbiol*, 3(10): 638-48 (2001).
- Gerstel U, Römling U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol*, 154: 659–667 (2003).
- Ghannoum M, O'Toole GA, editors. *Microbial biofilms*. **ASM Press**; Washington DC: 49: 711-745 (2001).
- Ghigo, J.M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412: 442-445 (2001).
- Ghigo, J.M. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Res Microbiol*, 154(1): 1-8 (2003).
- Gibson, D.L.; White, A.P.; Rajotte, C.M.; Kay, W.W. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella enteritidis*. *Microbiology*, 153: 1131–1140 (2007).
- Gibson, D. L., White, A. P., Snyder, S. D., Martin, S., Heiss, C., Azadi, P., Surette, M. & Kay, W. W. *Salmonella* produces an Oantigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *J. Bacteriol*, 188: 7722–7730 (2006).
- Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C, Molin S, Tolker-Nielsen T. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiolgy*, 7: 894-906 (2005).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Glauert A.M, Thornley M.J. The topography of the bacterial cell wall. *Annu Rev Microbiol*, 23:159-98 (1969).
- Goller C, Wang X, Itoh Y, Romeo T. The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates *pgaABCD* transcription, required for production of the biofilm adhesin polybeta- 1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J. Bacteriol*, 188(23): 8022-8032 (2006).
- González Barrios, A.F., Zuo, R., Ren, D., and Wood, T.K. Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. *Biotechnology and Bioengineering*, 93: 188–200 (2006).
- Gophna, U.; Barlev, M.; Seijffers, R.; Oelschlager, T.A.; Hacker, J.; Ron, E.Z. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect. Immun*, 69: 2659–2665 (2001).
- Gordon DM, Cowling A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiol*, 149: 3575–3586 (2003).
- Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*. 43: 1367–1378 (2002).
- Goyal P, et al. (2014) Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG. *Nature*, 516: 250–253 (2014).
- Grant, W. D. and Long, P. E., “Environmental Microbiology” *Thomson Litho Ltd.*, Glasgow/Scotland, 215-217 (1981).
- Grosu-Tudor S.S., Zamfir M., “Exopolysaccharide production by selected lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables” *Scientific Bulletin Series F. Biotechnologies*, 18: 2285-1364 (2014).
- Gualdi L, Tagliabue L, Bertagnoli S, Ierano T, De Castro C, Landini P . "Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*." *Microbiol*, 154(7): 2017-2024 (2008).
- Gualdi L, Tagliabue L, Landini P . "Biofilm formation-gene expression relay system in *Escherichia coli*: modulation of sigmaS-dependent gene expression by the CsgD regulatory protein via sigmaS protein stabilization." *J. Bacteriol*, 189(22): 8034-8043 (2007).
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S. and Tribedi, P. Biofilm, pathogenesis and prevention a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1): 1–15 (2016).
- Gün İ ve Ekinci Y.F. BİYOFİMLER: YÜZEYLERDEKİ MİKROBİYAL YAŞAM. *GİD*, 34 (3): 165-173 (2009)

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Habibi N, Jazani NH, Yousefi S. Evaluation of the Antibacterial Effects of Nickel Nanoparticles on Biofilm Production by *Streptococcus mutans*. *Journal of Medical Bacteriology*, 6(1–2): 8–14 (2017).
- Hall MN, Silhavy TJ. Genetic analysis of the *ompB* locus in *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol*, 151: 1-15 (1981).
- Hallam NB, West, JR, Forster, CF, Simms J. The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Res*, 35: 4063-4071 (2001).
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 95–108 (2004).
- Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsen A, Normark S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, 18: 661–670 (1995).
- Hammar M, Bian Z, Normark S. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 6562–6566 (1996).
- Hammer ND, Schmidt JC, Chapman MR. The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 12494–12499 (2007).
- Hammer ND, et al. The C-terminal repeating units of CsgB direct bacterial functional amyloid nucleation. *J Mol Biol*, 422: 376–389 (2012).
- Hartwig, A., Mullenders, L.H.F., Asmuss, M., Benters, M. And Kruger, I. Effect of metal compounds on the function of zinc finger proteins involved in DNA repair. In: *Metals and Genetics*, 159-169 (1999).
- Hasman H, Chakraborty T, Klemm P. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J. Bacteriol*, 181: 4834–4841 (1999).
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15: 305-311 (2011).
- Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce JD, Adler B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 144: 1–17 (2010).
- Hausinger P. R., Zamble B. D., "Microbial Physiology of Nickel and Cobalt", *Mol Microbiol of Heavy Metals*. Nies, S. *Published Springer-Verlag*, 287-320 (2007).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Henderson IR, Meehan M, Owen P. Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett*, 149: 115–120 (1997).
- Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^{54} (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Mol. Biol. Rev*, 66: 373-395 (2002).
- Hermans K , Roberfroid S, Inge M. T, Gwendoline K, David De C, Kathleen M, Jos V, Sigrid C. J. De K, and Hans P. Steenackerscorresponding author. FabR regulates *Salmonella* biofilm formation via its direct target FabB. *BMC Genomics*, 17: 253 (2016).
- Herzberg M, Kaye IK, Peti W, Wood TK. YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *J. Bacteriol*, 188(2): 587–98 (2006).
- Heyde M, Portalier R. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K 12 by pH. *Mol Gen Genet*, 208(3): 511-7 (1987).
- Heyde, M., Lazzaroni, J. C., Magnouloux, B. B. and Portalier, R., Regulation of porin gene expression over a wide range of extracellular pH in *Escherichia coli* K-12: influence of a tolA mutation. *FEMS Microbiology*, 52: 59-66 (1988).
- Heyde, M., Lalo P. i, and R. Portalier. Involvement of Carbon Source and Acetyl Phosphate in the External-pH-Dependent Expression of Porin Genes in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol*, 182: 198-202 (2000).
- Hiroshi Y ve Nakae T, “Protein C (OprC) of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* is a copper-regulated channel protein”, *Microbiology*, 142: 2137-2144 (1996).
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J.P., Danchin, A., Bertin, P. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol*, 40(1): 20-36 (2001).
- Hostacka, A., Ciznar, I: Biofilms formation and response to oxidative stress in *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* non-O1 depending on culture media. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol*, 56: 186–190 (2007).
- Hostacka, A., Ciznar, I., and Stefkavicova, M., Temperature and PH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiologica*, 1 (55): 75-78 (2010).
- Hoyle BD, Jass J, Costerton JW. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 26(1): 1-5 (1990).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Hu SQ, Gao YG, Tajima K, Sunagawa N, Zhou Y, Kawano S, Fujiwara T, Yoda T, Shimura D, Satoh Y, Munekata M, Tanaka I, Yao M. Structure of bacterial cellulose synthase subunit D octamer with four inner passageways. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the USA*, 107: 17957–17961 (2010).
- Hudson, M. C., Ramp, W. K., & Frankenburg, K. P. Staphylococcus aureus adhesion to bone material and bone associated biomaterials. *FEMS Microbiol Lett*, 173: 279-284 (1999).
- Hufnagel D.A, Depas W.H, Chapman M.R. The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiology Spectrum*, 3: 3 (2015).
- Hussain M, Wilcox MH, White PJ. The slime of coagulase negative Staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiolgy*, 10:191-207 (1993).
- Irie Y, Parsek MR. Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322: 67–84 (2008).
- Ishihama A., Prokaryotic genome regulation: multifactor promoters, multitarget regulators and hierarchic networks, *FEMS Microbiol*, 34: 628–645 (2010).
- Itoh, Y, Rice J. D, Goller C, Pannuri A, Taylor J, Meisner J, Beveridge T. J, Preston J. F and Romeo T. Roles of pgaABCD Genes in Synthesis, Modification, and Export of the *Escherichia coli* Biofilm Adhesin Poly-1,6-N-Acetyl-D-glucosamine. *J. Bacteriol*, 190(10): 3670–3680 (2008)
- Ivorra, N., Bremer S., Guasch H., Kraak M. H. S., and Admiraal W.. Differences in the sensitivity of benthic microalgae to Zn and Cd regarding biofilm development and exposure history. *Environmental Toxicology*, 19: 1332–1339 (2000).
- Izano, E.A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Mulks, M.H., Velliyagounder, K., Rangunath, C. and Kaplan, J.B. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 43(1): 1–9 (2007).
- Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B. and Kaplan, J.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Appl. Environ. Microbiol*, 74(2): 470–476 (2008).
- Jackson, D. W., J. W. Simecka, and T. Romeo. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J. Bacteriol*, 184: 3406–3410 (2002a).
- Jackson, D. W., Suzuki K., Oakford L., Simecka J. W., Hart M. E. , and Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 184: 290–301 (2002b).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Jaffe, A. et al. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother*, 22: 942–948 (1982).
- Johnson DC, Neogi AN ve Leblanc HA " Bacterial cellulose as surface treatment for fibrous web ", *ABD Birleşik Devletler Patenti*, 4,861,427 (1988).
- Jain N, Adén J , Nagamatsu K , Evans M. L. , Li X, McMichael B, Ivanova Magdalena I , Almqvist Fr, Buxbaum J. N. , and Chapman M R., Inhibition of curli assembly and *Escherichia coli* biofilm formation by the human systemic amyloid precursor transthyretin. *PNAS Early Edition*, 1-6 (2017).
- Jenal U, Malone J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 40: 385–407 (2006).
- Jensen, L.J.; Kuhn, M.; Stark, M.; Chaffron, S.; Creevey, C.; Muller, J.; Doerks, T.; Julien, P.; Roth, A.; Simonovic, M.; et al. String 8—A global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Research*, 37: 412–416 (2009).
- Jayaraman A, Cheng ET, Earthman JC, Wood TK. Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 18: 396–401 (1997).
- Jubelin G, Vianney A, Beloin C, Ghigo JM, Lazzaroni JC, Lejeune P, Dorel C. CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli* . *J. Bacteriol*, 187: 2038-2049 (2005).
- Kanamaru K, Kanamaru K, Tatsuno I, Tobe T, Sasakawa C. SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol*, 38: 805–816 (2000).
- Kaplan JB., Rangunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., & Ramasubbu, N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7): 2633-2636 (2004a).
- Kaplan JB, Velliyagounder K, Rangunath C, Rohde H, Mack D, Knobloch JK, Ramasubbu N. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J. Bacteriol*, 186: 8213–8220 (2004b)
- Karatan E, Michael A.J. A wider role for polyamines in biofilm formation. *Biotechnology Letters*, 35(11): 1715–1717 (2013).
- Kart Y. K, Aybar B. Y, Pehlivanoglu F, Sengoz G. Stafilokok suşlarında slaym faktör pozitifliği, metisilin ve antibiyotik direnci. *ANKEM Dergi*, 25(2): 89- 93 (2011).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kato M, Hirofumi A, Shin-ichi T, Yoshifumi N, Takeshi M. Location of phosphorylation site and DNA-binding site of a positive regulator, OmpR, involved in activation of the osmoregulatory genes of *Escherichia coli*. **FEBS PRESS**, 249(2): 168-172 (1989).
- Keiski CL, et al. AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin. **Structure**, 18(2): 265–273 (2010).
- Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, Yoshida S. Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. **Microbiology and Immunology**, 49: 875-884 (2005).
- Kim H, Ryu JH, Beuchat LR. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. **Appl. Environ. Microbiol**, 72 (9): 846–5856 (2006).
- Kjaergaard K, Schembri MA, Hasman H, Klemm P. Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. **J. Bacteriol**, 182: 4789–4796 (2000).
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. **Mol Microbiol**, 48(6): 1511-1524 (2003).
- Klemm P, Hjerrild L, Gjermansen M, Schembri MA. Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, 51: 283-296 (2004).
- Klemm P, Vejborg R.M, Sherlock O Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. **International Journal of Medical Microbiology**, 296: 187-195 (2006).
- Kleinschmidt JH. Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 60: 1547–1558 (2003).
- Knott B. C, Crowley M. F., Himmel M. E., Zimmer J, and Beckham G. T. Simulations of cellulose translocation in the bacterial cellulose synthase suggest a regulatory mechanism for the dimeric structure of cellulose. **Chemical Science**, 7(5): 3108–3116 (2016).
- Koebnik, R., Structural and functional roles of surface exposed loops of the barrel membrane protein OmpA from *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**, 181: 3688-3694 (1999).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Koebnik, R., Locher, K. P. and Van Gelder, P., Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*, 37(2): 239-253 (2000).
- Kolter R, Tormo A. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol*, 47: 855 – 874 (1993).
- Korteland J, Tommassen J, Lugtenberg B "PhoE protein pore of the outer membrane of *Escherichia coli* K12 is a particularly efficient channel for organic and inorganic phosphate." *Biochim Biophys Acta*, 690(2): 282-9 (1982).
- Kropec A., et al. Poly-*N*-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. *Infect. Immun*, 73: 6868–6876 (2005).
- Kuen, M. J. & Kesty, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev*, 19: 2645–2655 (2005).
- Kuhn, M. L., Zemaitaitis, B., Hu, L. I., Sahu, A., Sorensen, D., Minasov, G., Lima, B. P., Scholle, M., Mrksich, M. & other authors . Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation. *PLoS ONE*, 9: 4 (2014).
- Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 9–27 (1998).
- Lacqua A, Wanner O, Colangelo T, Martinotti MG, Landini P. Emergence of biofilm-forming subpopulations upon exposure of *Escherichia coli* to environmental bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol*, 72 (1): 956-9 (2006).
- Lai EM, Nair U, Phadke ND, Maddock JR . Proteomic screening and identification of differentially distributed membrane proteins in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol*, 52(4): 1029-44 (2004).
- Lambert PA "Enterobacteriaceae: composition, structure and function of the cell envelope." *Society for Applied Bacteriology symposium series*, 17: 21-34. (1988).
- Landini, P. Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 160(4): 259-266 (2009).
- Landini, P., Zehnder, A.J. The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J. Bacteriol*, 184(6): 1522-1529 (2002)

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Larsen P., Nielsen J.L., Dueholm M.S., Wetzel R., Otzen D., Nielsen P.H. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ. Microbiol*, 9: 3077–3090 (2007).
- Lasa I, Penadés JR. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol*, 157: 99–107 (2006).
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Penades, J.R., Lasa, I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol*, 58(5): 1322-1339 (2005).
- Lauren M. Stancik, Dawn M. Stancik, Brian Schmidt, D. Michael Barnhart, Yuliya N. Yoncheva, and Joan L. Slonczewski pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid Catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 184(15): 4246–4258 (2002).
- Leaphart, A. B., D. K. Thompson, K. Huang, E. Alm, X. F. Wan, A. Arkin, S. D. Brown, L. Wu, T. Yan, X. Liu, G. S. Wickham, and J. Zhou. Transcriptome profiling of *Shewanella oneidensis* gene expression following exposure to acidic and alkaline pH. *J. Bacteriol*, 188: 1633-1642 (2006).
- Lee Jin-Hyung, Kim Yong-Guy, Moo Hwan Cho, Jintae Lee. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiological Research*, 169(12): 888-896 (2014).
- Lee, Y. K., Kwon, K. K., Cho, K. H., Kim, H. W., Park, J. H., & Lee, H. K. Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *The Journal of Microbiology*, 41: 183-188 (2003).
- Lefcort, H., M. Q. Aguon, K. A. Bond, K. R. Chapman, M.R. Chaquette, J. Clark, P. Kornachuk, B. Z. Lang, and J. C. Martin. Indirect effects of heavy metals on parasites may cause shifts in snail species compositions. *Arch. Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43: 34–41 (2002).
- Lembre, P., Lorentz, C. and Martino, P.Di. Exopolysaccharides of the biofilm matrix: A *complex biophysical world*. 371–392. (2012).
- Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Donato A, Parrilli M. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 341: 2456 – 2461 (2006).
- Lejeune, P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiolgy*, 11: 179–184 (2003).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Li H, Lin XM, Wang SY, Peng XX .Identification and antibody-therapeutic targeting of chloramphenicol-resistant outer membrane proteins in *Escherichia coli*. ***Journal of Proteome Research***, 6(9): 3628–3636 (2007).
- Li, X.Z., Nikaido, H. and Williams, K.E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. ***J. Bacteriol***, 179: 6127-6132 (1997).
- Lin XM, Li H, Wang C and Peng X.X. Proteomic Analysis of Nalidixic Acid Resistance in *Escherichia coli*: Identification and Functional Characterization of OM Proteins.. ***Journal of Proteome Research***, 7 (6): 2399–2405 (2008).
- Lin XM, Yang JN, Peng XX, Li HA. A novel negative regulation mechanism of bacterial outer membrane proteins in response to antibiotic resistance. ***Journal of Proteome Research***, 9(11): 5952–5959 (2010).
- Lin XM, Yang MJ, Li H, Wang C, Peng XX. Decreased expression of LamB and Omp1 complex is crucial for antibiotic resistance in *Escherichia coli*. ***Journal of Proteomics***, 98: 244–253 (2014).
- Lindsay D, Brözel V.S, Mostert J.F, Von Holy A. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate, ***J Appl Microbiol***, 92: 352 – 361 (2002).
- Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. ***Journal of Hospital Infection***, 64(4): 313-25 (2006).
- Liu J., Luo J., Ye H., Sun Y., Lu Z., Zeng X., “ Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3” ***Carbohydr Polym***, 79: 206-213 (2010).
- Liu, X. and Ferenci, T. Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. ***J. Bacteriol***, 180: 3917–3922 (1998).
- Liu, X., and Ferenci T. An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of *ompF* and *ompC* porin expression under nutrient limitation. ***Microbiology***, 147: 2981–2989 (2001).
- Lopes, F. A., Morin P., Oliveira R., and Melo L. F. The influence of nickel on the adhesion ability of *Desulfovibrio desulfuricans*. ***Colloids and Surfaces***, 46: 127–133 (2005).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Los, R., Sawicki, R., Juda, M., Stankevic, M., Rybojad, P., Sawicki, M., et al. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett*, 310: 97-103 (2010).
- Lower B.H, Yongsunthon R, Vellano F.P & Lower SK. Simultaneous force and fluorescence measurements of a protein that forms a bond between a living bacterium and a solid surface. *J. Bacteriol*, 187: 2127–2137 (2005).
- Lugtenberg, B., Meyer J., Peters R., van der Hoek, P. and van Alphen, L., Electroforetic resolution of the "major outer membrane protein" of *E. coli* K12 into four bands, *FEBS Letters*, 58: 254-258 (1975).
- Ma Q and Wood T.K. OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. *Environ. Microbiol*, 11 (10): 2735–2746 (2009).
- Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol*, 178: 175–183 (1996).
- Madigan M. T. Ve Matinko J. M., ‘‘BROCK Mikrobiyal Yaşama Genel Bir Bakış’’, Mikroorganizmaların Biyolojisi, Cumhuriyet ÇÖKMÜŞ, *Palme Yayıncılık*, 30-31 (2010).
- Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G, 3rd, Goldmann DA, Pier GB. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect. Immun*, 70: 4433–4440 (2002).
- Mamonova I. Study of the antibacterial action of metal nanoparticles on clinical strains of Gram negative bacteria. *World J Med Sci*, 8: 314 (2013).
- Marketon, M.M., Glenn, S.A., Eberhard, A. and González, J.E. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol*, 185(1): 325-331 (2003).
- Marić, S. and Vraneš, J. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum Biologorum*, 109(2): 115–121 (2007).
- Marsh P.D. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 30(2):76-78 (2009).
- Martinez-Martinez, L., Conejo, M.C., Pascual, A. et al. Activities of Imipenem and cephalosporins against clonally related strains of *Escherichia coli* hyperproducing chromosomal beta-lactamase and showing altered porin profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 2534–2536 (2000).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Martinez, M. B., M. Flickinger, L. A. Higgins, T. Krick, and G. L. Nelsestuen. Reduced outer membrane permeability of *Escherichia coli* O157: H7: suggested role of modified outer membrane porins and theoretical function in resistance to antimicrobial agents. *Biochemistry*, 40: 11965–11974 (2001).
- Maruvada, R. & Kim, K. S. Extracellular loops of the *Escherichia coli* outer membrane protein A contribute to the pathogenesis of meningitis. *J Infect. Dis*, 203: 131–140 (2011).
- Matsubara, M., Kitaoka, S., Takeda, S. and Mizuno, T., Tuning of the porin expressions by His-to-Asp cross phosphorelay through both the EnvZ-osmosensor and ArcB-anaerosensor in *Escherichia coli*. *Genes to Cell*, 5: 555-569 (2000).
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(6): 327-356 (2003).
- Maurer J.J, Brown T.P, Steffens W.L, Thayer S.G. The occurrence of ambient temperatureregulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin *tsh* among avian *Escherichia coli* . *Avian Diseases*, 42: 106-118. (1998).
- Mayer R, Ross P, Weinhouse H, Amikam D, Volman G, Ohana P, Calhoon RD, Wong HC, Emerick AW, Benziman M. Polypeptide composition of bacterial cyclic diguanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting proteins in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the USA*, 88: 5472–5476 (1991)
- McCrate O.A., Zhou X., Reichhardt C., Cegelski L., Sum of the Parts: Composition and Architecture of the Bacterial Extracellular Matrix, *Journal of Molecular Biology*, 425(22): 4286-4294 (2013).
- McKenney, D., Pouliot K. L., Wang Y., Murthy V., Ulrich M., Doring G., Lee J. C., Goldmann D. A., and Pier G. B.. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science*, 284: 1523-1527 (1999).
- Migula W. "Bakteriaceae (Stabchenbacterien)". Engerl A'da, Prantl K. Die Natürlichen Pflanzenfamilien, W. Engelmann, Leipzig, Teil I, Abteilung Ia . 20–30 (1895).
- Mika, F. & Hengge, R. Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA Biology*, 11: 494–507 (2014).
- Miura T, Mizushima S. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membrane of *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta*, 150: 159–161 (1968).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Monroe, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol*, 5(11): 307 (2007).
- Moreira S, Brown A, Ha R, Iserhoff K, Yim M, Yang J, Liao B, Pszczolko E, Qin W, Leung KT. Persistence of *Escherichia coli* in freshwater periphyton: biofilm-forming capacity as a selective advantage. *FEMS Microbiol Ecol*, 79: 608–618 (2012).
- Morgan J.L, Strumillo J, Zimmer J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature*, 493(7431): 181–186 (2013).
- Mortensen, B. L. & Skaar, E. P. The contribution of nutrient metal acquisition and metabolism to *Acinetobacter baumannii* survival within the host. *Front. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3: 95 (2013).
- Musarrat J, Ali K, Ansari M, Saquib Q, Siddiqui M, Khan S, et al. Green Synthesis of nanoparticles and their role as nano-antibiotics and anti-biofilm agents. *Planta Medica*, 81:44 (2015).
- Nadell, C.D., Bassler, B.L. and Levin, S.A. Observing bacteria through the lens of social evolution. *Journal of Biology*, 7(7): 27 (2008).
- Nakae, T., Identification of outer membrane protein of *Escherichia coli* that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 71: 877-884 (1976).
- Nasr, A.R., AbuShady, M.H., Hussein, S.H., Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of *staphylococci*. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 13: 269–274 (2012).
- Nenninger A.A, Robinson L.S, Hultgren S.J. Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 900–905 (2009).
- Nenninger, A.A.; Robinson, L.S.; Hammer, N.D.; Epstein, E.A.; Badtke, M.P.; Hultgren, S.J.; Chapman, M.R. CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation. *Mol Microbiol*, 81: 486–499 (2011).
- Nicolaus B., Kambourova M., Oner E.T., “Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology” *Environmental Technology*, 31(10): 1145– 1158 (2010).
- Nies, D. H., and Silver S.. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 14: 186-199 (1995).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Nies, D. H. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 730–750 (1999).
- Nies, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Letter*, 27: 313–339 (2003).
- Nikaido H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 1831–1836 (1989).
- Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem*, 269: 3905–3908 (1994).
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 67: 593–656 (2003).
- Nikaido, H., and Wu H. C. P.. Amino acid sequence homology among the major outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 81: 1048-1052 (1984).
- Nikaido, H., and Vaara M.. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev*, 49: 1-32 (1985).
- Nilsson, R. E., Ross, T., & Bowman, J. P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1): 14-24 (2011).
- Nishiyama Y, Sugiyama J, Chanzy H, Langan P. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I(alpha) from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Societ*, 125(47): 14300–14306 (2003).
- Nostro A, Cellini L, Di Giulio M, D'Arrigo M, Marino A, Blanco AR, Favalaro A, Cutroneo G, Bisignano G. Effect of alkaline pH on staphylococcal biofilm formation. *APMIS*, 120(9): 733-42 (2012).
- Novick R.P, Muir W.M. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr. Opinion Microbiol*, 2: 40-45 (1999).
- Oliveira R, Melo L, Oliveira A, et al. Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*: effects of pH and surface material. *Colloids and Surfaces*, 2: 41–46 (1994).
- O'Toole G, Kaplan H.B, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54: 49-79 (2000).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Olsen A, Arnqvist A, Hammar M, Normark S. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect Agents*, 2: 272-274 (1993a).
- Olsen A, Arnqvist A, Hammar M, Sukupolvi S, Normark S. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 7: 523-536 (1993b).
- Olsen A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, 338(6217): 652-655 (1989).
- Olsen, P.B., Schembri, M.A., Gally, D.L., Klemm, P. Differential temperature modulation by H-NS of the *fimB* and *fimE* recombinase genes which control the orientation of the type 1 fimbrial phase switch. *FEMS Microbiol. Letters*, 162(1): 17-23 (1998).
- Olson, E. R. Influence of pH on bacterial gene expression. *Mol Microbiol*, 8: 5-14 (1993).
- Omadjela O., Narahari A., Strumillo J., Melida H., Mazur O., Bulone V., Zimmer J. BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. Proc. *National Academy of Sciences*, 110: 17856 (2013).
- Orme R, Douglas C.W, Rimmer S & Webb M. Proteomic analysis of *Escherichia coli* biofilms reveals the overexpression of the outer membrane protein OmpA. *Proteomics*, 6: 4269-4277 (2006).
- Orruno, M., Parada, C., Kaberdin, V.R., Arana, I. Survival of *Escherichia coli* under Nutrient-Deprived Conditions: Effect on Cell Envelope Subproteome. *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*". *Book edited by Amidou Samie*, Chapter 20: 953-978 (2017).
- Osborn M.J, Gander J.E, Parisi E, Carson J. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J. Biol. Chem*, 247: 3962-3972 (1972).
- Otto, K., and Silhavy T. J.. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. Proc. *National Academy of Sciences*, 99: 2287-2292 (2002).
- Otto K, Norbeck J, Larsson T, Karlsson KA, Hermansson M: Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. *J. Bacteriol*, 183: 2445-2453 (2001).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Otto, K., Silhavy, T.J. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(4): 2287-2292 (2002).
- Outten, F. W., C. E. Outten, and T. O'Halloran. Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance,. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress responses*, 145–157 (2000).
- Outten, F.W., Hujman, D.L., Hale, J.A. and O'Halloran, T.V. The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* , 276: 30670-30677 (2001).
- Owen P, Meehan M, de Loughry-Doherty H, Henderson I. Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 16: 63–76 (1996).
- Özkanca, R. and Flint, K. P., The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 533-537 (2002).
- Özkanca, R., Survival and physiological status of *Escherichia coli* in lake water under different nutrient conditions, Ph D., *Department of Biological Sciences, University of Warwick*, 297 (1993).
- Padera R.F. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovasc Pathol*, 15: 264– 270 (2006).
- Pages J.M, James C.E, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 893–903 (2008).
- Patel, R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 437: 41–47 (2005).
- Papenfort K, Bassler B.L. Quorum sensing signalresponse systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14: 576–588 (2016).
- Pascal, T. A. *et al.* Experimental validation of the predicted binding site of *Escherichia coli* K1 outer membrane protein A to human brain microvascular endothelial cells: identification of critical mutations that prevent *E. coli* meningitis. *J Biol Che* , 28:37753–37761 (2010).
- Pautsch, A. & Schulz, G. E. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol*, 5: 1013–1017 (1998).
- Perrin C, Briandet R, Jubelin G, Lejeune P, Nickel Promotes Biofilm Formation by *Escherichia coli* K-12 Strains That Produce Curli. *Appl. Environ. Microbiol*, 75(6): 1723-1733 (2009).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Phisalaphong M, Jatupaiboon N. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose chitosan film. *Carbohydr Polym*, 74(3): 482-488 (2008).
- Planchon S, Gaillard-Martinie B, Dordet-Frisoni E, Bellon-Fontaine M.N, Leroy S, Labadie J, Hébraud M, Talon R. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosum*. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 88–96 (2006).
- Pogliano J, Lynch A.S, Belin D, Lin E.C, Beckwith J. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev*, 11(9):1169-1182 (1997).
- Poli A., Di Donato P., Abbamondi G. R., Nicolaus B., “Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea” *Hindawi Publishing Corporation Archaea*, 13 (2011).
- Posfai G, Koob M, Hradecná Z, Hasan N, Filutowicz M, and Szybalski W. In vivo excision and amplification of large segments of the *Escherichia coli* genome. *Nucleic Acids Research*, 22(12): 2392–2398 (1994).
- Poulsen L.V. Microbial biofilm in food processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, 32 (6): 321-326. (1999).
- Pratt, L. A., Hsing W., Gibson K. E., and Silhavy T. J.. From acids to osmZ: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 20: 911–917 (1996).
- Pratt, L. A., and Kolter R.. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*, 30: 285–293 (1998).
- Price S.B, Wright J.C, DeGraves F.J, Castanie-Cornet M.P, Foster J.W. Acid resistance systems required for survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. *Applied and Environmental Microbiol*, 70(8): 4792–4799 (2004).
- Prigent-Combaret C, Brombacher E, Vidal O, Ambert A, Lejeune P, Landini P, Dorel C. "Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene." *J. Bacteriol* , 183(24): 7213-7223 (2001).
- Prigent-Combaret C, et al. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* , 181: 5993–6002 (1999).
- Prigent-Combaret C, Prensier G, Le Thi T.T, Vidal O, Lejeune P, Dorel C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ. Microbiol*, 2: 450-464 (2000).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Pugsley, A.P. and Schnaitman, C.A. Outer membrane proteins of *Escherichia coli*. VII. Evidence that bacteriophage-directed protein 2 functions as a pore. **J. Bacteriol**, 133: 1181–1189 (1978).
- Raffa R.B, Iannuzzo J.R, Levine D.R, Bacterial communication (“Quorum Sensing”) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 312: 417-423 (2005).
- Raffa R.G, Raivio T.L. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. **Mol Microbiol**, 45: 1599–1611 (2002).
- Randall-Hazelbauer L, Schwartz M "Isolation of the bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli*." **J. Bacteriol**, 116(3): 1436-46 (1973).
- Rasko, D. V. & Sperandio, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discover**, 9: 117–128 (2010).
- Re, S. D and Ghigo, J. A CsgD-Independent Pathway for Cellulose Production and Biofilm Formation in *Escherichia coli* A CsgD-Independent Pathway for Cellulose Production and Biofilm Formation in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**, 188(8): 3073–3087 (2006).
- Reading N.C, Rasko D.A, Torres A.G, Sperandio V. The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106: 5889–5894 (2009).
- Reisner, A., Haagensen, J.A., Schembri, M.A., Zechner, E.L., and Molin, S. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Mol Microbiol**, 48: 933-946 (2003).
- Ren, D., Bedzyk L. A., Thomas S. M., Ye R. W. and Wood T. K.. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 64: 515–524 (2004).
- Rensing, C., and Grass G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. **FEMS Microbiology Reviews**, 27: 197–213 (2003).
- Phoenix D.A. "On the targeting and membrane assembly of the *Escherichia coli* outer membrane porin, PhoE." **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 16(2): 77-82 (1996).
- Roane, T. M., and I. L. Pepper. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. **Microbial Ecology**, 38: 358–364 (2000).
- Robinson N.J, Bird A.J, Turner J.S. Metallothionein gene regulation in cyanobacteria. In: Silver S, Walden W. eds. **Metal ions in gene regulation**, 372–397 (1998).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Robinson, L.S.; Ashman, E.M.; Hultgren, S.J.; Chapman, M.R. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol Microbiol*, 59: 870–881 (2006).
- Rosen, B.P. The role of efflux in bacterial resistance to soft metals and metalloids. *Essays in Biochemistry*, 34: 1-15 (1999).
- Rosetta N. Reusch. Insights into the structure and assembly of *Escherichia coli* outer membrane protein A. *FEBS Journal*, 279: 894–909 (2012).
- Rosner, J.L., Chai, T.J., and Foulds J., Regulation of OmpF porin expression by salicylate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 173 (18): 5631-5638 (1991).
- Rowland B.M. Bacterial contamination of dental unit waterlines: what is your dentist spraying into your mouth? *Journal of Clinical Microbiol*, 25: 73–77 (2003).
- Römling U, Amikam D. Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr. Opinion Microbiol*, 9: 218–228 (2006).
- Römling U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol*, 153(4): 205–212 (2002).
- Römling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta WD, Normark S. Curli fibers respect to operon structure and regulation. *J. Bacteriol*, 180: 722-731 (1998b).
- Römling U, Bokranz W, Rabsch W, Zogaj X, Nimtz M, Tschape H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 293: 273-285 (2003).
- Römling U, Sierralta WD, Eriksson K, Normark S. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol*, 28: 249–264 (1998a).
- Römling U, Rohde M, Olsén A, Normark S, Reinköster J ‘*AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways.’ *Mol Microbiol*, 36(1): 10-23 (2000).
- Römling U. Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 1234–1246 (2005).
- Römling U. Cyclic di-GMP, an established secondary messenger still speeding up. *Environ Microbiol*, 14: 1817–1829 (2012).
- Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P., “An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria” *International Dairy Journal*, 12: 163-171 (2002).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Rupp M.E, Fey P.D, Heilmann C, Gotz F. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *The Journal of Infectious Diseases*, 183: 1038–1042 (2001).
- Russell, J. B., and Diez-Gonzalez F.. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv. Advances in Microbial Physiology*, 39: 205–234 (1998).
- Ryu, J.H.; Beuchat, L.R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: Effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Appl. Environ. Microbiol*, 71: 247–254 (2005).
- Saito, H., and Kobayashi, H., “Bacterial responses to alkaline stress”, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, *Chiba University*, 260: 8675 (2003).
- Sakuma, T., N. Yamada, H. Saito, T. Kakegawa, and H. Kobayashi. pH dependence of the function of sodium ion extrusion systems in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1363: 231–237 (1998).
- Samanta, P., Clark, E. R., Knutson, K., Horne, S. M. & Prů β, B. M. OmpR and RcsB abolish temporal and spatial changes in expression of flhD in *Escherichia coli* biofilm. *BMC Microbiology*, 13: 182 (2013).
- Sato, M., Machida K., Arikado E., Saito H., Kakegawa T., and Kobayashi H. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 943-947 (2000).
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriology*, 184(4): 1140-1154 (2002).
- Sauer K, Cullen M.C, Rickard A.H, Zeef L.A, Davies D.G, Gilbert P. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm. *J. Bacteriol*, 186: 7312-7326 (2004).
- Saxena I.M, Kudlicka K, Okuda K, Brown R.M, Jr. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: Implications for cellulose crystallization. *J. Bacteriol* , 176(18): 5735–5752 (1994).
- Schembri M.A, Hjerrild L, Gjermansen M, Klemm P. Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43 *J. Bacteriol*, 185: 2236–2242 (2003a)
- Schembri, M.A., Kjaergaard, K., Klemm, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol*, 48(1): 253-267 (2003b).
- Schirmer, T., General and specific porins from bacterial outer membrane. *Journal of Structural Biology*, 121: 101-109 (1998).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Schulz, G. E., The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1565: 308-317 (2002).
- Serra D.O, Richter A.M, Hengge R. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J. Bacteriol* , 195: 5540–5554 (2013).
- Shankar S, Ye RW., Schlichtman D., Chakrabarty AM., Exopolysaccharide Alginate Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Enzymology and Regulation of Gene Expression, *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 70: 221–255 (1995).
- Sharma V.K, Casey TA. *Escherichia coli* O157:H7 lacking the qseBC-encoded quorum-sensing system outcompetes the parental strain in colonization of cattle intestines. *Appl. Environ. Microbiol*, 80(6): 1882–1892 (2014).
- Sheikh, J., Hicks, S., Dall’Agnol, M., Phillips, A.D., and Nataro, J.P. ‘‘Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*’’. *Mol Microbiol*, 41: 983–997 (2001).
- Sheykhnazari S, Tabarsa T, Ashori A, Shakeri A, Golalipour M .Bacterial synthesized cellulose nanofibers. Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. *Carbohyd Polym*, 86(3): 1187-1191 (2011).
- Shrout, J.D. and Nerenberg, R. Monitoring Bacterial Twitter: Does Quorum Sensing Determine the Behavior of Water and Wastewater Treatment Biofilms? *Environmental Science & Technology*, 46(4): 1995-2005 (2012).
- Shu, C.-H., Lung, M.-Y., Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. *Process Biochemistry*, 39: 931-937 (2004).
- Shu, Q., Krezel, A.M., Cusumano, Z.T., Pinkner, J.S., Klein, R.; Hultgren, S.J., Frieden, C. Solution NMR structure of CsgE: Structural insights into a chaperone and regulator protein important for functional amyloid formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113: 7130–7135 (2016).
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. & Romling, U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*, 53: 1123–1134 (2004).
- Sinde, E., & Carballo, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol*, 17: 439-447 (2000).
- Singer, S.W., Erickson, B.K., VerBerkmoes, N.C., Hwang, M., Shah, M.B., Hettich, R.L. and Thelen, M.P. Posttranslational modification and sequence variation of redox-active proteins correlate with biofilm life cycle in natural microbial communities. *The ISME Journal*, 4(11): 1398–1409. (2010).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Slonczewski, J. L., and J. W. Foster. pH-regulated genes and survival at extreme pH, *American Society for Microbiology*, 1539–1552 (1996).
- Slonczewski, J. L. pH stress. *Academic Press*, 625–632 (2000).
- Smith S.G, Mahon V, Lambert M.A, Fagan R.P. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett*, 273: 1–11 (2007).
- Smyth C.J, Marron M.B, Twohig J.M, Smith S.G. Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 16(2): 127-39 (1996).
- Sokollek SJ; Hertel C; Hammes WP. "Cultivation and preservation of vinegar bacteria" *Journal of Biotechnology*, 60 (3): 195–206. (1998).
- Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol*, 43: 793-808 (2002).
- Somorin Y. M. Vollmerhausen T, Waters N , Pritchard L , Abram F , Brennan F , 3 and O'Byrne C. Absence of Curli in Soil-Persistent *Escherichia coli* Is Mediated by a C-di-GMP Signaling Defect and Suggests Evidence of Biofilm-Independent Niche Specialization. *Front Microbiology*, 9: 1340 (2018).
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., Bertin, P. Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J. Bacteriol*, 181(24): 7500-7508 (1999).
- Soyuçok A, Ekiz T , Kılıç B.G. Ekzopolisakkaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayindeki Önemi. *Neşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD Özel Sayı*, 332-344 (2016).
- Srey S, Jahid I.K, Ha S.D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31: 572–585 (2013).
- Stancik, M. L., Stancik, M. D., Schmidt, B., Barnhart, M. D., Yoncheva, N. Y., and Joan L. Slonczewski, L. J., “pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid Catabolism in *Escherichia coli*” , *J. Bacteriol*, 184 (15): 4246-4258 (2002).
- Stanley, N. R., and B. A. Lazazzera.. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol*, 52: 917– 924 (2004).
- Starkey, M., A. K. Gray, S. I. Chang, and M. Parsek. A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms. *Microbial biofilms*, 174-191 (2004).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Stenberg, F., Chovanec, P., Maslen, L. S., Robinson, V. C., Ilag, L. L., Heijne, G., and Daley, O. D., Protein Complexes of the *Escherichia coli* Cell Envelope, **J. Biol. Chem**, 280 (41): 34409–34419 (2005).
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic I., Savic, B., Svabic- Vlahovic, M., “A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation”, **Journal of Microbiological Methods**, 40: 175–9 (2000).
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. Biofilms as complex differentiate communities. **Annu Rev Microbiol**, 56: 187-209 (2002).
- Stoorvogel J, Van Bussel M, Van de Klundert JAM. Cloning of a beta-lactam resistance determinant of *Enterobacter cloacae* affecting outer membrane proteins of Enterobacteriaceae. **FEMS Microbiol Lett**, 48: 277–281 (1987).
- Stumpe S, Schmid R, Stephens DL, Georgiou G, Bakker EP "Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*." **J. Bacteriol**, 180(15): 4002-4006 (1998).
- Subbarao G.V, Van den Berg B. Crystal structure of the monomeric porin OmpG. **Journal of Molecular Biology**, 360(4): 750-9 (2006).
- Sugawara E, Nikaido H. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem**, 267(4): 2507–2511 (1992).
- Sutherland, I. W. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. **Cambridge, Cambridge University Press**, (1990).
- Sutherland, I. W. The biofilm matrix an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends Microbiol**, 9: 222–227 (2001).
- Tavio, M.D., Vila, J., Ruiz, J., Martin-Sanchez, A.M. and de Anta, M.T.J. Mechanisms involved in the development of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 44: 735–74 (1999).
- Taylor, J.D.; Zhou, Y.; Salgado, P.S.; Patwardhan, A.; McGuffie, M.; Pape, T.; Grabe, G.; Ashman, E.; Constable, S.C.; Simpson, P.J.; et al. Atomic resolution insights into curli fibre biogenesis. **Structure**, 19: 1307–1316 (2011).
- Thomas, A. D., and I. R. Booth. The regulation of expression of the porin gene *ompC* by acid pH. **Journal of General Microbiology**, 138: 1829–1835 (1992).
- Thormann K.M, Saville R.M, Shukla S, Spormann A.M. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms **J. Bacteriol**, 187: 1014-1021 (2005).
- Todt J.C., Rocque W.J., McGroarty F.J.: Effects of pH on bacterial porin function. **Biochemistry**, 31: 10471–10478 (1992).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Tormo M.A, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penade's J.R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*, 151: 2465–2475 (2005).
- Trachoo N. Biofilms and the food industry. Songklanakarin *Journal of Science and Technology*, 25 (6): 807-815 (2003).
- Truhlar A. M., Salvucci A. E., Walter M. T., Warnick L. D., Hay A. G., Steenhuis T. Effects of manure-application practices on curli production by *Escherichia coli* transported through soil. *Environmental Science & Technology*, 49 :2099–2104 (2015).
- Uhlich G.A, Cooke P.H, Solomon E.B. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl. Environ. Microbiol*, 72: 2564-2572 (2006).
- Ünlütürk, A., Turantaş, F., ‘‘Gıda mikrobiyolojisi’’, *Mengi Tan Basımevi*, İzmir, 605-606 (1998).
- Vallee, B. L., and D. S. Auld. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, 29: 5647–5659 (1990).
- Van Alphen L, Havekes L, Lugtenberg B. "Major outer membrane protein d of *Escherichia coli* K12. Purification and in vitro activity of bacteriophages k3 and f-pilus mediated conjugation." *FEBS Letters*, 75(1): 285-290 (1977).
- Vandeputte-Rutten L, Kramer R, Kroon O , Dekker N,Egmond M.R and Gros P. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site. *The EMBO J*, 20(18): 5033–5039. (2001).
- Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J., De Vuyst L., ‘‘Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus thermophilus* Strains is Reflected in their Production and their Molecular and Functional Characteristics’’ *Appl. Environ. Microbiol*, 70 (2): 900-912 (2004).
- Verstraete K, DE Ru K, S, VAN Weyenberg S, Pi_erard D, DE Zutter L, Herman L, Robyn J, Heyndrickx M, ‘Genetic characteristics of Shiga toxin-producing *E. coli* O157, O26, O103, O111 and O145 isolates from humans, food, and cattle in Belgium.’ *Epidemiology & Infection*, 141: 2503–2515 (2013).
- Vidal, O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman,M. and Lejeune P.. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression *J. Bacteriol*, 180: 2442–2448 (1998).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Von Canstein, H., Y. Li, J. Leonhäuser, E. Haase, A. Felske, W.-D. Deckwer, and I. Wagner-Doöbler. Spatially oscillating activity and microbial succession of mercury-reducing biofilms in a technical-scale bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol*, 68: 1938–1946 (2002).
- Vuong C., et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiology*, 6: 269–275 (2004).
- Wang Y. The Function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 292: 396–401 (2002).
- Wang Y.F, Dutzler R, Rizkallah P.J, Rosenbusch J.P, Schirmer T "Channel specificity: structural basis for sugar discrimination and differential efflux rates in maltoporin." *J Mol Biol*, 272(1): 56-63 (1997).
- Wang X, Hammer N.D, Chapman M.R. The molecular basis of functional bacterial amyloid polymerization and nucleation. *J. Biol. Chem*, 283: 21530–21539 (2008).
- Wang X, Preston J.F, III, Romeo T. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J. Bacteriol*, 186: 2724–2734 (2004).
- Wang X, Rochon M, Lamprokostopoulou A, Löunsdorf H, Nimtz M, Römling U. Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 2352–2363 (2006).
- Waters C.M, Bassler B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 319–346 (2005).
- Watnick P, Kolter R. Biofilm city of microbes. *J. Bacteriol* , 182: 2675-2679 (2000).
- Weibel, D.B., Flickinger, S.T., Copeland, M.F., Downes, E.M., Braasch, A.T., Tuson, H.H. and Eun, Y.J. Quorum Sensing between *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Accelerates Cell Growth. *J. Am. Chem. Soc*, 133(15): 5966-5975 (2011).
- White C.B, Chen Q, Kenyon G.L, Babbitt P.C "A novel activity of OmpT. Proteolysis under extreme denaturing conditions." *J. Biol. Chem*, 270(22): 12990-12994 (1995).
- Whiteley M, Parsek M.R, Greenberg E.P. Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol*, 182(15): 4356-60 (2000).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Wood T.K, Gonzalez Barrios A.F, Herzberg M, Lee J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, 1–7 (2006).
- Wong A.C.L. Biofilms in food processing environments. ***Journal of Dairy Science***, 81: 2765–2770 (1998).
- Wu A J, Labrie Y.D., Tremblay N, Haine D., Mourez M., Jacques M. Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. ***Journal Applied Microbiology***, 115(1): 30-40 (2013)
- Wu L, Lin X, and Peng X. From Proteome to Genome for Functional Characterization of pH-Dependent Outer Membrane Proteins in *Escherichia coli*. ***Journal of Proteome Research***, 8: 1059–1070 (2009).
- Xu C, Lin X, Ren H, Zhang Y, Wang S, Peng X. Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline. ***Proteomics***, 6(2): 462–473 (2006).
- Yang, X., Ma, Q., and Wood, T.K. The R1 conjugative plasmid increases *Escherichia coli* biofilm formation through an envelope stress response. ***Appl. Environ. Microbiol***, 74: 2690–2699 (2008).
- Yaron S., Römling U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. ***Microbial Biotechnology***, 7: 496–516 (2014).
- Yildiz O, Vinothkumar K.R, Goswami P, Kuhlbrandt W. "Structure of the monomeric outer-membrane porin OmpG in the open and closed conformation. ***EMBO J***, 25(15): 3702-3713 (2006).
- Yuan J, Wei B, Shi M, Gao H. Functional assessment of EnvZ/ OmpR two-component system in *Shewanella oneidensis*. ***PloS One***, 6(8): 23701 (2011).
- Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. ***New Microbiologica***, 33: 137–145 (2010).
- Zhang D, Li H, Lin X, Peng X. Outer membrane proteomics of kanamycin-resistant *Escherichia coli* identified MipA as a novel antibiotic resistance-related protein. ***FEMS Microbiol Lett***, 362(11): 1–8 (2015).
- Zhang D.F, Jiang B, Xiang Z.M, Wang S.Y. "Functional characterisation of altered outer membrane proteins for tetracycline resistance in *Escherichia coli*." ***J Antimicrob Agents***, 32(4): 315-319 (2008).
- Zhu J, Pei D. A LuxP-based fluorescent sensor for bacterial autoinducer II. ***ACS Chem Biol***, 3: 110–119 (2008).

KAYNAKLAR (devam ediyor)

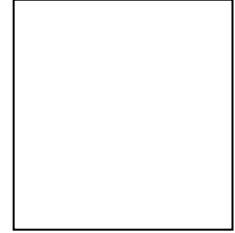
- Zogaj X, Bokranz W, Nimtz M, Römling U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun*, 71: 4151-4158 (2003).
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz,W. & Romling, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *E. coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol*, 39: 1452–1463 (2001).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Fatma ER

Doğum Yeri ve Tarihi: BİLECİK/ Pazaryeri - 05/02/1992



Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Denizli Pamukkale Üniversitesi/ Fen Edebiyat Fakültesi/ Biyoloji Bölümü

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce (orta seviye)

İş Deneyimi

1) Denizli Pamukkale Üniveristesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi
Onkoloji Anabilim Dalı Patoloji Bölümü (06.2014-09.2014) Zorunlu Staj

2) Denizli Pamukkale Üniveristesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi
Hematoloji Bölümü (06.2014-07.2015) Kısmi Zamanlı Öğrenci Çalışma Programı

İletişim Bilgileri

Adres : Doğanlar Mah. Kireçlik Sok. No:36/A BİLECİK/Pazaryeri

Tel : 0546 887 31 97

E-Posta Adresi : fatmaerr92@gmail.com

Akademik Çalışmaları

1. Gülçin ÇETİN, Özge KAYGUSUZ, **Fatma ER**, Şifa GÜNGÖR, Cihan DARCAN “The Effect of Some Metals (Cu, Co and Ni) on Expression of OmpC and OmpF Porin Proteins” ISEEP-2017 VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems. 2017.
2. Özge KAYGUSUZ, Gülçin ÇETİN, **Fatma ER**, Hatice Kübra ŞAHİN, Tuba Nur CEYHAN, Cihan DARCAN “Investigation of the Effect of Some Metals on Growth of cpxA, cpxR, cya and crp Mutant Strains” ISEEP-2017 VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems. 2017.
3. **Fatma ER**, Cihan DARCAN “Investigation of Role of Porin Proteins in Biofilm Formation of *Esherichia coli*” 7th International Moleculer Biology and Biotechnology Congress. 2018.

Tarih: