

Abiyotik yüzeylerde termofilik *Anoxybacillus rупiensis* DSM 17127^T suşunun biyofilm oluşumu ve polistiren yüzeyler üzerindeki biyofilm yapısının giderimi

Tuğba KILIÇ^{1,*}, Başar KARACA², Arzu ÇÖLERİ CİHAN²

¹Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, 06830, Gölbaşı, Ankara

²Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06100, Tandoğan, Ankara

Geliş Tarihi (Received Date): 30.07.2020

Kabul Tarihi (Accepted Date): 24.02.2021

Öz

Bu çalışmanın amacı, *Anoxybacillus rупiensis* DSM 17127^T'nin endüstride kullanılmakta olan abiyotik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumunu incelemek ve polistiren yüzeyler üzerinde oluşan biyofilm yapısının sanitasyon ajanları ile giderimini sağlamaktır. Bakterinin genomik DNA (gDNA)'sı ve biyofilm matriksi yapısında bulunan ekstraselüler DNA (eDNA)'sı spektrofotometrik analiz ve agaroz jel görüntülemesi ile tespit edilmiştir. Polistiren yüzeylerde biyofilm oluşumu ve biyofilm yapısının giderimi kristal viyole bağlanma yöntemi ile belirlenmiştir. Bakterinin ideal planktonik gelişimi için optimum sıcaklık, pH ve tuzluluk istekleri sırasıyla 55 °C, 8.0, % 1 ve ideal biyofilm üretimi için 60 °C, 8.0, % 0 olarak saptanmıştır. gDNA'nın (27.6 kb) molekül ağırlığının, eDNA'dan (20.9 kb) daha büyük olduğu belirlenmiştir. gDNA ve eDNA saflaştırıldıktan sonra DNaz I, RNaz A ve proteinaz K ile muamele edilmiştir. gDNA sadece DNaz I ile tamamen parçalanmıştır. Saflaştırılmış haldeki eDNA ise, üç enzime de direnç göstermiştir. Ancak, olgun biyofilmlerin DNaz I enzimi ile muamelesi sonucunda biyomasta 2 saat içerisinde % 80 oranında azalma gözlenmiştir. Bakterinin polikarbonat, polipropilen, polivinil klorür, paslanmaz çelik, polistiren ve cam yüzeylerinde biyofilm oluşturduğu gözlenmiş olup, en ideal yüzey polikarbonat (5.69 log kob/cm²) olarak belirlenmiştir. Biyofilm giderimi çalışmalarında, protein parçalayıcı sanitasyon ajanlarının polisakkarit parçalayıcı ajanlardan daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, bakterinin eDNA'sının olgun biyofilm matriksinin bütünlüğü ve sağlamlığı adına önemli bir yapısal rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca, bakterinin abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. *A. rупiensis*'in biyofilminin giderimi için süt

* Tuğba KILIÇ, tugbakilic@gazi.edu.tr, <http://orcid.org/0000-0002-5474-0288>

Başar KARACA, karaca@ankara.edu.tr, <http://orcid.org/0000-0001-6943-8965>

Arzu ÇÖLERİ CİHAN, acihan@science.ankara.edu.tr, <http://orcid.org/0000-0002-7289-6251>

endüstrisinde kullanımı olan seçilmiş sanitasyon ajanlarının önemli ölçüde etki sağladığı saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Abiyotik yüzeyler, *Anoxybacillus rupiensis*, biyofilm giderimi, sanitasyon ajanları.

Biofilm formation of the thermophilic *Anoxybacillus rupiensis* strain DSM 17127^T on abiotic surfaces and removal of its biofilm structure on polystyrene surfaces

Abstract

The aim of this study was to examine the biofilm formation of *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127^T on abiotic surfaces used in the industry and to remove the biofilm structure formed on polystyrene surfaces with sanitation agents. The genomic DNA (gDNA) and the extracellular DNA (eDNA) in the biofilm matrix structure of the bacteria were determined by spectrophotometric analysis and agarose gel imaging. For the biofilm formation on abiotic surfaces and the removal of the biofilm structure formed on polystyrene surfaces, crystal violet binding assay was applied. The optimum temperature, pH, and salinity for the growth and biofilm formation of the bacteria were 55 °C, 8.0, 1 % and, 60 °C, 8.0, 0 %, respectively. The molecular weight of gDNA (27.6 kb) was determined to be larger than eDNA (20.9 kb). gDNA and eDNA were partially purified and treated with DNase I, RNase A and proteinase K. The purified gDNA was completely disrupted only by DNase I, and the purified eDNA was resistant to all three enzymes. As a result of the treatment of biofilm containing eDNA with DNase I, it was observed that the eDNA was sensitive to DNase I and the biofilm mass decreased by 80 % within 2 hours. The bacterium was observed to form biofilms on polycarbonate, polypropylene, polyvinyl chloride, stainless steel, polystyrene and glass surfaces, and the most ideal surface determined as polycarbonate (5.69 log cfu/cm²). In the biofilm removal studies, protein degrading sanitation agents were found to be more effective than polysaccharide degrading agents. In conclusion, it was determined that the eDNA of the bacteria plays an important structural role in the integrity and robustness of the mature biofilm matrix. In addition, it was showed that the bacterium is capable of forming biofilms on abiotic surfaces. Dairy industrial sanitation agents had a significant effect on the removal of the biofilm mass of *Anoxybacillus rupiensis*.

Keywords: Abiotic surfaces, *Anoxybacillus rupiensis*, biofilm removal, sanitation agents.

1. Giriş

Anoxybacillus türlerinin birçoğu ilk kez Pikuta vd. [1] tarafından tanımlanmıştır. *Anoxybacillus rupiensis* DSM 17127^T (AJ879076) ise ilk kez Derekoa vd. [2] tarafından sıcak su kaynağından izole edilmiştir. Diğer bir çalışmada, Jabeen vd. [3] tarafından sıcak su kaynağından *A. rupiensis* JF82 ve JF83 izole edilmiştir. *A. rupiensis* Ir3 ise toprak

örneklerinden izole edilmiştir [4]. Ayrıca, *Anoxybacillus* cinsinin diğer türleri çamur, gübre, jeotermal toprak, süt ve jelatin örneklerinden izole edilmiştir [1, 5, 6].

Biyofilmler, süt işleme tesislerinde son ürünlerdeki bakteriyel kontaminasyonun temel kaynağı olmaktadır [7]. *Anoxybacillus flavithermus*, süt tozlarından sıklıkla izole edilebilen yaygın bir kontaminanttır. Ayrıca, bu bakterinin biyofilm ve spor oluşumu çok hızlı bir şekilde (6-8 saat) ve eş zamanlı olabilmektedir [5, 8]. Dahası, spor oluşturan termofilik *A. flavithermus*, süt tozu fabrikalarında bulunan evaporatörlerin duvarları veya sprey kurutucuları gibi paslanmaz çelik yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturabilmektedir [5]. Gıda endüstrisinde bulunan ekipmanların, su sistemlerinin, soğutma kulelerinin üzerinde biyofilmlerin oluşması gıda bozulmaları ve ekipman arızalanmaları sebebiyle ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir [9].

Biyofilmler dirençli fenotipleri sebebiyle çok zor elimine edilmektedir. Ancak, bazı geleneksel temizleme ve dezenfeksiyon rejimleri biyofilm kontrolüne katkı sağlayabilmektedir. Mikrobiyal orijinli enzimler, antimikrobiyal moleküller ve türler arası etkileşimleri sekteye uğratan bazı ajanların kullanımı ile yeni kontrol stratejileri geliştirilebilmektedir. Biyofilm oluşumunun önlenmesi için temel strateji, bakterilerin yüzeylere sıkıca tutunmadan önce yüzeylerin düzenli olarak temizlenmesi ve dezenfekte edilmesidir. Dezenfektanlar, yağ, karbonhidrat ve protein gibi organik kalıntıların varlığında çok etkili olabilmektedir [10]. Sanitasyon uygulamaları, yüzeylerden istenmeyen mikroorganizmaların ve ürünlerin kalıntılarını giderebilmektedir. Bu program dört temel aşama içermektedir ve bu aşamaların kombinasyonları da tercih edilebilmektedir. Bu aşamalar; kimyasal uygulama, mekanik/kinetik uygulama, sıcaklık/termal uygulama kullanımları ve temas süresidir. Kimyasal uygulamalar, temizleme ve dezenfeksiyon fazları için önemlidir. Temizleme fazında kimyasallar bakteriyel kontaminasyonu yok etmekte ve bakterilerin yüzeylere tutunmalarını azaltmaktadır. Dezenfeksiyon fazında kullanılan kimyasallar temizleme işleminden sonra geri kalan mikroorganizmaların yükünü azaltmaktadır [11]. Enzimatik içeriği olan deterjanların kullanımı, “yeşil kimyasallar”, gıda endüstrisinde biyofilm probleminin üstesinden gelmek için kullanılmaktadır [10]. Enzimatik giderim mekanizmaları, hücre zarının bileşenlerinin parçalanması ile hücre lizisini, yüzeye tutunan hücre bileşenlerinin ve çoğalarak tutunan hücrelerin salgıladığı hücre dışı matriksin parçalanmasını, hücre içi iletişimin kesilmesini (quorum sensing) ve çevresel maddelerin parçalanmasını kapsamaktadır [12]. Hücre dışı matriksi parçalayan enzimlerin antimikrobiyal etkisi biyofilmin mekanik stabilitesinin azalmasına neden olabilmektedir. Örneğin, proteazlar, ticari olarak kontakt lenslerden proteinlerin giderimi için kullanılmaktadır. Amilazlar ise, sıvı deterjanların formülasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Lizozimler, doğal antibakteriyel enzimlerdir. Selülaz, kağıt, tekstil ve gıda endüstrisinde biyofilmlerin önlenmesi ve giderilmesi için enzimatik solüsyonların bileşenleri olarak kullanılabilir [13].

Termofilik basillerin çeşitli yüzeylere tutunarak üretebildikleri biyofilm karakteristiklerinin anlaşılması, spor üreten bu bakterilerin pek çok endüstriyel süreçte oluşturdukları kontaminasyonu azaltabilmek ve etkili sanitasyon stratejileri geliştirmek adına önem arz etmektedir. Bu amaçla, daha önceki çalışmamızda *A. rупiensis* DSM 17127^T bakterisinin güçlü biyofilm oluşturabildiği, polistiren ve paslanmaz çelik yüzeylere tutunabildiği bilgisinden hareketle mevcut çalışma tasarlanmıştır [14]. Bu bakterinin özellikle biyofilm yapılarının giderimi hakkında literatürde henüz bir bilgi

bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı ise, daha önce güçlü bir biyofilm üreticisi olduğu tespit edilen *A. rupiensis*'in endüstride yaygın olarak kullanılmakta olan yüzey materyalleri üzerinde ne düzeyde biyofilm üretebildiğini tespit etmek ve polistiren yüzeyler üzerinde oluşan biyofilm yapısının sanitasyon ajanları ile giderim potansiyelini araştırmaktır. Gram-pozitif bakterilerin biyofilm giderimi için temel hedef bölgeleri, hücre duvarı, sitoplazmik zar, fonksiyonel ve yapısal proteinler, DNA, RNA'lardır [15]. Bu çalışmada bu hedef bölgeleri göz önünde bulundurularak, proteinlere, polisakkartilere, DNA ve RNA'ya etki eden sanitasyon ajanları test edilmiştir.

2. Deneysel çalışmalar

2.1. Bakteri kültürünün ön aktifleştirme şartları

Biyofilm çalışmaları için Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda mevcut olan, daha önce Derekoa vd. [2] tarafından sıcak su kaynağından izole edilmiş, aerobik, gram-pozitif basil, spor oluşturan termofilik *A. rupiensis* DSM 17127^T (AJ879076) bakterisi seçilmiştir. Ön aktifleştirme için, -80 °C'de gliserol stok kültürlerinde bulunan bakteri, öncelikle NaCl içeren Tryptic Soy Agar (TSA, Merck, Almanya) besiyerinde 55 °C'de 18 saat süresince inkübe edilmiştir. Bu kültürden 3 mL'lik NaCl içeren Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, Almanya) besiyerine yoğun bir bulanıklık (OD: 0.5-0.7) elde edilinceye kadar aşılınmış ve kültür süspansiyonu 55 °C'de 18 saat çalkalamalı koşullarda (170 rpm) geliştirilmiştir. Nihai aşamada bu aktif sıvı kültürden alınarak, NaCl ihtiva etmeyen TSB besiyerine inoküle edilmiş ve kültür çalkalamalı koşullarda 55 °C'de 6 saat süresince inkübe edilmiştir. Söz konusu üç basamaklı inokülüm hazırlığı ilgili termofilik basilin sporulasyonu fazını geciktirmek adına önem arz etmektedir. Sporulasyonda ki gecikme faz kontrast mikroskopisindeki incelemeler ile de teyit edilmiştir. Hazırlanan son kültür bütün biyofilm çalışmalarında kullanılmıştır.

2.2. Polistiren yüzeylerde kristal viyole ile biyofilm miktarının tayini

Bakterinin U-tabanlı 96 kuyucuklu polistiren mikrotitrasyon plakaların duvarlarında (Lp Italiana) biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Woodward vd. [16] ve Stepanović vd. [17] tarafından önerilen yöntemler modifiye edilerek uygulanmıştır. Ön aktifleştirme işleminden sonra, kuyulara öncelikle 190'ar µL NaCl içermeyen TSB besiyeri ve 10'ar µL aktif kültür aşılınmıştır. Yalnızca besiyeri ihtiva eden kuyular negatif kontrol grubu olarak tasarlanmıştır. Plakalar 60 °C'de 48 saat süresince statik olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, tutunamayan planktonik bakteri hücrelerini uzaklaştırmak için kuyular 2 defa serum fizyolojik (SF, % 0.85 NaCl) ile yıkanmıştır. Plakalar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Plaka kuyularında geriye kalan biyofilm matriks yapılarını fikse etmek adına kuyulara 200'er µL % 95'lik metanol (Merck, Almanya) transfer edilmiş ve plakalar 37 °C'de 15 dk bekletildikten sonra kuyular boşaltılmıştır. Daha sonra plakaların her biri oda sıcaklığında 15 dk kurutularak metanolün uçması sağlanmıştır. Ardından kuyulara 200'er µL kristal viyole çözeltisi (% 1'lik, Merck, Almanya) eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilerek biyofilm matriks yapılarının boyanması sağlanmıştır. Boyama işleminden sonra, kuyular distile su ile boya kalıntısı kalmayacak şekilde dikkatlice yıkanmış, oda koşullarında kurutulmuştur. Ardından, biyofilm tabakasına bağlanan kristal viyole boyasının çözünmesi için kuyulara 200'er µL etanol:aseton (70:30 w/w) (Merck, Almanya) çözeltisi ilave edilerek, plakalar 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda çözünen kristal viyole OD595nm'de Eliza okuyucusunda (BioTek Elisa reader, µQuant, Biotek Inc., Amerika)

okutulmuştur. Yukarıda anlatılan tüm basamaklar negatif kontrol grubuna da uygulanmıştır. Çalışma 3 tekrarlı olacak şekilde tasarlanmıştır.

2.3. Bakterinin planktonik gelişimi ve biyofilm oluşumu üzerine çevre şartlarının etkilerinin belirlenmesi

Bakterinin planktonik gelişimi ve biyofilm oluşumu için 96 kuyulu polistiren mikrotitrasyon plakalarda optimum pH (4.0-11.0), tuz (% 0.0-5.0) ve sıcaklık (50-65 °C) gereksinimlerinin belirlenmesi için ön aktifleştirme sonrası, toplam hacim 200 µL olacak şekilde, kuyulara 190 µL TSB besiyeri ve 10 µL aktif kültür aşılacaktır. Plakalar, 0., 6., 18., 24. ve 48. saatler de Eliza okuyucusunda her parametre için üç tekrarlı olacak şekilde OD595nm'de okutulmuştur. Negatif kontrol olarak sadece optimum koşullara ayarlanmış inokulum içermeyen TSB besiyeri kullanılmıştır. Bakterinin planktonik gelişimi için gerekli optimum pH, tuz ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesinin ardından, optimum biyofilm gelişimi için gerekli pH, tuz ve sıcaklık değerleri, 48. saat sonunda kristal viyole boyama uygulaması sonucunda belirlenmiştir. Bu kısımdan sonra gerçekleştirilen tüm deneyler, bakterinin biyofilm oluşumu için ihtiyaç duyduğu optimum pH, tuz ve sıcaklık değerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.4. Hücre dışı DNA içeriğinin tayini

Biyofilmin hücre dışı polimerik madde (EPS) bileşenlerinden olan hücre dışı DNA (eDNA) içeriğinin tayini için ön aktifleştirme işlemi sonrası, son aktif kültürden TSA besiyerine 200 µL ekim yapılarak 18 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda TSA besiyeri yüzeyinde gelişen koloniler hasat edilmiştir. Bu içerik daha sonra 2 mL SF içerisinde vortekslenerek süspanse edilmiştir. SF ile çözülen biyofilm örneği, daha sonra 13.000 rpm'de 4 °C'de 7 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Üst faz başka bir mikrofüj tüpüne alınarak 0.22 µm por çapına sahip membran filtrelerden (Sartorius, Fransa) geçirilerek tamamen hücrelerden arındırılmıştır. Elde edilen filtrat eDNA tayininde kullanılmıştır. Pelet kısmı ise, genomik DNA (gDNA) izolasyonu için muhafaza edilmiştir. eDNA izolasyonu için öncelikle filtre edilen üst faza, 750 µL kloroform-izoamil alkol (24:1) eklenmiştir. 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve üst faz yeni bir mikrofüj tüpüne alınmıştır. Üst faz üzerine 750 µL fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) (Sigma-Aldrich, Amerika) eklenerek tekrar 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst fazın üzerine hacminin 0.6'sı (yaklaşık 350 µL) kadar izopropanol (Merck, Almanya) eklenmiştir. Bu içerik -20 °C'de 20 dk bekletilmiş ve tekrar 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı dökülmüş, çökelti üstüne 350 µL % 70'lik soğuk etanol (Merck, Almanya) eklenmiştir. Tekrar 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. eDNA içeren pelet oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra 30 µL Tris-EDTA (TE) tamponu ile çözümlenerek üzerine 5 mg/mL'lik RNaz A'dan (Sigma R6513) 4 µL eklenmiş ve 37 °C'de 45 dk bekletilmiştir [18]. eDNA konsantrasyonu (ng/µL) ve saflığı için 260/280 ve 260/230 oranları nanodrop cihazı (Thermo Scientific NanoDrop Lite, Amerika) ile ölçülmüştür. Daha sonra, örnekler 1.5 µL etidyum bromür (Sigma E-8751) içeren % 1.5'lük agaroz (Sigma A9539) jel elektroforezinde 120 V'da 1 saat yürütülmüş ve UV translüminatör (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee, Fransa) ile görüntülenmiştir. eDNA örneklerinin moleküler ağırlıkları, Quantum-Capp software görüntüleme sistemi yardımıyla kilobaz (kb) cinsinden hesaplanmıştır.

2.5 Bakterinin genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA (gDNA) izolasyonu, gram pozitif bakterilerin izolasyonu için uygun DNA izolasyon kiti (Genomik DNA purifikasyon kiti, Thermo K0512, Amerika) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. gDNA izolasyonundan sonra, örneklere 5 mg/mL RNaz

A enziminden 4 µL eklenmiştir. Daha sonra, 37 °C’de 30 dk inkübe edilerek RNA’lar uzaklaştırılmıştır. Ardından, 300 µL % 100’lük soğuk etanol (Merck, Almanya) eklenerek, -20 °C’de 1 gece bekletildikten sonra 13.000 rpm’de 7 dk santrifüj edilmiştir. Üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra, üzerine 300 µL %70’lik soğuk etanol eklenmiş ve 13.000 rpm’de 7 dk santrifüj edilmiştir. Tekrar üst kısım uzaklaştırılarak, gDNA içeren pelletler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Örnekler, kurutma işleminden sonra 50 µL TE tampon ile çözülmüştür. gDNA konsantrasyonu (ng/µL) ve saflığı için 260/280 ve 260/230 oranları nanodrop cihazı ile ölçülmüştür. Daha sonra, örnekler 1.5 µL etidyum bromür içeren % 1.5’luk agaroz jel elektroforezinde 120 V’da 1 saat yürütülmüş ve UV translüminatör ile görüntülenmiştir. gDNA örneklerinin moleküler ağırlıkları, Quantum-Capp software görüntüleme sistemi yardımıyla kb cinsinden hesaplanmıştır.

2.6. Kısmi olarak saflaştırılmış gDNA ve eDNA’nın DNaz I, RNaz A ve proteinaz K enzimleri ile muamelesi

Bu çalışmada, öncelikle izole edilen gDNA ve eDNA’ların konsantrasyonları 200 ng/mL olacak şekilde ayarlanmış olup, ardından DNaz I (Sigma DN25, ABD), RNaz A (Sigma R6513, ABD) ve proteinaz K (Sigma P2308, ABD) enzimleri ile muamele edilmişlerdir. Mikrotitre plakalara 10’ar µL DNA eklendikten sonra, DNaz I (1.45, 1.70, 2.50 ve 3.0 mg/mL), RNaz A (0.90 mg/mL) ve proteinaz K (0.85 mg/mL) enzimleri ilave edilerek 37 °C’de 1 saat inkübe edilmiştir. Enzim eklenmemiş örnekler, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Enzimler ile muamele edilen ve edilmeyen DNA örnekleri, % 1.5’luk agaroz jelde 120 V’da 1 saat yürütüldükten sonra UV translüminatör ile görüntülenmiştir.

2.7. eDNA’nın *A. rubeus* biyofilmlerindeki rolünün araştırılması

Bu uygulama, Grande vd. [19] tarafından önerilen yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Plakalara, toplam hacim 100 µL olacak şekilde, optimum koşullarda hazırlanan TSB besiyerinden 95 µL ve ön aktiveleme sonucu elde edilen son aktif kültürden 5 µL eklenerek, biyofilm örnekleme için plakalar 40 saat (olgun biyofilm) inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, kuyular boşaltılarak, planktonik fazdaki bakteri hücrelerini uzaklaştırmak amacıyla iki defa SF ile yıkanmıştır. Biyofilm örneklerinin üzerine, 100 µL DNaz I enzimi (100 µg/mL; Sigma DN25, ABD) 2, 4, 8 ve 12 saat parametrelerinde eklenmiş ve 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyular boşaltılarak, enzim kalıntılarını gidermek için 2 kez SF ile yıkanmıştır. Ardından kristal viyole boyama deneyi uygulanarak biyofilmlere bağlanan boya miktarı Eliza’da spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak biyofilm örneklerinin üzerine DNaz I’in yerine DNaz I’in tamponu olan SF eklenmiştir.

2.8. Abiyotik yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumunun belirlenmesi

Bu çalışmada, polikarbonat, polipropilen, polistiren, polivinil klorür, paslanmaz çelik (R: 14 mm) ve cam (2.6 cm×2.0 cm×0.1 cm) gibi 6 farklı abiyotik yüzey kullanılmıştır. Bütün yüzeyler, besiyeri ortamına transfer edilmeden önce üzerlerindeki organik kalıntıları uzaklaştırmak için % 70 etanolde yıkanmış olup, daha sonra yüzeyler distile su ile iyice durulanarak paketlenmiş ve otoklavda (121 °C’de, 15 dk) sterilize edilmiştir. Çalışmada öncelikle hücre kültürü çalışmalarında kullanılan 6 kuyulu plaka kuyularına steril hale getirilmiş yüzeyler transfer edilmiştir. Daha sonra, kuyulara toplam hacim 4.5 mL olacak şekilde, içeriği optimize edilmiş 3.5’er mL TSB besiyeri ve biyofilm oluşumu için ön aktiveleme işleminden elde edilen son aktif kültürden 1’er mL eklenerek, plakalar 60 °C’de 48 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yüzeyler aseptik koşullar altında kuyulardan uzaklaştırılmış ve planktonik hücrelerin uzaklaşması için SF ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra yüzeyler, 4.5 mL SF ve 10 gr cam boncuk (R: 3mm) içeren tüplere alınarak, yüzeylere öncelikle steril plastik öze ile kazıma

işlemi uygulanmış ve bu işlemde sonra biyofilm süspansiyonları maksimum hızda 2 dk boyunca vortekslenmiştir. Nihai noktada elde edilen biyofilm süspansiyonlarından koloni oluşturan birimi (kob/cm²) hesaplamak için, MI (Medium I) agar besiyerine damla plak yöntemi [20] ile ekim yapılmış ve petri ler 18 saat inkübe edilmiştir. Cam boncuk ile vorteksleme işlemi, Giaouris ve Nychas [21] tarafından tanımlanmış metod modifiye edilerek uygulanmıştır. Kullanılan 14 mm çaplı kuponların her iki dairesel yüzey alanı toplam 3.08 cm² olarak, cam yüzeyin alanı ise 10.4 cm² olarak hesaplanmıştır. Birim alana (cm²) düşen koloni oluşturan birimin hesaplanması için, toplam koloni oluşturan birim sayısı, yüzey alanına (kob/cm²) bölünmüştür. Belirlenen bu değerin logaritması alınarak sonuç log kob/cm² cinsinden hesaplanmıştır. Aynı örneğe ait iki kuponun iki paralelli çalışılmasıyla tüm yüzey için hesaplanan ortalama koloni sayısı belirlenmiştir. Negatif kontrol grupları olarak yalnızca besiyeri ve uygun yüzeyi ihtiva eden kuyular tasarlanmıştır.

2.9. Polistiren yüzeylerde oluşan biyofilm yapısının sanitasyon ajanları ile kontrolü

Polistiren yüzeylerde geliştirilen biyofilm yapısının giderimi için polisakkarit ve protein parçalayıcı, antimikrobiyal, pro-oksidant, yeter sayı algılama (quorum-sensing) inhibisyon ajanlarını içeren 15 farklı sanitasyon ajanı kullanılmıştır. Bu ajanlar; α -amilaz (Sigma A-4551, ABD), selülaz (Sigma C-1184, ABD), sodyum metaperiyodat (SM) (Sigma 71859, ABD), lizozim (Sigma L-7651, ABD), triklorasetik asit (TCA) (Sigma 27242, ABD), alkalın proteaz (AP) (Sigma P-4860, ABD), proteaz (Sigma P-3111, ABD), subtilizin (Sigma P-5380, ABD), tripsin (Sigma T-2600000, ABD), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma L-5750, ABD), nisin (Sigma N-5764, ABD), potasyum-monopersülfat (PM) (Sigma 228036, ABD), sodyum-tiyosülfat (ST) (Sigma 72049, ABD), 2(5H)-furanon (Sigma 283754, ABD) ve triklosan (Sigma LRAA-1072)'dir. Ajanların etkili dozlarının tespit edilmesinde Tablo 1'de atıf yapılan makalelerdeki miktar, sıcaklık ve süre parametreleri doğrudan kullanılmış veya daha etkili sonuçlar elde edilebilmesi için bazı ajanlarda koşullar yeniden belirlenmiştir. Biyofilm örneği, her bir kimyasal ve enzim ajanı ile tek başına muamele edilmiş olup, sadece PM ve ST ajanı kombine olarak uygulanmıştır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan sanitasyon ajanları.

Ajanlar	Miktar	Sıcaklık	Süre	Referans
Polisakkarit parçalayıcı ajanlar				
α -Amilaz	% 1	37 °C	30 dk	[22]
Selülaz	% 1.66	37 °C	30 dk	[22]
Sodyum metaperiyodat	10 mM	22 °C	60 dk	[23]
Lizozim	% 2	37 °C	60 dk	[23]
TCA	% 10	100 °C	15 dk	[23]
Protein parçalayıcı ajanlar				
Alkalın proteaz	0.1 U/g	37 °C	60 dk	[22]
Proteaz	0.1 U/g	37 °C	60 dk	[22]
Subtilizin	% 1	37 °C	30 dk	[22]
Tripsin	% 3	37 °C	3 saat	[23]
SDS	% 3	100 °C	10 dk	[23]
Antimikrobiyal ajan				
Nisin	2 mg/ml	37 °C	24 saat	[23]
Pro-oksidan ajanlar				
Potasyum-monopersülfat	2 mg/ml	22 °C	30 dk	[23]
Sodyum-tiyosülfat	1 mg/ml	22 °C	5 dk	
Quorum-sensing inhibisyon ajanları				
2(5H)-Furanon	1 mg/ml	22 °C	60 dk	[24]
Triklolan	2 mg/ml	22 °C	60 dk	[25]

Giderim çalışmaları için mikrotitrasyon plakalarına, toplam hacim 100 µL olacak şekilde, TSB besiyerinden 95 µL ve son aktif kültürden 5 µL eklenerek, 60 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, kuyulardaki besiyerleri boşaltılmış ve bağlanmayan hücreler ile hücre kalıntılarını gidermek için kuyular iki defa SF ile yıkanmıştır. Daha sonra, kuyulara tutunan biyofilmler ajanlar ile muamele edilmiştir. Daha sonra, kuyular boşaltılmış ve bu sefer ajanların kalıntılarını gidermek için 2 defa SF ile yıkanmıştır. Ardından, biyofilmlerin miktarını belirlemek üzere kristal viyole deneyi uygulanmış ve biyofilmlere bağlanan boya miktarı Eliza'da spektrofotometrik (OD595nm) olarak ölçülmüştür. Uygulanan temizleme rejiminin başarısı, bakterilere uygulanan her ajan için % giderim oranı cinsinden hesaplanmıştır. Sanitasyon ajanlarının *A. rupiensis* DSM 17127^T biyofilmleri üzerindeki etkinliğini değerlendirmek için aşağıdaki yüzde azalma formülü kullanılmıştır [26].

$$\text{Yüzde azalma (\%)} = [(C-B) - (T-B)] / [(C-B)] \times 100$$

B = Blank (biyofilm yok, enzim yok, besiyeri var)

C = Kontrol (biyofilm var, enzim yok)

T = Örnek (biyofilm var, enzim var)

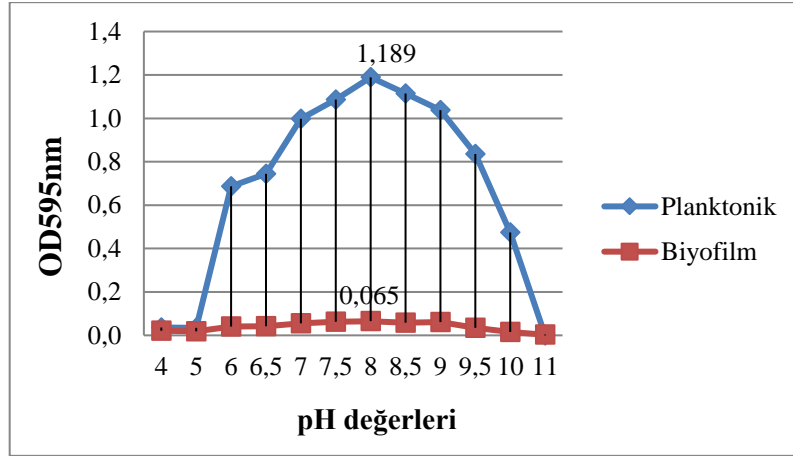
2.10. İstatistik analizler

Elde edilen sonuçların SPSS 17.0 istatistik program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ile değerlendirilmesinde, değerlerin ortalamaları arasındaki farkı anlamlandırmak için tek yönlü varyans analizleri (ANOVA) ile bu analizlerin ileri aşamaları olan ve her bir grubu ikili olarak karşılaştırmak için ise, Tukey ve Dunnet testleri uygulanmıştır. $p < 0.05$ olasılık düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

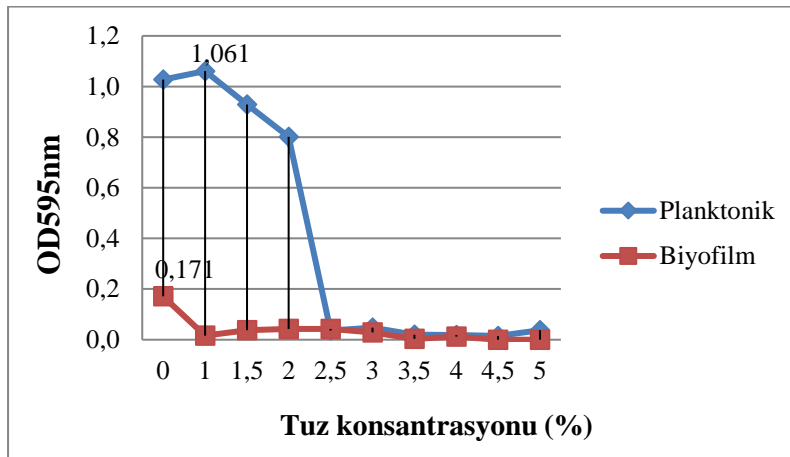
3. Sonuçlar ve tartışma

Anoxybacillus türlerinin çoğu termofilik olup. TSB-6 bakterisi hariç, gelişimleri için sıcaklık aralığı 30-75°C arasında değişmektedir. Türlerin birçoğu 50-65 °C arasında ise optimum gelişim göstermektedir. *Anoxybacillus amylolyticus* türü hariç, *Anoxybacillus* türleri alkalifilik veya alkalitolerant'dır ve türlerin çoğu nötral pH'da gelişim gösterebilmektedir [5, 27]. Bu çalışmada bakterinin planktonik gelişimi için gereksinim duyduğu optimum pH, tuz ve sıcaklık gereksinimleri 0, 6, 18, 24 ve 48. saatlerde OD595nm'de ölçülmüştür. Ardından, biyofilm gelişimi için gereken pH, tuz ve sıcaklık değerleri aynı plakanın, 48. saat sonunda kristal viyole bağlanma yönteminin uygulanmasıyla belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, bakterinin planktonik gelişimi ve biyofilm oluşumu için gerekli optimum sıcaklık, pH ve tuzluluk değerleri TSB besiyerinde sırasıyla 55 °C (OD 0.980 ± 0.07), 8.0 (OD 1.189 ± 0.03), % 1.0 (OD 1.061 ± 0.03) ve 60 °C (OD 0.344 ± 0.02), 8.0 (OD 0.065 ± 0.02), % 0.0 (OD 0.171 ± 0.05) olarak tespit edilmiştir. Metabolik aktiviteleri için gerekli olan çevresel faktörlerden sadece pH değerleri, biyofilm oluşumu ideal değerler ile aynı bulunmuş olup, bakteri her iki durumda da alkali ortamı tercih etmiştir. Her ne kadar planktonik gelişimi için pH 5.5 ve 10.5 arası uygunsa da, biyofilm üretimi daha dar bir aralıkta gerçekleşmiştir (Şekil 1). Ayrıca, bakteri planktonik gelişim için sadece % 0.0-2.0 aralığındaki tuz konsantrasyonlarını tolere edebilmiş ve sadece % 1.0 oranında NaCl'ye gereksinim duymuş olup, ideal biyofilm üretimi için tuz ihtiva etmeyen düşük ozmolariteli ortamı tercih etmiştir (Şekil 2). Optimum sıcaklık isteğine bakıldığında ise, planktonik gelişimi için 55 °C, biyofilm oluşumu için ise 60 °C'yi tercih etmiştir (Şekil 3). Bununla birlikte, bakteri 50 ile 65 °C arasında hem gelişebilmiş, hem de biyofilm üretebilmiştir. Derekova

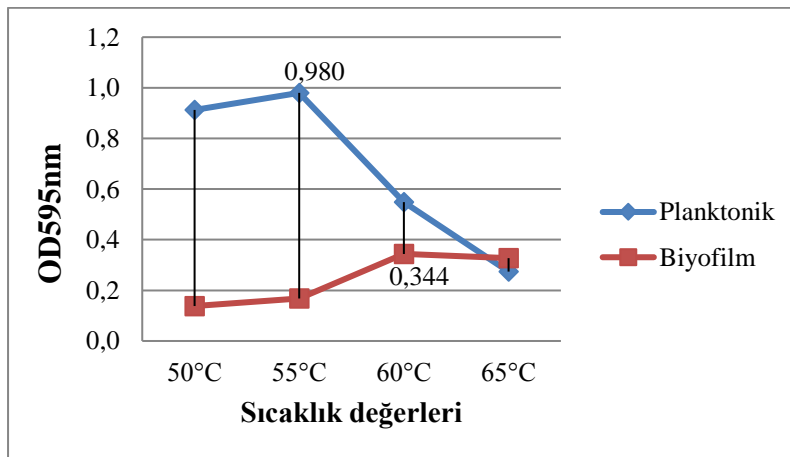
vd. [2] tarafından PY besiyerinde *A. rufipes* DSM 17127^T'nin optimum gelişimi için gerekli sıcaklık 55 °C ve pH değeri ise 6.0-6.5 olarak belirlenmiştir. Cihan vd. [28] tarafından ise, bu bakterinin MI besiyerinde optimum gelişimi için gerekli sıcaklık 55 °C, pH 6.0-6.5 ve tuzluluk değerleri % 0.5 olarak bulunmuştur.



Şekil 1. Bakterinin planktonik gelişimi ve biyofilm oluşumu için ideal pH değerleri.



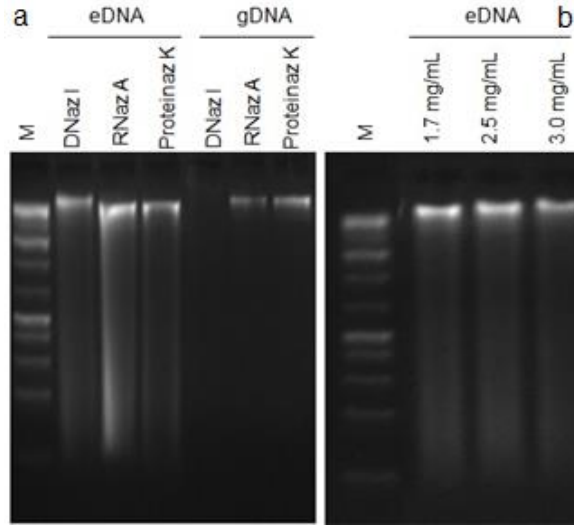
Şekil 2. Bakterinin planktonik gelişimi ve biyofilm oluşumu için ideal tuz değerleri.



Şekil 3. Bakterinin planktonik gelişimi ve biyofilm oluşumu için ideal sıcaklık değerleri.

eDNA ve gDNA'nın DNA konsantrasyonları (ng/ μ L) ve saflıklarını belirlemek için 260/280 ile 260/230 oranları nanodrop cihazı ile ölçülmüş olup, eDNA'nın varlığı agaroz jel elektroforezi ile tespit edilmiştir (Şekil 4). Elde edilen sonuçlara göre, gDNA'nın konsantrasyonu 1101.2 ng/ μ L, moleküler ağırlığı ise 27.6 kb olarak bulunmuştur. eDNA'nın konsantrasyonu ise, 766.8 ng/ μ L olup, moleküler ağırlığı 20.9 kb olarak bulunmuştur. Agaroz jel görüntülerinde de eDNA'nın, gDNA'dan farklı molekül ağırlıklarına sahip oldukları gözlenmiştir. Bakterinin gDNA'sının, eDNA'sından daha büyük olduğu görülmüştür.

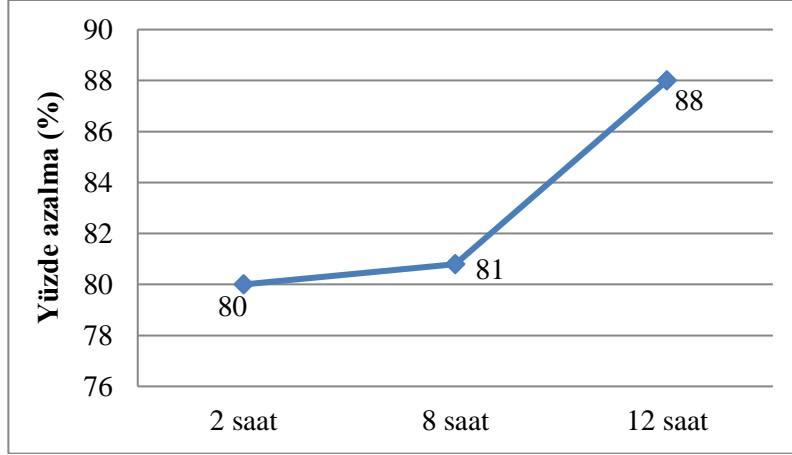
gDNA ve eDNA saflaştırıldıktan sonra üç enzim ile muamele edilmiştir. Sonuçlara göre, gDNA sadece DNaz I (1.45 mg/mL) ile tamamen parçalanmıştır. Bunu aksine, eDNA, DNaz I, RNaz A, ve proteinaz K enzimlerine direnç göstermiştir (Şekil 4a). Dahası, saf eDNA'lar, DNA, RNA ve proteinlere etki eden bu üç enzimle parçalanamamıştır. eDNA'nın DNaz I direncinin daha detaylı incelenebilmesi amacı ile, DNaz I'in konsantrasyonu 1.7, 2.5 ve 3.0 mg/mL olacak şekilde artırılmıştır. DNaz I konsantrasyonunun artırılmasına rağmen sonuçta bir değişiklik gözlenmemiştir. Saf eDNA'nın DNaz I enzimine dirençli olması dikkate değer bir bulgu olup artan enzim konsantrasyonlarına bağlı olarak da agaroz jelde kayma görülmesi de (shift) söz konusu olmuştur. Bu durumun ilave araştırmalarla aydınlatılması gerekmektedir (Şekil 4b). Gerek spektrofotometrik olarak, gerekse agaroz jel elektroforezi ile tespit edilen *A. rubeus* eDNA'sının birer DNA molekülü olarak varlıkları kesinleştirilmiştir.



Şekil 4. (a) gDNA ve eDNA'nın DNaz I (1.45 mg/mL), RNaz A (0.90 mg/mL), ve proteinaz K (0.85 mg/mL) ile muamelesi sonrası elde edilen agaroz jel görüntüleri. (b) eDNA'nın farklı konsantrasyonlarda DNaz I (1.7, 2.5, ve 3.0 mg/mL) enzimi ile muamele edilmesi. Markör (M), Thermo, Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder, 75-20000 bp.

Biyofilm yapılarının 2., 8., ve 12. saatler de DNaz I ile muamelesi sonucu biyomastaki yüzde (%) azalma değerleri Şekil 5'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, eDNA'nın biyofilm yapısı içerisindeyken DNaz I enzimine duyarlı olduğu, ve enzim uygulamasının biyofilm kütlelerinde önemli bir oranda azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda enzimin 2 saat içerisinde etkisini gösterdiği gözlenmiştir. Dahası, enzim muamelesi biyofilm yapısını zayıflatmış ve biyofilme yaklaşık olarak % 80 oranında giderim sağlamıştır. Bu sonuç ile birlikte, bakterinin eDNA'sının olgun biyofilm matriksinin bütünlüğü ve sağlamlığı adına önemli bir yapısal rol oynadığı anlaşılmış ve

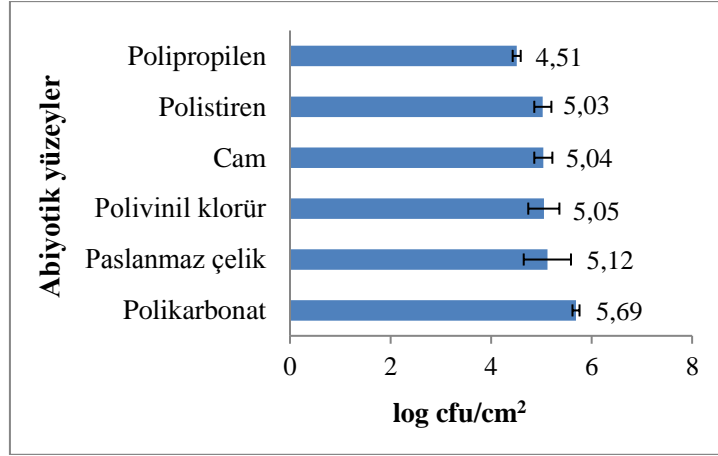
giderim çalışmalarında DNaz I enziminin kullanılabileceği belirlenmiştir. Son yıllardaki çalışmalarda eDNA'nın çoğu bakteri türlerinin biyofilmlerinin yapısı ve fonksiyonunda büyük bir rol oynadığı gösterilmiştir. DNaz I, eDNA'yı parçalamaktadır. Dahası, DNaz I adhezin gibi fonksiyon gören hücre yüzeyindeki nükleik asitleri parçalayabilmekte, böylece biyofilm üretimi için elzem olan hücre tutunması engellemektedir [13].



Şekil 5. Olgun biyofilmin DNaz I ile muamelesi sonrası biyofilm miktarındaki azalma.

Saflaştırılan eDNA'nın DNaz I'e direnci, saflaştırma aşamasında kullanılan kimyasal muamelelerden sonra karbonhidrat ve protein bileşenlerinin bulunmaması ile eDNA'nın yeniden düzenlenerek ilave katlanmalarla daha sıkı bir katlanma özelliği kazanmış olması ve yoğun bir üç boyutlu yapı oluşturması ile enzimin hedef DNA'ya erişememesi olasılığı ile açıklanabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda olgun biyofilmler üzerine DNaz I'in etki ettiği ve etmediği sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmaların bir çoğu, DNaz I'in çoğu mezofilik bakteri ve mantarların biyofilm gelişimlerini engelleyebildiğini ve dağıtabildiğini göstermiştir [29, 30, 31, 32, 33]. Diğer taraftan, mezofilik bakterilerin biyofilmlerinin eDNA içeriğinin DNaz I'e dirençli olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur [19, 34, 35]. Ancak, şu ana kadar literatürde eDNA saflaştırıldıktan sonra DNaz I direncinin kazanıldığına dair herhangi bir sonuç bulunamamıştır. Bu, termofilik bir bakteride izole edilen eDNA'nın termostabilitesi ile bağlantılı olabilir.

Paslanmaz çelik yüzeyler üzerinde termofilik basillerin biyofilm oluşumu üzerine bazı çalışmalar mevcuttur [8, 36]. Termofilik *A. flavithermus* ve *Geobacillus* paslanmaz çelik yüzeyler üzerine tutunabilir ve biyofilm oluşturabilmektedir [37]. Sadiq vd. [38] tarafından süt tozu içeren ortamda paslanmaz çelik kuponlar üzerinde *A. flavithermus*'un hücre sayısı $5.3 \log \text{ kob/cm}^2$ olarak bulunmuştur. Ancak, bu hücre sayısının TSB besiyeri (yaklaşık $2.2 \log \text{ kob/cm}^2$) ile karşılaştırıldığında azaldığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, bakterinin polikarbonat, polipropilen, polivinil klorür, paslanmaz çelik, polistiren ve cam tabiatında olan 6 farklı abiyotik yüzeyde oluşturdukları biyofilmdeki koloni sayımlarının hücre yüzey alanlarına bölünmesiyle elde edilen oranlar ($\log \text{ kob/cm}^2$) belirlenmiştir (Şekil 6). Elde edilen sonuçlara göre, bakterinin 6 yüzeye de tutunduğu gözlenmiş olup, hidrofobik ve düşük yüzey enerjili bir materyal olan polikarbonat ($5.69 \log \text{ kob/cm}^2$) hücre tutunması için en ideal abiyotik yüzey olarak belirlenmiştir. Ayrıca, hidrofilik, pürüzsüz ve pozitif yüzey yüküne sahip paslanmaz çelik ($5.12 \log \text{ kob/cm}^2$) ise, tutunma için ikinci en uygun yüzey olarak saptanmıştır. Bakteri ile yüzeyler üzerinde oluşturdukları biyofilm oranları arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

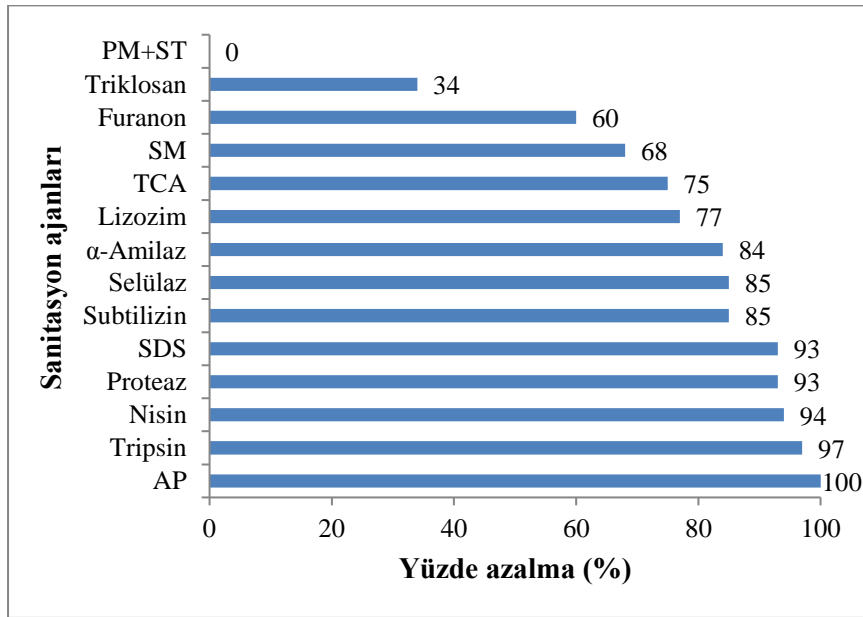


Şekil 6. Bakterinin farklı abiyotik yüzeylerde oluşturduğu biyofilmlerdeki koloni sayılarının yüzey alanına oranları.

Biyofilm kontrolü için temel olarak proteazları ve polisakkariti hidroliz eden enzimler kullanılabilir [9]. Proteolitik enzimler, biyofilm ile ilişkili proteinleri depolimerize etmektedir [39]. Bu çalışmada en etkin bileşenin alkalin proteaz (% 100) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7). Enzimatik muameleye tabi tutulan biyofilmin matriks proteinlerinin alkalin proteaz ve subtilizin gibi serin proteazlarca etkin bir şekilde yıkıma uğradığı görülmüştür. Her ikisi de endopeptidazdır ve proteinlerin peptit bağlarını yıkar ve serin proteazların aktif bölgelerindeki nükleofilik aminoasitler olarak görev yaparlar [40]. Bir çalışmada, purafect olarak adlandırılan bir subtilizin türeği ile paslanmaz çelik kuponların yüzeyleri üzerinde oluşan *A. flavithermus* B12-C^m biyofilmlerinin % 100 giderilmesinde başarı sağlanamamış; ancak canlılığın azaldığı saptanmıştır [22]. Loiseau ve Anderson [39] tarafından cam yüzeyler üzerinde oluşan *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmi kısmi olarak selülaz ile giderilmiştir. Molobela vd. [41] tarafından *Pseudomonas fluorescens* biyofilmleri üzerinde ticari proteaz ve amilazların etkisi değerlendirilmiş ve proteazların amilazlardan daha etkili olduğunu bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da, *A. rufipes* biyofilmleri üzerinde proteazın amilazdan daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. SDS, süt ve süt ürünlerinin işlendiği gıda çevrelerinde sanitasyon ajanı olarak kullanılmaktadır. Parkar vd. [23] tarafından SDS'in paslanmaz çelik yüzeyi üzerindeki *A. flavithermus* B12-C^m biyofilmini % 80 oranında azalttığı ve sadece sporların hayatta kaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise, polistiren mikrotitrasyon plakalar üzerinde oluşan *A. rufipes* biyofilm kütlelerinin SDS ile % 93 oranında azaldığı görülmüştür. Chen ve Stewart [42] tarafından *P. aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* bakterilerine uygulanan lizozim ile canlı hücre sayısında % 87 azalma olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, *A. rufipes* biyofilmleri üzerinde lizozimin etkisi % 77 oranında saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, pro-oksidan ajanı PM+ST (% 0) ve yeter sayı algılama (quorum-sensing) inhibisyon ajanı triklosan (% 34) dışında diğer ajanların bu bakterinin biyofilm yapısının giderimi için kayda değer derecede etki sağladığı gözlemlenmiştir. Yüzde giderim oranlarına bakıldığında, biyofilm kütlelerinin gideriminde protein parçalayıcı sanitasyon ajanlarının polisakkarit parçalayıcı ajanlardan daha fazla etkili olduğu tespit edilmiştir. Protein parçalayıcı ajanların etkisinin yüzde oranı sırasıyla; AP (% 100), tripsin (% 97), proteaz (% 93), SDS (% 93), subtilizin (% 85)'dir. Polisakkarit parçalayıcı ajanların etkisinin yüzde oranı ise sırasıyla; selülaz (% 85), α -amilaz (% 84), lizozim (% 77), TCA (% 75), SM (% 68)'dir. Gram-pozitif *A. rufipes* bakterisinin biyofilm kontrolü için antimikrobiyal ajan nisinin (% 94) önemli bir etkiye sahip olduğu

belirlenmiştir. Quorum-sensing inhibisyon ajanları olarak kullanılan 2(5H)-furanonun (% 60) triklosana (% 34) oranla daha çok etki sağladığı gözlenmiştir. Triklosan ayrıca antimikrobiyal ajan olarak da kullanılmaktadır.



Şekil 7. Biyofilmin sanitasyon ajanları ile muamelesi sonucunda biyofilm miktarındaki azalma yüzdeleri.

Sonuç olarak bu çalışmada, *A. rupiensis* biyofilmleri üzerinde sanitasyon ajanlarının etkisi gözlemlenmiş ve polistiren yüzeylerden başarıyla termofilik biyofilmlerin yok edilmesi sağlanmıştır. Bu bulguların pek çok endüstriyel süreçte sorun teşkil eden termofilik basil biyofilmlerinin kontrolünde kullanılarak sorunların çözümüne odaklı yaklaşımların sağlanacağı ön görülmektedir. Dahası, polistiren mikrotitrasyon plakalarında küçük hacimde yürütülen bu çalışmalar sonucunda, *A. rupiensis*'in biyofilm kütlelerinin, kullanılan ajanlardan hangisi uygulandığında en çok giderilebileceğine dair net veriler elde edilmiştir. Ayrıca, çalışmada endüstride sıklıkla kullanılan abiyotik yüzeyler üzerinde, termofilik basil *A. rupiensis*'in biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda ileriki çalışmalarda termofilik basil biyofilmlerinin abiyotik yüzeyler üzerinden giderimi için enzim-deterjan veya enzim-surfaktan gibi sanitasyon rejim kombinasyonları belirlenerek sinerjistik etkilerinin test edilmesi önerilmektedir.

Teşekkür

Bu makale, Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN danışmanlığında Tuğba KILIÇ'ın doktora tez çalışmasının bir bölümünü içermekte olup, finansal olarak Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir. Proje No: 14B0430003.

Kaynaklar

- [1] Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. ve Laurinavichius, K., *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov.,

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 50, 6, 2109-2117, (2000).
- [2] Derekova, A., Sjöholm, C., Mandeva, R. ve Kambourova, M., *Anoxybacillus rupiensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from Rupi basin (Bulgaria), **Extremophiles**, 11, 4, 577-583, (2007).
- [3] Jabeen, F., Muneer, B. ve Qazi, J. I., Characterization of thermophilic bacteria *Anoxybacillus rupiensis* and cultivation in agroindustrial wastes isolated from hot spring in Chakwal, Pakistan, **Pakistan Journal of Zoology**, 51, 4, 1243-1250, (2019).
- [4] Al-Jailawi, M. H., Mahdi, S. M. ve Fadil, A. M., Thermophilic bacteria isolated from hydrocarbon contaminated soils in Iraq, **International Journal of Biotechnology, Photon**, 111, 275-283, (2013).
- [5] Goh, K. M., Kahar, U. M., Chai, Y. Y., Chong, C. S., Chai, K. P., Ranjani, V., Illias, R. M. ve Chan, K., Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 97, 4, 1475-1488, (2013).
- [6] Cihan, A. C. ve Yildiz, E. D., General characteristics, taxonomic studies and biotechnological importance of the genus *Anoxybacillus*, **Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology**, 25, 1-2, 56-82, (2016).
- [7] Burgess, S. A., Lindsay, D. ve Flint, S. H., Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing, **International Journal of Food Microbiology**, 144, 2, 215-225, (2010).
- [8] Burgess, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M. ve Flint, S. H., The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*, **Journal of Applied Microbiology**, 107, 3, 1012-1018, (2009).
- [9] Meyer, B., Approaches to prevention, removal and killing of biofilms, **International Biodeterioration and Biodegradation**, 51, 4, 249-253, (2003).
- [10] Simões, M., Simões, L. C. ve Vieira, M. J., A review of current and emergent biofilm control strategies, **LWT-Food Science and Technology**, 43, 4, 573-583, (2010).
- [11] Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E. ve Holah, J. T., Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms, **Journal of Applied Microbiology**, 87, 1, 41-48, (1999).
- [12] Torres, C. E., Negro, C., Fuente, E. ve Blanco, A., Enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 96, 2, 327-344, (2012).
- [13] Cordeiro, A. L. ve Werner, C., Enzymes for antifouling strategies, **Journal of Adhesion Science and Technology**, 25, 17, 2317-2344, (2011).
- [14] Cihan, A. C., Karaca, B., Ozel, B. P. ve Kilic, T., Determination of the biofilm production capacities and characteristics of members belonging to Bacillaceae family, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33, 6, 118, (2017).
- [15] Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. ve Dubois-Brissonnet, F., Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review, **Biofouling**, 27, 9, 1017-1032, (2011).
- [16] Woodward, M. J., Sojka, M., Sprigings, K. A. ve Humphrey, T. J., The role of SEF14 and SEF17 fimbriae in the adherence of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis to inanimate surfaces, **Journal of Medical Microbiology**, 49, 5, 481-487, (2000).

- [17] Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. ve Švabić-Vlahović, M., A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, **Journal of Microbiological Methods**, 40, 2, 175-179, (2000).
- [18] Wilson, K., Preparation of genomic DNA from bacteria, **Current Protocols in Molecular Biology**, 56, 1, 2-4, (2001).
- [19] Grande, R., Di Giulio, M., Bessa, L. J., Di Campli, E., Baffoni, M., Guarnieri, S. ve Cellini, L., Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: a backstairs rumour, **Journal of Applied Microbiology**, 110, 2, 490-498, (2010).
- [20] Herigstad, B., Hamilton, M. ve Heersink, J., How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria, **Journal of Microbiological Methods**, 44, 2, 121-129, (2001).
- [21] Giaouris, E. ve Nychas, G. J., The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability, **Food Microbiology**, 23, 8, 747-752, (2006).
- [22] Parkar, S., Flint, S. ve Brooks, J. D., Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel, **Journal of Applied Microbiology**, 96, 1, 110-116, (2004).
- [23] Parkar, S., Flint, S. ve Brooks, J., Physiology of biofilms of thermophilic bacilli-potential consequences for cleaning, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 30, 9, 553-560, (2003).
- [24] Ponnusamy, K., Paul, D., Kim, Y. S. ve Kweon, J. H., 2 (5H)-Furanone: a prospective strategy for biofouling-control in membrane biofilm bacteria by quorum sensing inhibition, **Brazilian Journal of Microbiology**, 41, 1, 227-234, (2010).
- [25] Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K. R., Chikindas, M. L. ve Yaron, S., Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms, **FEMS Microbiology Letters**, 267, 2, 200-206, (2007).
- [26] Pitts, B., Hamilton, M. A., Zilver, N. ve Stewart, P. S., A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal, **Journal of Microbiological Methods**, 54, 2, 269-276, (2003).
- [27] Margaryan, A., Shahinyan, G., Hovhannisyan, P., Panosyan, H., Birkeland, N. K. ve Trchounian, A., *Geobacillus* and *Anoxybacillus* spp. from terrestrial geothermal springs worldwide: Diversity and biotechnological applications, In D. Egamberdieva, N. Birkeland, H. Panosyan, ve W. Li (Ed.), **Extremophiles in eurasian ecosystems: ecology, diversity, and applications**, pp. 119-166, (2018).
- [28] Cihan, A. C., Cokmus, C., Koc, M. ve Ozcan, B., *Anoxybacillus calidus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from soil near a thermal power plant, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64, 1, 211-219, (2014).
- [29] Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. ve Mattick, J. S., Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation, **Science**, 295, 5559, 1487-1487, (2002).
- [30] Tetz, G. V., Artemenko, N. K. ve Tetz, V. V., Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 53, 3, 1204-1209, (2009).
- [31] Nijland, R., Hall, M. J. ve Burgess, J. G., Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase, **PloS One**, 5, 12, e15668, (2010).
- [32] Harmsen, M., Lappann, M., Knochel, S. ve Molin, S., Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*, **Applied and Environmental Microbiology**, 76, 7, 2271-2279, (2010).

- [33] Martins, M., Uppuluri, P., Thomas, D. P., Cleary, I. A., Henriques, M., Lopez-Ribot, J. L. ve Oliveira, R., Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms, **Mycopathologia**, 169, 5, 323-331, (2010).
- [34] Lappann, M., Claus, H., Van Alen, T., Harmsen, M., Elias, J., Molin, S. ve Vogel, U., A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of *Neisseria meningitides*, **Molecular Microbiology**, 75, 6, 1355-1371, (2010).
- [35] Shields, R. C., Mokhtar, N., Ford, M., Hall, M. J., Burgess, J.G., ElBadawey, M. R. ve Jakubovics, N. S., Efficacy of a marine bacterial nuclease against biofilm forming microorganisms isolated from chronic rhinosinusitis, **PLoS One**, 8, 2, e55339, (2013).
- [36] Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J. ve Crawford, R., The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel, **Journal of Applied Microbiology**, 90, 2, 151-157, (2001).
- [37] Somerton, B., Flint, S., Palmer, J., Brooks, J. ve Lindsay, D., Preconditioning with cations increases the attachment of *Anoxybacillus flavithermus* and *Geobacillus* species to stainless steel, **Applied and Environmental Microbiology**, 79, 13, 4186-4190, (2013).
- [38] Sadiq, F. A., Flint, S., Yuan, L., Li, Y., Liu, T. ve He, G., Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders, **International Journal of Food Microbiology**, 262, 89-98, (2017).
- [39] Loiselle, M. ve Anderson, K. W., The use of cellulase in inhibiting biofilm formation from organisms commonly found on medical implants, **Biofouling**, 19, 2, 77-85, (2003).
- [40] Hedstrom, L., Serine protease mechanism and specificity, **Chemical Reviews**, 102, 12, 4501-4524, (2002).
- [41] Molobela, I. P., Cloete, T. E. ve Beukes, M., Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria, **African Journal of Microbiology Research**, 4, 14, 1515-1524, (2010).
- [42] Chen, X. ve Stewart, P. S., Biofilm removal caused by chemical treatments, **Water Research**, 34, 17, 4229-4233, (2000).