



ÖNSÖZ

Yürütücüsü olduğum, “Planktonik ve Biyofilmden-Dağılmış Hücrelerin Yüzeye Adhezyon Kuvvetleri ve Hücre Yüzeyi Fizyokimyasal Özellikleri” isimli proje 118M404 kodu ile “TÜBİTAK 3501-Ulusal Genç Araştırmacı Kariyer Geliştirme Programı” kapsamında desteklenmiştir. Proje 24 ayda tamamlanmak üzere 15 Kasım 2018 tarihinde yürürlüğe girmiştir. Ancak, pandemi ve İzmir depremi nedenleriyle, yaşanan olumsuzlukların projenin işleyişine etkisini gidermek adına ek süre almıştır.

Bu proje desteği sayesinde proje konusuna ve laboratuvar işleyişine hakim, pek çok farklı araştırma yöntemi kullanarak araştırmayı ve deneyleri kendi kendine yürütebilen, problemle karşılaşınca çözüm üretebilen iki tane araştırmacı yetiştirilmiş ve iki tane yüksek lisans tezi üretilmiştir. Proje konusu ile ilgili makalelerimiz SCI indeksli dergilere gönderilmek üzere hazırlık aşamasındadır. Bu proje desteği sayesinde edinilen çeşitli laboratuvar malzemeleri, kazanılan tecrübe ve bilgi ile yeni projeler için ön çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır.

Proje kapsamında planktonik ve biyofilmden-dağılmış hücrelerin, biyofilm oluşum sürecinin ilk aşaması olan, nano-ölçekteki yüzeye ilk tutunmaları ve bu sürece etki eden moleküler mekanizmalar, fizyokimyasal yüzey özellikleri ve adhezyon kuvvetleri mühendislik bakış açısı ve fiziksel yaklaşımlarla incelenmiştir. Projeden elde edilen sonuçların biyofilmlerle mücadelede daha etkili stratejilerin geliştirilmesine büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu projeyi desteklemeye kabul ettikleri ve proje çalışmaları boyunca her adımda yardımcı olan TÜBİTAK-Mühendislik Araştırma Destek Grubu'na, değerli yorumları için hakemlerimize ve projenin yürütülmesine imkan sağlayan İzmir Ekonomi Üniversitesi Rektörlüğü'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

F. Pınar GÖRDESLİ DUATEPE

İzmir, Haziran 2021



İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
2.1 Bakteriyel Biyofilmler.....	5
2.1.1 Bakteriyel biyofilmlerin neden olduğu problemler.....	6
2.1.2 Biyofilm oluşumu ve yaşam döngüsü.....	7
2.1.3 Bakteriyel biyofilmlerin dağılımı için geliştirilmiş stratejiler.....	9
2.2 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile bakteriyel adhezyonun araştırılması.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1 Projede Kullanılan Model Planktonik Bakteriyel Hücreler.....	16
3.2 Statik Sistemde Biyofilmlerin Oluşturulması, Dağıtılması ve Dağılan Hücrelerin Eldesi	17
3.3 Dinamik Sistemde Biyofilmlerin Oluşturulması, Dağıtılması ve Dağılan Hücrelerin Eldesi	19
3.4 Planktonik ve Biyofilmden-dağılmış Hücrelerin c-di-GMP Miktarlarının Belirlenmesi....	21
3.4.1 Planktonik ve biyofilmden-dağılmış hücrelerden c-di-GMP ekstraksiyonu ve kalan bakteriyel pelletlerin toplam protein miktarlarının belirlenmesi.....	21
3.4.2 Planktonik ve biyofilmden-dağılmış hücrelerin c-di-GMP konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	22
3.5 Planktonik ve Biyofilmden-dağılmış Hücre Katmanları Üzerinde Su ve Diiyodometanın Temas Açılarının Ölçülmesi ve Hücrelerin Yüzey Gerilimlerinin Hesaplanması.....	24
3.6 Planktonik ve Biyofilmden-dağılmış Hücrelerin Su İçerisinde Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile Görüntülerinin Elde Edilmesi ve Adhezyon Kuvvetlerinin Ölçümü.....	26
3.6.1 AFM ölçümleri için örneklerin hazırlanması.....	26
3.6.2 AFM ile bakteriyel adhezyon kuvveti ölçümleri.....	28
3.7 Planktonik ve Biyofilmden-dağılmış Hücrelerin Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Ölçülen Adhezyon Kuvvetlerinin Analizi.....	30
3.7.1 AFM geri-çekilme eğrilerinin analizi.....	30



3.7.2	Ortalaması hesaplanan adhezyon kuvvetlerinin istatistiksel Poisson analizi.....	30
4.	BULGULAR.....	32
4.1	Eklenen SNP Konsantrasyonunun Statik Sistemde Büyütülen <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> Biyofilmlerinin Dağılım Miktarları Üzerindeki Etkisi.....	32
4.2	Eklenen SNP Konsantrasyonunun Dinamik Sistemde Büyütülen <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> Biyofilmlerinin Dağılımları Üzerindeki Etkisi.....	34
4.3	Planktonik <i>E. coli</i> ve Farklı SNP Konsantrasyonu İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen <i>E. coli</i> Biyofilmlerinden Dağılmış Hücrelerin AFM Görüntüleri ve AFM ile Ölçülen Adhezyon Kuvvetleri Dağılımları.....	36
4.4	Planktonik <i>B. subtilis</i> ve 5 μ M SNP İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen <i>B. subtilis</i> Biyofilmlerinden Dağılmış Hücrelerin AFM Görüntüleri ve AFM ile Ölçülen Adhezyon Kuvvetleri Dağılımları.....	39
4.5	Planktonik <i>E. coli</i> ve Farklı SNP Konsantrasyonu İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen <i>E. coli</i> Biyofilmlerinden Dağılmış Hücrelerin AFM ile Ölçülen Adhezyon Kuvvetleri Değerleri.....	41
4.6	Planktonik <i>B. subtilis</i> ve 5 μ M SNP İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen <i>B. subtilis</i> Biyofilmlerinden Dağılmış Hücrelerin AFM ile Ölçülen Adhezyon Kuvvetleri Değerleri 42	
4.7	Planktonik ve Farklı Konsantrasyonlarda SNP İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen Biyofilmlerinden Dağılmış <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> Hücrelerinin c-di-GMP Miktarları....	42
4.8	Planktonik ve 5 μ M SNP İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen Biyofilmlerden Dağılmış <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> Hücre Katmanları Üzerinde Ölçülen Temas Açılırları ve Hesaplanan Yüzey Gerilimleri.....	45
4.9	Planktonik ve 5 μ M SNP İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen Biyofilmlerden Dağılmış <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> Hücrelerinin AFM ile Ölçülen ve Ortalaması Hesaplanan Adhezyon Kuvvetlerinin Poisson Analizi ile Spesifik ve Spesifik-Olmayan Bileşenlerine Ayrıştırılması.....	47
5.	TARTIŞMA.....	54



5.1 Planktonik ve Statik Sistemde Büyütülen Biyofilmlerden Dağılmış <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> Hücrelerinin Nano-ölçekteki Yüze Adhezyon Kapasitelerinin Dağılım için Kullanılan SNP Konsantrasyonu ve Hücre İçi c-di-GMP miktarı ile İlişkisi.....	54
5.2 Dinamik Sistemde Büyütülen Biyofilmlerden Dağılmış <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> Hücrelerinin Nano-ölçekteki Yüze Adhezyon Kapasitelerinin Dağılım için Kullanılan SNP Konsantrasyonu ve Hücre İçi c-di-GMP miktarı ile İlişkisi.....	59
5.3 Planktonik ve 5 μ M SNP İlavesiyle Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen Biyofilmlerden Dağılmış <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> Hücrelerinin Yüzey Fizyokimyasal Özelliklerinin Spesifik Adhezyon Kuvvetleri ile İlişkisi.....	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Planktonik hücrelerin ve SNP ilavesi ile statik ve dinamik sistemlerde büyütülen biyofilmlerden dağılmış hücrelerin AFM ile ölçülen adhezyon kuvvetlerinin ortalama, medyan ve mod değerleri, analiz edilen geri-çekilme eğrisi ve elde edilen toplam adhezyon piki sayıları. Ayrıca hücrelerin içerdiği c-di-GMP miktarları da sunulmuştur.....	44
Tablo 2. Planktonik ve 5 μ M SNP ilavesi ile statik ve dinamik sistemlerde büyütülen biyofilmlerden dağılmış <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> hücre katmanları üzerinde ölçülen su ve diiyodometan temas açıları ve HM modeli kullanılarak hesaplanmış apolar ve polar bakteriyel yüzey gerilimi bileşenleri.....	46
Tablo 3. Planktonik <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> hücreleri ile statik ve dinamik koşullarda oluşmuş biyofilmlerden besiyerlerine 5 μ M SNP ilavesiyle dağılan <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin ortalamaları ve varyansları.....	50
Tablo 4. Planktonik hücreler ile statik ve dinamik koşullarda 5 μ M SNP ilavesiyle biyofilmlerden dağılmış (B-D) <i>E. coli</i> ve <i>B. subtilis</i> hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları ortalama adhezyon kuvvetleri ve Poisson analizi ile bulunan spesifik ve spesifik-olmayan adhezyon kuvveti bileşenleri. Ayrıca spesifik ve spesifik-olmayan kuvvet bileşenlerinin toplamının AFM ile ölçülen ortalama adhezyon kuvveti değerleri ile karşılaştırması (% fark) verilmiştir.....	53

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Biyofilm yaşam döngüsü. Planktonik hücrelerin yüzeye ilk adhezyonu ile başlayan, EPS sentezi ve kolonileşme ile olgulaşan biyofilmin en son aşamada dağılmasını gösteren şematik diagram..... 8
- Şekil 2. AFM cihazının temel komponentleri ve AFM ucu ile bakteriyel yüzey biyopolimerlerinin arasındaki etkileşimin şematik gösterimi..... 14
- Şekil 3. (A) AFM yaklaşma (kırmızı çizgi) ve geri-çekilme (mavi çizgi) eğrileri, (B) Bakteri hücreleri ve silikon nitrat AFM ucu arasında su içerisinde elde ettiğimiz etkileşimleri gösteren tipik AFM geri-çekilme eğrileri ve adhezyon pikleri..... 15
- Şekil 4. *E. coli* (ATCC 25404) ve *B. subtilis* (ATCC 6633) büyüme eğrileri. *E. coli* 170 rpm ve 37 °C'de LB besiyeri içerisinde, *B. subtilis* ise 170 rpm ve 37 °C'de TSB besiyeri içerisinde büyütülmüştür. Deneyler her bakteri için 3 kere tekrarlanmıştır..... 17
- Şekil 5. Statik koşulda mikroplak kuyularında biyofilm oluşumu, oluşan biyofilmlerin kristal viyole ile boyanması ve asetik asit ilavesiyle biyofilmlerden boyaların geri çözdürülmesi basamaklarını içeren şematik diyagram. Görüntüler *E. coli* biyofilmlerine aittir..... 18
- Şekil 6. Dinamik sistem ve komponentleri..... 20
- Şekil 7. c-di-GMP standart HPLC pikleri. 200 pmol/µl c-di-GMP stok çözeltisinin seyreltilmesi ile hazırlanan 1, 2, 5, 10 ve 20 pmol/µl'lik çözeltilerin HPLC analizi ile elde edilmiştir..... 23
- Şekil 8. c-di-GMP kalibrasyon doğrusu. 1, 2, 5, 10 ve 20 pmol/µl'lik c-di-GMP çözeltilerinin standart HPLC piklerinin altında kalan alanların hesabıyla elde edilmiştir..... 23
- Şekil 9. Gliserin içeren agar üzerine yerleştirilmiş selüloz asetat membran üzerinde filtrelenmiş olarak bulunan bakteri katmanları görüntüsü ve gerçekleştirilen temas açısı ölçümlerinden görüntüler..... 24
- Şekil 10. PLL kaplı mika disk üzerine immobilize olmuş planktonik ve biyofilmden-dağılmış (B-D) *E. coli* hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. Yeşil ile (SYTO 9) boyanmış hücreler canlı, kırmızı ile (propidyum iyodür) boyanmış hücreler ölü hücrelerdir..... 27
- Şekil 11. PLL kaplı mika disk üzerine immobilize olmuş planktonik ve biyofilmden-dağılmış (B-D) *B. subtilis* hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. Yeşil ile (SYTO 9) boyanmış hücreler canlı, kırmızı ile (propidyum iyodür) boyanmış hücreler ölü hücrelerdir..... 28
- Şekil 12. AFM ölçümleri için ön hazırlıklar. a) Bakteriyel hücrelerin immobilize olduğu PLL kaplı mika disklerin AFM piezo tarayıcısı üzerine yerleştirilmesi ve b) diskler üzerine su koyulması, c) konsolun tutucaya yerleştirilip AFM cihazına entegrasyonu ve d) örneğin konsol ve dolayısı ile AFM ucuna yaklaştırılması..... 29

Şekil 13. AFM adhezyon kuvveti ölçümü şematik gösterimi. + ile verilen yerler kuvvet ölçümlerinin yapıldığı bölgeleri temsil etmektedir. Bir bölgeden bir adet geri-çekilme eğrisi alınıp adhezyon piklerinin kuvvet değerleri belirlenmektedir.....	29
Şekil 14. E. coli ve B. subtilis biyofilmlerinin farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesiyle dağıtılması sonucunda kalan biyofilmlerin optik yoğunluklarının karşılaştırılması.....	32
Şekil 15. Dinamik sistemde akış hücresinde oluşturulan E. coli biyofilmi (A) ve sistemden 5 µM SNP (B) ve 0.5 µM SNP (C) içeren besiyerleri geçirildikten sonra kalan biyofilmlerin floresan mikroskop görüntüleri.....	35
Şekil 16. Dinamik sistemde akış hücresinde oluşturulan B. subtilis biyofilmi (A) ve sistemden 5 µM SNP (B) içeren besiyeri geçirildikten sonra kalan biyofilmin floresan mikroskop görüntüleri.	35
Şekil 17. E. coli hücrelerinin su altında AFM ile elde edilen üç boyutlu görüntüleri. A) Planktonik, B) 0.5 µM, C) 5 µM, D) 50 µM ve E) 2.5 mM SNP ile statik biyofilmden-dağılmış hücreler; F) 0.5 µM ve G) 5 µM SNP ile dinamik biyofilmden-dağılmış hücrelerdir.....	37
Şekil 18. Planktonik ve statik sistemde oluşturulmuş biyofilmlerden farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesiyle dağılmış E. coli hücrelerin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin olasılık histogramları.....	38
Şekil 19. Dinamik sistemde oluşturulmuş biyofilmlerden farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesiyle dağılmış E. coli hücrelerin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin olasılık histogramları.....	39
Şekil 20. B. subtilis hücrelerinin su altında AFM ile elde edilen üç boyutlu görüntüleri. A) Planktonik, B) 5 µM SNP ile statik biyofilmden-dağılmış, C) 5 µM SNP ile dinamik biyofilmden-dağılmış hücrelerdir.....	39
Şekil 21. Planktonik ve biyofilmlerden 5 µM SNP ilavesiyle dağılmış B. subtilis hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin olasılık histogramları..	40
Şekil 22. Planktonik ve 5 µM SNP ilavesiyle statik ve dinamik sistemlerde oluşmuş E. coli ve B. subtilis biyofilmlerinden dağılan bakteriyel hücrelerin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin Poisson dağılımları.....	49
Şekil 23. Planktonik ve biyofilmlerden 5 µM SNP ilavesiyle dağılmış E. coli hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin varyanslarına karşı çizilen ortalama kuvvet doğruları.....	51
Şekil 24. Planktonik ve biyofilmlerden 5 µM SNP ilavesiyle dağılmış B. subtilis hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin varyanslarına karşı çizilen ortalama kuvvet doğruları.....	52



ÖZET

Biyofilm oluşumu, planktonik bakterilerin bir yüzeye nano-ölçekte adhezyonuyla başlayan ve biyofilmin dağılmasıyla tamamlanan gelişimsel bir süreçtir. Biyofilmden-dağılmış bakteriyel hücrelerin planktonik muadillerine kıyasla daha öldürücü özellik gösterip farklı fizyolojide olmaları, biyofilmden-dağılmış bakterilerin oluşturacağı yeni biyofilmlerle mücadelede farklı stratejilerin uygulanmasını gerekli kılmıştır. NO-donörü sodyum nitroprussid (SNP) kullanarak, c-di-GMP yollarının hedeflenmesi ve böylece biyofilm dağılımının sağlanması biyofilmlerle mücadelede yaygın olarak kullanılan etkili bir stratejidir. Bu sebeple, projede farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesiyle statik ve dinamik sistemlerde büyütülen biyofilmlerden dağılmış Gram-negatif *E. coli* ve Gram-pozitif *B. subtilis* hücreleri ile planktonik muadillerinin su içinde silikon nitrat yüzeyine uyguladıkları adhezyon kuvvetleri atomik kuvvet mikroskopuyla (AFM) ölçülerek karşılaştırılmıştır. Buna göre statik sistemde 5 μM SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış *E.coli* ve *B. subtilis* hücrelerinin adhezyon kapasitelerinin planktonik hücrelerinkine benzer veya düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca statik sistemde biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerinin adhezyon kapasitelerinin ve yüzey heterojenliklerinin ilave edilen SNP konsantrasyonuna bağlı olduğu, özellikle 0.5 μM ve 2.5 mM (toksik) konsantrasyonlarda SNP kullanımının biyofilmden-dağılmış hücrelerin moleküler adhezyonunda ve c-di-GMP miktarlarında önemli artışlara neden olduğu görülmüştür. Dinamik sistemde 5 μM SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerinin adhezyon kapasitelerinin planktonik hücrelerden daha yüksek olduğu ve bu durumun yüzey hidrofobisiteleriyle ilişkili olduğu gözlenmiştir. Dinamik sistemde 5 μM SNP ile biyofilmden-dağılmış *B. subtilis* hücrelerinin adhezyon kapasiteleri, statik sistemde olduğu gibi, planktonik hücrelere kıyasla daha düşük bulunmuştur. Tüm koşullarda hücrelerin adhezyon kapasiteleri ile içerdikleri c-di-GMP miktarları arasında pozitif ilişki gözlenmiş, bu durumun da SNP ilavesiyle açığa çıkan NO konsantrasyonuna ve ortam koşullarına bağlı olarak değişen nitrosatif stres ve açlık stresine bağlı olabileceği düşünülmüştür. 5 μM SNP ilavesiyle biyofilmlerden dağılan hücrelerin planktonik hücrelere kıyasla daha hidrofobik oldukları ve bakteriyel adhezyonu spesifik hidrojen bağı kuvvetlerinin domine ettiği bulunmuştur. Projeden elde edilen sonuçların biyofilmlerle mücadelede daha etkili stratejilerin geliştirilmesine büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm dağılımı, adhezyon kuvveti, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), c-di-GMP, sodyum nitroprussid (SNP), *E. coli*, *B. subtilis*



ABSTRACT

Biofilm formation is a developmental process that begins with nano-scale adhesion of planktonic cells to a surface and is eventually completed by the dispersal of the biofilm. The fact that biofilm-dispersed cells are more lethal and have different physiology compared to their planktonic counterparts necessitated the application of different strategies to combat biofilms. Targetting c-di-GMP pathways by NO-donor sodium nitroprusside (SNP), thereby inducing biofilm dispersal, is a widely used strategy in combating biofilms. Therefore, in this project, the adhesion forces of Gram-negative *E. coli* and Gram-positive *B. subtilis* dispersed from biofilms grown in static and dynamic systems with the addition of different concentrations of SNP, and those of their planktonic counterparts to silicon nitrate surface in water were measured by atomic force microscopy (AFM). The adhesion capacities of biofilm-dispersed *E. coli* and *B. subtilis* at 5 μM SNP in the static system, were found to be similar or lower than that of planktonic cells. The adhesion capacity and surface heterogeneity of biofilm-dispersed *E. coli* were found to be depended on the added SNP concentration. The use of SNP at 0.5 μM and 2.5 mM (toxic) concentrations, resulted in significant increases in molecular adhesion and cellular c-di-GMP amounts. In dynamic system, the adhesion capacity of biofilm-dispersed *E. coli* at 5 μM SNP was higher than that of planktonic cells, but dispersed *B. subtilis* showed lower adhesion capacity. A positive correlation was observed between the adhesion capacities and amounts of intracellular c-di-GMP, and linked to the released NO concentration and possible nitrosative and starvation stresses. Dispersed cells were found to be more hydrophobic than planktonic cells, and bacterial adhesion was dominated by specific-hydrogen bonds at all investigated. It is thought that the results obtained from the project will contribute greatly to the development of more effective strategies to combat biofilms.

Keywords: Biofilm dispersion, adhesion force, atomic force microscope (AFM), c-di-GMP, sodium nitroprusside (SNP), *E. coli*, *B. subtilis*

1. GİRİŞ

Bakteriler toprakta, insan vücudunda, su kaynaklarında ve hatta radyoaktif atıklar gibi hemen hemen her ortamda bulunmaktadır. Ortam koşullarına bağlı olarak bakteri hücreleri, sıvılarda serbestçe yüzen *planktonik hücreler* olarak veya sıvı-katı arayüzde bakteriyel toplulukların üç boyutlu karmaşık mimarileri olarak, yani *biyofilmler* olarak bulunabilirler. Bakteriler, çevrede biyofilm oluşturarak zorlu çevre koşullarına karşı dirençli hale gelir. Bu topluluklar temelde bakteri hücrelerinin yüzeylerde hücre dışı polimerik maddelerden (EPS'ler) oluşan adhezif bir matris içinde çoğalmasıyla oluşmaktadır.

Biyofilm formunda yaşamının bakteri hücreleri için birçok avantajı bulunmaktadır. Belki de en önemli avantajı, hücre dışı matrisin hem fiziksel hem de kimyasal dış etkenlere karşı bakteriler için koruyucu kalkan görevi üstlenmesidir. EPS bileşimi çevre koşullarındaki değişikliklere göre değişebilir, böylelikle biyofilm içinde bakteri yaşamının korunmasının sürekliliğini sağlar (Kostakioti vd., 2013). Bir diğer önemli avantajı ise metabolitlerin değişimini kolaylaştıran bir ortam yaratmasıdır. Biyofilm matrisi, küçük moleküllerin difüzyonunu azaltarak biyofilmde daha uzun süre kalmalarını sağlar. Böylece biyofilm içindeki bakteriyel hücrelerin besin maddelerine daha uzun süre erişimi olur (Flemming ve Wingender, 2010). Bu özellik açlık stresine giren bakteriyel hücrelerin biyofilm formuna geçiş yapmak istemesinin ve metabolizmalarını buna göre ayarlamalarının başlıca nedenidir. EPS matrisinin ve çok hücreli yaşam tarzının avantajlarının sonucu olarak, biyofilmler, olumsuz çevresel koşullara, antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı son derece dirençli hale gelip, pek çok farklı yüzeyde kontrolsüzce büyüyerek ciddi problemlere yol açabilirler.

Biyofilmler, klima sistemlerinin, su sistemlerinin, gıda işleme ekipmanlarının ve medikal malzemelerin yüzeylerinde oluşarak insan sağlığını etkileyebilecek pek çok probleme neden olabilirler. Örneğin, içme suyunun ya da gıda ürünlerinin patojenik bakteriyel biyofilmlerle kontaminasyonu sonucu oluşabilecek geniş çaptaki bakteriyel enfeksiyonlar, tekrarlayan kulak ve diş enfeksiyonları, katater, eklem protezleri, yapay kalp kapakçıkları gibi medikal gereçlerin bakterilerle kontaminasyonu sonucu oluşabilecek enfeksiyonlar gibi insan vücudunda meydana gelen mikrobiyal ve kronik enfeksiyonların % 65-80'inden biyofilmlerin sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Davies, 2003; Chua vd., 2014). Biyofilmler endüstride ekipman, zaman ve iş gücü kayıplarına neden olurlar. Endüstriyel/evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde veya gemi karinalarında istenmeyen tortu ve tabakalaşmaların oluşumu ya da bakteri kaynaklı yüzey

korozyonu gibi problemlerin de nedeni biyofilmlerin oluşumudur ve büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Biyofilm oluşumu, farklı aşamalarla gelişimsel bir süreç olarak ilerlemektedir. İlk aşama planktonik varoluş biçimindeki bakteri hücrelerinin bir yüzeye temasına imkan sağlayacak kadar yaklaşmasıdır. Bakteriyel hücre yüzeye yaklaşırken, Lifshitz-van der Waals ve elektrostatik kuvvetleri gibi spesifik-olmayan fizyokimyasal kuvvetlere maruz kalır. Bakteri yüzeyinin ve yaklaştıkları yüzeyin potansiyellerine göre bu kuvvetler itici (repulsive) veya çekici (attractive) özellik gösterebilir. Dolayısıyla fizyokimyasal kuvvetler bakterinin adhezyonunu kolaylaştıracağı gibi yüzeye yaklaşmasına engel de olabilir. Bağlanma sürecindeki ikinci aşama, bakteri hücresi ve yüzeyin geri döndürülemez bir şekilde birbirine bağlanmasıdır. Bu aşamada bakteriler hücre yüzeyiyle ilişkili adhezif yüzey biyopolimerleri veya moleküler gruplar aracılığıyla yüzeye kilitlenirler. İkinci aşamada görülen geri döndürülemez birleşmeye geçişte, kovalent, iyonik ve hidrojen bağları kuvvetleri gibi spesifik kuvvetler söz konusudur (Israelachvili, 1992; Kaplan, 2010; Gordesli ve Abu-Lail, 2012a). Bahsedilen iki aşamalı mekanizma ile yüzeye ilk tutunmayı başaran öncü bakteri hücreleri bölünmeye başlar, hücre dışı polimerik madde (EPS) üretir ve mikrokoloniler oluşturarak koruyucu EPS matrisiyle örtülü yapılar geliştirirler. Olgun biyofilm aşaması olarak da adlandırılan bu aşamada, EPS matrisi mikrokolonilerin gelişebilmesi için çok fonksiyonlu ve koruyucu bir iskelet sağlar (Donlan, 2002). Son aşamada ise, bakteri hücreleri biyofilmi terk ederek biyofilm dağılımını gerçekleştirirler. Dağılıma aşaması olarak bilinen bu süreçte, biyofilmden-dağılmış hücreler diğer yüzeylere göç ederek yeni biyofilm yapıları oluştururlar (Koo vd., 2017). Dolayısı ile bir biyofilmin son aşaması olan dağılım, başka bir biyofilm oluşumunun da ilk aşamasıdır.

Biyofilm oluşumunu engellemenin en temel yolu öncü bakterilerin yüzeye ilk tutunmasının önlenmesidir. Ancak nano-ölçekte gerçekleşen bu kritik aşama ile ilgili çok az bilgi bulunması sebebiyle biyofilmle mücadelede geliştirilmiş stratejilerin çoğu öncelikle olgun biyofilmin dağıtılmasını hedeflemektedir. Olgun biyofilmlerin antimikrobiyal ajanlara oldukça dirençli olması nedeniyle, daha önce yapılan çalışmalar temel olarak enfeksiyonları ortadan kaldırmak için biyofilmlerin dağılımına odaklanmıştır. Biyofilm dağılımı biyofilm yaşam döngüsünün bir parçasıdır ve çevredeki olumsuz şartların sonucunda veya biyofilm içindeki bakteriyel popülasyonun artmasıyla besin maddelerine olan ihtiyaç sebebiyle doğal olarak meydana gelmektedir. Araştırmacılar, biyofilmlerle mücadele yöntemi olarak bu doğal dağılım sürecini tetikleyen yöntemler geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda, EPS üreten ekzoenzimleri, polisakkaritleri, adhezinleri ve bakteriyel motiliteyi kontrol eden intraselüler nükleotid siklik

diguanozin monofosfat (c-di-GMP), çeşitli çevresel faktörler ve bakteri hücreleri arasındaki sinyallere yanıt olarak biyofilmin dağılmasını ve planktonik forma geçişi düzenleyen bir sinyal iletim ağının merkezi unsuru olarak ortaya çıkmıştır (McDougald vd., 2011; Koo vd., 2017). Planktonik varoluştan biyofilm formuna geçişte veya biyofilm formundan planktonik forma geçişte bakteri hücrelerinin c-di-GMP seviyesi değişir. Başka bir ifadeyle, bakteriler çevresel değişikliklere ve çeşitli stres unsurlarına bir yanıt olarak hücre içi c-di-GMP seviyelerini değiştirip farklı formlara geçiş yapabilirler.

Hem in vivo hem de in vitro ortamlarda uygulanabilirliği ile c-di-GMP sinyal yollarının hedeflenmesi, biyofilmlerin yüzeylerden dağılımı için oldukça etkili bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Barraud vd., 2009a, 2015; McDougald vd., 2011; Romling vd., 2013; Chua vd., 2014, 2015; Koo vd., 2017). Nitrik oksit (NO) donörlerinin kullanımı yoluyla, biyofilmlerin c-di-GMP seviyelerinin modüle edilerek dağılımlarının sağlanabildiği gözlenmiştir. Bu mekanizmanın nasıl olduğu *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde çalışılmış ve NO'nun c-di-GMP'yi ayrıştıran spesifik fosfodiesterazları (PDE) aktive ettiği bulunmuştur (Barraud vd., 2006, 2009a). Benzer NO-c-di-GMP etkileşim mekanizmalarının diğer bakteri türlerinde de olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, hipertansiyon tedavisinde FDA onaylı ilaç olarak kullanılan NO-donörü sodyum nitroprussid (SNP) (Barraud vd., 2015), düşük dozlarda kullanıldığında biyofilmlerin yüksek oranda dağılımını gerçekleştiren ve düşük dozda kullanımı sebebiyle de bakterilerin SNP'ye karşı direnç oluşturmayacağı düşününen en yaygın NO donörü biyofilm-dağıtıcı ajan olarak kullanılmaktadır.

Ancak yapılan çalışmalar biyofilmden-dağılmış hücrelerin planktonik hücrelerden fizyolojik olarak farklı olduğunu, daha öldürücü (virülent) olduğunu ve enfeksiyonu yaydığını göstermiştir (Chua vd., 2014; Guilhen vd., 2019; Ruhul vd., 2019). Biyofilmden-dağılmış hücrelerin planktonik forma geçişten önce bir ara-form olduğu da ayrıca belirtilmiştir. Planktonik ve biyofilmden-dağılmış hücrelerin farklı seviyelerde c-di-GMP içeriğine sahip olması, bu hücrelerin adhezyon kapasitelerinde de farklılıklar olacağını düşündürmektedir. Çünkü c-di-GMP bakterilerin bir yüzeye ilk tutunmasını sağlayacak yüzey biyopolimerlerinin oluşumunda ve sonrasında bakteri yüzeyi ilişkili EPS sentezinde etki göstermektedir. Örneğin endüstriyel su sistemlerinde veya gıda işleme sistemlerinde istenmeyen biyofilmin dağılımının gerçekleştirildiği bir işlem sonrasında planktonik hücrelere kıyasla, adhezif özellikleri daha farklı biyofilmden-dağılmış hücrelerin ortama salınmasıyla, vücut içindeki enfeksiyon yayılımında görüldüğü gibi, endüstriyel sistemlerde de daha güçlü biyofilmlerin yeni yüzeylerde oluşumu gerçekleşebilir. Bu nedenlerle, biyofilmlerin in vivo ve in vitro yüzeylerden arındırılması için etkili bir strateji olarak düşünülen



biyofilm dağılımının indüklenmesi, çevreye planktonik hücreler yerine daha farklı fizyolojide hücre salınacağından tekrar gözden geçirilmelidir.

Biyofilm oluşumunu azaltmaya yönelik yeni ve/veya iyileştirilmiş stratejiler geliştirmek için öncelikle planktonik hücreler ve biyofilmden-dağılmış hücrelerin yüzeylere adhezyonunun moleküler mekanizmalarının incelenmesi gerektiği düşünülmektedir. Proje kapsamında Gram-negatif *Escherichia coli* ve Gram-pozitif *Bacillus subtilis* planktonik bakteriyel hücreleri ile biyofilmden-dağılmış muadillerinin biyofilm oluşum sürecinin ilk aşaması olan nano-ölçekteki yüzeye ilk tutunmaları ve bu süreçte etki eden adhezyon kuvvetleri mühendislik bakış açısı ve fiziksel yaklaşımlarla incelenmiştir. Bu amaçla statik ve dinamik sistemlerde oluşturulan biyofilmler NO donörü SNP'nin farklı konsantrasyonlarda kullanımıyla dağıtılmış, dağılan hücreler ile planktonik hücrelerin silikon nitrat yüzeyine uyguladıkları adhezyon kuvvetleri su içerisinde atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarındaki heterojenlik ve elde edilen toplam adhezyon kuvveti değerleri karşılaştırılarak incelenen tüm koşullarda bakterilerin adhezyon kapasiteleri belirlenmiştir. Detaylı istatistiksel Poisson analizleri ile AFM ile ölçülen adhezyon kuvvetleri spesifik ve spesifik-olmayan bileşenlerine ayrıştırılmış ve hangi bileşenin adhezyonu domine ettiği belirlenmiştir. Ayrıca adhezyon kapasitelerinde görülen farklılıkları açıklamak amacıyla bakterilerin apolar ve polar yüzey gerilimleri ile yüzey hidrofobisiteleri temas açısı ölçüm sonuçları ve termodinamik-tabanlı harmonik ortalama modeli (HM modeli) kullanılarak hesaplanmış, içerdikleri c-di-GMP miktarları da sıvı kromatografisi ölçümleri ile belirlenmiştir. Elde edilen tüm bulgular literatürdeki bilgiler ışığında tartışılarak ilerleyen bölümlerde sunulmuştur. Sonuçlarımızın biyofilmlerle mücadelede yeni ve daha etkili stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Bakteriyel Biyofilmler

Bakteriyel hücreler, insan vücudu, su sistemleri, tıp ve gıda endüstrileri de dahil olmak üzere çok çeşitli çevresel nişlerde bulunabilir. Bakteriyel hücreler, sıvılarda serbestçe yüzen planktonik hücreler olarak veya yüzeylerde üç boyutlu karmaşık yapılar, yani biyofilmler olarak var olabilirler. Biyofilm oluşumu, bakterilerin tek hücreli yaşam tarzından çok hücreli yaşam tarzına geçici geçişidir. Bu grup davranışı sayesinde bakteriler olumsuz çevre koşullarına karşı dirençli hale gelir. Bakteri hücresinin yüzeyle teması, gen ekspresyonunu değiştiren yanıtları uyararak, biyofilmin oluşumu ve olgunlaşması için gerekli gen ekspresyonunu tetikler. Bu genetik düzenlemedeki ilk adım, hücre dışı polimerik maddelerden (EPS'ler) oluşan bir matrisin oluşumunu ve dolayısıyla biyofilmin olgunlaşmasını sağlayan genlerin ekspresyonudur. EPS'ler, bakteri hücrelerinin çevrelerine salgıladıkları yapı malzemeleridir (Di Martino, 2018) ve biyofilmin fizyokimyasal özelliklerini oluşturan matris olarak kabul edilir. EPS matrisi ayrıca biyofilmlerin işlevsel ve yapısal bütünlüğünün oluşturulmasında önemli rollere sahiptir (Flemming vd., 2000).

EPS'lerin ana bileşenleri olan ekzopolisakkaritler, hetero-polisakkarit veya homo-polisakkarit yapıda olabilir (Di Martino, 2018). Polisakkaritlerin çoğu nötr olmasına rağmen, birçok bakteriyel EPS'in negatif yük taşıdıkları görülmüştür. Bakteriler, çevre koşullarındaki değişikliklere göre EPS bileşimini değiştirerek, biyofilm mimarisini buldukları özel ortama göre uyarırlar. EPS matrisi, bakteri hücrelerini koruyucu bir tabaka ile kaplar ve zararlı maddelerin biyofilm içine difüzyonunu engellerken, besinlerin matris içinde kalmalarını sağlayarak bakteriler için elverişli bir ortam oluşturur. EPS matrisi biyofilm hücrelerini konağın savunma sisteminden (Donlan, 2002), kurumadan ve oksitleyici ajanlardan, radyasyon etkilerinden ve antibiyotikler gibi diğer zararlı maddelerden korur (Flemming ve Wingender, 2010; Kostakioti vd., 2013). Aynı zamanda bakterileri yakın mesafede tutmayı mümkün kılar ve DNA değişimine ve hücre-hücre etkileşimlerine izin verir. Tüm bu özellikler EPS matrisini bakteri hücrelerinin yuvası haline getirir. Ek olarak, EPS matrisinin bileşenleri bakterilerin yüzeye ve birbirlerine yapışmasına/adhezyonuna izin verir.

Biyofilm yapısı, bakteri hücrelerinin yaşamsal aktiviteleri için uygun bir ortam bulunduğu ve kendilerini çevresel faktörlerden koruduğu bir mikro ekosistem olarak da ifade edilebilir (Kaplan, 2010; Yin vd., 2019). Dolayısıyla biyofilm yapısı, bakteri hücrelerinin kolonizasyonunu destekler. Kolonilerdeki popülasyonlar tek tip veya farklı bakteri türlerinden oluşabilir. Popülasyonlardaki heterojenlik, karmaşık ve kombine tedavi yöntemleri gerektirdiğinden biyofilm ile mücadeleyi

zorlaştırmaktadır (Burmølle vd., 2006). Ayrıca biyofilm yapısı, ortam pH'ının ve sıcaklığının değişimi, besin eksikliği ve antimikrobiyal ajanlar ve dezenfektanlar gibi dış etkenlere karşı bakterileri dirençli hale getiren önemli bir virülans faktörüdür (Koo et al., 2017; Deliorman vd., 2019). Planktonik hücreler ile karşılaştırıldığında, biyo filmlerin antibakteriyel tedavilere yaklaşık 500 kat daha dirençli olduğu belirtilmektedir (Costerton vd., 1995).

2.1.1 Bakteriyel biyo filmlerin neden olduğu problemler

Biyofilmler, su sistemleri, gıda ürünleri ve gıda üretim yüzeyleri, yaralar, konakçı organizmanın mukozal yüzeyleri, implantlar ve tıbbi cihazlar, kulak kanalları ve diş yüzeyleri gibi hemen hemen her biyotik ve abiyotik yüzeylerde gelişebilir. Biyo filmler, antimikrobiyal işlemlere karşı yüksek dirençleri ve dağıldıktan sonra yüzeyleri yeniden kontamine etme kabiliyetleri nedeniyle ciddi tıbbi ve endüstriyel sorunlara neden olurlar. Biyo filmlerin insan vücudundaki mikrobiyal ve kronik enfeksiyonların % 65-80'inden sorumlu oldukları tahmin edilmektedir (Davies, 2003; Chua vd., 2014).

Kateterler, implante edilebilir protez cihazlar ve eklem replasmanları, bakteri hücrelerinin kolayca tutunup biyofilm oluşturabildiği tıbbi gereçlerden bazılarıdır. Bu tür yüzeylerde oluşan enfeksiyonların tedavisi genellikle mevcut implantın çıkarılması yoluyla yapılmaktadır. Bu ameliyatlarda travma sayısını ve tedavi maliyetlerini artırmaktadır (Blanchette ve Wenke, 2018). Biyo filmlerin ayrıca kronik yaralara neden olduğu da anlaşılmıştır. Kronik yaraların tedavi maliyetlerinin sağlık sisteminde büyük bir yük oluşturduğu bilinmektedir. Bakteriyel biyo filmler, yara bölgesindeki iltihabı uyarak bu alanı tedaviye dirençli hale getirir ve doku onarımını yavaşlatır (Zhao vd., 2013; Wu vd., 2019). Bu durumun, özellikle diyabetik hastaların tedavisinde büyük problemlere yol açtığı görülmektedir. Etkili bir strateji ile kronik yara biyo filminin dağıtılması, iyileşme sürecini de kolaylaştıracağından, oldukça önemlidir. Ancak biyo filmlerin dağıtılması ya da yüzeyden sıyrılmasıyla farklı ortamlarda yeni biyofilm oluşumları görülebileceği unutulmamalıdır. Bunun nedeni, biyo filmde dağılmış hücrelerin olgun biyofilm dağıtıldığında serbest kalmasıdır. Bu nedenle, biyofilm dağılımı hastada uygun antimikrobiyal kullanımı ve/veya biyo filmde dağılmış bakteriyel hücreleri de hedef alan diğer stratejiler ile takip edilmelidir.

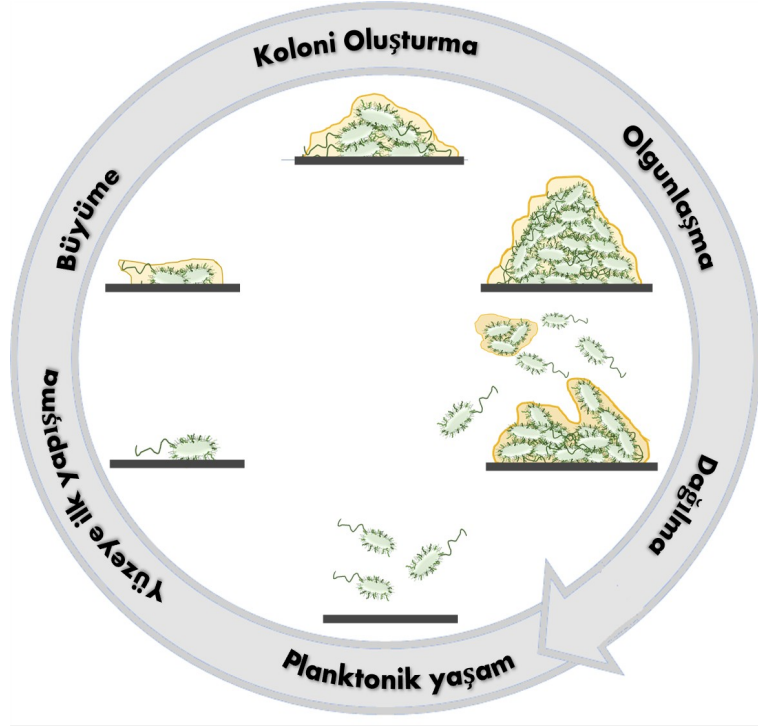
Biyofilmler, tıbbi/sağlık sorunlarına yol açmanın yanı sıra borularda, tanklarda, işleme ekipmanlarında ve ısı eşanjörlerinde tıkanma ve korozyon gibi büyük ekonomik kayıplara ve birçok farklı ambalaj malzemesinin yüzeylerinde kontaminasyon gibi farklı endüstriyel sorunlara da neden olur (Li vd., 2013). Özellikle gıda endüstrisinde, işleme ekipmanlarının yüzeylerinde

oluşan biyofilmler doğrudan gıda yüzeylerine geçerek gıdanın kontaminasyonuna, raf ömrünün kısılmasına, gıda kaynaklı hastalıklara ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Dünya çapında yılda yaklaşık 1.3 milyar ton gıda kaybı meydana gelmektedir ve bu kaybın ana nedenlerinden birinin biyofilmler nedeniyle gıda bozulması olduğu tahmin edilmektedir (Marino vd., 2018). *Escherichia coli* ve *Clostridium botulinum* gibi gıda kaynaklı bakterilerin, gıda işleme tesislerinin yüzeylerinde ve dolayısıyla gıda ürünlerinde biyofilmler oluşturduğu görülmüştür. Bu durum insan yaşamını tehdit edebilecek hastalıklarla ve salgınlarla sonuçlanabilir. Örneğin 2007 ve 2013 yılları arasında dünyada *E. coli* ile ilişkili toplam 423 gıda kaynaklı salgın rapor edilmiştir. Biyofilm yapısı temizleme ve dezenfeksiyon prosedürlerine karşı da oldukça dirençli olduğundan olgun biyofilmlerle mücadele her alanda zor bir süreç haline gelmiştir (Van Houdt ve Michiels, 2010; Galié vd., 2018). Biyofilmlerin oluşumunu baştan önlemek veya var olan biyofilmi ortadan kaldırmak amacıyla araştırmalar devam etmektedir.

2.1.2 Biyofilm oluşumu ve yaşam döngüsü

Biyofilm oluşumu, farklı aşamalarla gelişimsel bir süreç olarak ilerlemektedir. İlk aşama iki basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamak planktonik varoluş biçimindeki bakteri hücrelerinin bir yüzeye temasına imkan sağlayacak kadar yaklaşmasıdır. Bakteriyel hücre yüzeye yaklaşırken, Lifshitz-van der Waals ve elektrostatik kuvvetleri gibi spesifik-olmayan fizyokimyasal kuvvetlere maruz kalır. Bakteri yüzeyinin ve yaklaştıkları yüzeyin potansiyellerine göre bu kuvvetler itici (repulsive) veya çekici (attractive) özellik gösterebilir. Dolayısıyla fizyokimyasal kuvvetler bakterinin adhezyonunu kolaylaştıracağı gibi yüzeye yaklaşmasına engel de olabilir. Yaklaşık <100 nm'lik bir mesafede bakteri yüzeye yaklaşırken spesifik-olmayan kuvvetlerin etkileri hissedilmeye başlar, spesifik kuvvetlerin etkileşim mesafesine (< 1nm) kıyasla spesifik-olmayan kuvvetlerin uzun mesafeli/menzilli etkileşimler oldukları söylenebilir (Israelachvili, 1992; Gordesli ve Abu-Lail, 2012a). Elektrostatik kuvvetler genellikle itici kuvvetler olarak etki gösterir, çünkü bakteri ve inert yüzeylerin çoğu sulu ortamda negatif olarak yüklenir (Gordesli ve Abu-Lail, 2012b). İkinci basamak ise, bakteri hücresi ve yüzeyin geri döndürülemez bir şekilde birbirine bağlanmasıdır. Bu basamakta bakteriler hücre yüzeyiyle ilişkili adhezif yüzey biyopolimerleri veya moleküler gruplar aracılığıyla yüzeye kilitlenirler. İkinci basamakta görülen geri döndürülemez birleşmeye geçişte, kovalent, iyonik, ligand-reseptör ve hidrojen bağları kuvvetleri gibi spesifik kuvvetler söz konusudur (Israelachvili, 1992; Kaplan, 2010; Gordesli ve Abu-Lail, 2012a). Bakterinin yüzeye ilk tutunması/adhezyonu sırasında etkileşen yüzeylerin ve elektrolitik çevrenin kimyasal doğasının bu mekanizmaya etki ettiği düşünülmektedir. Bahsedilen iki basamaklı mekanizma ile yüzeye ilk tutunmayı başaran öncü bakteri hücreleri bölünmeye ve

hücre dışı polimerik madde (EPS) üretmeye başlar (Şekil 1). EPS matrisi, bakteri hücrelerini bir arada tutar ve bakterileri yüzeye sıkıca bağlar. Çevre koşullarına ve bakteri türünün yüzey özelliklerine bağlı olarak EPS ve/veya biyofilm matrisi polisakaritler, proteinler, hücre dışı DNA, su ve iyonlar gibi farklı bileşenler içerebilir.



Şekil 1. Biyofilm yaşam döngüsü. Planktonik hücrelerin yüzeye ilk adhezyonu ile başlayan, EPS sentezi ve kolonileşme ile olgulaşan biyofilmin en son aşamada dağılmasını gösteren şematik diagram (Kaynak: Ördek, 2021)

Biyofilm oluşum sürecinin üçüncü aşaması, EPS matrisinin güvenli ortamında bakterilerin mikrokoloniler oluşturarak üç boyutlu yapılar geliştirmesidir. Mikrokoloniler, bir iskele olarak EPS matrisini kullanıp büyür ve olgun biyofilmleri oluşturur. Bu aşamada, üç boyutlu bir yapı oluşturmak için ilk katmanlara daha fazla bakteri ve EPS materyali eklenir. Ayrıca biyofilm içinde besinlerin ve atık ürünlerin değişimi için su kanalları oluşturulur. Biyofilmin olgunlaşması olan dördüncü aşama, EPS matrisi içerisinde heterojen kimyasal ve fiziksel mikro ortamların oluşmasını ve bu ortamlardaki bakteri hücrelerinin sosyal (rekabetçi ve sinerjik) etkileşimlerini içerir. Bu aşamada mineral kristaller, korozyon parçacıkları, kil veya silt parçacıkları veya kan bileşenleri gibi biyofilmin geliştiği çevreye bağlı olarak hücre dışı materyal de olgun biyofilm

matrisinde bulunabilir (Donlan, 2002). Ortam koşulları, biyofilmin olgunlaşma oranının belirlenmesinde önemli rol oynar. Beşinci ve son aşamada ise, bakteri hücreleri biyofilmi terk ederek biyofilm dağılımını gerçekleştirirler (Şekil 1). Biyofilm yapısından tek tek bakteri ve/veya bakteri hücre kümelerinin dağılımı görülebilir. Dağılan hücreler uygun ortam ve koşullar sağlandığında Şekil 1’de belirtilen tüm aşamaları tekrar ederek yeni biyofilm oluşumlarını gerçekleştirirler (Koo vd., 2017). Dolayısı ile bir biyofilmin son aşaması olan dağılım, başka bir biyofilm oluşumunun da ilk aşamasıdır. Biyofilm yaşam döngüsü biyofilmin yayılmasına veya akut enfeksiyonların kronik bir duruma geçişine neden olmaktadır.

2.1.3 Bakteriyel biyofilmlerin dağılımı için geliştirilmiş stratejiler

Biyofilm oluşumunu engellemenin en temel yolu öncü bakterilerin yüzeye ilk tutunmasının önlenmesidir. Ancak nano-ölçekte gerçekleşen bu kritik aşama ile ilgili çok az bilgi bulunması sebebiyle biyofilmle mücadelede geliştirilmiş stratejilerin çoğu öncelikle olgun biyofilmin dağıtılmasını hedeflemektedir. Biyofilm dağılımı biyofilm yaşam döngüsünün bir parçasıdır ve çevredeki olumsuz şartların sonucunda veya biyofilm içindeki bakteriyel popülasyonun artmasıyla besin maddelerine olan ihtiyaç sebebiyle doğal olarak meydana gelmektedir.

Araştırmacılar, biyofilmlerle mücadele yöntemi olarak bu doğal dağılım sürecini tetikleyen yöntemler geliştirmişlerdir. Genel olarak, biyofilm dağılımı için geliştirilen yöntemler *pasif* ve *aktif* biyofilm dağılım yöntemleri olmak üzere iki grupta ele alınabilir. Pasif dağılım yöntemleri mekanik uygulamalar yoluyla biyofilmlerin yüzeylerden dağıtılmasını/sıyırılmasını hedefler. Örneğin dış yüzeyinde oluşan plağın fırçalanarak temizlenmesi pasif biyofilm dağılımına bir örnektir (Kaplan, 2010; Fleming ve Rumbaugh, 2017). Fırçalama, baskı uygulama veya kazıma gibi mekanik yöntemlerle açık yüzeylerdeki biyofilmlerden kurtulmak mümkün görünse de kazıma sonrası kazınan yüzey zarar görebilir ve biyofilm artıkları büyümeye devam edebilir veya biyofilmden-dağılmış hücreler farklı ortamlara kaçıp yeni biyofilm oluşumlarını başlatabilir. Ayrıca hassas ve kapalı ortamlardaki yüzeylerde biyofilm ile mücadele etmek büyük çaba gerektirir ve sadece mekanik sıyırma ile mümkün olmadığı görülmektedir (Fabbri vd., 2016; Fleming ve Rumbaugh, 2017; Blanchette ve Wenke, 2018).

Aktif biyofilm dağılım yöntemleri ise üç ana başlık altında toplanabilir; birincisi, çoğunluğu algılama (quorum sensing) sistemlerinin hedef alınarak biyofilmin dağılmasının tetiklenmesi, ikincisi, EPS matrisinin hedef alınarak biyofilmin dağılmasının tetiklenmesi, üçüncüsü ise c-di-GMP sinyal yollarının hedef alınarak biyofilmin dağılmasının tetiklenmesi yöntemleridir (McDougald vd., 2011; Koo vd., 2017). Bu yöntemler arasında çoğunluğu algılama sistemlerinin

biyofilm gelişimi ve dağılımındaki rolü, yeni terapötiklerin geliştirilmesi için yoğun olarak uzun zamandır çalışılmaktadır (Koo vd., 2017). Çoğunluğu algılama sistemi, bakterilerin birbirleriyle sinyal molekülleri aracılığı ile iletişim kurarak yeterli çoğunluğa ulaşıp ulaşmadıklarını algılamalarına olanak vermektedir. Yeterli çoğunluğa ulaştıkları anda da biyofilm oluşumu, EPS matrisi ve virülens faktörlerin üretimi gibi kritik gen ekspresyonları tetiklenmektedir. Bu olay bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izleme ve buna bağlı olarak davranışlarını düzenleme olanağı verir. Böylelikle, konakta enfeksiyon oluşturabilecek yeterli çoğunluğa ulaşıncaya kadar bağışıklık sistemi tarafından patojen bakterinin fark edilmemesi sağlanarak başarılı bir enfeksiyon süreci oluşturulur (Bosgelmez-Tinaz vd., 2007; Gutierrez vd., 2009). Çoğunluğu algılama, AHL (acyl-homoserine lactones), AIP (autoinducer peptide) ve AI-2 (autoinducer-2) sinyal moleküllerinin ve türevlerinin karşılık geldiği bir transkripsiyon düzenleyiciye bağlanmasını gerektirir. Bu sinyal moleküllerini bloke eden, dolayısı ile bakteriler arasındaki haberleşme ağını bozan çoğunluk algılama inhibitörleri (quorum sensing inhibitors, QSI), in vitro ve in vivo modeller kullanılarak klinik olarak ilgili bakteriyel biyofilmler üzerinde bazı çalışmalarda denenmiş ve biyofilmlerin dağılımını sağladıkları rapor edilmiştir (Lauderdale vd., 2010; Anderson, 2015). Ancak bu bileşiklerin çoğunun ya toksik olmaları ya da tolere edilebilir dozlarda etki gösterememeleri nedeniyle insan kullanımına çok uygun olmadıkları görülmüştür. Ayrıca bu bileşiklerin, biyofilmlerin EPS tabakasından difüzyonu sırasında EPS tabakasına bağlanabileceği dolayısı ile etkilerinin azalabileceği düşünülmektedir (Koo vd., 2017).

EPS matrisinin hedef alınarak biyofilmin dağılması ise, EPS matrisinin EPS-ayırıştırıcı enzimler ile tahribatı yoluyla gerçekleştirilmektedir. Ekzopolisakkarit ayırıştırıcı enzimler olan glukanohidrolazlar (dekstranaz ve mutanaz), dispersin-B ve deoksiribonükleaz (DNAaz) gibi EPS-ayırıştırıcı pek çok enzimin biyofilm dağılımında etkili olduğu görülmüştür (Kaplan, 2014; Okshevsky vd., 2015; Pleszczynska vd., 2015; Fleming vd., 2016). Ancak, EPS matrisinin biyofilmi oluşturan bakterilere ve olduğu ortama göre değişkenlik gösteren heterojen yapısı nedeniyle, hedef alınacak biyofilme göre EPS-ayırıştırıcı enzim tasarlanması etkili biyofilm dağılımının gerçekleşmesinde büyük önem arz etmektedir (Becker vd., 2016).

Farklı bakteriyel türlerin oluşturduğu farklı yapıdaki biyofilmlerin dağılması hedefinde uygulanacak ortak ve etkili yöntem ise c-di-GMP sinyal yollarının hedef alınarak biyofilmin dağılmasının tetiklenmesi yöntemidir (Barraud vd., 2009a, 2015; McDougald vd., 2011; Romling vd., 2013; Chua vd., 2014, 2015; Koo vd., 2017). Birçok farklı bakteri türünün biyofilm oluştururken Şekil 1'dekine benzer aşamalardan geçtiği gözlemi, biyofilm oluşumunun genetik olarak düzenlenmiş bir süreç olduğunu düşündürmektedir. EPS üreten ekzoenzimleri,

polisakkaritleri, adhezinleri ve bakteriyel motiliteyi kontrol eden intraselüler nükleotid siklik diguanozin monofosfat (c-di-GMP), çeşitli çevresel faktörler ve bakteri hücreleri arasındaki sinyallere yanıt olarak biyofilmin dağılmasını ve planktonik forma geçişi düzenleyen bir sinyal iletim ağının da merkezi unsuru olarak ortaya çıkmıştır (McDougald vd., 2011; Koo vd., 2017). Genel olarak, hücre içi c-di-GMP seviyesindeki bir artış bakterilerin biyofilm modunda kalmasını teşvik ederken, c-di-GMP seviyesindeki azalış biyofilmin dağılmasına, dolayısı ile bakteriyel motilitenin artmasına ve bakterilerin planktonik varoluş biçimine geçmesine neden olmaktadır. Hücre içi c-di-GMP seviyesi, c-di-GMP'yi sentezleyen diguanilat siklazlar (DGC) ve ayrıştırıcı fosfodiesterazlar (PDE) tarafından belirlenir. Bakteriyel hücreler, karmaşık ve değişen çevre koşullarına uyum sağlamak için hücre içi c-di-GMP içeriğini hızla ayarlayabilir. Açlık ve nitrosatif koşullar da dahil olmak üzere strese maruz kalma sırasında bakteri hücreleri, spesifik PDE'leri aktive ederek biyofilm dağılımına neden olan hücre içi c-di-GMP içeriğini değiştirebilir (Koo vd., 2017).

c-di-GMP'nin, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerin biyofilm yaşam döngüsündeki önemli rolü sebebiyle, hem in vivo hem de in vitro ortamlarda uygulanabilirliği ile c-di-GMP sinyal yollarının hedeflenmesi, biyofilmlerin yüzeylerden dağılımı için oldukça etkili bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Barraud vd., 2009a, 2015; McDougald vd., 2011; Romling vd., 2013; Chua vd., 2014, 2015; Koo vd., 2017). c-di-GMP düzeylerini modüle etmek için iyi tanımlanmış ve kolay uygulanabilir bir yaklaşım ise nitrik oksit (NO) kullanımınıdır. Nitrik oksit (NO) biyolojik sistemlerde serbestçe dağılabilen ve her yerde bulunan bir sinyal molekülüdür. NO, hücrelerde endojen veya ekzojen kaynaklı olarak üretilir. Nitrik oksit (NO) donörlerinin kullanımı yoluyla, biyofilmlerin c-di-GMP seviyelerinin modüle edilerek dağılımlarının sağlanabildiği gözlenmiştir. Bu mekanizmanın nasıl olduğu *P. aeruginosa* üzerinde çalışılmış ve NO'nun c-di-GMP'yi ayrıştırıcı spesifik fosfodiesterazları (PDE) aktive ettiği bulunmuştur (Barraud vd., 2006, 2009a). Benzer NO-c-di-GMP etkileşim mekanizmalarının diğer bakteri türlerinde de olabileceği düşünülmektedir. NO'nun *P. aeruginosa* dışında ayrıca *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *S. marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Legionella pneumophila*, *Nitrosomonas europaea* ya da *Neisseria gonorrhoeae* bakterilerinin oluşturduğu tektür biyofilmlerde dağılımı uyardığı rapor edilmiştir (Barraud vd., 2009b). İçme suyu ve geri dönüşümlü su sistemleri yüzeylerinde oluşmuş, pek çok türün birlikte bulunduğu biyofilmlerde de dağılmayı sağladığı gözlemlenmiştir.

Hipertansiyon tedavisinde FDA onaylı ilaç olarak kullanılan NO-donörü sodyum nitroprussid (SNP) (Barraud vd., 2015), düşük dozlarda kullanıldığında biyofilmlerin yüksek oranda dağılımını

gerçekleştiren ve düşük dozda kullanımı sebebiyle de bakterilerin SNP'ye karşı direnç oluşturmayacağı düşününen en yaygın NO donörü biyofilm-dağıtıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Diğer NO-donörü ajanların, S-nitrozo-L-glutasyon (GSNO) ve S-nitrozo-N-asetilpenisilamin (SNAP), SNP kadar etkili olmasa da *P. aeruginosa* biyofilminde dağılımı uyardığı belirtilmiştir (Barraud vd., 2006).

C-di-GMP sinyal yollarının çeşitli moleküllerle hedef alınarak, hücre içi c-di-GMP seviyesinin azaltılması yoluyla biyofilm dağılımının sağlanması biyofilmlerin yüzeylerden arındırılması hedefinde oldukça başarılı bir strateji olarak görünmektedir. Ayrıca Christensen vd. (2013), intraselüler c-di-GMP içeriğinin manipülasyonu ile bir implant-fare enfeksiyon modelinde biyofilmin dağıtılabileceğini, dolayısı ile in vivo ortamda bu stratejinin uygulanabilirliğini kanıtlamıştır. Ancak Chua vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada biyofilmden-dağılmış hücrelerin planktonik hücrelerden fizyolojik olarak farklı olduğu bulunmuştur. Bu bulguya ek olarak biyofilmden-dağılmış hücrelerin morfolojik yapılarının planktonik hücrelerden farklı olduğunu ve yüzeylerinin hücre dışı malzeme ile kaplı olduğu SEM görüntüleri ile gösterilmiştir (Guilhen vd., 2019). *P. aeruginosa* biyofilmlerinden dağılmış hücrelerin planktonik *P. aeruginosa* hücrelerine kıyasla makrofajlara ve *Caenorhabditis elegans*'a karşı çok daha fazla öldürücü (virulent) olduğu gözlemlenmiştir (Chua vd., 2014). Bu durum, örneğin, bir implant üzerinde oluşmuş biyofilmin yüzeyden arındırılması ve planktonik faza geçecek hücrelerin antibiyotiklerle öldürülmesi gayesiyle, in vivo'da biyofilmin dağıtılmasının gerçekleştirildiği bir tedavinin güvenilir olup olmayacağı sorusunu gündeme getirmiştir. Çünkü böyle bir tedavi yöntemi planktonik hücrelere kıyasla antimikrobiyal ajanlara daha fazla dirençli ve çok daha fazla öldürücü özellik gösteren dağılmış hücrelerin enfeksiyonu yayması ya da septik şoka neden olması ile sonuçlanabilir. Son zamanda yapılan bir çalışmada ise biyofilmden-dağılmış hücrelerin akciğer enfeksiyonu fare modeli üzerindeki etkileri incelenmiş ve NO yoluyla biyofilmden-dağılmış hücrelerin enfeksiyonlar üzerinde önemli etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma, biyofilmden-dağılmış hücrelerin kan yoluyla akciğerden dalağa ve karaciğere yayıldığını, enfeksiyon ve ölüm riskini artırdığını göstermiştir (Ruhail vd., 2019). Biyofilmden-dağılmış hücreler biyofilm ile ilgili enfeksiyonları daha karmaşık hale getirmektedir.

Planktonik ve biyofilmden-dağılmış hücrelerin farklı seviyelerde c-di-GMP içeriğine sahip olması, bu hücrelerin adhezyon kapasitelerinde de farklılıklar olacağını düşündürmektedir. Çünkü c-di-GMP, EPS üreten ekzoenzimleri, polisakkaritleri, adhezinleri ve bakteriyel motiliteyi kontrol etmektedir. Bir başka ifadeyle, c-di-GMP bakterilerin bir yüzeye ilk tutunmasını sağlayacak

yüzey biyopolimerlerinin oluşumunda ve sonrasında bakteri yüzeyi ilişkili EPS sentezinde etki göstermektedir.

Planktonik ve biyofilmden-dağılmış hücrelerin adhezyon kapasitelerindeki farklılıkları anlamak için hücrelerin bir yüzeye ilk tutunmasının veya bağlanmasının moleküler düzeyde incelenmesi önemlidir. Konuyla ilgili derinlemesine bir anlayış sağlamak ve yeni etkili stratejiler geliştirebilmek için, nano-ölçekte bakterilerin yüzeye adhezyonunun araştırılması ve moleküler mekanizmalarının açıklanması gerekmektedir.

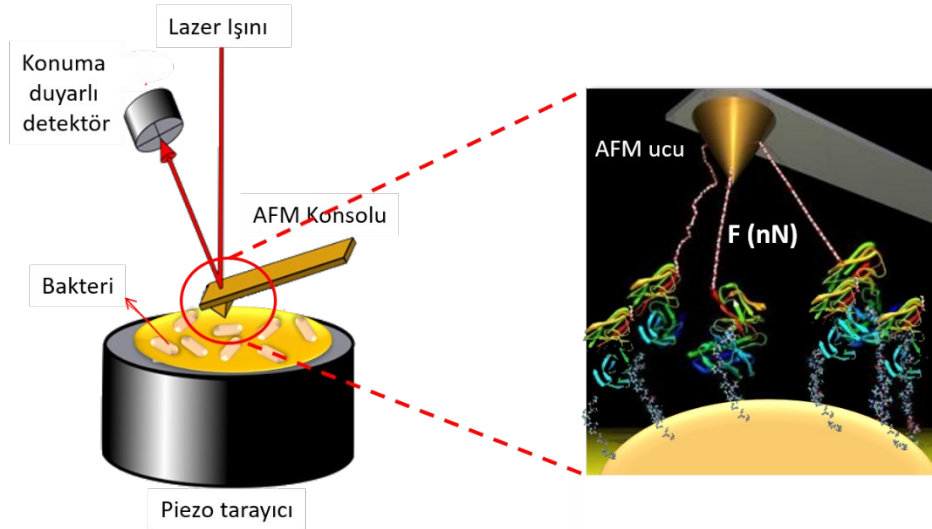
2.2 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile bakteriyel adhezyonun araştırılması

Taramalı uç teknolojilerinin, özellikle atomik kuvvet mikroskobunun (AFM) icadı ile nanoteknolojideki bilimsel araştırmalarda büyük ilerleme sağlanmıştır (Binnig vd., 1986; Gerber ve Lang, 2006). AFM'nin icadı fizik, kimya ve biyoloji gibi temel bilim alanlarındaki araştırmalarda da önemli gelişmelere katkı sağlamıştır (Gerber ve Lang, 2006). AFM'nin çalışma prensibi, numune yüzeyini keskin bir uçla tarama ve etkileşim kuvvetlerini nano Newton duyarlılıkla ölçmeye dayanmaktadır (Müller ve Dufrene, 2010). Hem hava ortamında hem de sıvı çözeltilerde yüksek çözünürlükte yüzeyleri inceleyebilen AFM cihazı, özellikle nano-biyoteknolojideki pek çok konuyu aydınlatan çok yönlü bir araştırma aracı haline gelmiştir (Dufrene, 2004; Müller ve Dufrene, 2010).

Atomik kuvvet mikroskobunun diğer geleneksel mikroskoplardan farkı sulu çözeltilerde doğrudan biyolojik yapıları incelemek için kullanılabilmesi ve nanometre veya alt-nanometre ölçeklerinde üç boyutlu morfolojik görüntü elde edebilmesidir (Dufrene, 2004; Gaboriaud ve Dufrene, 2007). Böylelikle canlı bakteri hücrelerinin morfolojisi doğal ortamında elde edilebilir. Görüntülemeye ek olarak, AFM ucu/iğnesi ile canlı hücrelerin yüzeyinde sıvı veya hava ortamında yaklaşma-dokunma-geri çekilme yöntemiyle hücre yüzeyinde bulunan moleküller ve AFM ucu arasındaki etkileşim ya da adhezyon ölçülebilmektedir. Böylelikle, canlı bakteri hücrelerinin yüzey biyopolimerlerinin fiziksel özellikleri ve etkileşim kuvvetleri hakkında detaylı bilgi AFM ile elde edilebilir. Ek olarak, bakteriyel yüzey biyopolimerlerinin yapısı, esnekliği ve heterojenliği gibi bilgiler de AFM kullanılarak elde edilebilmektedir. AFM'ye dayalı analiz örnekleri arasında; bakteri yüzeyi ilişkili eDNA (Das vd., 2011), flagella (Díaz vd. 2011) ve pili (Touhami vd., 2006) de dahil olmak üzere pek çok bakteri yüzey yapıları bulunmaktadır. Ayrıca, bakteri hücrelerinin yüzeyinde bulunan adhezinlerin ligand-reseptör bağlanması (Dupres vd., 2005), bakteri yüzey biyopolimerlerinin mekanik özellikleri (Gordesli ve Abu-Lail, 2012b, 2012c; Gordesli-Duatepe vd., 2020), hidrojen bağı kuvvetleri (Busscher vd., 2008; Gordesli ve Abu-Lail, 2012a; Park vd.,

2014) veya adhezyon kuvvetleri (Busscher vd., 2008; Das vd., 2011, Gordesli ve Abu-Lail, 2012a, 2012b, 2012c; Park vd., 2014; Gordesli-Duatepe vd., 2020) nicelleştirilebilir.

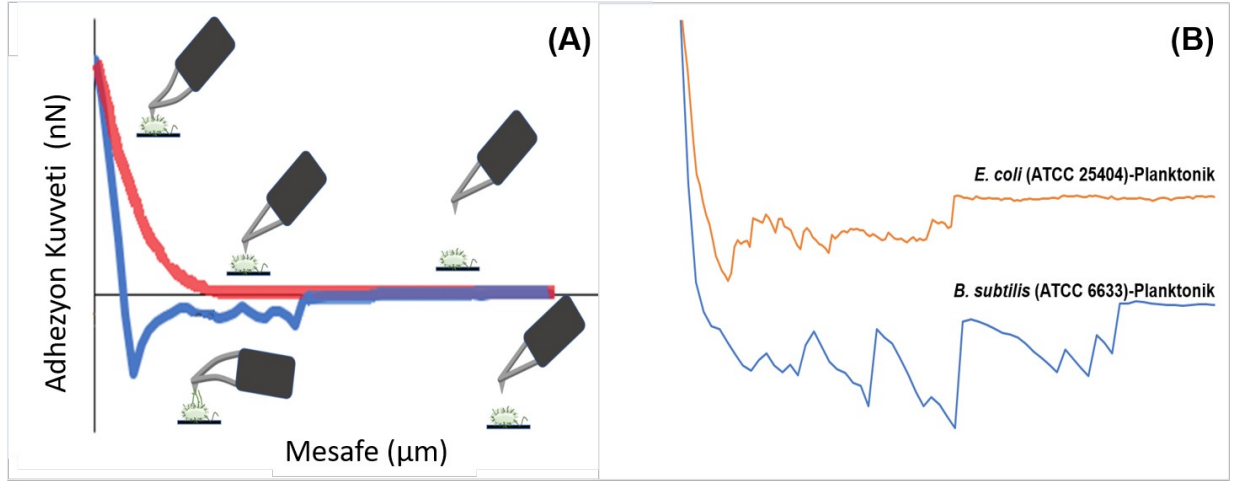
AFM, son derece küçük çaplı (yaklaşık 40 nm çapında) bir uç ile numune yüzeyi arasındaki etkileşim kuvvetlerini tespit edebilmektedir. Nano-ölçekte adhezyon kapasitesini anlamak için etkileşim kuvvetlerini doğrudan değerlendirebilmek oldukça önemlidir. AFM'nin temel bileşenlerinden biri konsoldur (cantilever) (Şekil 2) (Dufrêne, 2004; Gaboriaud ve Dufrêne, 2007; Müller ve Dufrene, 2010). Esnek konsolun sonunda, numune ile kendisi arasındaki çekici veya itici kuvvetleri algılayabilen, AFM ucu veya AFM probu olarak da adlandırılan keskin bir uç bulunmaktadır. Numune ve AFM ucu arasındaki etkileşim kuvvetleri, konsolun sapması ölçülerek izlenebilmektedir. AFM ucunun üstüne bir lazer ışını odaklayarak, konsol sapması yüksek çözünürlükte ölçülebilmekte ve yansıyan ışının konumu bir fotodiyot detektörü tarafından algılanmaktadır (Dufrêne, 2004). Konsolun sapması (nm) yay sabiti ile çarpıldığında (N/m) gözlenen kuvvetin değerini vermektedir. AFM cihazının temel bileşenleri olarak sivri uçlu konsolun yanında, konsolun hareketlerini kontrol eden piezo tarayıcı, konuma duyarlı detektör ve lazer diyot verilebilir (Şekil 2). Bunlar arasında, AFM'nin anahtar bileşeninin konsol, özellikle de konsolun ucuna yerleştirilen prob (keskin uç) olduğu söylenebilir.



Şekil 2. AFM cihazının temel komponentleri ve AFM ucu ile bakteriyel yüzey biyopolimerlerinin arasındaki etkileşimin şematik gösterimi

AFM, farklı uygulamalar için farklı modlar içermektedir. Bu modlar genellikle 2 kategoride sunulabilir: *contact* ve *tapping* modları. Contact modunda, konsol numune yüzeyi boyunca sürüklenir ve yüzey eğilimleri ve/veya kuvvetler direkt olarak konsolun sapması olarak kaydedilir. Başka bir deyişle, numune ve AFM ucu doğrudan temas halindedir. Vurma modu olarak da adlandırabileceğimiz tapping mod ya da dinamik akışkan modu (DFM), konsolun rezonans frekansının yakınında titreştiği veya salındığı durumdayken numune yüzeyini taramasıdır. Tapping mod biyolojik örneklerin kırılğan yapısı nedeniyle numuneye hasar vermeden ölçüm yapılmasına izin veren ve sıvı içinde numune yüzeylerinin yüksek çözünürlüklü topografik görüntülerini sağlayan bir AFM çalışma modudur (Dufrêne, 2004; Gaboriaud ve Dufrêne, 2007; Müller ve Dufrene, 2010).

Atomik kuvvet mikroskobu ile bakteri ve AFM ucu arasındaki adhezyon, AFM bakteri yüzeyinden geri çekilirken elde edilen kuvvet-mesafe eğrilerinden (Şekil 3 (A) ve (B)) belirlenebilir (Busscher vd., 2008; Das vd., 2011, Gordesli ve Abu-Lail, 2012a, 2012b, 2012c; Park vd., 2014; Gordesli-Duatepe vd., 2020). Aslında AFM ucu ve bakterilerin yüzey biyopolimerleri veya yüzeyinde bulunan moleküler grupların AFM ucuna yapıştığı ve AFM ucu geri çekilirken koptuğu noktada gözlenen adhezyon piklerinin kuvvet değerleri adhezyonu temsil etmektedir. Bir bakteri türünün adhezyonunun kuvvet değerinin belirlenebilmesi için, ölçümlerin bakteri hücrelerinin yüzeylerinde belirli bölgelerde yapılması ve pek çok bakteriyel hücre üzerinde tekrarlanması gerekmektedir. Çünkü bakteri yüzeyi heterojendir, kullandığımız AFM ucunun çapı (yaklaşık 40 nm) ve bir bakterinin ortalama çapı da (yaklaşık 1000 nm) hesaba katılırsa bakterinin ortalama adhezyon kuvvetinin elde edilebilmesi için AFM ölçümlerinin bakteri yüzeyinde mümkün olduğunca çok sayıda tekrarlanması gerekmektedir. Bu şekilde AFM ölçümleri sıvı ortamda ve canlı bakteri hücreleri üzerinde gerçekleştirilebilirse, bakterilerinin doğal ortamlarındaki biyofilm oluşum sürecinin ilk basamağını yani bir yüzeye ilk tutunmalarını kantitatif olarak temsil edebilmek mümkün olacaktır. Çalışmamızda AFM ile canlı bakterilerin su içinde ortalama ve medyan adhezyon kuvvetleri (adhezyon kapasiteleri) belirlenmiş ve ilerleyen bölümlerde karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.



Şekil 3. (A) AFM yaklaşma (kırmızı çizgi) ve geri-çekilme (mavi çizgi) eğrileri, (B) Bakteri hücreleri ve silikon nitrat AFM ucu arasında su içerisinde elde ettiğimiz etkileşimleri gösteren tipik AFM geri-çekilme eğrileri ve adhezyon pikleri

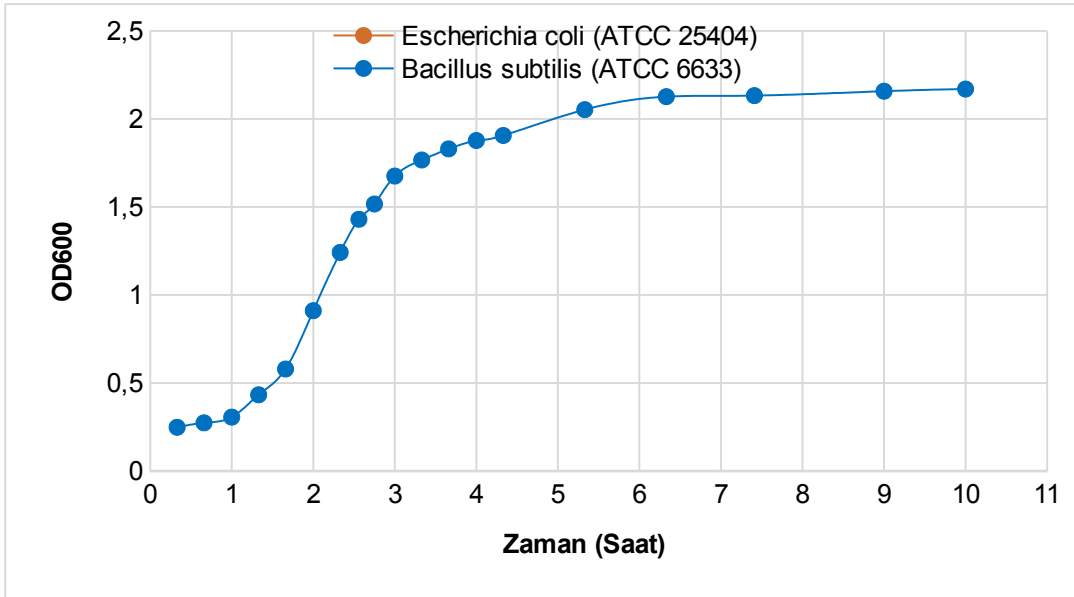
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Projede Kullanılan Model Planktonik Bakteriyel Hücreler

Projede üzerinde çalışılan ve biyofilm oluşturma özelliği olan Gram-negatif *Escherichia coli* K-12 (ATCC 25404), Penn State Üniversitesi Kimya Mühendisliği ve Biyoteknoloji Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Thomas K. Wood tarafından ve *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) Adnan Menderes Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Bülent Bozdoğan tarafından sağlanmıştır. Gram-negatif *E. coli* K-12 (ATCC 25404) ve Gram-pozitif *B. subtilis* (ATCC 6633), 1) biyofilm oluşturma özelliklerinin olması, 2) genom dizilimlerinin biliniyor olması, dolayısı ile projeden çıkan sonuçların daha kolay yorumlanabilmesi, 3) Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterileri temsilen kullanılmaları (Tong vd., 2010), 4) laboratuvar koşullarında güvenli bir şekilde çalışmaya elverişli olmaları (Biyogüvenlik Düzey 1) sebepleriyle model bakteriler olarak seçilmişlerdir. Ayrıca *E. coli* üzerindeki çalışmaların, genetik ve moleküler yaklaşımlara daha az yatkın olan bakterilerin incelenmesi için de bir model olabileceği düşünülmektedir (Wood, 2009).

Bakteri kültürlerinin canlılığının tespiti ve büyüme eğrilerinin eldesi için öncelikle *E. coli* ve *B. subtilis* aktifleştirilmek üzere 170 rpm'de çalışan sıcaklık kontrollü bir çalkalayıcıda LB (Luria broth) besiyeri içerisinde 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Aktifleşme sonunda *E. coli* kültürü LB (Luria broth) besiyeri içerisinde, *B. subtilis* kültürü ise TSB (Tryptic Soy Broth) besiyeri içerisinde 1/100 oranında seyreltildikten sonra tekrar 170 rpm ve 37°C'de büyümeye bırakılmıştır. Bakterilerin büyüme eğrileri UV/visible spektrofotometre ile optik yoğunluğun zamana karşı 600 nm dalga boyunda okunmasıyla Şekil 1'deki gibi gözlemlenmiştir.

Elde ettiğimiz tipik bakteri-büyüme eğrilerine göre *E. coli* ve *B. subtilis* 37 °C'de yaklaşık olarak 4 saat sonunda geç eksponansiyel artış evresine (late exponential phase), 6 saat sonunda da denge evresine (stationary phase) ulaşmaktadır. Planktonik bakteri hücreleri geç eksponansiyel artış evresine ulaşmış bakteri kültürlerinin 5525g'de 10 dakikalık santrifüjlenmesi sonrasında distile suyla tekrar karıştırılıp bir 10 dakikalık daha santrifüjlenmesi yoluyla elde edilmiş ve stok kültürleri hazırlanmıştır.

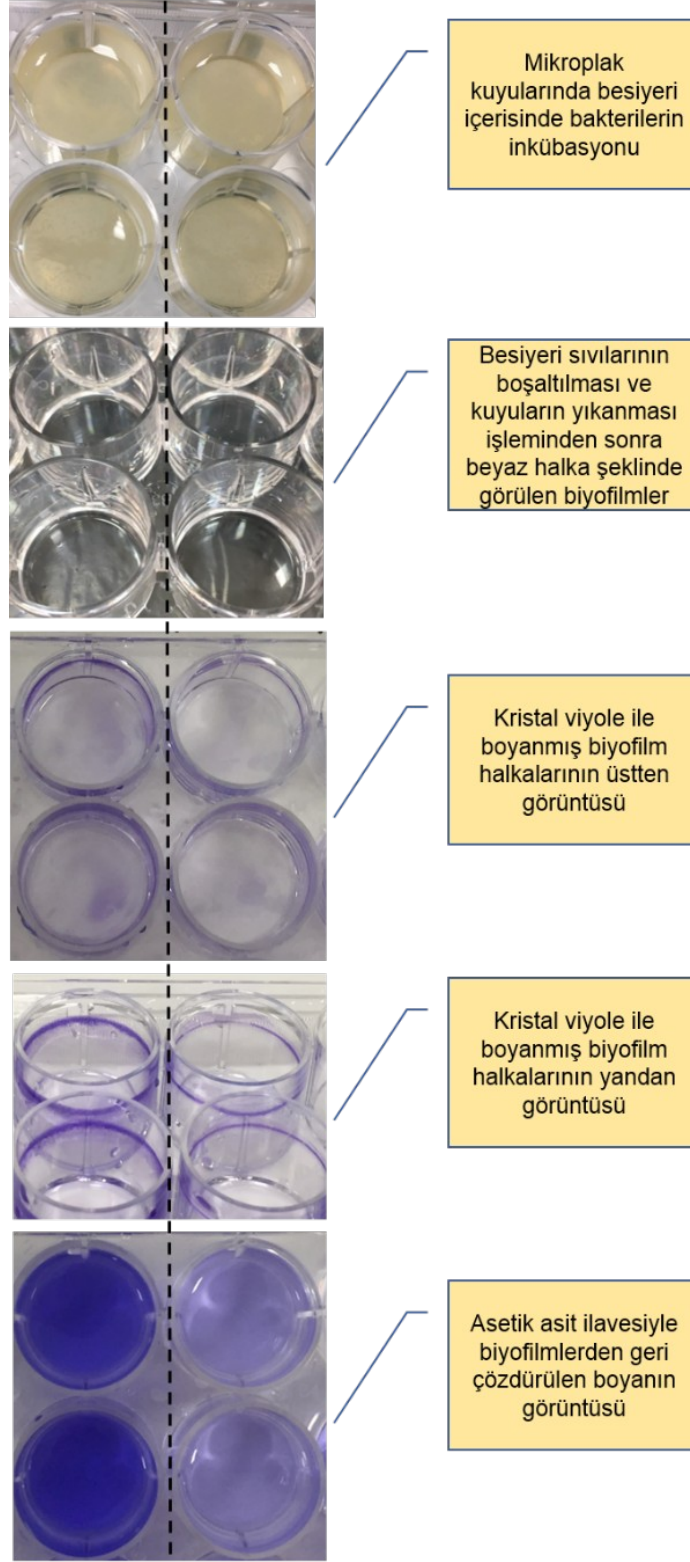


Şekil 4. *E. coli* (ATCC 25404) ve *B. subtilis* (ATCC 6633) büyüme eğrileri. *E. coli* 170 rpm ve 37 °C'de LB besiyeri içerisinde, *B. subtilis* ise 170 rpm ve 37 °C'de TSB besiyeri içerisinde büyütülmüştür. Deneyler her bakteri için 3 kere tekrarlanmıştır.

3.2 Statik Sistemde Biyofilmlerin Oluşturulması, Dağıtılması ve Dağılan Hücrelerin Eldesi

Aktifleştirme sonrasında *E. coli* kültürü LB besiyeri ile, *B. subtilis* kültürü ise TSB besiyeri ile ayrı ayrı 1/100 oranında seyreltilip steril düz tabanlı mikropklaların (96 well plate) her bir kuyusuna 200 µl konulmuştur. *E. coli* kültürü 37 °C'de yaklaşık 16-17 saat çalkalama olmadan inkübasyona bırakılmış, *B. subtilis* ise (oldukça uzun sürede biyofilm oluşumunu gözlemlediğimizden) yaklaşık 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deneylerimizde 96 kuyulu ya da 12 kuyulu mikropklak kullanılmıştır. 96 kuyulu mikropklak için çalışma hacmi 200 µl, 12 kuyulu mikropklak için çalışma hacmi ise yaklaşık 4 ml olarak belirlenmiştir. İnkübasyon sonrasında mikropklak kuyularındaki besiyeri sıvısı boşaltılmış ve kuyular distile suyla 3 kere nazikçe

yıkanarak planktonik hücrelerin ortamdan ayrışması sağlanmıştır. Daha sonra mikroplaklar ters çevrilerek oda sıcaklığında 10 dakikalık kurumaya bırakılmıştır. Bu işlemi takiben, mikroplaktaki her bir kuyuya % 0.1'lik kristal viyole çözeltisinden 200 μ l (ya da 4 ml) eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyular tekrar suyla yıkanmış ve oda sıcaklığında bir 10 dakika daha kurutulmuştur. Kuyuların yüzeyinde oluşan biyofilmler mor renkli halkalar şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 5). Biyofilmlere bağlanan boyanın geri çözdürülmesi için her bir kuyuya % 30 asetik asit eklenmiştir. Geri çözdürülen boyanın optik yoğunluğu oluşan biyofilm miktarıyla doğru orantılıdır.



Şekil 5. Statik koşulda mikroplak kuyularında biyofilm oluşumu, oluşan biyofilmlerin kristal viyole ile boyanması ve asetik asit ilavesiyle biyofilmlerden boyaların geri çözdürülmesi basamaklarını içeren şematik diyagram. Görüntüler *E. coli* biyofilmlerine aittir.

Biyofilmlerden çözdürülen boyaların optik yoğunluklarının (OD) ELISA okuyucu ile 595 nm'de okunmasıyla biyofilm oluşumları kantitatif olarak belirlenmiştir. Her deney en az 3 kere tekrarlanmış ve ölçülen OD595 değerlerinin standart sapmaları hesaplanmıştır.

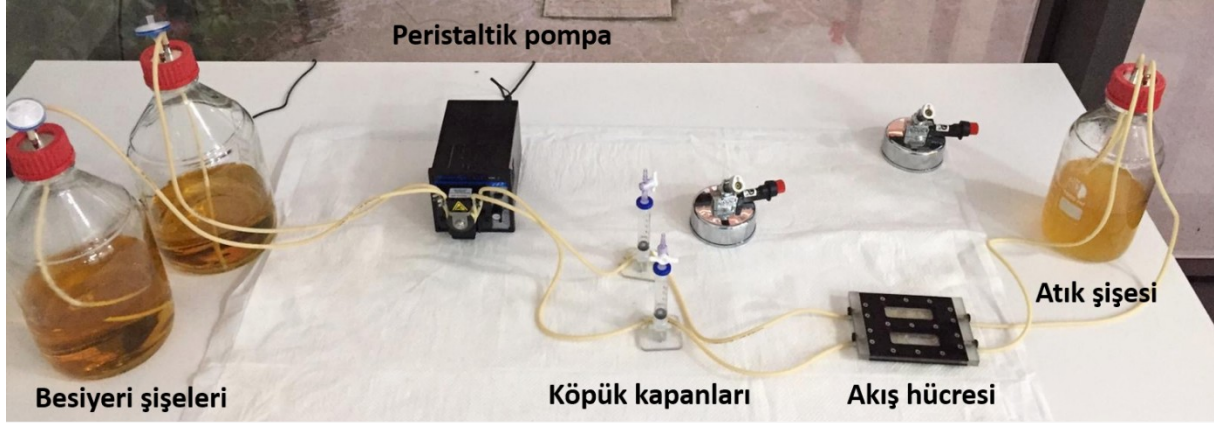
Statik koşulda biyofilmlerin dağılımları ise, Barraud vd. (2006)'nin çalışması takip edilerek biyofilmlerin 24 saat 37 °C'de farklı konsantrasyonlarda SNP içeren besiyerlerinde (125 nM-100 mM) inkübasyonu yoluyla gerçekleştirilmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra, besiyerlerinin bulanıklaştığı yani biyofilmlerin dağıldıkları ve dağılan hücrelerin besiyerlerinde oldukları gözlenmiştir. Kuyulardan besiyerleri nazıkçe mikropipetle çekilmiş ve santrifüjlenerek biyofilmlerden dağılan hücreler elde edilmiştir. Dağılan hücrelerin alındığı ve dağılma sonucunda kalan biyofilmlerin bulunduğu mikropipler ise yıkanmış ve kristal viyole ile boyanmıştır. Daha sonra ise, tekrar asetik asit ilavesiyle kalan biyofilmlerdeki boyalar çözdürülmüş ve optik yoğunlukları (OD) 595 nm'de ELISA okuyucu ile belirlenmiştir. Statik koşulda biyofilmlerin dağıtılması deneyleri, dağılma için gerekli optimum SNP konsantrasyonunun tayini için farklı SNP konsantrasyonlarında denenmiştir.

Statik sistemde oluşan Gram-negatif *E. coli* biyofilmlerinden 0.5, 5 ve 50 µM düşük dozda SNP ilavesiyle dağılmış hücreler ile 2.5 mM yüksek dozda (toksik) SNP ilavesiyle dağılmış *E. coli* hücreleri, AFM ile adhezyon kuvvetleri ölçümleri gibi daha detaylı araştırma için seçilmiştir. Statik sistemde oluşan Gram-pozitif *B. subtilis* biyofilmlerinden ise 5 µM düşük dozda SNP ilavesiyle dağılmış hücreler seçilmiştir.

3.3 Dinamik Sistemde Biyofilmlerin Oluşturulması, Dağıtılması ve Dağılan Hücrelerin Eldesi

Dinamik koşulda biyofilmlerin oluşturulabilmesi için, otoklavlanabilir çift kanallı düz plaka akış hücresi, otoklavlanabilir borular ve düşük hacimsel akış sağlayabilecek bir peristaltik pompa kullanılmıştır (Şekil 6). Sternberg ve Tolker-Nielsen (2006)'in protokolü takip edilerek, dinamik koşulda *E.coli* biyofilmi oda sıcaklığında 48 saat boyunca sistemden LB besiyeri geçirilerek, *B. subtilis* biyofilmi ise oda sıcaklığında 72 saat boyunca sistemden TSB besiyeri geçirilerek oluşturulmuştur. Biyofilmlerin akış hücresinde cam üzerinde oluşumunun sağlanabilmesi için, öncelikle steril besiyerleri hazırlanmış ve akış hücresinin kanalları peristaltik pompa yardımıyla steril besiyerleri ile doldurulmuştur. Daha sonra kanallara aktive edilmiş *E. coli* ya da *B. subtilis* kültürlerinden 1/1000 oranında seyreltilmiş 300 µL'lik bakteri kültürü şırınga yardımı ile enjekte edilmiştir. Kanallara verilen bakteri hücrelerinin cam yüzeyinde biyofilm oluşumunu gerçekleştirebilmesi için öncelikle cam yüzeyine tutunabilmeleri gerekmektedir. Bu sebeple

bakteri hücrelerinin cam üzerine ilk tutunmasının sağlanabilmesi için akış olmadan 1 saat beklenilmiş, daha sonra akış peristaltik pompa yardımı ile başlatılmıştır. Laminar akışın sağlanabilmesi için besiyeri yaklaşık olarak 0.4 ml/dak hızla devamlı olarak sisteme verilmiştir.



Şekil 6. Dinamik sistem ve komponentleri

E. coli biyofilminin dağılımı, dinamik sistemde oluşan biyofilm üzerinden 24 saat boyunca 0.5 veya 5 μM SNP içeren LB besiyeri geçirilerek sağlanmıştır. *B. subtilis* biyofilminin dağılımı ise, oluşan biyofilm üzerinden 24 saat boyunca 5 μM SNP içeren TSB besiyeri geçirilerek sağlanmıştır. Akış hücresinin kanallarındaki cam yüzeyler (akış hücresinin cam pencereleri-cam lameller) işlemler bittikten sonra çıkarılarak floresan mikroskopta görüntülenmek üzere ölü ve canlı hücreleri farklı boyayan 200 μL Baclight ile (3 μL SYTO9 ve 3 μL propidyum iyodür boyalarının 1 mL distile su içerisinde karıştırılması sonucunda oluşan iki komponentli floresan boya) 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır (Muñoz-Egea vd., 2013). Daha sonra *E. coli* ve *B. subtilis* biyofilm (kontrol) örnekleri ve dağılım gerçekleştikten sonra kalan biyofilm örnekleri floresan mikroskopta görüntülenmiştir.

Dinamik sistemde oluşturulan biyofilmlerin dağılımları floresan mikroskop görüntüleriyle gözlenmiştir. Biyofilmlerin dağılımları ayrıca atık şişesinde SNP ilavesinden sonra bulanıklaşmanın belirgin hale gelmesiyle de, yani dağılan hücrelerin atık şişesinde birikimiyle de, görülmüştür. *E. coli* ve *B. subtilis* biyofilmlerinden dinamik sistemde SNP ilavesiyle dağılan hücreler ayrı ayrı atık toplama şişesinden santrifüjleme ile elde edilmiştir.

3.4 Planktonik ve Biyofilmden-dağılmış Hücrelerin c-di-GMP Miktarlarının Belirlenmesi

Statik ya da dinamik sistemlerde oluşturulmuş *E. coli* ve *B. subtilis* biyofilmlerinden besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesiyle dağılan bakteri hücrelerinin, aslında hücre içi c-di-GMP seviyelerindeki değişiklik sebebiyle dağıldıklarının gösterilebilmesi için, dağılmış hücrelerin ve (SNP'ye maruz kalmamış) planktonik hücrelerin ihtiva ettikleri hücre içi c-di-GMP konsantrasyonları (pmol/μl) HPLC ile ölçülmüş, pmol cinsinden c-di-GMP miktarları hesaplanmış ve Modified Lowry protein assay kit'i kullanılarak tayin edilen toplam hücresel protein miktarları (mg) ile normalize edilip pmol c-di-GMP/mg protein cinsinden karşılaştırılmıştır (Tablo 1).

3.4.1 Planktonik ve biyofilmden-dağılmış hücrelerden c-di-GMP ekstraksiyonu ve kalan bakteriyel pelletlerin toplam protein miktarlarının belirlenmesi

Hücrelerden c-di-GMP ekstraksiyon işlemi Petrova ve Sauer (2017)'in protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu protokole göre, hücrelerden yeterli c-di-GMP ekstrakte edilebilmesi için hücrelerin optik yoğunlukları (OD 600 nm) yaklaşık 1.5-2.0 olana kadar çoğaltılmalıdır. Bu değerler *E. coli* ve *B. subtilis* için geç eksponansiyel artış evresi ile denge evresi arasında buldukları zamana tekabül etmektedir ve protokole göre HPLC-UV/Vis analizi için ölçülebilir düzeyde c-di-GMP'nin ekstrakte edilebileceği evre olarak yorumlanmıştır. Buna göre planktonik *E. coli* ve *B. subtilis* hücreleri LB ve TSB besiyerlerinde, biyofilmden-dağılmış hücreler ise SNP içeren LB veya TSB besiyerleri içinde 37 °C'de 170 rpm'de büyütülmüştür (çoğaltılmıştır). Daha sonra bakteri kültürlerinin her birinden 1 ml alınmış, PBS (phosphate-buffered saline) ile yıkanmış ve 16000×g'de, 4 °C'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen bakteriyel pellet'ler 100 °C'de PBS içinde 5 dakika inkübe edilmiş, hemen sonra da buz soğukluğunda etanol eklenerek vortekslenmiştir. Bu basamakta bakteriyel hücrelerin parçalandığı ve c-di-GMP'nin hücre dışına çıktığı düşünülmektedir. c-di-GMP'yi içeren süpernatantları elde etmek için, son kez 16000×g'de, 4 °C'de santrifüjleme yapılmıştır. Süpernatantlar donmalı kurutucu (freeze dryer) ile kurutulmuş, ekstrakte edilen c-di-GMP'nin de bulunduğu beyaz partiküller -80 °C'de HPLC ölçümlerine kadar stoklanmıştır.

Petrova ve Sauer (2017)'in protokolünde ve pek çok başka çalışmalarda (Barraud vd., 2009a; Spangler vd., 2010; Chua vd., 2014) belirtildiği üzere, c-di-GMP ekstraksiyonundan sonra geriye kalan parçalanmış bakteriyel pellet'lerin ihtiva ettikleri toplam protein miktarlarının belirlenip, HPLC ile tayin edilen c-di-GMP (pmol), toplam hücresel protein miktarına (mg) bölünerek normalize edilmelidir. Sonuçların pmol c-di-GMP/toplam hücresel protein (pmol/mg) olarak karşılaştırılmasının daha doğru bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir. Buna göre c-di-GMP

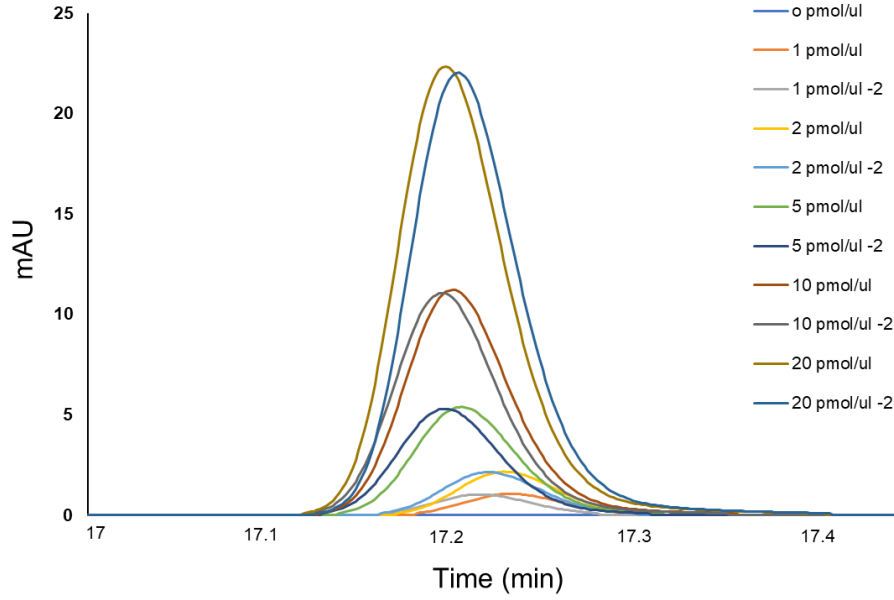
ekstraksiyonundan sonra geriye kalan parçalanmış bakteriyel pelletler (0.2 µm gözenek çaplı filtreler kullanarak) filtrelenmiş yaklaşık 500 µl distile suda tüpler içerisinde süspansiyon edilmiştir. Pelletlerin suda homojen dağılması için tüpler 1 dakika vortekslenmiştir. Süspansiyonlar, 10 saniye sonikasyon ve 15 saniye durma aralıkları şeklinde toplam 2 dakika buz üzerinde sonikasyona tabi tutulmuştur. 0.2 mL'lik örnekler test tüplerine aktarılarak 15 saniye aralıklarla 1.0 mL Modifiye Lowry reaktifi ile karıştırılıp 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüplere 100 µL daha önce hazırlanmış 1X Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her tüpte miktarı hücre süspansiyonunun protein miktarı ile orantılı olan suda çözünür bir ürün oluşmuştur. Örneklerin absorbans ölçümleri, 750 nm'ye ayarlanmış UV/visible spektrofotometre ile yapılmıştır. Standart olarak sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır.

3.4.2 Planktonik ve biyofilmden-dağılmış hücrelerin c-di-GMP konsantrasyonlarının belirlenmesi

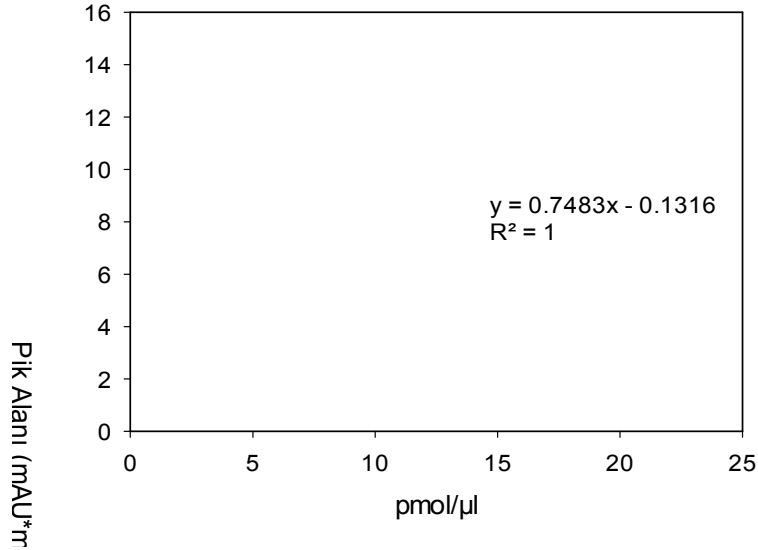
Planktonik ve biyofilmden-dağılmış hücrelerin içerdikleri c-di-GMP konsantrasyonları UV/Vis dedektör ve C18 kolonu kullanılarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ölçülmüştür. Algılama dalgaboyu ise 253 nm olarak ayarlanmıştır (Petrova ve Sauer, 2017). Mobil faz için iki adet çözücü kullanılmıştır. Bunlar, 0.385 gram amonyum asetatın 500 ml su içerisinde çözünmesiyle oluşturulan HPLC-A ve 0.385 gram amonyum asetatın 500 ml metanol içerisinde çözünmesiyle oluşturulan HPLC-B çözücüleridir. Protokoldeki metoda göre, 0-9 dakika %1 B (% 99 A), 9-14 dakika %15 B (% 85 A), 14-19 dakika %25 B (% 75 A), 19-26 dakika %90 B (%10 A) ve 26-40 dakika da %1 B (% 99 A) mobil fazı kolondan geçirileceği ve yaklaşık 14-15 dakika içinde c-di-GMP'nin elüsyonunun gözlenebileceği belirtilmiştir (Petrova ve Sauer, 2017). Ancak, protokolde kullanılan C18 kolonu (Reversed-phase C18 kolonu 2.1 x 40 mm, 5µm) ile projede kullanılan C18 kolonunun (Reversed-phase C18 kolonu 4.6 x 100 mm, 5 µm) farklı boyutlarda olmaları sebepleriyle kolonun son yıkama işlemi 5 dakika daha uzatılarak metod modifiye edilmiş ve yaklaşık 17.2 dakika sonra c-di-GMP elüsyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 7). c-di-GMP standart pikleri 200 pmol/µl c-di-GMP stok çözeltisinin seyreltilmesi ile elde edilmiş 1, 2, 5, 10 ve 20 pmol/µl'lik çözeltilerin HPLC analizi ile elde edilmiştir (Şekil 7). Farklı konsantrasyonlardaki c-di-GMP piklerinin altında kalan alan hesabıyla oluşturulan c-di-GMP kalibrasyon eğrisi de Şekil 8'te verilmiştir.

Ekstraksiyon işleminden sonra stoklanmış örnekler su içerisinde (nanopure water) çözüldükten sonra santrifüjlenmiş, çözünmeyen materyaller ise atılmıştır. Süpernatantlar filtrelenerek vialler

içerisine koyulmuş ve içerdikleri c-di-GMP konsantrasyonları (pmol/µl), yaklaşık 17.2. dakikada görülen pikler baz alınarak HPLC ölçümleri ile belirlenmiş, pmol cinsinden miktarları hesaplanmıştır. c-di-GMP miktarları (pmol) ekstraksiyondan sonra geriye kalan parçalanmış bakteriyel pellet'lerin ihtiva ettikleri toplam protein miktarlarına (mg) bölünerek normalize edilmiş ve Tablo 1'de sunulmuştur.



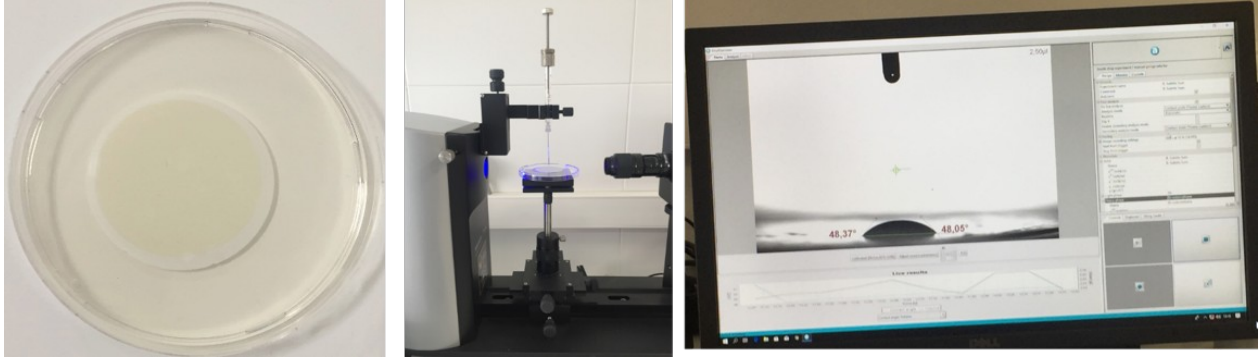
Şekil 7. c-di-GMP standart HPLC pikleri. 200 pmol/µl c-di-GMP stok çözeltisinin seyreltilmesi ile hazırlanan 1, 2, 5, 10 ve 20 pmol/µl'lik çözeltilerin HPLC analizi ile elde edilmiştir.



Şekil 8. c-di-GMP kalibrasyon doğrusu. 1, 2, 5, 10 ve 20 pmol/µl'lik c-di-GMP çözeltilerinin standart HPLC piklerinin altında kalan alanların hesabıyla elde edilmiştir.

3.5 Planktonik ve Biyofilmden-dağılmış Hücre Katmanları Üzerinde Su ve Diiyodometanın Temas Açılarının Ölçülmesi ve Hücrelerin Yüzey Gerilimlerinin Hesaplanması

Temas açısı ölçümlerinden önce, planktonik *E. coli* hücreleri 20 mL LB besiyeri içerisinde, planktonik *B. subtilis* hücreleri ise 20 mL TSB besiyeri içerisinde 37 °C'de 4 saat büyütülmüştür. Statik ve dinamik sistemlerde biyofilmlerden 5 µM SNP ile dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* hücreleri 37 °C'de 4 saat 5 µM SNP içeren 20 mL'lik besiyerlerinde ayrı ayrı büyütülmüştür (temas açısı ölçümleri için sadece 5 µM SNP ile biyofilmlerden dağılmış hücreler kullanılmıştır). Daha sonra hücreler santrifüjlenmiş ve 0.2 µm-filtreden geçirilmiş 20 mL distile suyla ayrı ayrı süspansiyon edilmiştir. Bakteri çözeltileri gözenek çapı 0.45 µm olan selüloz asetat filtre membranından bir vakum filtresi ile negative basınç uygulanarak süzdürülmüştür. Bu şekilde hazırlanan membran üzerindeki bakteri yoğunluğunun $1 \times 10^7 - 5 \times 10^7$ hücre/mm² olduğu (yaklaşık olarak 40 - 200 katman bakteri hücresi) daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Park ve Abu-Lail, 2011; Gordesli ve Abu-Lail, 2012c). Membranlar üzerinde bulunan bakteri katmanlarındaki fazla suyun buharlaşması için yaklaşık 30 dakika boyunca membranlar kurutulmuştur. Ardından bakteri katmanlarının nem oranını korumak için, membranlar %10 gliserin içeren agar üzerine yerleştirilip petri kaplarında muhafaza edilerek (Şekil 9) temas açısı ölçümlerinin gerçekleştirildiği İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarlarına götürülmüştür. Temas açısı ölçümlerinde kullanılan sıvılar, farklı polariteler ile karakterize edilen ultra saf su ve diiyodometandır. Su ve diiyodometanın membranlar üzerinde bulunan bakteri katmanları üzerindeki temas açıları, sıvılardan bakteri katmanı yüzeyine damlalar damlatılarak (Şekil 9) zamana karşı (yaklaşık 10 saniye) kaydedilmiş ve ortalamaları ile standart sapmaları hesaplanmıştır (Tablo 2).



Şekil 9. Gliserin içeren agar üzerine yerleştirilmiş selüloz asetat membran üzerinde filtrelenmiş olarak bulunan bakteri katmanları görüntüsü ve gerçekleştirilen temas açısı ölçümlerinden görüntüler

Wu (1971) tarafından önerilen termodinamik-tabanlı harmonik ortalama modeli (HM modeli) kullanılarak, bakterilerin apolar ve polar yüzey gerilimi bileşenleri hesaplanmıştır (Gordesli ve Abu-Lail, 2012b, 2012c). HM modeli, apolar ve polar yüzey gerilimi bileşenleri ile düşük enerjili fazların etkileşimlerinin tahmin edilmesinde kullanılmaktadır. Özellikle bakteri yüzeyinde bulunan biyopolimerlerin diğer fazlarla etkileşimlerinde HM modelinin kullanılması önerilmektedir (Srivastava ve Siddique, 1973; Serro vd., 1997; Dario vd., 2010; Park ve Abu-Lail, 2011). HM modeline göre temas açısı (θ); 1) moleküller arasındaki dispersiyon enerjisi nedeniyle oluşan

apolar (Lifshitz-van der Waals) yüzey gerilimi bileşenine (γ_L^d) ve 2) hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimleri ve dipol momentleri gibi polar etkileşimler nedeniyle oluşan polar yüzey gerilimi bileşenine (γ_L^p) bağlıdır:

$$(1 + \cos \theta) \gamma_L = 4 \left[\frac{\gamma_L^d \gamma_S^d}{\gamma_L^d + \gamma_S^d} + \frac{\gamma_L^p \gamma_S^p}{\gamma_L^p + \gamma_S^p} \right] \quad (1)$$

Eşitlik-1'de verilen L (liquid) ve S (solid) alt simgeleri sırası ile sıvı ve katı fazları ifade etmektedir. Sıvı fazı temsilen polariteleri farklı ve yüzey gerilimi bileşenleri bilinen saf su ve diiyodometan (Park ve Abu-Lail, 2011) kullanılmıştır. Sıvıların temas açıları bakteri katmanı (katı faz) üzerinde Tablo 2'de verildiği gibi ölçülmüştür. Sonuçta, Eşitlik-1'deki temas açısı (θ_{su} ve

$\theta_{diiyodometan}$), ölçüm sonuçlarından (Tablo 2), bu sıvıların yüzey gerilimi bileşenlerinin (γ_L^d , γ_L^p ve $\gamma_L = \gamma_L^d + \gamma_L^p$) değerleri ise literatürdeki çalışmalardan bilindiği için, Eşitlik-1'deki bilinmeyenler

bakterilerin apolar (γ_L^A) ve polar (γ_L^P) yüzey gerilimi bileşenleridir. Su ve diiyodometan temas açıları olmak üzere iki farklı temas açısı bilindiğinden, Eşitlik-1 kullanılarak iki bilinmeyenli (bakterilerin apolar ve polar yüzey gerilimi bileşenleri) iki denklem elde edilmiştir. İki bilinmeyenli iki denklem sisteminin katsayılarını kullanarak bilinmeyenler Matlab ortamında hesaplanmıştır. Ayrıca bakteriyel hücrelerin polarite değerleri de belirlenmiştir (Tablo 2). Polarite, bir yüzeyin ne kadar polar olduğunun bir ölçüsüdür ve bir bakteri yüzeyinde bulunan polar grupların miktarını belirlemek ve hidrofobisite hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır (Park ve Abu-Lail, 2011).

3.6 Planktonik ve Biyofilmden-dağılmış Hücrelerin Su İçerisinde Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile Görüntülerinin Elde Edilmesi ve Adhezyon Kuvvetlerinin Ölçümü

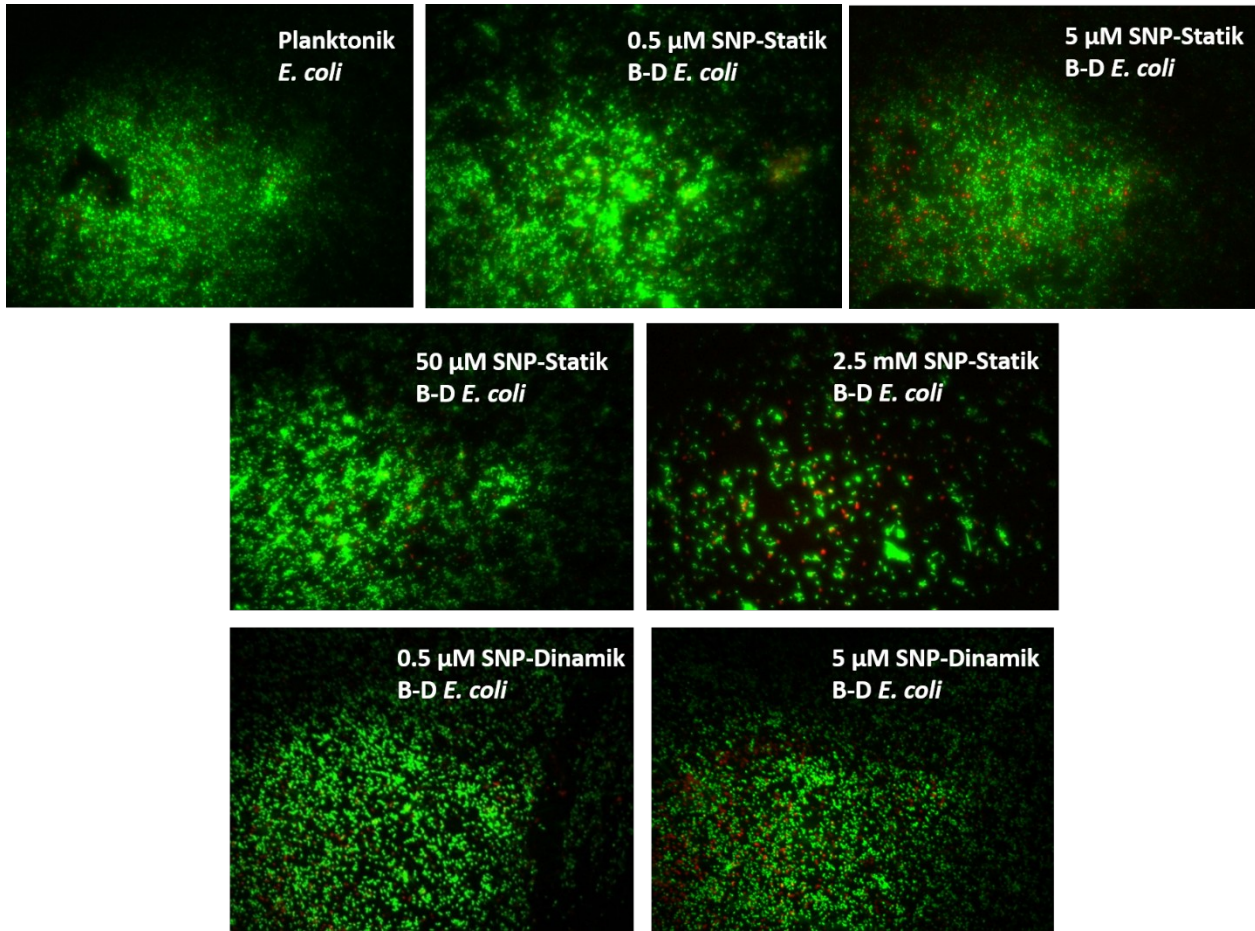
3.6.1 AFM ölçümleri için örneklerin hazırlanması

Bakteri hücresi ile silikon nitrat AFM ucu arasındaki adhezyon kuvvetinin ölçülebilmesi için öncelikle bakteri hücresinin AFM ile görüntülenebilmesi gerekmektedir. Bu amaçla bakteri hücrelerinin bir yüzeye immobilize edilmesi ve AFM görüntülemesi ile kuvvet ölçümleri yapılırken yüzeyde sabit durması gerekmektedir. Bu sebeple Poly-L-lysine (PLL) ile bakterilerin mika yüzeylerine immobilizasyonu yöntemi tercih edilmiştir. PLL polikatyonik bir moleküldür yani su içerisinde pozitif yüklüdür. Bakteri hücrelerinin ise su içerisinde negatif yüklü oldukları bilinmektedir (Gordesli ve Abu-Lail, 2012b). PLL kaplı mika diskin su içerisinde bakteri hücrelerini güçlü elektrostatik etkileşimlerle immobilize ettiği düşünülmektedir.

AFM ile bakterilerin adhezyon ölçümleri çalışmalarında elde edilen sonuçların kalitesini ve güvenilirliğini artıran önemli etkenlerden ilki ölçümlerin bakterilerin doğal yaşam alanını andıran ortamlarda yapılması (örneğin su içerisinde), diğeri ise bakterilerin immobilize edildikleri yüzey üzerinde ve buldukları ortamda canlılığının mümkün olduğunca korunması, bir başka ifadeyle canlı bakteriler üzerinde ve doğal ortamlarında ölçümlerin yapıldığının ve elde edilen adhezyon bulgularının doğal ortamdaki bulgular olarak kabul edilebileceğinin gösterilmesidir.

Poly-L-lysine (PLL) ile immobilizasyon yöntemini kullanarak planktonik bakteri hücrelerini AFM ile inceleyen pek çok çalışma literatürde bulunmaktadır (Schaer-Zammaretti ve Ubbink, 2003; Obst ve Dittrich, 2005; Stukalov vd., 2008; Chen vd., 2009; Vadillo-Rodriguez vd., 2009; Liu vd., 2009, 2010; Thompson vd., 2012; Potthoff vd., 2015; Mertens vd., 2019). Ancak PLL'in

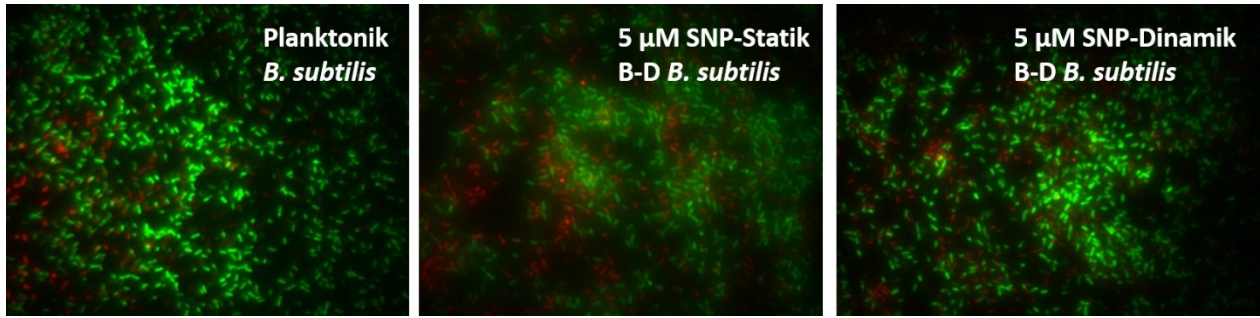
antibakteriyel özelliğini, özellikle bakterilerin membranı üzerindeki tahribatını rapor etmiş çalışmalara da rastlanmıştır (Katsu vd., 1984; Colville vd., 2010). Bu sebeple PLL ile bakterilerin immobilizasyonu yönteminde kullanılacak PLL konsantrasyonuna dikkat edilmesi gerekmektedir. Çalışmamızda Wang vd. (2019)'nin önerdiği protokol uyarlanarak planktonik ve biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerinin PLL kaplı mika diskler üzerine immobilizasyonu yöntemi kullanılmıştır. Buna göre, %0.01 (w/v) konsantrasyonundaki PLL solüsyonundan mika disk üzerine yaklaşık 100 µl koyulup 2-3 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra disk tamamen yıkanarak yaklaşık 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra bakteri kültüründen 20 µl alınıp PLL kaplı mika diskin tüm yüzeyine yayılmıştır. 10-15 dakikalık bekleme süresinden sonra ise PLL kaplı mika disk distile suyla tekrar yıkanmıştır (immobilize olmayan bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması). Bu şekilde hazırlanmış PLL kaplı mika diskler üzerinde *E. coli* hücrelerinin çoğunlukla canlı olduğu ve çok sayıda bakterinin immobilize olduğu görülmüştür (Şekil 10).



Şekil 10. PLL kaplı mika disk üzerine immobilize olmuş planktonik ve biyofilmden-dağılmış (B-D) *E. coli* hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. Yeşil ile (SYTO 9) boyanmış hücreler canlı, kırmızı ile (propidyum iyodür) boyanmış hücreler ölü hücrelerdir.

B. subtilis hücrelerinin mika disk üzerine immobilizasyonu, PLL inkübasyonundan sonra yıkama olmadan kurumaya bırakılan diskler üzerine yapılmıştır. Canlılık testlerine göre *B. subtilis* hücrelerinin de PLL kaplı mika üzerinde çoğunlukla canlı olduğu ve çok sayıda bakterinin immobilize olduğu görülmüştür (Şekil 11).

Yukarıda verildiği gibi PLL kaplı mika diskler üzerine immobilize olmuş çoğunlukla canlı *E. coli* ve *B. subtilis* hücreleri üzerinde, immobilizasyondan hemen sonra AFM ile görüntüleme ve adhezyon kuvveti ölçümleri yapılmıştır.

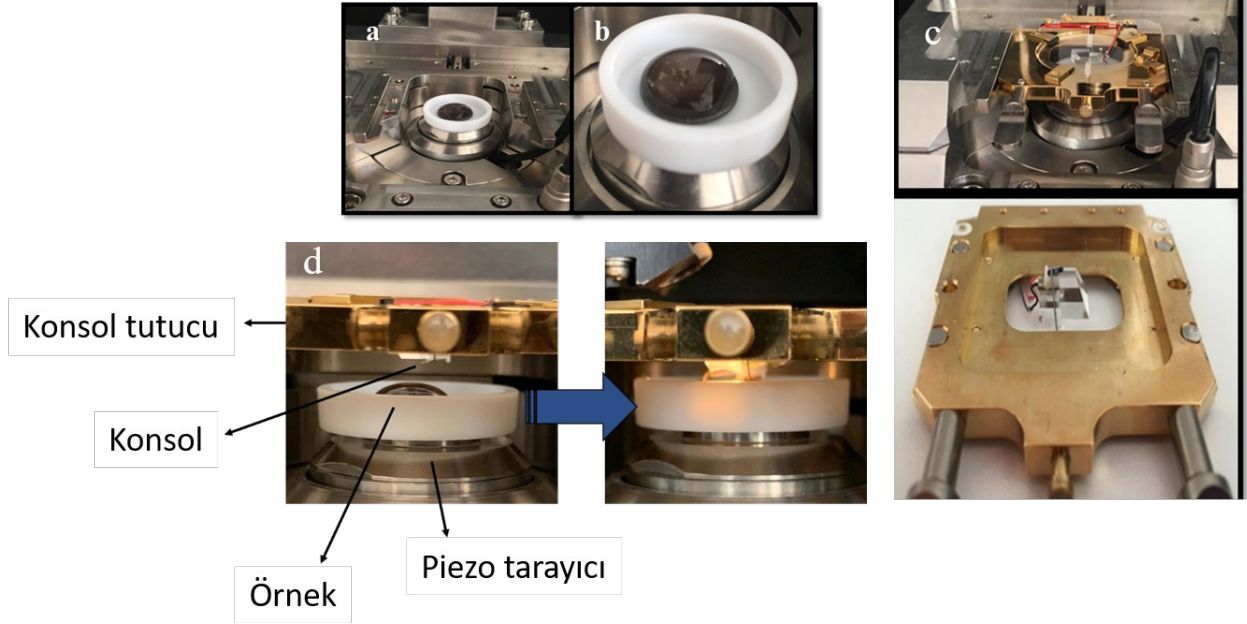


Şekil 11. PLL kaplı mika disk üzerine immobilize olmuş planktonik ve biyofilmden-dağılmış (B-D) *B. subtilis* hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. Yeşil ile (SYTO 9) boyanmış hücreler canlı, kırmızı ile (propidyum iyodür) boyanmış hücreler ölü hücrelerdir.

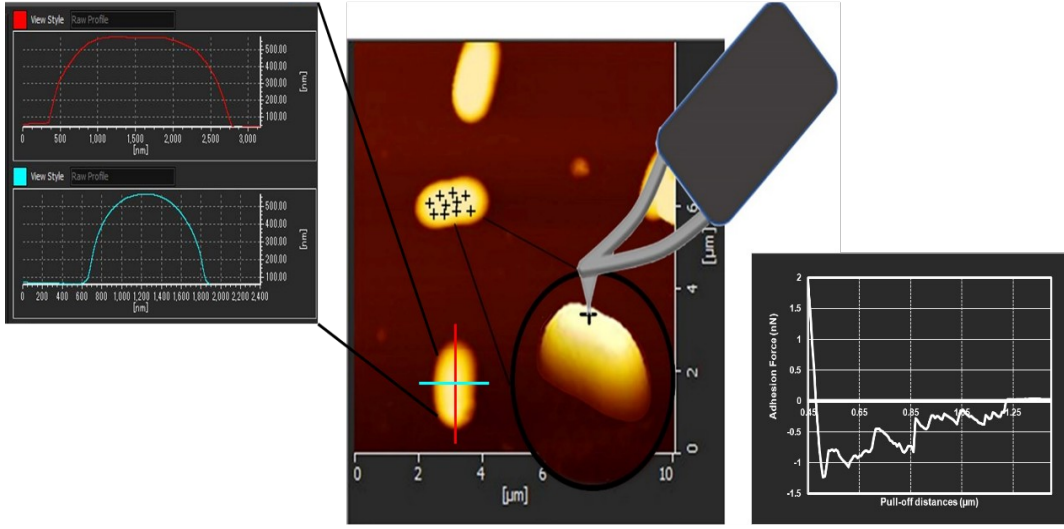
3.6.2 AFM ile bakteriyel adhezyon kuvveti ölçümleri

AFM ile bakteriyel adhezyon kuvveti ölçümlerinden önce bakteri görüntülerinin elde edilmesi gerekmektedir. Bakteriyel hücrelerin görüntüleri elde edildikten sonra üzerlerinde belirli bölgelerde kuvvet ölçümleri yapılabilir. Bu amaçla, ilk önce bakteriyel hücrelerin immobilize olduğu PLL kaplı mika diskler AFM piezo tarayıcısı üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 12). Tüm görünleme ve ölçümler HITACHI 5100N atomik kuvvet mikroskobu ile su içerisinde silikon nitrat AFM uçları kullanılarak yapılmıştır (kullanılan AFM uçlarının yay sabiti 0.24 N/m, Bruker AFM Probes-DNP-S10). Silikon nitrat, bakterinin sıklıkla bağlandığı ve üzerinde kolaylıkla koloniler oluşturabildiği substratlar olan toprak ve camın yüzey potansiyeliyle benzer bir yüzey potansiyeline sahiptir (Allan vd., 2004; Gordesli ve Abu-Lail, 2012a, 2012b, 2012c), bu sebeple bakteri adhezyonu çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Silikon nitrat uçlara sahip AFM konsolları (cantilever), konsol tutucuya yerleştirilip AFM cihazına entegre edilmiştir (Şekil 12). Konsol ve numune birbirine su içinde yaklaştırılmış, konsolun sudaki titreşim spektrumu elde edilmiş ve sudaki rezonans frekansı belirlenmiştir (HITACHI 5100N'de Q eğrisi ölçümü). Daha sonra tarama Tapping mod'ta düşük hızda (0.50 Hz) başlatılıp bakteri hücrelerinin üç boyutlu

görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 13). Düzgün morfolojideki bakteri görüntüleri alındıktan sonra hücreler üzerindeki belirli bölgelerde Şekil 13'te görüldüğü gibi AFM adhezyon kuvveti ölçümleri gerçekleştirilmiştir (siyah + ile gösterilen bölgeler). *E. coli* grubunda incelenen bir koşul için en az 20 bakteri hücresi üzerinde, *B. subtilis* grubunda incelenen her koşul için 10 bakteri hücresi üzerinde AFM ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 12. AFM ölçümleri için ön hazırlıklar. a) Bakteriyel hücrelerin immobilize olduğu PLL kaplı mika disklerin AFM piezo tarayıcısı üzerine yerleştirilmesi ve b) diskler üzerine su koyulması, c) konsolun tutucaya yerleştirilip AFM cihazına entegrasyonu ve d) örneğin konsol ve dolayısı ile AFM ucuna yaklaştırılması



Şekil 13. AFM adhezyon kuvveti ölçümü şematik gösterimi (Kaynak: Ördek, 2021). + ile verilen yerler kuvvet ölçümlerinin yapıldığı bölgeleri temsil etmektedir. Bir bölgeden bir adet geri-çekilme eğrisi alınıp adhezyon piklerinin kuvvet değerleri belirlenmektedir.

3.7 Planktonik ve Biyofilmden-dağılmış Hücrelerin Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Ölçülen Adhezyon Kuvvetlerinin Analizi

3.7.1 AFM geri-çekilme eğrilerinin analizi

Adhezyon kuvveti ölçümlerinin yapıldığı her bölgeden 1 adet geri-çekilme eğrisi elde edilmektedir. AFM ile elde edilen adhezyon kuvvetleri, bakterilerin yüzeyinde bulunan biyopolimerler aracılığıyla bir yüzeye ilk tutunmalarındaki kuvvetleri temsil etmektedir. Bakterilerin yüzey biyopolimerlerinin silikon nitrat AFM ucu yüzeyine su ortamında tutunduğu (yapıştığı) ve AFM ucu bakteri yüzeyinden geri çekilirken yapışan biyopolimerlerin belirli mesafelerde AFM ucundan koptuğu (pull-off), bu esnada da adhezyon pikleri olarak tasvir edilen (AFM ucuna yapışmış biyopolimerin AFM ucundan kopmasını sağlayacak kuvvet değeri-pull-off force) adhezyon kuvvetlerinin belirdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda *E. coli* grubu için en az 200 geri-çekilme eğrisi, *B. subtilis* grubunda incelenen her koşul için 100 geri-çekilme eğrisi analiz edilmiştir. Geri-çekilme eğrilerinin gösterdiği adhezyon piklerinin kuvvet değerleri (nN) belirlenmiş, ortalama, ortalamanın sapması, medyan ve mod değerleri hesaplanmıştır (Tablo 1). Her koşul için incelenen bakteri hücre sayısı, analiz edilen geri-çekilme eğrisi sayısı ve sonucunda elde edilen toplam adhezyon piki sayısı da Tablo 1’de verilmiştir.

3.7.2 Ortalaması hesaplanan adhezyon kuvvetlerinin istatistiksel Poisson analizi

AFM ucu ve bakteri yüzeyi arasında ölçülen tüm etkileşim kuvvetlerinin toplamı, belirtilen geriçekilme eğrilerinin analizi sonucunda bulunan ortalama adhezyon kuvvetidir. Bu toplam ortalama kuvvetin spesifik ve spesifik-olmayan kuvvet bileşenlerine ayrıştırılması AFM verilerinin istatistiksel analizini gerektirmektedir. Örneğin, Poisson istatistiksel metodu ile çok sayıda kuvvet ölçümü yapmadan, böylelikle numuneye hasar vermeden toplam kuvvet bileşenlerine ayrıştırılabilir (Gordesli ve Abu-Lail, 2012a; Park vd., 2014). Spesifik ve spesifik-olmayan kuvvetlerin nicelleştirilmesi ile bakteri hücrelerinin bir yüzeye adhezyonunda etki eden Lifshitz-van der Waals ve elektrostatik kuvvetler gibi numuneye spesifik-olmayan kuvvetler ya da ligand-reseptör ve hidrojen bağları kuvvetleri gibi numuneye spesifik olan kuvvetler hakkında bilgi sahibi olunabilir (Gordesli ve Abu-Lail, 2012a).

Poisson analizini gerçekleştirebilmek için iki temel varsayımda bulunulması gerekmektedir. Bunlardan ilki ölçülen adhezyon kuvvetinin silikon nitrat AFM ucu ve bakteri yüzey biyopolimerleri arasındaki ayırık bağ etkileşimlerinden kaynaklanıyor olmasıdır. İkincisi ise; bu bağların rastgele oluştuğu ve bağ kuvvetlerinin benzer değerlerde olduğudur. Dolayısı ile bir

bağın oluşturduğu kuvvete F_i denilirse, ölçülen adhezyon kuvveti (F) , n adet bağ F_i kuvvetlerinin toplamı olacaktır (Eşitlik-2).

$$F = nF_i \quad (2)$$

E. coli-silikon nitrat ya da *B. subtilis*-silikon nitrat etkileşiminde ligand-reseptör ilişkisi olmadığı için buradaki F_i spesifik hidrojen bağı kuvvetini temsil etmektedir. Poisson olasılık fonksiyonunu, bakteri-silikon nitrat sistemine uygularsak, fonksiyon Eşitlik-3'te verildiği gibi gösterilecektir:

$$P(n; \mu_F) = (\mu_F)^n \frac{\exp(-\mu_F)}{n!} \quad (3)$$

$P(n; \mu_F)$ belirli bir değerde gözlenen adhezyon kuvvetinin olasılığını, n bakteri-silikon nitrat arasında oluşan bağ sayısını, μ_F ise bakteri yüzeyindeki bölgelerde ölçülen tüm adhezyon kuvvetlerinin ortalamasını (mean force) temsil etmektedir. Eğer Poisson olasılık fonksiyonu ölçülen adhezyon kuvvetlerinin olasılık histogramlarını ifade edebilirse (fitting), yani oluşturulan

histogramlar Poisson dağılımları ise, Poisson dağılımının “ortalama = varyans” özelliği kullanılabilir. Bu durumda, ortalama adhezyon kuvveti değeri, kuvvet değerlerinin varyansına eşit olacaktır ($\mu_F = \sigma_F^2$). Spesifik-olmayan kuvvetler (F_o) de hesaba katıldığında, aşağıdaki eşitlikler elde edilecektir.

$$\mu_F = \mu_n F_i + F_o \quad (4)$$

$$\sigma_F^2 = \sigma_n^2 F_i^2 = \mu_F F_i - F_i F_o \quad (5)$$

Eşitlik-5 kullanılarak, varyansa (σ_F^2) karşı ortalama kuvvet (μ_F) doğrusu çizildiğinde; eğim spesifik kuvveti (F_i), kesim noktası ise spesifik ve spesifik-olmayan kuvvetlerin negatif çarpımını ($-F_i F_o$) verecektir. Poisson dağılımının “ortalama = varyans” özelliğinden yararlanarak elde edilen eşitlikler ile spesifik ve spesifik-olmayan kuvvetleri nicelleştirebilmek amacıyla ortalama adhezyon kuvveti değerleri ve bu kuvvet değerlerinin varyansları planktonik ve 5 μ M SNP ile statik ve dinamik sistemlerde oluşturulan biyofilmlerden dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* hücreleri için ayrı ayrı hesaplanmıştır (Tablo 3). Daha sonra varyansa karşı ortalama kuvvet doğruları çizilerek spesifik ve spesifik-olmayan kuvvetler nicelleştirilmiştir (Tablo 4).

4. BULGULAR

4.1 Eklenen SNP Konsantrasyonunun Statik Sistemde Büyütülen *E. coli* ve *B. subtilis* Biyofilmlerinin Dağılım Miktarları Üzerindeki Etkisi

E. coli ve *B. subtilis* biyofilmleri oluştuktan sonra NO donörü SNP'nin farklı konsantrasyonlarda besiyerlerine eklenip 24 saat boyunca 37 °C'de inkübasyonu ile biyofilmlerin dağılım miktarları üzerindeki etkisi statik sistemde test edilmiştir. Sonuçlarımız, düşük dozlarda (nanomolar ve mikromolar seviyesinde) SNP'ye maruz kalan biyofilmlerin miktarlarının önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (. Nanomolar-mikromolar seviyesinde SNP konsantrasyonu ilavesiyle biyofilmlerin dağıldıkları, besiyerlerinin bulanıklaştığı yani biyofilmden dağılan hücrelerin besiyerlerinde oldukları gözlenmiştir.

Şekil 14. *E. coli* ve *B. subtilis* biyofilmlerinin farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesiyle dağıtılması sonucunda kalan biyofilmlerin optik yoğunluklarının karşılaştırılması

'te görüldüğü gibi *E. coli* biyofilmlerinin maksimum dağılması için gerekli SNP konsantrasyonu 5 μM olarak belirlenmiştir. Kontrol biyofilminin optik yoğunluğu ile karşılaştırılınca 5 μM SNP ilavesinin biyofilmi % 56 oranında dağıttığı hesaplanmıştır. 0.5 μM (500 nM), 2.5 μM , 50 μM ve 250 μM SNP ilavelerinin ise sırasıyla % 48.5, % 54.5, % 50.5 ve % 51 oranlarında biyofilmleri dağıttığı hesaplanmıştır. *B. subtilis* biyofilmlerinin maksimum dağılması için gerekli SNP konsantrasyonu 0.5 μM (500 nM) ya da 0.125 μM (125 nM) olduğu görülmektedir (). Kontrol biyofilminin optik yoğunluğu ile karşılaştırılınca 0.5 μM (500 nM) ya da 0.125 μM (125 nM) SNP ilavesinin *B. subtilis* biyofilmini % 45 oranında dağıttığı, 5 μM SNP ilavesinin ise % 37 oranında dağıttığı hesaplanmıştır. Ancak projede önerildiği üzere, Gram-pozitif ve Gram-negatif biyofilmden-dağılmış bakteri hücreleri arasındaki karşılaştırmalar her iki grup için 5 μM SNP ilavesiyle dağılmış *B. subtilis* ve *E. coli* hücreleri üzerinde yapılmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesinin biyofilmden-dağılmış hücrelerin adhezyon kuvvetlerine ve c-di-GMP miktarlarına etkisini araştırmak için biyofilmlerden 0.5 μM (500 nM), 5 μM ve 50 μM düşük dozlarda SNP ilavesiyle dağılmış *E. coli* hücreleri seçilmiştir. Özellikle *E. coli* hücreleri

üzerinde yapılan çalışmalar önemlidir. Bunun nedeni *E. coli* üzerindeki çalışmaların genetik ve moleküler yaklaşımlara daha az yatkın olan bakteriler için de bir model olabileceği düşüncesidir (Wood vd., 2009). 0.5 μM (500 nM), 5 μM ve 50 μM SNP konsantrasyonlarını seçmemizin nedeni ise, kademeli olarak SNP konsantrasyonundaki artışın biyofilmden-dağılmış hücreler üzerindeki etkisini görebilmek içindir. Ayrıca, 0.5 μM SNP konsantrasyonu daha önce *E. coli* biyofilmlerinin (Barraud vd., 2009b) ve *P. aeruginosa* biyofilmlerinin (Barraud vd., 2006) maksimum dağılması için önerilen en uygun düşük doz SNP konsantrasyonu olarak literatürde verilmektedir. Ancak çalışmamızda, maksimum miktarda *E. coli* biyofilmi dağılımı (% 56) için belirlenen optimum SNP konsantrasyonu statik sistemde 5 μM SNP olarak belirlenmiştir. Bu sebeple, özellikle 0.5 μM ve 5 μM SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerinin adhezyon kuvvetlerinin karşılaştırılması gerektiği düşünülmüştür.

Biyofilmlerin dağılması için kullanılacak optimum SNP konsantrasyonu, düşük doz (toksik olmayan) SNP konsantrasyonları arasında maksimum biyofilm dağılımını sağlayan SNP konsantrasyonu olarak düşünülmektedir. Ancak, dağılan hücrelerin tekrar biyofilm oluşturabileceği düşünülürse, özellikle optimum SNP konsantrasyonları olarak düşünülen konsantrasyonlarda biyofilmden-dağılmış hücrelerin adhezyon kapasitelerinin araştırılması ve biyofilm oluşumunun ilk basamağında etki eden (nano-ölçekte) adhezyon kuvveti değerlerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

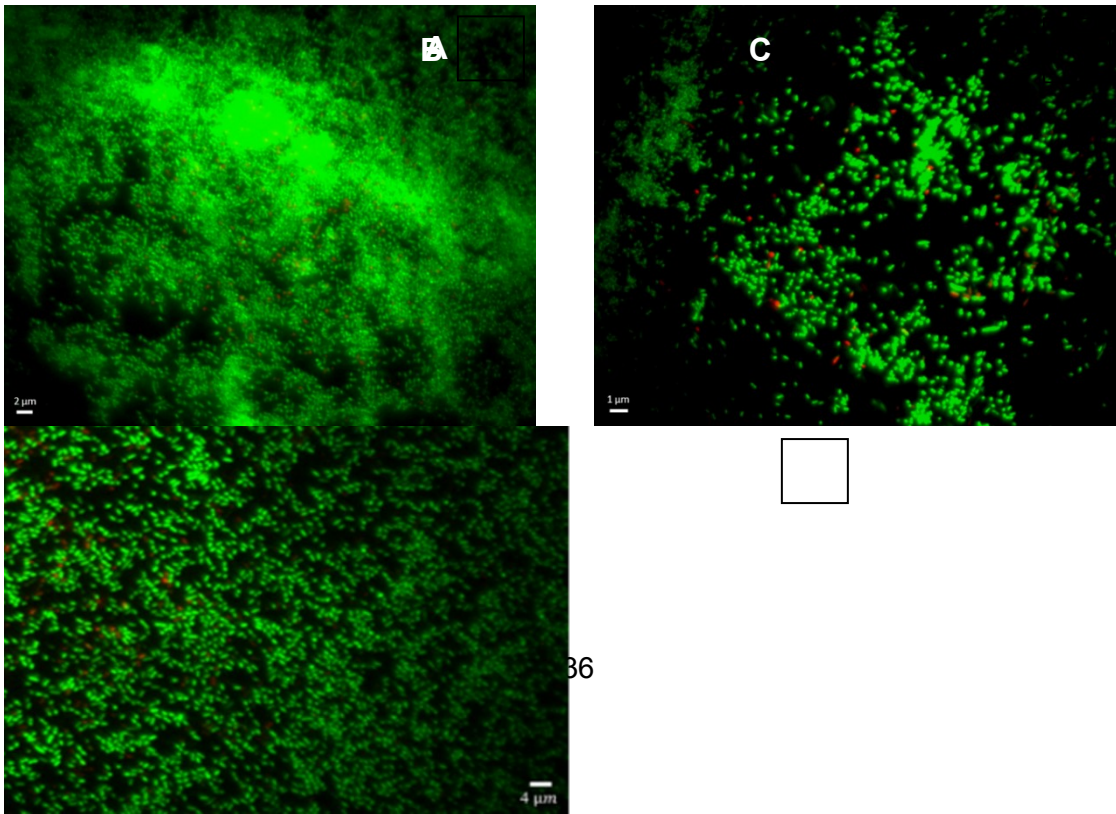
Milimolar mertebesindeki yüksek SNP konsantrasyonlarında ise hem *E. coli* hem de *B. subtilis* biyofilmlerinde dağılmanın aksine artış gözlenmiştir. Bu durum daha önce Barraud vd. (2006)'nin çalışmasında da gözlenmiştir. Yüksek SNP konsantrasyonlarının biyofilm için toksik etki yaptığı ve bu etkiden korunmak için biyofilmin aşırı EPS tabakası üreterek miktarını artırdığı düşünülmektedir. Yüksek dozlarda SNP ilavesinin biyofilm biyokütlesindeki artışa sebep olmasına rağmen, bu grupların bulunduğu kuyularda çok az da olsa dağılmış hücrelere de rastlanmıştır. Biyofilmlerin yüksek SNP konsantrasyonlarında aşırı EPS tabakası üreterek büyümeye devam ettiği, aynı zamanda bazı bakteri hücrelerinin de biyofilm topluluğundan ayrıldığı/dağıldığı söylenebilir. Bu hücreler özellikle *E. coli* grubu için 2.5 mM SNP'nin eklendiği kuyularda, *B. subtilis* için ise 25 mM SNP'nin eklendiği kuyularda gözlenmiştir. Bunun sebebi, 2.5 mM veya 25 mM SNP konsantrasyonlarında diğer milimolar mertebesindeki yüksek SNP konsantrasyonlarında gözlenenlerden daha az biyofilmin oluşması olabilir (Şekil 14). Yüksek dozlarda SNP ilavesinden sonra elde edilen bu tür biyofilmden-dağılmış hücrelerin, düşük dozlarda SNP ilavesinden sonra elde edilen biyofilmden-dağılmış hücrelere kıyasla farklı

adhezyon özelliklerinin olup olmadığını araştırmak için, 2.5 mM SNP konsantrasyonu ile biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücreleri seçilmiştir.

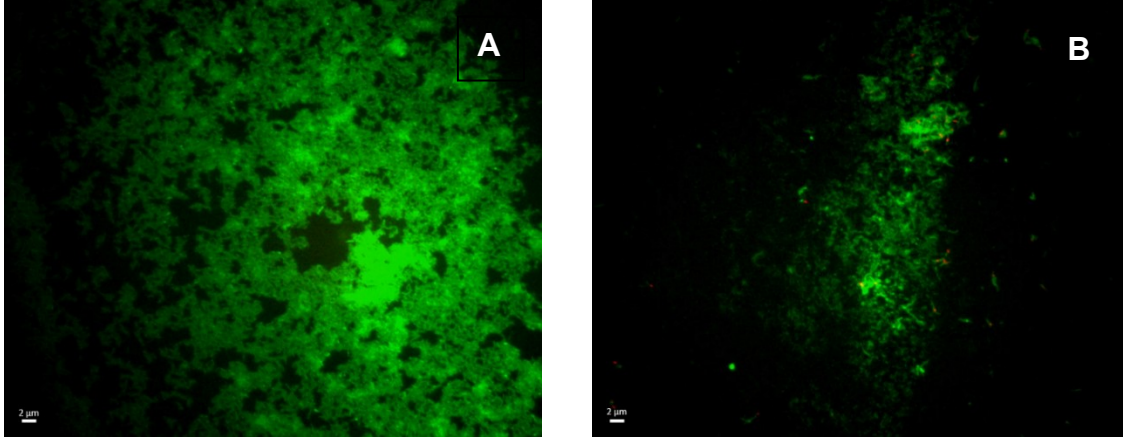
Sonuç olarak, statik sistemde üretilen Gram-negatif *E. coli* biyofilmlerinden 0.5, 5 ve 50 μM düşük dozda SNP ilavesiyle dağılmış hücreler ile 2.5 mM yüksek dozda (toksik) SNP ilavesiyle dağılmış *E. coli* hücreleri, AFM ile adhezyon kuvvetleri ölçümleri gibi daha detaylı araştırma için seçilmiştir. Statik sistemde üretilen Gram-pozitif *B. subtilis* biyofilmlerinden 5 μM düşük dozda SNP ilavesiyle dağılmış hücreler, aynı konsantrasyonda biyofilmden-dağılmış Gram-negatif *E. coli* hücreleri ile karşılaştırma için seçilmiştir. Biyofilmden-dağılmış hücreler üzerindeki tüm bulgular planktonik muadilleri üzerindeki bulgularla da karşılaştırılmış, ilerleyen bölümlerde sunulmuştur.

4.2 Eklenen SNP Konsantrasyonunun Dinamik Sistemde Büyütülen *E. coli* ve *B. subtilis* Biyofilmlerinin Dağılımları Üzerindeki Etkisi

Dinamik sistemde oluşturulan *E. coli* biyofilminin dağılması sistemden 24 saat boyunca ayrı ayrı 0.5 μM SNP ve 5 μM SNP içeren besiyerlerinin geçirilmesiyle test edilmiştir. Statik sistemde olduğu gibi, dinamik sistemde de 5 μM SNP ilavesiyle *E. coli* biyofilminin 0.5 μM SNP ilavesine kıyasla daha fazla dağıldığı gözlenmiştir (Şekil 15). Dinamik sistemde oluşturulan *B. subtilis* biyofilminin dağılması ise sistemden 24 saat boyunca sadece 5 μM SNP içeren besiyerinin geçirilmesiyle test edilmiştir. *B. subtilis* biyofilmi de yüksek oranda dağılım göstermiştir (Şekil 16). Dinamik sistemde gerçekleştirilen tüm deneylerden sonra atık şişesindeki biyofilmden-dağılmış hücreler incelenen her koşul için santrifüjlenerek elde edilmiştir.



Şekil 15. Dinamik sistemde akış hücresinde oluşturulan *E. coli* biyofilmi (A) ve sistemden 5 μM SNP (B) ve 0.5 μM SNP (C) içeren besiyerleri geçirildikten sonra kalan biyofilmlerin floresan mikroskop görüntüleri



Şekil 16. Dinamik sistemde akış hücresinde oluşturulan *B. subtilis* biyofilmi (A) ve sistemden 5 μM SNP (B) içeren besiyerleri geçirildikten sonra kalan biyofilmin floresan mikroskop görüntüleri

4.3 Planktonik *E. coli* ve Farklı SNP Konsantrasyonu İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen *E. coli* Biyofilmlerinden Dağılmış Hücrelerin AFM Görüntüleri ve AFM ile Ölçülen Adhezyon Kuvvetleri Dağılımları

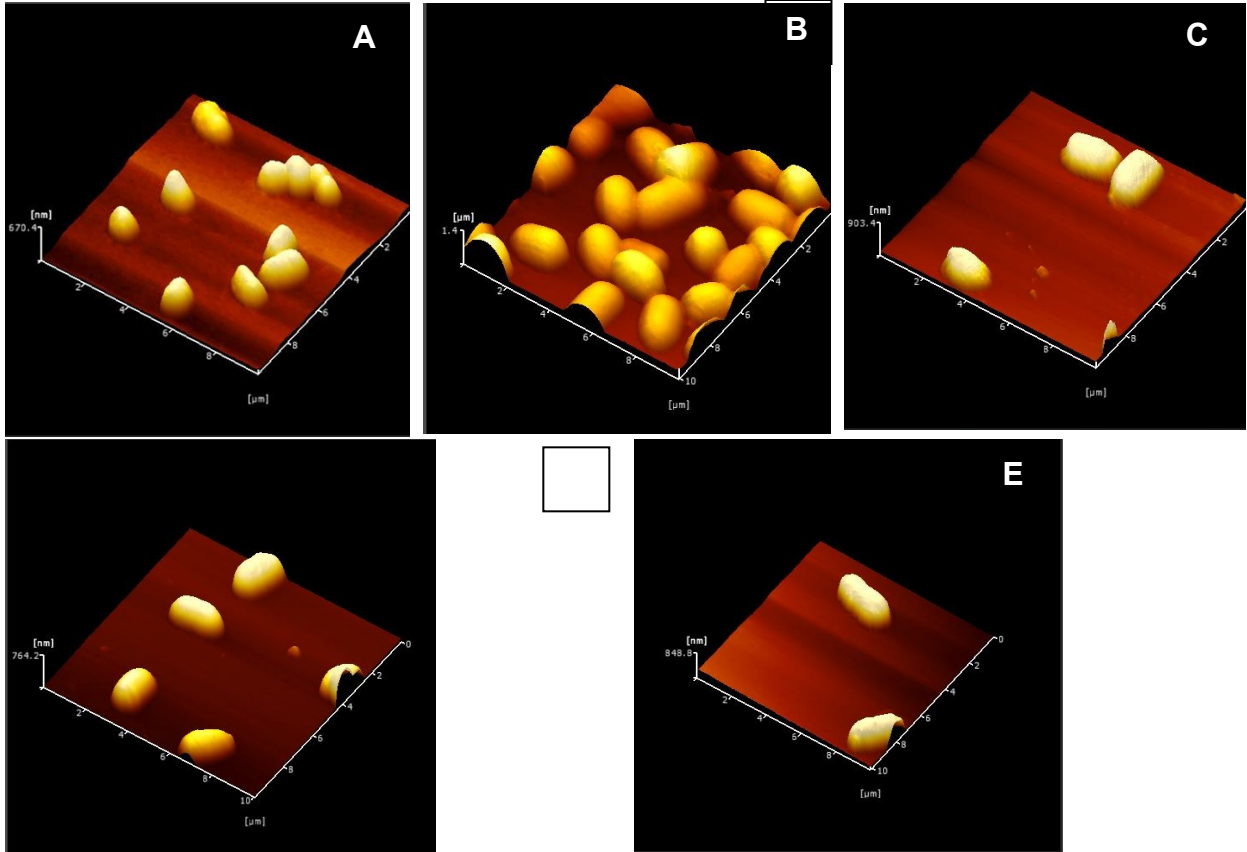
E. coli ile silikon nitrat AFM ucu arasındaki adhezyon kuvveti her koşul için en az 20 adet (çoğunlukla canlı) bakteri hücresi üzerinde ve her bir bakteri yüzeyinde yaklaşık olarak 9-12 bölgede su içerisinde ölçülmüştür. Ölçümler öncesinde PLL kaplı mika yüzeyine bakteriler immobilize edilmiş ve AFM ile su içerisinde düzgün morfolojideki görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 17). Bu bakteriler üzerinde AFM ölçümlerinden elde edilen geri-çekilme eğrilerinin gösterdiği adhezyon piklerinin kuvvet değerleri (nN) belirlenmiş ve olasılık histogramları hazırlanarak heterojenlikleri Şekil 18 ve Şekil 19'da karşılaştırılmıştır.

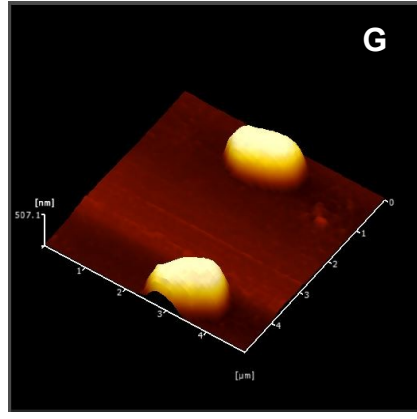
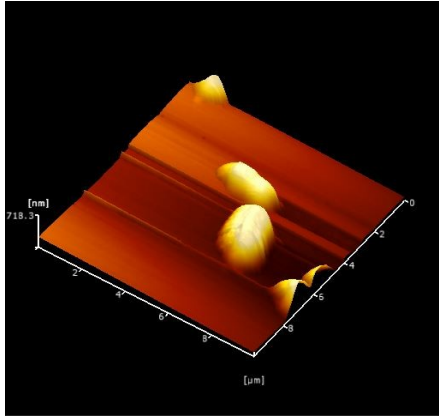
İstatistiksel karşılaştırmalar, planktonik hücreler ile statik sistemde 5 μM SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış hücrelerin AFM ile ölçülen ve olasılık dağılımları verilen adhezyon kuvveti değerlerinin birbirinden önemli ölçüde farklı olmadığını göstermiştir. Bu benzerlik ilgili hücreler için verilen adhezyon kuvvetlerinin dağılımlarındaki benzerlikten de anlaşılabilir (Şekil 18 (A) ve (C)). Ancak statik sistemde araştırılan diğer koşullar için ölçülen adhezyon kuvvetlerinin, istatistiksel olarak ve önemli ölçüde birbirinden ve planktonik hücreler için bulunan adhezyon kuvvetlerinden farklı oldukları bulunmuştur (Dunn's test, $P < 0.05$). Karşılaştırıldığında, en yüksek heterojenlik ve/veya adhezyon kuvvetlerinin en geniş dağılımı, statik sistemde büyütülen biyofilm kültürüne 2.5 mM toksik SNP eklendiğinde dağılan hücreler için gözlenmiştir (Şekil 18 (E)),

ardından sırasıyla 0.5 μM (Şekil 18 (B)), 50 μM SNP (Şekil 18 (D)) ve 5 μM SNP (Şekil 18 (C)) eklendiğinde elde edilen biyofilmden-dağılmış hücreler için gözlenmiştir.

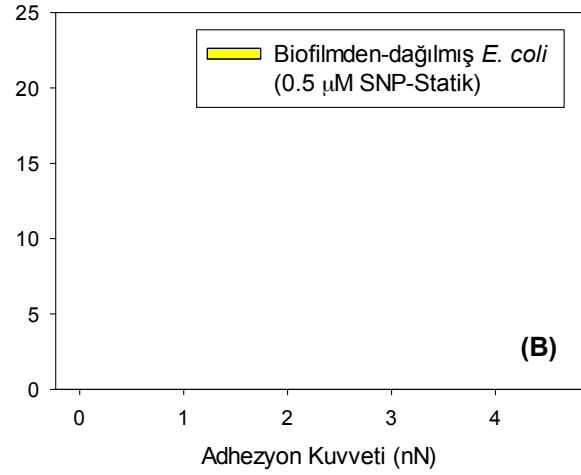
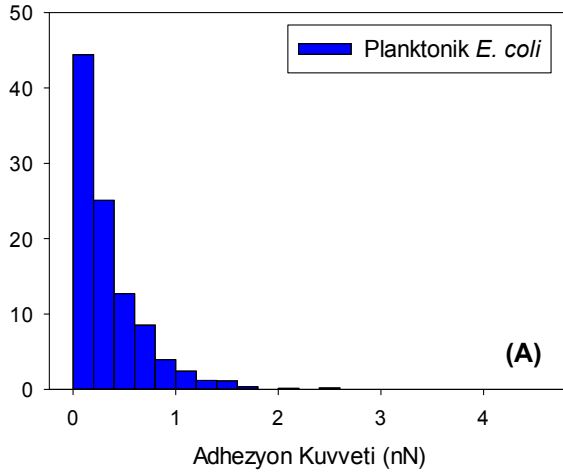
Planktonik hücreler için elde edilen ve Şekil 18 (A)'da dağılımları verilen adhezyon kuvveti değerleri ile dinamik sistemde oluşmuş biyofilmlerden 0.5 μM ve 5 μM SNP ilavesiyle dağılmış *E. coli* hücreleri için elde edilen ve Şekil 19'da olasılık dağılımları verilen adhezyon kuvvetleri karşılaştırıldığında ise, planktonik ve 0.5 μM SNP ile dinamik biyofilmden dağılanların adhezyon piklerinin kuvvet değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı, ancak 5 μM SNP ilavesiyle dinamik biyofilmden dağılanların ise istatistiksel olarak diğer iki gruptan farklı olduğu bulunmuştur (Dunn's test, $P < 0.05$).

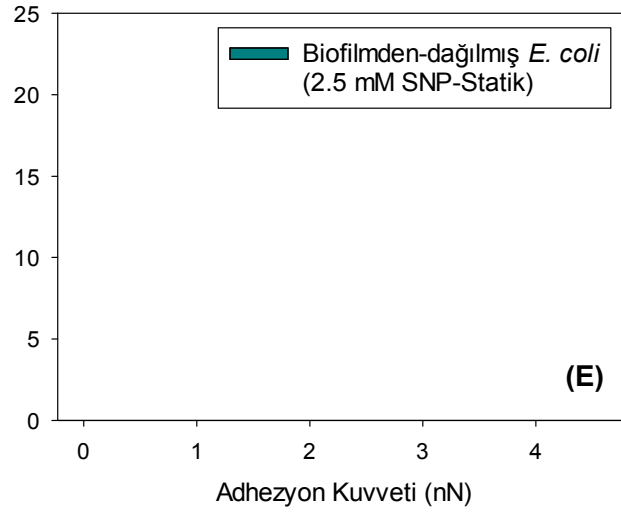
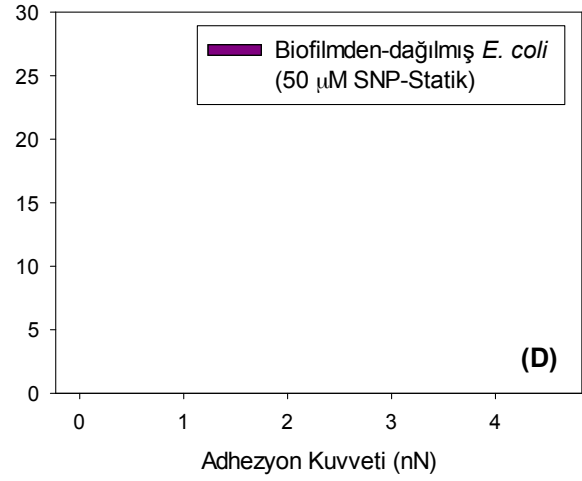
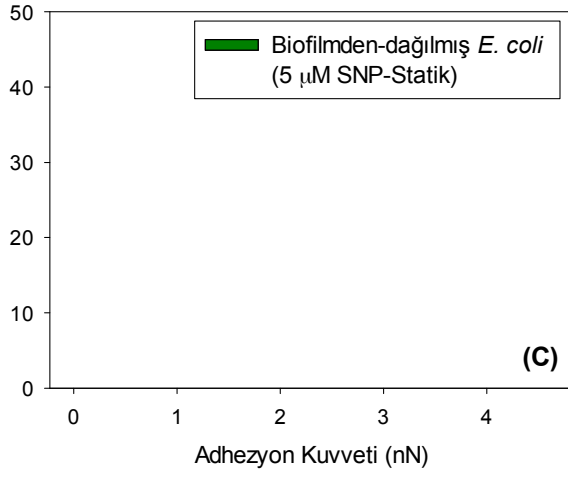
0.5 μM ve 5 μM SNP ile statik ve dinamik sistemlerde oluşturulmuş biyofilmlerden dağılmış hücrelerin adhezyon kuvveti değerleri, statik ve dinamik koşul farkını görmek amacıyla, kendi aralarında karşılaştırıldığında ise birbirinden istatistiksel olarak farklı oldukları her iki konsantrasyon için de ayrı ayrı görülmüştür (Rank sum test, $P = < 0.001$).



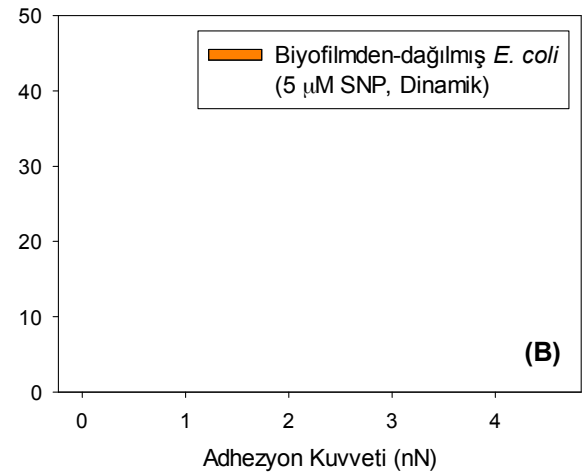
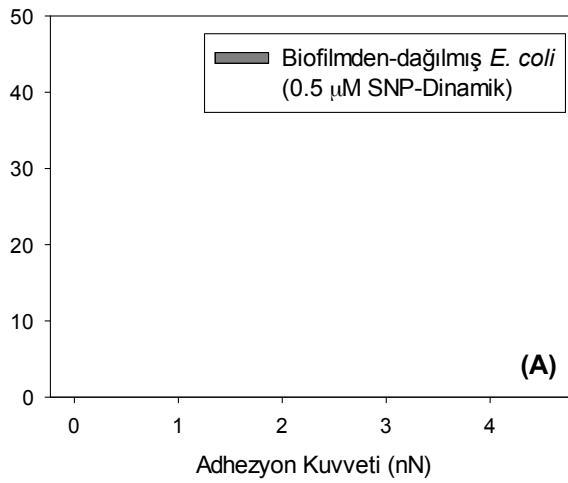


Şekil 17. *E. coli* hücrelerinin su altında AFM ile elde edilen üç boyutlu görüntüleri. A) Planktonik, B) 0.5 μM , C) 5 μM , D) 50 μM ve E) 2.5 mM SNP ile statik biyofilmden-dağılmış hücreler; F) 0.5 μM ve G) 5 μM SNP ile dinamik biyofilmden-dağılmış hücrelerdir





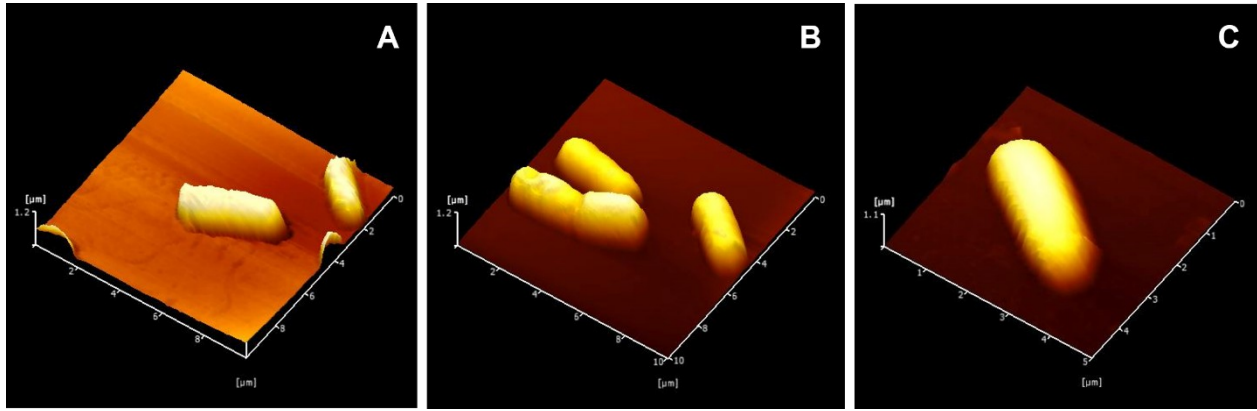
Şekil 18. Planktonik ve statik sistemde oluşturulmuş biyofilmlerden farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesiyle dağılmış *E. coli* hücrelerin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin olasılık histogramları



Şekil 19. Dinamik sistemde oluşturulmuş biyofilmlerden farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesiyle dağılmış *E. coli* hücrelerin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin olasılık histogramları

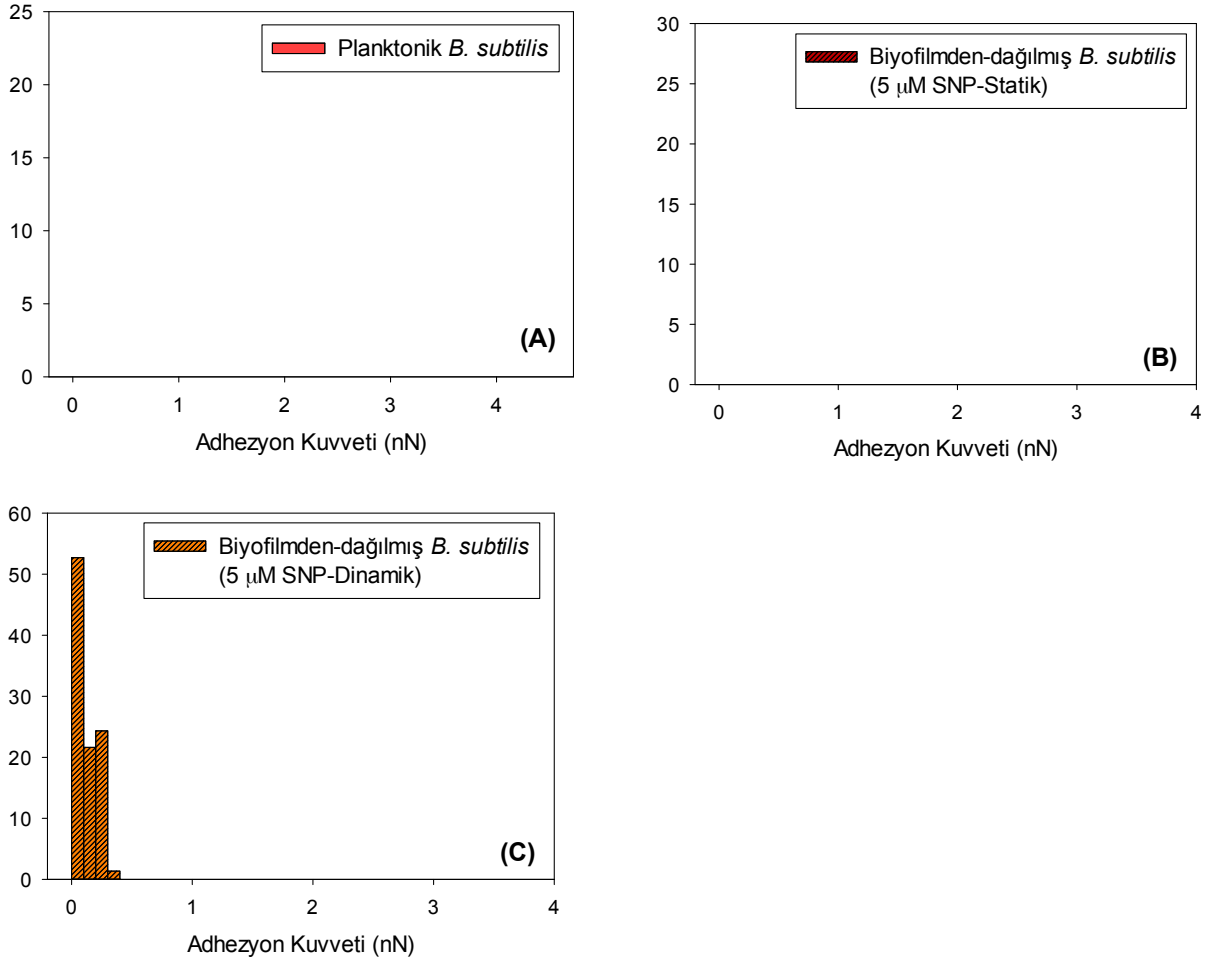
4.4 Planktonik *B. subtilis* ve 5 μM SNP İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen *B. subtilis* Biyofilmlerinden Dağılmış Hücrelerin AFM Görüntüleri ve AFM ile Ölçülen Adhezyon Kuvvetleri Dağılımları

B. subtilis ile silikon nitrat AFM ucu arasındaki adhezyon kuvveti her koşul için 10 adet (çoğunlukla canlı) bakteri hücresi üzerinde ve her bir bakteri yüzeyinde 10 bölgede su içerisinde ölçülmüştür. Ölçümler öncesinde PLL kaplı mika yüzeyine bakteriler immobilize edilmiş ve AFM ile su içerisinde düzgün morfolojideki görüntüleri *B. subtilis* için de elde edilmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. *B. subtilis* hücrelerinin su altında AFM ile elde edilen üç boyutlu görüntüleri. A) Planktonik, B) 5 μM SNP ile statik biyofilmden-dağılmış, C) 5 μM SNP ile dinamik biyofilmden-dağılmış hücrelerdir

Planktonik, 5 μM SNP ile statik biyofilmden-dağılmış ve 5 μM SNP ile dinamik biyofilmden-dağılmış *B. subtilis* hücreleri için AFM ölçümlerinden elde edilen geri-çekilme eğrilerinin gösterdiği adhezyon piklerinin kuvvet değerleri (nN) belirlenerek olasılık histogramları hazırlanmış ve heterojenlikleri karşılaştırılmıştır. En yüksek heterojenlik ve/veya adhezyon kuvvetlerinin en geniş dağılımı planktonik *B. subtilis* hücreleri için gözlenmiştir (Şekil 21 (A)), ardından sırasıyla 5 μM SNP ile statik biyofilmden-dağılmış hücreler (Şekil 21 (B)) ve 5 μM SNP ile dinamik biyofilmden-dağılmış hücreler (Şekil 21 (C)) için gözlenmiştir. Ayrıca *B. subtilis* için incelenen tüm koşullarda ölçülen adhezyon kuvvetlerinin, istatistiksel olarak ve önemli ölçüde birbirinden farklı oldukları bulunmuştur (Dunn's test, $P < 0.05$).



Şekil 21. Planktonik ve biyofilmlerden 5 μ M SNP ilavesiyle dağılmış *B. subtilis* hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin olasılık histogramları

4.5 Planktonik *E. coli* ve Farklı SNP Konsantrasyonu İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen *E. coli* Biyofilmlerinden Dağılmış Hücrelerin AFM ile Ölçülen Adhezyon Kuvvetleri Değerleri

Silikon nitrat AFM uçları ile planktonik ve biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücreleri arasında ölçülen ve olasılık dağılımları verilen (Şekil 18 ve Şekil 19) adhezyon kuvvetlerinin ortalama, medyan ve mod değerleri hesaplanıp, statik ve dinamik biyofilm kültürlerine eklenen SNP konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak Tablo 1'de sunulmuştur. Planktonik *E. coli* hücreleri ile statik sistemde 5 μ M SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış hücreler ve dinamik sistemde 0.5 μ M SNP ile biyofilmden-dağılmış hücreler için dağılımları verilen adhezyon kuvvetleri

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak adhezyon kuvvetleri arasında bir önceki bölümde sunulduğu üzere bir fark bulunmamıştır. Bu gruplar için bulunan adhezyon kuvvetlerinin ortalama (0.347 nN, 0.358 nN, 0.327 nN) ve medyan (0.233 nN, 0.220 nN, 0.226 nN) değerlerinin de beklenildiği üzere birbirlerine çok yakın değerler olduğu görülmüştür. Ayrıca incelenen koşullar arasında gözlenen en düşük ortalama ve medyan adhezyon kuvveti değerleridir (Tablo 1).

En yüksek ortalama ve medyan adhezyon kuvveti değerleri ise statik sistemde büyütülen biyofilm kültürüne 2.5 mM toksik SNP konsantrasyonu eklendiğinde dağılan hücreler için gözlenmiştir (0.917 nN, 0.720 nN), ardından sırasıyla statik sistemde 0.5 µM SNP (0.799 nN, 0.526 nN), 50 µM SNP (0.594 nN, 0.436 nN) ve dinamik sistemde 5 µM SNP (0.406 nN, 0.302 nN) eklendiğinde elde edilen biyofilmden-dağılmış hücreler için gözlenmiştir (bu hücreler için ölçülen adhezyon kuvvetlerinin, istatistiksel olarak birbirinden ve planktonik hücreler için bulunan adhezyon kuvvetlerinden farklı oldukları bulunmuştur).

İncelenen tüm gruplar için AFM ile ölçülen adhezyonların şiddeti veya gücü (adhesion strength) adhezyon kuvvetlerinin ortalama ve medyan değerleri ile ölçülmektedir. Adhezyon kuvvetlerinin mod değerleri ise, her grup için elde edilen veri setlerindeki en çok tekrarlanan değeri göstermektedir. Buna göre, mod değerleri karşılaştırıldığında, en yüksek değer beklenildiği üzere statik sistemde büyütülen biyofilm kültürüne 2.5 mM toksik SNP eklendiğinde dağılan hücreler için gözlenmiştir (Tablo 1). Ancak her grup için elde edilen veri setleri yani adhezyon pikleri sayıları çok farklı olduğundan ve elde edilen verilerdeki heterojenlik çok yüksek olduğundan, mod değeri karşılaştırmaları yanıltıcı olabilir. Bu sebeple, adhezyon piklerinden elde edilen adhezyon kuvvetlerinin olasılık dağılımları karşılaştırmalarının sonuçlarımızı daha doğru ifade ettiği düşünülmektedir.

4.6 Planktonik *B. subtilis* ve 5 µM SNP İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen *B. subtilis* Biyofilmlerinden Dağılmış Hücrelerin AFM ile Ölçülen Adhezyon Kuvvetleri Değerleri

Planktonik *B. subtilis* hücreleri ile statik ve dinamik sistemlerde 5 µM SNP ilavesiyle biyofilmlerden dağılmış *B. subtilis* hücreleri için olasılık dağılımları verilen (Şekil 21) adhezyon kuvvetlerinin ortalama, medyan ve mod değerleri hesaplanmış Tablo 1'de sunulmuştur. En yüksek ortalama ve medyan adhezyon kuvveti değerleri planktonik *B. subtilis* hücreleri için gözlenmiştir (0.896 nN, 0.665 nN), ardından statik sistemde 5 µM SNP eklendiğinde elde edilen biyofilmden-dağılmış hücreler (0.284 nN, 0.201 nN) ve dinamik sistemde 5 µM SNP

eklendiğinde elde edilen biyofilmden-dağılmış hücreler (0.122 nN, 0.085 nN) için sırasıyla gözlenmiştir (*B. subtilis* için incelenen tüm koşullarda ölçülen adhezyon kuvvetlerinin, istatistiksel olarak farklı oldukları bulunmuştur).

Mod değerleri karşılaştırıldığında ise, en düşük değer dinamik sistemde 5 μ M SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış *B. subtilis* hücreleri için bulunmuştur. Planktonik *B. subtilis* ve statik sistemde 5 μ M SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış *B. subtilis* hücreleri için bulunan adhezyon kuvvetlerinin mod değerlerinin benzer olduğu söylenebilir (Tablo 1). Adhezyon piklerinden elde edilen adhezyon kuvvetlerinin olasılık dağılımları karşılaştırmalarının sonuçlarımızı daha doğru ifade ettiği düşünülmektedir.

4.7 Planktonik ve Farklı Konsantrasyonlarda SNP İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen Biyofilmlerinden Dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* Hücrelerinin c-di-GMP Miktarları

Planktonik *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinin ve farklı konsantrasyonlarda besiyerlerine SNP ilavesiyle statik ve dinamik sistemlerde büyütülmüş *E. coli* ve *B. subtilis* biyofilmlerinden dağılmış hücrelerin içerdikleri c-di-GMP konsantrasyonları HPLC ile ölçülmüş ve hücrelerin toplam protein miktarları ile normalize edilerek pmol/mg cinsinden ortalama değerleri hesaplanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1'e bakıldığında statik biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerinin c-di-GMP miktarlarının planktonik *E. coli* hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir. *E. coli* için araştırdığımız koşullar arasında, en yüksek c-di-GMP miktarı statik sistemde büyütülen biyofilm kültürüne 2.5 mM toksik SNP eklendiğinde dağılan hücreler için gözlenmiştir (67.3 pmol c-di-GMP/mg protein), ardından sırasıyla statik sistemde 50 μ M SNP (24.2 pmol/mg), 0.5 μ M SNP (19.6 pmol/mg), 5 μ M SNP (12.8 pmol/mg) eklendiğinde elde edilen biyofilmden-dağılmış hücreler için ve planktonik hücreler (8.4 pmol/mg) için gözlenmiştir. Bu hücrelerin içerdği c-di-GMP miktarları ve ölçülen adhezyon kuvvetlerinin ortalama veya medyan değerleri arasında yani hücrelerin adhezyon şiddetleri/güçleri arasında pozitif bir ilişki olduğu söylenebilir.

Dinamik sistemde oluşturulmuş biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerinin c-di-GMP miktarlarında ise planktonik hücrelere kıyasla düşüş gözlenmektedir. Dinamik sistemde 0.5 μ M SNP eklendiğinde elde edilen biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerinin içerdği c-di-GMP miktarı (8.2 pmol/mg) ile planktonik *E. coli* hücrelerinin c-di-GMP miktarları arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. İncelenen gruplar arasında en düşük c-di-GMP miktarı (6.5 pmol/mg) içeren hücrelerin ise dinamik sistemde 5 μ M SNP eklendiğinde elde edilen biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücreleri olduğu görülmüştür (Tablo 1).



Planktonik *B. subtilis* hücrelerinin c-di-GMP miktarının 15.3 pmol/mg olduğu görülmüştür. Statik ve dinamik sistemde 5 μ M SNP eklendiğinde elde edilen biyofilmden-dağılmış *B. subtilis* hücrelerinin içerdikleri c-di-GMP miktarları (8.3 ve 7.0 pmol/mg) planktonik *B. subtilis* hücrelerine kıyasla çok daha azdır. Bu hücrelerin içerdği c-di-GMP miktarları ve ölçülen adhezyon kuvvetlerinin ortalama veya medyan değerleri arasında yani hücrelerin adhezyon şiddetleri/güçleri arasında pozitif bir korelasyon görülmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Planktonik hücrelerin ve SNP ilavesi ile statik ve dinamik sistemlerde büyütülen biyofilmlerden dağılmış hücrelerin AFM ile ölçülen adhezyon kuvvetlerinin ortalama, medyan ve mod değerleri, analiz edilen geri-çekilme eğrisi ve elde edilen toplam adhezyon piki sayıları. Ayrıca hücrelerin içerdiği c-di-GMP miktarları da sunulmuştur.

<i>E. coli</i> (ATCC 25404)	Planktonik hücreler	Biyofilmden-Dağılmış Hücreler					
		Statik Sistem				Dinamik Sistem	
Eklene SNP Konsantrasyonu	0 μ M	0.5 μ M	5 μ M	50 μ M	2.5 mM	0.5 μ M	5 μ M
Ortalama (nN)	0.347	0.799	0.358	0.594	0.917	0.327	0.406
SEM (nN)	0.008	0.019	0.011	0.011	0.017	0.008	0.018
Medyan (nN)	0.233	0.526	0.220	0.436	0.720	0.226	0.302
Mod (nN)	0.070	0.108	0.050	0.126	0.659	0.090	0.030
Pik sayısı	1702	1615	856	2760	1974	1300	358
Geri-çekilme eğrisi sayısı	225	225	225	350	240	200	200
Hücre sayısı	25	25	25	35	25	20	20
c-di GMP (pmol/mg)	8.4	19.6	12.8	24.2	67.3	8.2	6.5
Standart Sapma (pmol/mg)	0.8	3.2	0.9	0.3	0.4	0.5	0.4

<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	Planktonik hücreler	Biyofilmden-Dağılmış Hücreler	
		Statik Sistem	Dinamik Sistem
Eklene SNP Konsantrasyonu	0 μ M	5 μ M	5 μ M
Ortalama (nN)	0.896	0.284	0.122
SEM (nN)	0.025	0.013	0.007
Medyan (nN)	0.665	0.201	0.085
Mod (nN)	0.168	0.183	0.040
Pik sayısı	916	457	148
Geri-çekilme eğrisi sayısı	100	100	100
Hücre sayısı	10	10	10
c-di GMP (pmol/mg)	15.3	8.3	7.0
Standart Sapma (pmol/mg)	3.5	1.2	1.0

4.8 Planktonik ve 5 µM SNP İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen Biyofilmlerden Dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* Hücre Katmanları Üzerinde Ölçülen Temas Açıları ve Hesaplanan Yüzey Gerilimleri

Su ve diiyodometanın temas açıları planktonik ve 5 µM SNP ilavesiyle statik ve dinamik sistemlerde büyütülen biyofilmlerden dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* bakteri katmanları üzerinde ölçülmüştür. Ölçülen temas açıları ve termodinamik-tabanlı harmonik ortalama modeli (HM

modeli) kullanılarak, incelenen bakterilerin apolar (γ_s^d) ve polar (γ_s^p) yüzey gerilimi bileşenleri ile polariteleri hesaplanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2'de *E. coli* için sunulan apolar yüzey gerilimi bileşenlerine bakıldığında, dinamik koşulda oluşmuş biyofilmden 5 µM SNP ilavesiyle dağılmış *E. coli* hücrelerinin (28.9 mJ/m²) sırasıyla 5 µM SNP ilavesiyle statik biyofilmden-dağılmış (26.4 mJ/m²) ve planktonik *E. coli* hücrelerine (20.1 mJ/m²) kıyasla apolar yüzey gerilimi bileşeninin daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum dinamik biyofilmden-dağılmış *E. coli*'nin incelenen diğer *E. coli* hücrelerine kıyasla yüzeyinde daha az polar grup olduğunu ve dolayısı ile en yüksek hidrofobisiteye sahip olduğunu göstermektedir. Bu aynı zamanda, hücrelerin polarite değerlerinden de anlaşılabilir. Polarite, bir yüzeyin ne kadar polar olduğunun bir ölçüsüdür ve bir bakteri yüzeyinde bulunan polar grupların miktarını belirlemek için kullanılmaktadır (Park ve Abu-Lail, 2011). Sonuçlarımıza göre, *E. coli* üzerinde mevcut olan en yüksek polarite ve dolayısıyla en yüksek polar grup miktarı sırasıyla planktonik (0.717), 5 µM SNP ile statik biyofilmden-dağılmış (0.632) ve 5 µM SNP ile dinamik biyofilmden-dağılmış *E. coli* (0.602) için gözlenmiştir. Polar moleküller suda kolayca çözündükleri veya doğada hidrofilik oldukları için, planktonik *E. coli* için hesaplanan en yüksek polarite, en düşük hidrofobisiteye sahip olan hücre grubu olduğunu göstermektedir. Başka bir ifadeyle, 5 µM SNP ile dinamik biyofilmden-dağılmış *E. coli* için bulunan en düşük polarite en yüksek hidrofobik yüzey özelliğine sahip olduğunu göstermektedir.

B. subtilis için ise, Tablo 2'de sunulan sonuçlarımıza göre, en yüksek hidrofobisite anlamına gelen en düşük polarite 5 µM SNP ile statik biyofilmden-dağılmış *B. subtilis* hücreleri için (0.577) bulunmuştur. Daha sonra sırası ile planktonik ve dinamik biyofilmden-dağılmış *B. subtilis* hücreleri için gelmektedir (0.639 ve 0.654). Genel olarak yorumlamak gerekirse, özetle biyofilmden-dağılmış hücrelerin planktonik hücrelere kıyasla daha hidrofobik olduğu ancak bu durumun biyofilmin olduğu statik veya dinamik koşula ayrıca bakteri türüne göre değişebileceği söylenebilir.

Tablo 2. Planktonik ve 5 μM SNP ilavesi ile statik ve dinamik sistemlerde büyütülen biyofilmlerden dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* hücre katmanları üzerinde ölçülen su ve diiyodometan temas açıları ve HM modeli kullanılarak hesaplanmış apolar ve polar bakteriyel yüzey gerilimi bileşenleri

<i>E. coli</i> (ATCC 25404)	Planktonik hücreler	Biyofilmden-Dağılmış Hücreler	
		Statik Sistem	Dinamik Sistem
Eklenen SNP Konsantrasyonu	0 μM	5 μM	5 μM
θ_{su}	13.1 \pm 0.7	12.8 \pm 1.0	12.7 \pm 4.0
$\theta_{\text{diiyodometan}}$	73.0 \pm 0.1	58.8 \pm 0.2	53.3 \pm 0.2
γ_s^d	20.1	26.4	28.9
γ_s^p	50.9	45.4	43.7
$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$	71.0	71.8	72.6
Polarite = γ_s^p / γ_s	0.717	0.632	0.602

4.9

<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	Planktonik hücreler	Biyofilmden-Dağılmış Hücreler	
		Statik Sistem	Dinamik Sistem
Eklenen SNP Konsantrasyonu	0 μM	5 μM	5 μM
θ_{su}	14.3 \pm 1.3	11.8 \pm 0.6	15.6 \pm 1.1
$\theta_{\text{diiyodometan}}$	60.4 \pm 0.1	48.3 \pm 0.1	63.2 \pm 0.7
γ_s^d	25.7	31.2	24.4
γ_s^p	45.5	42.5	46.1
$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$	71.2	73.7	70.5
Polarite = γ_s^p / γ_s	0.639	0.577	0.654

Planktonik ve 5 μM SNP İlavesi ile Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen Biyofilmlerden Dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* Hücrelerinin AFM ile Ölçülen ve Ortalaması Hesaplanan Adhezyon Kuvvetlerinin Poisson Analizi ile Spesifik ve Spesifik-Olmayan Bileşenlerine Ayrıştırılması

Planktonik *E. coli* ve *B. subtilis* hücreleri ile statik ve dinamik sistemlerde büyütülmüş biyofilmlerden besiyerlerine 5 μM SNP ilavesiyle dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinin AFM ile ölçülen ve (%) olasılık dağılımları verilen adhezyon kuvvetlerinin Poisson dağılımı ile de ifade edilebileceği (minimum $R^2 = 0.76$) Şekil 22'de gösterilmiştir.

İncelenen bakteri hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin ortalamaları ve varyansları; *E. coli* grubu için incelenen her koşulda 20 adet bakteri hücresi üzerinde, *B. subtilis* grubu için incelenen her koşulda 10 adet bakteri hücresi üzerinde hesaplanmış ve Tablo 3'te sunulmuştur. Daha sonra varyansa (σ_F^2) karşı ortalama kuvvet (μ_F) doğruları çizilerek spesifik (F_i) ve spesifik-olmayan kuvvetler (F_o) hesaplanmıştır (Şekil 23 ve Şekil 24, Tablo 4). Poisson dağılımının “ortalama = varyans” özelliğinden yararlanarak elde edilen eşitlikler ile spesifik ve spesifik-olmayan kuvvet değerleri nicelleştirilmiştir.

AFM ile ölçülmüş ortalama adhezyon kuvveti değerleri Poisson analizi ile bileşenlerine (spesifik ve spesifik-olmayan kuvvet bileşenleri) ayrıştırılmıştır. Dolayısı ile, teoride bu bileşenler toplandığında yine AFM ile ölçülmüş ortalama adhezyon kuvveti değerlerini vermelidir. Başka bir ifadeyle, Poisson analizi ile kuvvet bileşenlerine ayrıştırma işleminin başarısı, bu toplam kuvvet değerleri ile AFM ile ölçülen ortalama adhezyon kuvveti değerleri arasındaki % farka bağlıdır. Tablo 4'te görüldüğü gibi planktonik *E. coli* ve *B. subtilis* hücreleri için yapılan Poisson analizlerinin diğerlerine kıyasla daha doğru sonuçlar verdiği söylenebilir. Ayrıca statik ve dinamik sistemlerde 5 μ M SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış *E. coli* ve statik sistemde 5 μ M SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış *B. subtilis* için bulunan % fark değerleri de literatürdeki benzer çalışmalar sonucunda bulunan maksimum % fark değerlerine oldukça yakındır. Örneğin, daha önceki çalışmamızda farklı sıcaklıklarda büyütülen *L. monocytogenes* hücrelerinin Poisson analizi ile bulunmuş spesifik ve spesifik-olmayan kuvvet bileşenleri toplandığında, AFM ile ölçülmüş adhezyon kuvvetlerinden maksimum % 23 farkla yüksek olduğu görülmüştür (Gordesli ve Abu-Lail, 2012a). Dinamik sistemde oluşmuş biyofilmden 5 μ M SNP ilavesiyle dağılmış *B. subtilis* için bulunan % 38 fark ise diğer gruplara kıyasla yüksektir. Ancak bu grup için ayrıştırılan kuvvet değerleri kendi içinde değerlendirilebilir; Poisson analizine göre % 62 ihtimalle (%100-%38) dinamik sistemde oluşmuş biyofilmden dağılan *B. subtilis* hücrelerinin spesifik adhezyon kuvvetleri, spesifik-olmayan adhezyon kuvvetlerinden yüksektir. Özetle, Poisson analizleri sonucunda incelenen her grup için bakterilerin silikon nitrat yüzeyine ilk tutunmasında etki eden spesifik hidrojen bağı kuvvetlerinin spesifik-olmayan fizyokimyasal kuvvetlerden daha etkili olduğu görülmüştür (Tablo 4).

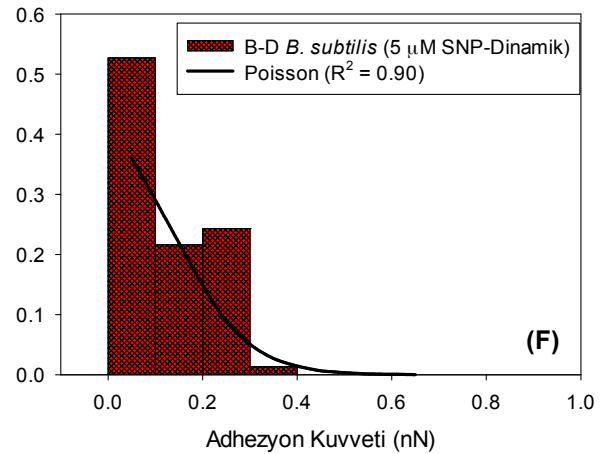
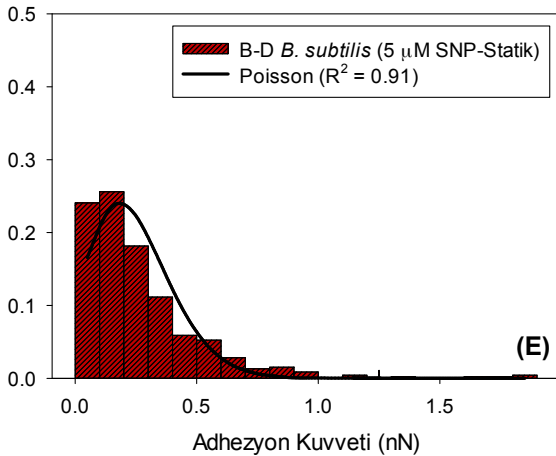
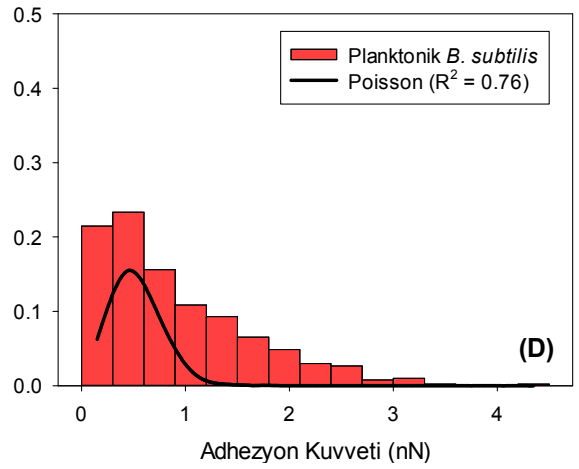
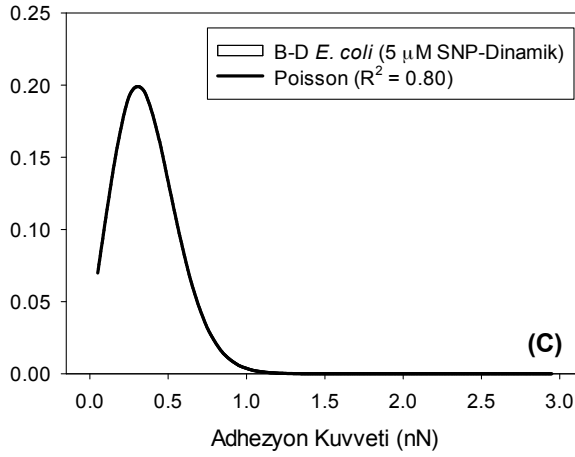
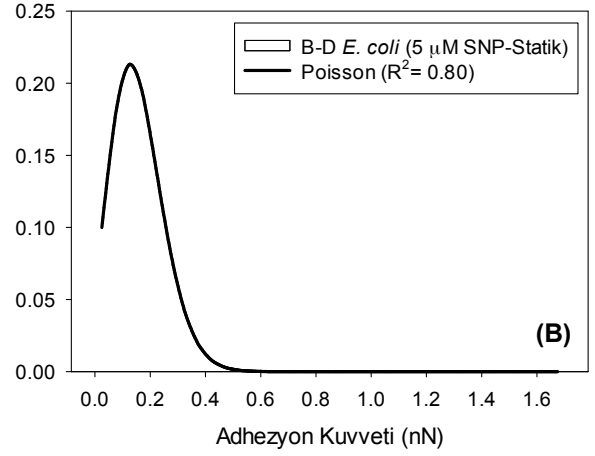
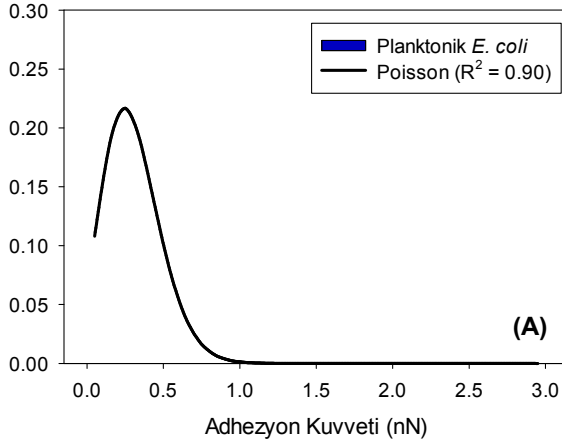
Tablo 4'teki verileri *E. coli* grupları arasında karşılaştırdığımızda ise, en yüksek adhezif spesifik kuvvetin (0.350 nN) statik biyofilmden 5 μ M SNP ile dağılmış *E. coli* hücreleri için hesaplandığı

görülmüştür. Ardından sırasıyla dinamik sistemde biyofilmden 5 μM SNP ile dağılmış *E. coli* hücreleri için hesaplanan değer (0.218 nN) ve planktonik *E. coli* için hesaplanan spesifik kuvvet değeri (0.206 nN) gelmektedir. En yüksek adhezif spesifik-olmayan kuvvet değeri (0.126 nN) ise dinamik sistemde biyofilmden 5 μM SNP ile dağılmış *E. coli* hücreleri için gözlenmiştir.

B. subtilis için ise, en yüksek adhezif spesifik kuvvet değeri (0.569 nN) ve spesifik-olmayan kuvvet değeri (0.408 nN) planktonik hücreler için gözlenmiştir. Ardından statik ve dinamik sistemlerde biyofilmlerden 5 μM SNP ile dağılmış *B. subtilis* hücreleri için sırasıyla gözlenmiştir (0.128 nN ve 0.052 nN).

Planktonik *B. subtilis* hücrelerinin planktonik *E. coli* hücrelerine kıyasla spesifik ve spesifik-olmayan adhezyon kuvvetleri bileşenleri (0.569 nN ve 0.408 nN) ile AFM ile ölçülmüş toplam adhezyon kuvveti değeri (0.896 nN) oldukça yüksek bulunmuştur. Statik veya dinamik sistemlerde biyofilmlerden 5 μM SNP ile dağılmış *B. subtilis* hücrelerinin ise 5 μM SNP ile biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerine kıyasla spesifik ve spesifik-olmayan adhezyon kuvvetleri değerleri ve toplam adhezyon kuvvetleri daha düşüktür.

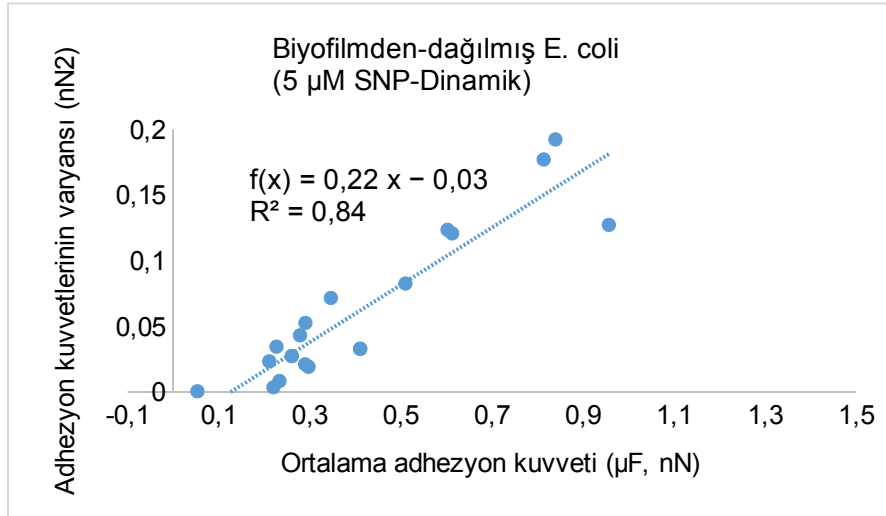
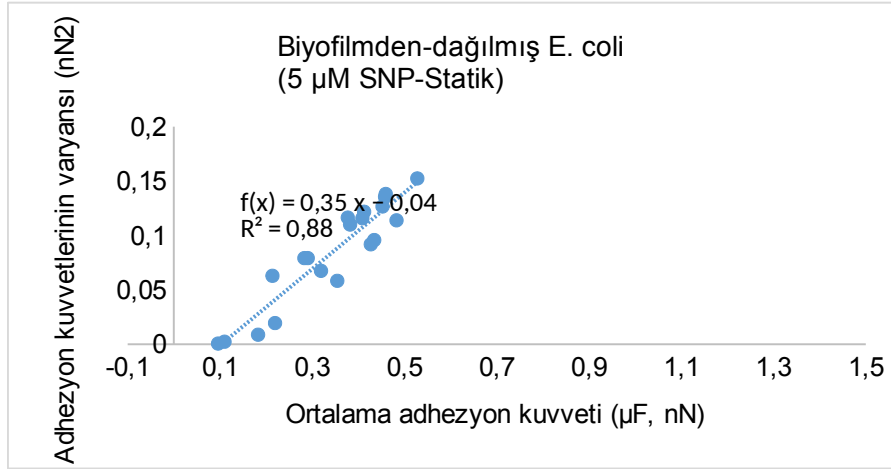
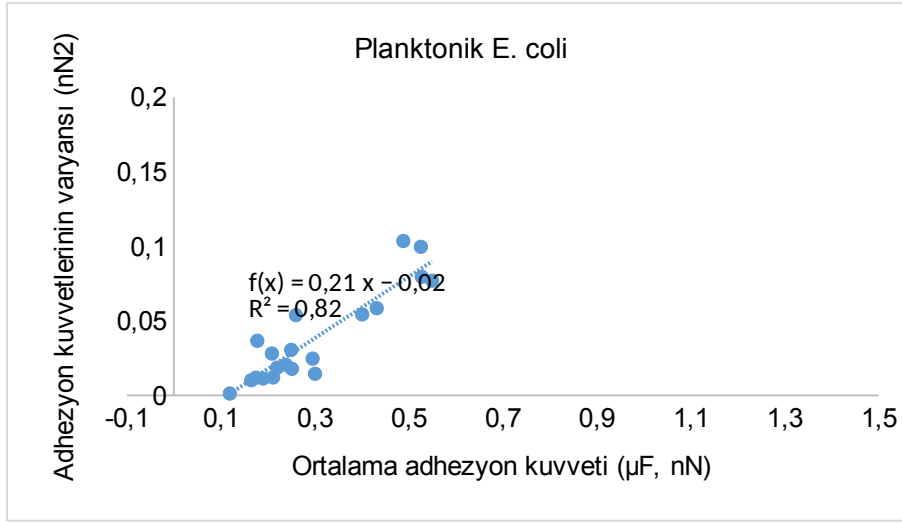
Tüm bulgularımız bir sonraki bölümde literatürdeki bilgiler ışığında tartışılmıştır.



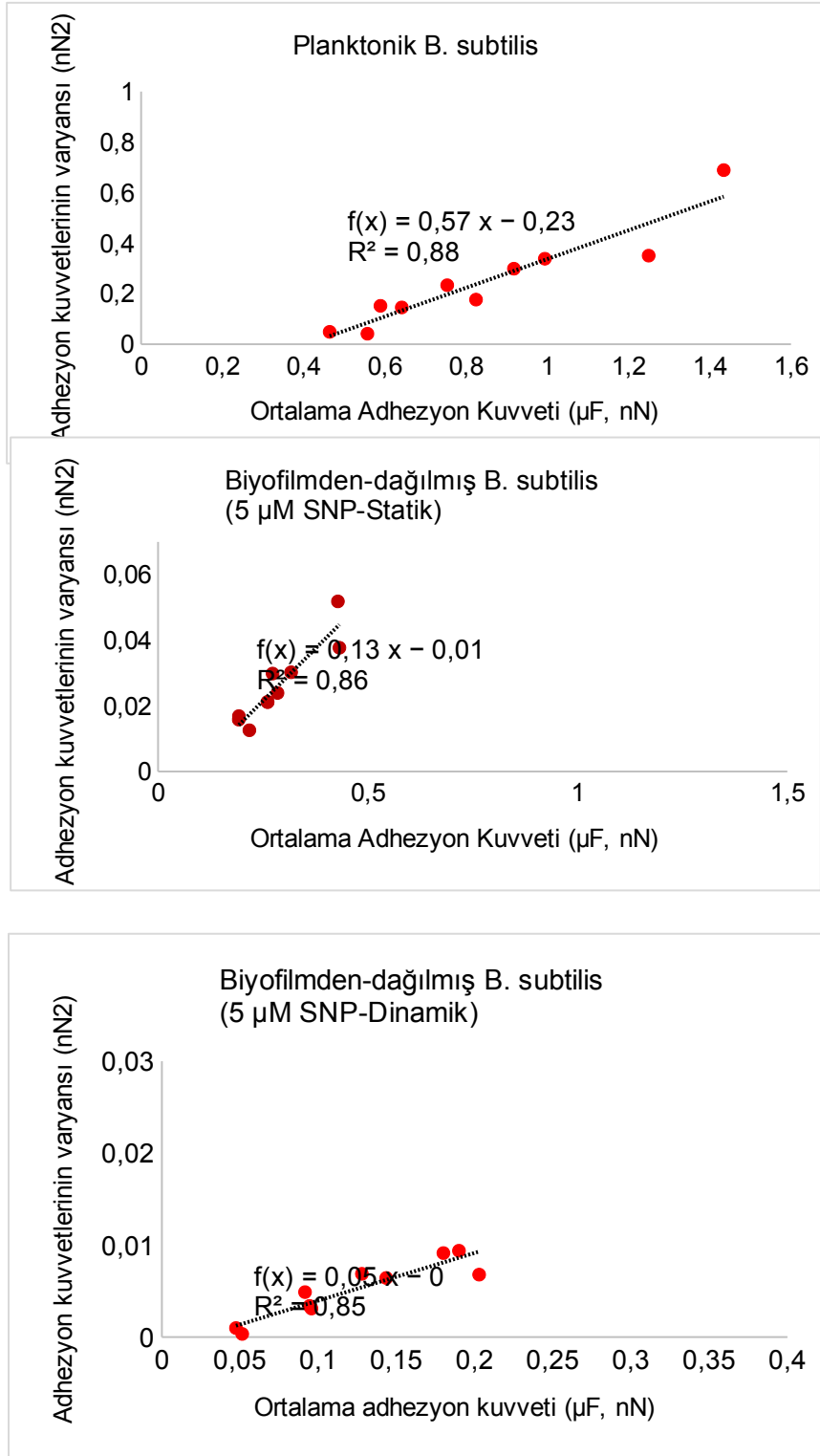
Şekil 22. Planktonik ve 5 µM SNP ilavesiyle statik ve dinamik sistemlerde oluşmuş *E. coli* ve *B. subtilis* biyofilmlerinden dağılan bakteriyel hücrelerin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin Poisson dağılımları

Tablo 3. Planktonik *E. coli* ve *B. subtilis* hücreleri ile statik ve dinamik koşullarda oluşmuş biyofilmlerden besiyerlerine 5 μM SNP ilavesiyle dağılan *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin ortalamaları ve varyansları

Hücre No	Planktonik <i>E. coli</i>		Statik Biyofilmden- dağılmış <i>E. coli</i>		Dinamik Biyofilmden- dağılmış <i>E. coli</i>	
	μ_F	σ_F^2	μ_F	σ_F^2	μ_F	σ_F^2
1	0.525	0.099	0.213	0.063	0.814	0.177
2	0.412	0.057	0.180	0.008	0.839	0.192
3	0.400	0.054	0.283	0.079	0.602	0.124
4	0.177	0.036	0.319	0.067	0.289	0.021
5	0.189	0.011	0.377	0.116	0.410	0.032
6	0.250	0.017	0.459	0.138	0.297	0.019
7	0.219	0.018	0.109	0.002	0.260	0.027
8	0.237	0.020	0.094	0.001	0.233	0.008
9	0.300	0.014	0.354	0.058	0.956	0.127
10	0.118	0.001	0.382	0.110	0.053	0.001
11	0.259	0.053	0.222	0.018	0.220	0.003
12	0.296	0.024	0.290	0.079	0.278	0.043
13	0.551	0.076	0.527	0.152	0.211	0.023
14	0.527	0.079	0.482	0.113	0.227	0.034
15	0.255	0.030	0.427	0.091	0.410	0.032
16	0.210	0.011	0.457	0.135	0.346	0.071
17	0.164	0.012	0.412	0.121	0.260	0.027
18	0.208	0.028	0.452	0.126	0.290	0.052
19	0.175	0.012	0.408	0.115	0.612	0.120
20	0.488	0.103	0.434	0.095	0.510	0.082
Hücre No	Planktonik <i>B. subtilis</i>		Statik Biyofilmden- dağılmış <i>B. subtilis</i>		Dinamik Biyofilmden- dağılmış <i>B. subtilis</i>	
	μ_F	σ_F^2	μ_F	σ_F^2	μ_F	σ_F^2
1	1.249	0.351	0.261	0.021	0.203	0.007
2	0.994	0.338	0.317	0.030	0.143	0.006
3	0.825	0.176	0.432	0.038	0.128	0.007
4	1.435	0.689	0.429	0.052	0.094	0.003
5	0.464	0.049	0.218	0.013	0.092	0.005
6	0.589	0.152	0.192	0.016	0.047	0.001
7	0.754	0.234	0.193	0.017	0.051	0.000
8	0.557	0.041	0.285	0.024	0.096	0.003
9	0.642	0.146	0.273	0.030	0.189	0.009
10	0.918	0.298	0.261	0.021	0.180	0.009



Şekil 23. Planktonik ve biyofilmlerden 5 µM SNP ilavesiyle dağılmış *E. coli* hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin varyanslarına karşı çizilen ortalama kuvvet doğruları



Şekil 24. Planktonik ve biyofilmlerden 5 μM SNP ilavesiyle dağılmış *B. subtilis* hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları adhezyon kuvvetlerinin varyanslarına karşı çizilen ortalama kuvvet doğruları

Tablo 4. Planktonik hücreler ile statik ve dinamik koşullarda 5 μM SNP ilavesiyle biyofilmlerden dağılmış (B-D) *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinin su içerisinde silikon nitrat AFM ucuna uyguladıkları ortalama adhezyon kuvvetleri ve Poisson analizi ile bulunan spesifik ve spesifik-olmayan adhezyon kuvveti bileşenleri. Ayrıca spesifik ve spesifik-olmayan kuvvet bileşenlerinin toplamının AFM ile ölçülen ortalama adhezyon kuvveti değerleri ile karşılaştırması (% fark) verilmiştir.

	AFM ölçülen ortalama adhezyon kuvveti	ile Poisson analizi ile belirlenen spesifik kuvvet (F_i)	Poisson analizi ile belirlenen spesifik-olmayan kuvvet (F_o)	Poisson analizi ile belirlenen toplam kuvvet ($F_i + F_o$)	AFM ile ölçülen ve Poisson analizi ile belirlenen toplam kuvvet arasındaki % fark
Planktonik <i>E.coli</i>	0.347 nN	0.206 nN	0.115 nN	0.321 nN	% 8
Statik B-D <i>E. coli</i>	0.358 nN	0.350 nN	0.103 nN	0.453 nN	% 26
Dinamik B-D <i>E. coli</i>	0.406 nN	0.218 nN	0.126 nN	0.344 nN	% 18
Planktonik <i>B. subtilis</i>	0.896 nN	0.569 nN	0.408 nN	0.977 nN	% 9
Statik B-D <i>B. subtilis</i>	0.284 nN	0.128 nN	0.082 nN	0.210 nN	% 26
Dinamik B-D <i>B. subtilis</i>	0.122 nN	0.052 nN	0.023 nN	0.075 nN	% 38

5. TARTIŞMA

5.1 Planktonik ve Statik Sistemde Büyütülen Biyofilmlerden Dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* Hücrelerinin Nano-ölçekteki Yüzeğe Adhezyon Kapasitelerinin Dağılım için Kullanılan SNP Konsantrasyonu ve Hücre İçi c-di-GMP Miktarı ile İlişkisi

Bakterilerin yüzeyinde bulunan biyopolimerlerin bir yüzeğe ilk tutunmayı sağlayan bağlanma yapıları olarak görev yaptıkları düşünülmektedir (Boonaert vd., 2000; Camesano ve Abu-Lail, 2002; Dorobantu vd., 2009; Dufrene, 2004; Park ve Abu-Lail, 2011; Gordesli ve Abu-Lail, 2012a, 2012b, 2012c, Gordesli-Duatepe vd., 2020). AFM ile elde edilen nano-ölçekteki adhezyon kuvvetleri, bakterilerin yüzeyinde bulunan biyopolimerler aracılığıyla bir yüzeğe ilk tutunmalarındaki kuvvetleri temsil etmektedir. Başka bir ifadeyle, AFM tarafından ölçülen her bir adhezyon kuvvetinin değeri, AFM ucu ile bir yüzeğe biyopolimeri ve/veya bakteri yüzeyindeki bir grup molekül arasındaki bir yapışma olayını temsil etmektedir. Gram-negatif *E. coli* yüzeyinde bulunan fimbria, pili gibi uzantısal yapıların ve polisakkaritlerin, lipopolisakkaritlerin (LPS) ve proteinlerin bu bakterinin bir yüzeğe adhezyonunda etki ettiği bilinmektedir (Walker vd., 2004; Van Houdt ve Michiels, 2005; Hamadi vd., 2008). Benzer şekilde, Gram-pozitif *B. subtilis* yüzeyinde bulunan peptidoglikan tabakası, proteinler, polisakkaritler, teikoik asit ve lipoteikoik asit gibi biyopolimerlerin de bu bakterinin yüzeğe adhezyonunda etki ettiği rapor edilmiştir (Archibald vd. 1989; Driks, 1999; Hayhurst vd., 2008). Dolayısı ile bir grup bakteri yüzeyinden elde edilen adhezyon kuvvetlerinin değerlerindeki heterojenlik, bu bakteri hücrelerinin üzerinde bulunan yüzeğe biyopolimerlerinin heterojenliklerini karşılaştırmak için de kullanılabilir. Bakteri yüzeyi ne kadar yüksek yoğunlukta ve/veya ne kadar çeşitli adhezif biyopolimerlerle kaplıysa, AFM ile elde edilen adhezyon kuvvetlerinin heterojenlikleri de o kadar yüksek olacaktır.

AFM ile kuvvet verilerinden elde ettiğimiz heterojenliğin temel sebebinin biyopolimer çeşitliliğinden çok belirli biyopolimerlerin miktarıyla ve/veya hücre yüzeyindeki yoğunluğuyla ilişkili olduğu planktonik hücreler için tarafımızdan gözlenmiştir (Aspar, 2021; Gordesli-Duatepe vd., 2020). Gram-negatif *E. coli* için özellikle yüzeyinde bulunan lipopolisakkaritlerin (LPS) miktarı/yoğunluğu ve Gram-pozitif *B. subtilis* ve Gram-pozitif *L. monocytogenes* için yüzeyinde bulunan hücre duvarı ilişkili teikoik asit ve proteinlerin miktarı/yoğunluğu ile doğru orantılı olarak bu bakterilerin adhezyon kuvvetlerinin heterojenliklerinde ve adhezyon kapasitelerinde artış gözlenmiştir (Aspar, 2021; Gordesli-Duatepe vd., 2020). Ancak biyofilmden-dağılmış hücreler için bu çalışmayı henüz yapmadığımızdan elde edilen AFM verilerindeki heterojenliğin kaynağı biyopolimerlerin yoğunluğu ve/veya çeşitliliğine bağlı olabilir.

Biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücreleri için en yüksek heterojenlik ve/veya adhezyon kuvvetlerinin en geniş dağılımı sırasıyla statik sistemde büyütülen biyofilm kültürüne 2.5 mM toksik SNP, 0.5 μ M SNP ve 50 μ M SNP eklendiğinde elde edilen hücreler için gözlenmiştir. Planktonik hücreler ile statik sistemde 5 μ M SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış hücrelerin adhezyon kuvvetlerindeki heterojenliğinin ise çok benzer olduğu görülmüştür. Dolayısıyla statik sistemde 0.5 μ M, 50 μ M ve 2.5 mM ilave SNP konsantrasyonlarında biyofilmden dağılan bakteri hücrelerinin, araştırılan diğer hücre gruplarına kıyasla yüzeylerinin daha yüksek oranda veya çeşitlikte adhezif biyopolimerlerle kaplı olduğu söylenebilir. Bunun sebebinin de içerdikleri c-di-GMP miktarlarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Statik sistemde *B. subtilis* biyofilmlerinin dağılımında sadece 5 μ M SNP'nin etkisi incelenmiştir. Sonuçlarımıza göre, planktonik *B. subtilis* hücrelerinin AFM adhezyon kuvveti verilerindeki heterojenlik, statik sistemde 5 μ M SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış hücreler için bulunan heterojenliğe göre oldukça yüksektir. Planktonik *B. subtilis* hücrelerinin yüzeyinin biyofilmden-dağılmış muadillerine kıyasla daha yüksek oranda adhezif biyopolimerlerle, özellikle de hücre duvarı ilişkili teikoik asitlerle, kaplı olduğu söylenebilir (Aspar, 2021).

AFM kuvvet verilerindeki yüksek heterojenlik yüksek adhezyon kuvveti değerleriyle sonuçlanmıştır. *E. coli* için, en yüksek ortalama ve medyan adhezyon kuvveti değerleri veya en yüksek adhezyon kapasitesi sırasıyla statik sistemde büyütülen biyofilm kültürüne 2.5 mM toksik SNP, 0.5 μ M SNP ve 50 μ M SNP eklendiğinde elde edilen biyofilmden-dağılmış hücreler için gözlenmiştir. Planktonik hücreler ile statik sistemde 5 μ M SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerinin adhezyon kuvveti değerleri arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. *B. subtilis* planktonik hücrelerinin ise statik sistemde 5 μ M SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış *B. subtilis* hücrelerine kıyasla çok daha yüksek adhezyon kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.

E. coli üzerinde statik sistemde yapılan çalışmalarımız ve istatistiksel karşılaştırmalar, adhezyon kuvvetlerinde gözlenen heterojenliğin ve elde edilen kuvvet değerlerindeki farklılıkların biyofilm kültürlerine eklenen nitrik oksit (NO)-donörü sodyum nitroprussid (SNP) konsantrasyonuna bağlı olduğunu göstermiştir. Literatürde SNP ilavesiyle biyofilm dağılımının gerçekleştiğini rapor eden çalışmalarda farklı ortamlar ve koşullarda farklı bakteriyel biyofilmler oluşturulmuş ve farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesiyle biyofilm dağılımları gerçekleştirilmiştir (Barraud vd. 2006; Barraud vd. 2009a, 2009b; Chua vd., 2014; Howlin vd., 2017). Ancak bu çalışmalarda biyofilm oluşum sürecinin ilk basamağı olan, biyofilmden dağılan hücrelerin yüzeylere nano-ölçekteki

adhezyonu veya farklı SNP konsantrasyonlarının biyofilmden-dağılmış bakteriyel hücrelerin adhezif özelliklerine etkisi araştırılmamıştır.

SNP'nin biyofilm dağılımını gerçekleştirmesi NO üretimi yoluyla olmaktadır. NO'nun biyofilm içinde bulunan bakteriyel hücrelerin c-di-GMP seviyelerini düşürerek biyofilm dağılımını tetiklediği rapor edilmiştir. Bu mekanizmanın nasıl olduğu *P. aeruginosa* üzerinde çalışılmış ve NO'nun c-di-GMP'yi ayrıştıran spesifik fosfodiesterazları (PDE) aktive ettiği bulunmuştur (Barraud vd., 2006, 2009a). Benzer NO-c-di-GMP etkileşim mekanizmalarının diğer bakteri türlerinde de olabileceği düşünülmektedir. *P. aeruginosa* planktonik bakterilerinin 2 saat boyunca SNP ilaveli besiyerlerinde (0.5 μ M, 5 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarda) büyütüldükten sonra, SNP ilavesiz besiyerinde büyütülen hücrelere kıyasla, c-di-GMP değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Aynı çalışmada dinamik sistemde büyütülmüş *P. aeruginosa* biyofilmlerinin 1 saat boyunca 5 μ M SNP'ye maruz bırakılması biyofilmlerin c-di-GMP miktarlarında (kontrol grubuna göre) düşüşe yol açmıştır (Barraud vd., 2009a). Chua vd. (2014)'nin yaptığı çalışmada ise, dinamik sistemde 48 saat boyunca büyütülen *P. aeruginosa* biyofilmlerinin 5 saat veya 24 saat boyunca 5 μ M SNP'li besiyerinde inkübasyonu sonucunda biyofilmden dağılan hücrelerin c-di-GMP miktarlarında planktonik hücrelere kıyasla düşüş tespit edilmiştir. Aynı çalışmada biyofilmden dağılan hücrelerin planktonik hücrelere göre daha farklı fizyolojide olduğu ve bu fizyolojinin biyofilm dağılımını sağlayan ajanın ortamda bulunmasıyla yani NO üretiminin devam etmesiyle korunduğunu bildirmişlerdir.

Statik sistemde incelediğimiz tüm koşullarda biyofilm dağılımı, biyofilmlerin SNP içeren besiyerlerinde 37 °C'de 24 saat inkübasyonu ile gerçekleşmiştir. Biyofilm dağılımı 5, 12 ve 24 saat inkübasyon sürelerinde takip edilmiştir. Biyofilmlerin SNP'li besiyerinde 5 saat inkübasyonundan sonra dağılma gözlenmemiş, 12 saat inkübasyonundan sonra dağılmanın başladığı (besiyerlerinde bulanıklaşma görülmesi), 24 saat sonunda ise gözle görülür şekilde biyofilm halkalarında kontrol grubuna göre azalma/dağılma gerçekleşmiştir. Dolayısıyla biyofilmden dağılan hücrelerin kuyucuklar içinde SNP'li besiyerlerinde en azından 12 saat boyunca kaldığı, bu süre içinde büyümeye/çoğalmaya devam ettiği ve popülasyon arttıkça da besinlerin tükenmeye başlaması ile açlık stresine girmiş olabilecekleri düşünülmektedir. *E. coli*'nin besin kaynakları tükendiğinde çeşitli adhezif biyopolimerler üreterek biyofilm moduna geçmeye hazırlandığı ve biyofilm moduna geçerken de c-di-GMP miktarının arttığı rapor edilmiştir (Hengge, 2011; Povolotsky vd., 2012). *E. coli*'nin strese karşı verdiği tepkilerin ve dolayısı ile içerdiği c-di-GMP miktarının bulunduğu büyüme fazına göre değiştiği de bildirilmiştir (Hengge, 2011; Povolotsky vd., 2012). Ayrıca benzer şekilde, açlığa maruz bırakılan

Myxococcus xanthus hücrelerinin de zamanla c-di-GMP miktarlarının arttığı tespit edilmiştir. Örneğin, 12 saatlik açlık *M. xanthus* bakterisinde yaklaşık 20 pmol/mg c-di-GMP birikimine yol açarken, 48 saatlik açlık yaklaşık 100-120 pmol/mg c-di-GMP birikimine yol açmıştır (Skotnicka vd., 2016). Açlık stresi gibi stres koşulları altında hücrelerin biyofilm moduna girmeleri bir çeşit korunma güdüsü olarak da düşünülebilir. Benzer şekilde biyoofilmin olduğu ortamda yeterli besin kalmadığı durumda yani açlık stresinin etkisiyle biyofilmden hücreler dağılıp daha elverişli ortamlara da kaçabilirler. Aynı stres unsurları karşısında kalan planktonik, biyofilmden-dağılmış veya biyofilm hücreleri c-di-GMP seviyelerini ayarlayarak planktonik formdan biyofilm formuna, biyofilm formundan ara-form olan biyofilmden-dağılmış forma (fizyolojik olarak planktonik hücrelerden farklı olduklarından yeni ve farklı bir form oldukları düşünülmektedir (Chua vd., 2014)) ve sonrasında tekrar planktonik forma geçiş yapabilirler.

24 saatlik inkübasyon boyunca SNP'nin yatışkın durumda NO üretimine devam ettiği düşünülmektedir. Kullanılan SNP konsantrasyonundan yaklaşık 1000 kat düşük konsantrasyonda NO üretimi gerçekleştiği önceki çalışmalarda gözlenmiştir (Barraud vd., 2009a, 2009b; Bradley vd., 2015). Ancak bu çalışmalar, NO'nun mikrosensör ile tespit edilebilmesi adına, yüksek konsantrasyonlarda SNP kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bradley vd. (2015)'nin çalışmasında PBS (pH 7.4) içinde 100 μM SNP'nin üç günlük NO üretim profili gözlenmiştir. Birinci gün 100 μM SNP'nin yatışkın durumda yaklaşık 70 nM NO ürettiği, ikinci gün 61 nM, üçüncü gün ise 64 nM ürettiği belirtilmiştir. Ayrıca benzer şekilde 200 ve 300 μM SNP'nin yatışkın durumda ve yaklaşık 1000 kat düşük konsantrasyonda NO ürettiği aynı çalışmada gözlenmiştir. Ancak 0.5 μM veya 5 μM gibi çok düşük SNP konsantrasyonlarında NO salınım profillerini inceleyen çalışmalar bulunmamaktadır.

Yukarıda sunulan bilgiler ışığında, 0.5 μM SNP'nin LB besiyerinde statik sistemde biyofilm dağılımına sebep olduğu, ancak dağılan hücrelerin kuyucuklar içinde kalma süresi boyunca 0.5 μM SNP'nin yeterli miktarda NO üretimini gerçekleştirmediği ve biyofilmden-dağılmış hücrelerin fizyolojik özelliklerini koruyamadığı düşünülmektedir. Yeterli NO'nun ortamda bulunmaması nedeniyle bu hücrelerin c-di-GMP seviyelerindeki düşüklüğün korunamadığı ve açlık stresinin etkisiyle de hücrelerin c-di-GMP seviyelerinde artış olduğu düşünülmektedir.

5 μM SNP'nin LB besiyerinde statik sistemde biyofilm dağılımına sebep olduğu ve dağılan hücrelerin kuyucuklar içinde kalma süresi boyunca yeterli miktarda (c-di-GMP degradasyonunu sağlayacak miktarda) NO'ya maruz kaldıkları ve fizyolojilerini korudukları, bu sebeple de (0.5 μM SNP'nin eklendiği durumda gözlenen aksine) c-di-GMP seviyelerindeki düşüşün korunduğu

düşünülmektedir. Açlık stresi bu koşul için de geçerlidir ve bu stresin etkisiyle hücrelerin c-di-GMP seviyelerinin, açlığın görülmediği geç ekspanansiyel fazdan alınmış planktonik hücrelerin c-di-GMP seviyelerine kıyasla, az da olsa yüksek olduğu düşünülmektedir.

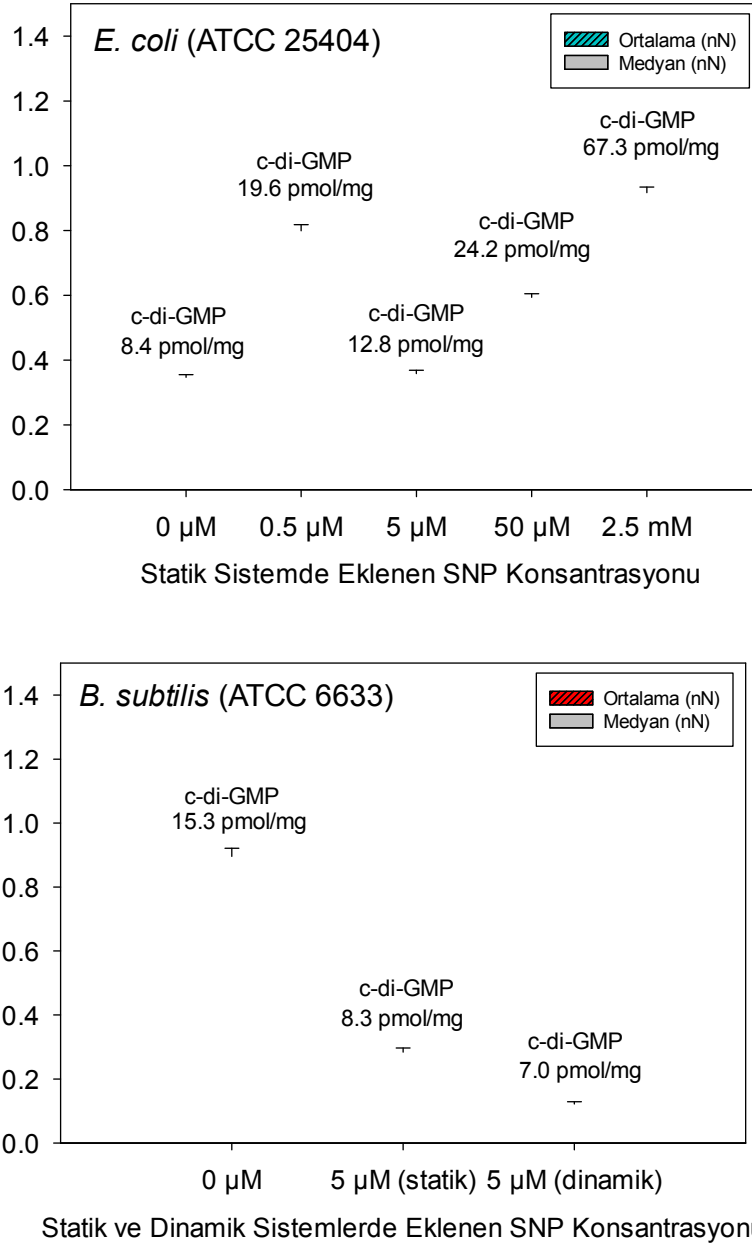
50 μ M SNP'nin LB besiyerinde statik sistemde biyofilm dağılımına sebep olduğu ve dağılan hücrelerin kuyucuklar içinde kalma süresi boyunca fazla miktarda NO'ya maruz kaldıkları ve belki de nitrosatif strese girdikleri düşünülmektedir. Özellikle *E. coli*'de gözlenen stres unsurlarının biyofilm moduna geçişi yani c-di-GMP miktarlarını artırdığı düşünülürse, nitrosatif stres ve açlık stresiyle birlikte bu hücrelerin c-di-GMP miktarlarında artış görüldüğü söylenebilir.

2.5 mM SNP konsantrasyonunun belirgin bir şekilde biyofilm oluşumunu artırdığı gözlenmiştir. Biyofilm dağılımı için önerilen nanomolar veya mikromolar seviyesinde "toksik-olmayan" konsantrasyon aralığında olmadığından, "toksik" SNP konsantrasyonu olarak etkilerini görmek amacıyla çalışmamızda kullanılmıştır. 2.5 mM toksik SNP kullanıldığında biyofilm artışı görülmüş ancak az miktarda dağılan hücrelere de rastlanmıştır. Bu hücrelerin kuyucuklar içinde kalma süresi boyunca aşırı miktarda NO'ya maruz kaldıkları, nitrosatif strese girdikleri, belki bunun yanında toksisiteden kaynaklı başka stres unsurlarının da hücre içindeki spesifik enzimleri aktive ettiği (Barraud vd., 2006; Hengge, 2011) ve açlık stresinin de etkisiyle hücrelerin aşırı miktarda c-di-GMP ürettiği düşünülmektedir.

B. subtilis için statik sistemde 5 μ M SNP'nin TSB besiyerinde biyofilm dağılımına sebep olduğu ve dağılan hücrelerin c-di-GMP miktarının planktonik hücrelerden daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum *E. coli*'de (5 μ M SNP eklendiği durumda) olduğu gibi dağılan *B. subtilis* hücrelerinin kuyucuklar içinde kalma süresi boyunca yeterli miktarda NO'ya maruz kaldıkları ve fizyolojilerini korudukları, bu sebeple de c-di-GMP seviyelerindeki düşüşün korunduğu şeklinde yorumlanabilir. NO'nun *B. subtilis* büyüme hızı üzerindeki etkisi daha önce test edilmiş ve toksik-olmayan NO konsantrasyonlarında *B. subtilis* hücrelerinin büyümelerini/çoğalmalarını askıya aldıkları tespit edilmiştir (Moore vd., 2004). Dolayısı ile dağılan hücre popülasyonu için ortamda yeterli besin olduğu veya açlık stresinin olmadığı bu sebeple de dağılan hücrelerin c-di-GMP miktarının planktonik hücrelere kıyasla (düşük dozda NO'ya maruz kalmaları sebebiyle) oldukça düşük olduğu söylenebilir.

Biyofilm dağılımını kontrol etmenin yanı sıra, c-di-GMP'nin ayrıca bakteriyel yüzey adhezinlerini, ve ekzopolisakkarit matris malzemelerinin biosentezini uyararak bakteri adhezyonunda düzenleyici olarak görev yaptığı bilinmektedir. Başka bir ifadeyle, c-di-GMP, özellikle biyofilm

oluşum sürecinin ilk aşamasında bakterilerin yüzeylere tutunmasını sağlayacak yüzey biyopolimerlerinin oluşumunda ve EPS sentezinde önemli işlevlere sahiptir (Romling vd., 2013). Sonuçlarımız, bakterilerin içerdikleri yüksek c-di-GMP miktarının yüksek adhezyon kapasitesine yol açtığını, yüksek adhezyon kapasitesinin de AFM verilerindeki yüksek heterojenlikten kaynaklandığını göstermektedir (Şekil 25).



Şekil 25. AFM ile ölçülen bakteriyel adhezyon kuvvetinin biyofilm kültürüne eklenen SNP konsantrasyonu ve hücreSEL c-di-GMP miktarıyla ilişkisi. 0 μ M SNP, kontrol grubu olan planktonik hücreleri temsil etmektedir.

5.2 Dinamik Sistemde Büyütülen Biyofilmlerden Dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* Hücrelerinin Nano-ölçekteki Yüze Adhezyon Kapasitelerinin Dağılım için Kullanılan SNP Konsantrasyonu ve Hücre İçi c-di-GMP Miktarı ile İlişkisi

Dinamik sistemde *E. coli* biyofilmlerinin dağılımı için 0.5 μM ve 5 μM SNP konsantrasyonları, *B. subtilis* biyofilm dağılımı için ise sadece 5 μM SNP konsantrasyonu kullanılmıştır. Biyofilmlerin dağılımları 24 saat boyunca laminar akışta sisteme sürekli SNP ilaveli besiyeri geçirilmesi ile gerçekleştirilmiş ve dağılan hücreler elde edilmiştir. Dinamik sistemin (sürekli akış) statik ve/veya kesikli sistemden en büyük farkı bilindiği üzere sisteme sürekli taze besiyerinin verilmesidir. Çalışmamızda dinamik sistemde biyofilm dağılımı sisteme sürekli olarak SNP içeren besiyeri verilerek gerçekleştirilmiştir. Dolayısı ile atık şişesinde toplanan dağılmış hücrelere de yeni hücrelerle birlikte sürekli taze besiyeri ilavesi olmaktadır. Bu sebeple, incelediğimiz dinamik sistemde oluşan biyofilmden-dağılmış hücrelerin açlık stresine maruz kalmadıkları düşünülmektedir.

Dinamik sistemde biyofilmden 0.5 μM SNP ile dağılmış *E. coli* hücrelerinin AFM kuvvet verilerindeki heterojenliğin planktonik hücreler için elde edilen heterojenlikle benzer olduğu görülmüştür. Bu durum planktonik *E. coli* hücreleri ile dinamik sistemde 0.5 μM SNP ile biyofilmden-dağılmış hücrelerin yüzey biyopolimer yoğunluklarının ve çeşitliliğinin de benzer olduğu şeklinde yorumlanabilir. Adhezyon kuvvetleri ve c-di-GMP miktarları karşılaştırıldığında ise, planktonik ve 0.5 μM SNP ile dinamik biyofilmden dağılanların adhezyon piklerinin kuvvet değerleri arasında veya c-di-GMP miktarları arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür.

0.5 μM SNP'nin LB besiyerinde dinamik sistemde biyofilm dağılımına sebep olduğu, ancak dağılan hücrelerin atık şişesi içinde kalma süresi boyunca 0.5 μM SNP'nin yeterli miktarda NO üretimini gerçekleştirmediği, biyofilmden-dağılmış hücrelerin fizyolojik özelliklerini koruyamadığı ve planktonik hücre formuna girdiği düşünülmektedir. Chua vd. (2014) biyofilmden-dağılmış *P. aeruginosa* hücrelerinin ortamda dağıtıcı ajanın olmadığı durumda planktonik hücre moduna geri döndüğünü tespit etmiştir. Benzer bir durum *E. coli* için de geçerli olabilir.

Dinamik sistemde biyofilmden 5 μM SNP ile dağılmış *E. coli* hücrelerinin AFM kuvvet verilerindeki heterojenliğin planktonik hücreler için elde edilen heterojenliğe benzediği görülse de adhezyon kuvvetleri karşılaştırıldığında planktonik ve 5 μM SNP ilavesiyle dinamik biyofilmden dağılanların kuvvet verilerinin istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur. Dinamik sistemde 5 μM SNP eklendiğinde elde edilen biyofilmden-dağılmış hücrelerin ortalama ve medyan

adhezyon kuvveti değerleri de planktonik hücrelere kıyasla daha yüksek bulunmuştur, yani adhezyon kapasiteleri daha yüksektir.

5 μM SNP'nin LB besiyerinde dinamik sistemde biyofilm dağılımına sebep olduğu ve dağılan hücrelerin atık şişesi içinde kalma süresi boyunca yeterli miktarda NO'ya maruz kaldıkları ve fizyolojilerini korudukları, bu sebeple de planktonik hücrelerin c-di-GMP seviyesine kıyasla daha düşük seviyede c-di-GMP içerdikleri düşünülmektedir.

Dinamik sistemde biyofilmden 5 μM SNP ile dağılmış *B. subtilis* hücrelerinin ise AFM kuvvet verilerinde bir heterojenlik görülmemiştir. Yüzeyinin planktonik *B. subtilis* hücrelerine kıyasla çok daha az yoğunlukta biyopolimerle kaplı olduğu söylenebilir ve çok daha düşük adhezyon kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.

B. subtilis için dinamik sistemde 5 μM SNP'nin TSB besiyerinde biyofilm dağılımına sebep olduğu ve dağılan hücrelerin c-di-GMP miktarının, statik sistemde olduğu gibi, planktonik hücrelerden daha düşük olduğu görülmüştür (Şekil 25). Dağılan *B. subtilis* hücrelerinin atık şişesi içinde kalma süresi boyunca yeterli miktarda NO'ya maruz kaldıkları ve fizyolojilerini korudukları, bu sebeple de c-di-GMP seviyelerindeki düşüşün korunduğu şeklinde yorumlanabilir.

Dinamik sistemden elde ettiğimiz sonuçlarımız, statik sistemde olduğu gibi c-di-GMP miktarı, adhezyon kapasitesi ve AFM verilerindeki heterojenlik veya bakteriyel yüzey biyopolimer yoğunluğu/çeşitliliği arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Ancak dinamik sistemde 5 μM SNP ile biyofilmden-dağılmış hücrelerin c-di-GMP miktarının planktonik hücrelere kıyasla daha düşük olmasına rağmen, bu hücrelerin adhezyon kapasitesinin planktonik *E. coli* hücrelerinden yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum bakteriyel adhezyonun sadece c-di-GMP'ye bağlı biyopolimer üretimine ve yoğunluğuna değil, yüzey biyopolimerlerinin çeşitine ve dolayısı ile bakterilerin yüzey fizyokimyasal özelliklerine de bağlı olduğunu tekrar düşündürmektedir.

5.3 Planktonik ve 5 μM SNP İlavesiyle Statik ve Dinamik Sistemlerde Büyütülen Biyofilmlerden Dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* Hücrelerinin Yüzey Fizyokimyasal Özellikleri ve Spesifik Adhezyon Kuvvetlerinin Toplam Adhezyon Kapasiteleri ile İlişkisi

Elde ettiğimiz bulgularımıza göre planktonik hücrelere kıyasla 5 μM SNP ile biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerinin yüzeyinin daha yüksek hidrofobik özellik gösterdiği bulunmuştur. En yüksek hidrofobisite veya en düşük yüzey polaritesi dinamik sistemde büyütülen biyofilmden 5 μM SNP ile dağılmış *E. coli* hücreleri için gözlenmiştir. Bu durum yüzeyinde bulunan LPS'lerin diğer koşullara göre daha fazla olduğu şeklinde yorumlanabilir. LPS'lerin tekrarlayan birimlerinin miktarı ve üç boyutlu yapı gibi özellikleri bakteri adhezyonunu büyük ölçüde etkiler. Bununla birlikte, LPS'ler, yapısının dışında, hücrenin arayüz enerjisi, hidrofobisite ve elektrostatik yük gibi fizyokimyasal özellikleri üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir (Atabek ve Camesano, 2007). LPS, büyük hidrofobik lipid A ve hidrofilik oligosakkarit ve polisakkarit (O-antijen) içeren bir makromoleküldür. LPS miktarının artmasıyla bakterilerin yüzey hidrofobisiteilerinin de arttığı gözlenmiştir. Ayrıca LPS moleküllerinin *E. coli* adhezyon kapasitesini de arttırdığı AFM çalışmalarıyla tarafımızdan gözlenmiştir (Aspar, 2021).

B. subtilis için ise, en yüksek hidrofobisite anlamına gelen en düşük polarite 5 μM SNP ile statik biyofilmden-dağılmış *B. subtilis* hücreleri için bulunmuştur. Bu hücre grubu için hidrofobisite ve adhezyon kapasitesi arasında beklenen pozitif ilişki gözlenmemiştir.

Sonuçlarımız biyofilmden-dağılmış bakterilerin planktonik muadillerine kıyasla farklı adhezif özellik gösterdiğini ve farklı hidrofobisitelere sahip olduklarını, dolayısıyla farklı çeşitlikte ve/veya miktarda adhezif yüzey biyopolimeri ihtiva ettiklerini işaret etmektedir.

Biyofilmden-dağılmış ve planktonik hücrelerin biyofilm oluşturma yeteneklerindeki varyasyonların, hücre yüzeyi heterojenlikleri ve fizyokimyasal yüzey özelliklerindeki varyasyonlarla ilişkili olabileceği daha önce literatürde belirtilmiştir. Berlanga vd. (2017) hepsi Gram-negatif olan, klinik, endüstriyel veya çevre açısından önemli ve farklı kökenden bakterileri (*A. baumannii*, *Klebsiella oxytoca*, *Halomonas venusta* ve *P. aeruginosa*) aljinat boncuklar üzerine immobilize ederek besiyeri içinde 24 saat inkübe etmiş ve biyofilmler oluşturmuş, biyofilm-dağıtıcı ajan kullanmadan doğal olarak açlık stresi nedeniyle 24 saat sonunda biyofilmden-dağılmış hücreleri elde etmiş ve bu hücreleri statik koşulda 96 kuyulu mikropalakalarda 1 saat inkübe ederek oluşturdukları biyofilm miktarlarını incelemiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre dağılan hücrelerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin planktonik



muadillerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada dağılan ve planktonik hücrelerin çeşitli çözücülere olan affiniteleri incelenmiş ve yüzey fizyokimyasal özellikleriyle bağlantı kurulmaya çalışılmıştır. Buna göre dağılmış hücrelerin planktonik hücrelere kıyasla daha fazla hidrofobik özelliğe sahip oldukları sonucuna varmışlardır.

Projeden elde ettiğimiz sonuçlarımız literatürdeki bilgileri desteklemekte olup, statik ve dinamik sistemlerde oluşan biyofilmlerden-dağılmış Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriyel hücrelerin ele alınmış olmasıyla çok daha kapsamlı ve kantitatif bilgiler sunmaktadır.

Spesifik etkileşimler olarak da tanımlanan kısa menzilli moleküler etkileşimler, hücre ile yüzey arasındaki mesafe 1 nm'nin (moleküler temas mesafesi) altına düştüğünde etkilidir. Bu etkileşimler sistemimizde hidrojen bağlarının kuvvetlerini temsil etmektedir. Detaylı Poisson analizleri sonucunda incelenen her grup için bakterilerin silikon nitrat yüzeyine ilk tutunmasında etki eden spesifik hidrojen bağı kuvvetlerinin spesifik-olmayan fizyokimyasal kuvvetlerden daha etkili olduğu görülmüştür (Tablo 4). Bu durum incelediğimiz planktonik ve biyofilmden-dağılmış bakterilerin yüzey biyopolimerleri aracılığıyla yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanıp biyofilm oluşturabileceğini ve bunu da öncelikle hidrojen bağlarıyla gerçekleştirebileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

AFM ile ölçülen ve Poisson analizleri ile bileşenlerine ayrıştırılan adhezyon kuvvetleri değerleri bakterilerin yüzeyinde bulunan çeşitli adhezif biyopolimerler ile silikon nitrat AFM ucu arasında su içerisinde gerçekleşen adhezyon olayının şiddetini/gücünü temsil etmektedir. Bakterilerin yüzeyinde bulunan biyopolimer çeşitliliği veya miktarı/yoğunluğu fazlaysa adhezyon kuvvetlerinin olasılık dağılımlarının heterojenliği de fazla olacaktır. Bakteri yüzeyinde bulunan bazı spesifik biyopolimerlerin ya da molekül gruplarının diğer moleküler gruplara kıyasla adhezyonu hidrojen bağlarıyla domine ettiği düşünülmektedir. Sonuçlarımız biyofilmden-dağılmış bakterilerin planktonik muadillerine kıyasla farklı adhezif özellik gösterdiğini ve farklı hidrofobisitelere sahip olduklarını, dolayısıyla farklı çeşitlikte ve/veya miktarda adhezif yüzey biyopolimeri ihtiva ettiklerini işaret etmektedir.

Statik sistemde biyofilmden-dağılmış *E. coli* hücrelerinin adhezyon kapasitelerinin ve yüzey heterojenliklerinin ilave edilen SNP konsantrasyonuna bağlı olduğu gözlenmiştir. Özellikle 0.5 μM ve 2.5 mM (toksik) konsantrasyonlarda SNP kullanımının biyofilmden-dağılmış hücrelerin moleküler adhezyonunda ve c-di-GMP miktarlarında önemli artışlara neden olduğu görülmüştür. Ancak statik sistemde 5 μM SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış *E. coli* ve *B. subtilis* hücrelerinin adhezyon kapasitelerinin ve c-di-GMP miktarlarının planktonik hücrelerinkine benzer veya düşük olduğu bulunmuştur. Açlık stresinin de olduğu statik bir sistemde biyofilmleri SNP gibi NO-donörü ajanlar yoluyla hedef alan bir stratejide kullanılacak NO-donörü konsantrasyonu önem taşımaktadır. Hem biyofilm dağılım oranına hem de açığa çıkan biyofilmden-dağılmış hücrelerin adhezyon kapasitelerine bakacak olursak, statik sistemde 5 μM SNP ilavesinin *E. coli* ve *B. subtilis* biyofilm dağılımları için kullanılabilir optimum konsantrasyon olduğu görülmüştür.

Açlık stresinin olmadığı sürekli akışın gözleendiği bir sistemde biyofilmlerin dağılmasını SNP gibi NO-donörü ajanlar yoluyla hedef alan bir stratejide kullanılacak NO-donörü konsantrasyonunun optimizasyonu da oldukça önemli gözükmektedir. Sonuçlarımız düşük doz 5 μM SNP ile üretilen yaklaşık 1000 kat düşük konsantrasyonda NO'nun dağılan *E. coli* hücrelerinin fizyolojilerini korumalarına olanak sağladığını ve planktonik muadillerine kıyasla daha adhezif dağılmış hücrelerin ortama salındığını ve bu hücrelerin daha hidrofobik olduğunu göstermiştir. Ayrıca 0.5 μM SNP ilavesiyle sağlanan *E. coli* biyofilm dağılım oranının, 5 μM SNP'ye kıyasla daha az olmasına rağmen, dağılan hücrelerin fizyolojik özelliklerini koruyamayıp tekrar planktonik forma dönüşmeleri ve planktonik adhezif özellik göstermeleri sebebiyle dinamik sistemde biyofilm dağılımı için optimum konsantrasyon olarak 0.5 μM SNP kullanılabilirliği görülmüştür.

Sürekli akışın gözlemlendiği durumda, statik sistemde olduğu gibi, 5 μ M SNP ilavesiyle açığa çıkan NO'nun *B. subtilis* biyofilmini dağıtabildiği, dağılan hücrelerin fizyolojik özelliklerini koruduğu ve planktonik hücrelere kıyasla daha düşük adhezyon kapasitelerine sahip oldukları görülmüştür. Ancak her iki sistemde de *B. subtilis*'in açlık stresine maruz kalmadığı düşünülmektedir. Açlık stresi gibi önemli bir stres unsuru olduğunda bu hücrelerin de biyofilm moduna geçiş için bir hazırlık olan yüzey biyopolimer üretimlerini artırıp daha yüksek adhezyon kapasitelerine sahip olabilecekleri düşünülmektedir. Ayrıca *B. subtilis* için de farklı konsantrasyonlarda biyofilm kültürlerine eklenen SNP'nin veya üretilen NO'nun biyofilmden-dağılmış hücrelerin adhezif özelliklerine etkisinin araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Böylece *E. coli* için elde edilen tüm bulguların karşılaştırılması *B. subtilis* için de yapılabilecek ve büyük resim çok daha net görülebilecektir.

Literatürde biyofilm dağılımını konu alan çalışmalar biyofilm oluşumunun çok fazla görüldüğü Gram-negatif bakteriler üzerine ve özellikle klinik öneme sahip *P. aeruginosa* üzerine yoğunlaşmıştır. Gram-pozitif bakteriler üzerinde kısıtlı çalışmalar olduğundan *B. subtilis* üzerinde elde ettiğimiz bulgularımızın ayrıca önemli olduğu düşünülmektedir. Özellikle çoklu antibiyotik direnci olan, yüksek oranda ölümlerle sonuçlanan pek çok gıda ilişkili salgına yol açan ve neredeyse her ortamda üreyip biyofilm oluşturabilen, üzerinde uzun zamandır çalıştığım Gram-pozitif patojen *Listeria monocytogenes* biyofilmlerinin dağılımının da araştırılması ve *B. subtilis* için elde edilen bulgularla karşılaştırılması planlanmaktadır.

Çalışmamızın belki de en önemli sonucu; NO-donörü ajan yoluyla Gram-negatif bakteriyel biyofilm dağılımını hedef alan bir stratejinin etkisinin kullanılacak NO-donörü ajanın konsantrasyonuna bağlı olduğu ve bu konsantrasyonun optimizasyonu yapılırken sadece biyofilm dağılım miktarı veya kalan biyofilm miktarının değil, aynı zamanda dağılan bakterilerin adhezyon kapasitelerinin de hesaba katılması gerektiğidir. Ayrıca biyofilmlerle mücadelede NO-donörü ajanın konsantrasyonunun optimizasyonuna ek olarak, hidrojen bağlarını da hedef alan bir stratejinin geliştirilmesinin önemli olduğu gösterilmiştir. Projeden elde edilen sonuçların biyofilmlerle mücadelede yeni ve daha etkili stratejilerin geliştirilmesine büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Allan, J. T., Yan, Z., Genzlinger, L. L., Kornacki, J. L. 2004. "Temperature and biological soil effects on the survival of selected foodborne pathogens on a mortar surface", *Journal of Food Protection*, 67, 2661–2665.
- Anderson, J. K., Huang, J. Y., Wreden, C., Sweeney Goers, E. Goers, J., Remington, S. J., Guillemin, K. 2015. "Chemorepulsion from the quorum signal autoinducer-2 promotes *Helicobacter pylori* biofilm dispersal", *mBio*, 6, e00379.
- Archibald, A. R., Glassey, K., Green, R.S., Lang, W. K. 1989. "Cell wall composition and surface properties in *Bacillus subtilis*: anomalous effect of incubation temperature on the phage-binding properties of bacteria containing varied amounts of teichoic acid", *Journal of General Microbiology*, 135, 667-673.
- Aspar, G. N. 2021. "Role of Growth Phase in Physiochemical properties and Adhesion Capacities of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* Cells at the Nano- and Macro-Scales", Yüksek Lisans Tezi, İzmir Ekonomi Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İzmir.
- Atabek, A., Camesano, T. A. 2007. "Atomic force microscopy study of the effect of lipopolysaccharides and extracellular polymers on adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of bacteriology*, 189, 8503-8509.
- Barraud, N., Hassett, D. J., Hwang, S.-H., Rice, S. A., Kjelleberg, S., Webb, J. S. 2006. "Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of Bacteriology*, 188, 7344–7353.
- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J. S., Hassett, D. J., Rice, S. A., Kjelleberg, S. 2009a. "Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal", *Journal of Bacteriology*, 191, 7333–7342.
- Barraud, N., Storey, M. V., Moore, Z. P., Webb, J. S., Rice, S. A., Kjelleberg, S. 2009b. "Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms", *Microbial Biotechnology*, 2, 370–378.
- Barraud, N., Kelso, M. J., Rice, S. A., Kjelleberg, S. 2015. "Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases" *Curr. Pharm. Des.*, 21, 31-42.
- Becker, S. C., Roach, D. R., Chauhan, V. S., Shen, Y., Foster-Frey, J., Powell, A. M., Bauchan, G., Lease, R. A., Mohammadi, H., Harty, W. J., Simmons, C., Schmelcher, M., Camp, M., Dong, S., Baker, J. R., Sheen, T. R., Doran, K. S., Pritchard, D. G., Almeida, R. A., Nelson, D. C., Marriott, I., Lee, J. C., Donovan, D. M. 2016. "Triple-acting lytic enzyme treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*", *Scientific Reports*, 6, 25063.
- Berlanga, M., Gomez-Perez, L., Guerrero, R. 2017. "Biofilm formation and antibiotic susceptibility in dispersed cells versus planktonic cells from clinical, industry and environmental origins", *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110, 1691-1704.
- Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C. 1986. "Atomic force microscope", *Physical Review Letters*, 56, 930.

- Blanchette, K. A., Wenke, J. C. 2018. "Current therapies in treatment and prevention of fracture wound biofilms: why a multifaceted approach is essential for resolving persistent infections", *Journal of Bone and Joint Infection*, 3, 50-67.
- Boonaert, C. J. P., Rouxhet, P. G., Dufrene, Y. F. 2000. "Surface properties of microbial cells probed at the nanometer scale with atomic force microscopy", *Surface and Interface Analysis*, 30, 32–35.
- Bosgelmez-Tinaz, G., Ulusoy, S., Ugur, A., Ceylan, O. 2007. "Inhibition of quorum sensing-regulated behaviors by *Scorzonera sandrasica*", *Current Microbiology*, 55, 114-118.
- Bradley, S. A.; Steinert, J. R. 2015. "Characterisation and comparison of temporal release profiles of nitric oxide generating donors", *Journal of Neuroscience Methods*, 245, 116-124.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Kjelleberg, S. 2006. "Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms", *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3916-3923.
- Busscher, H. J., Norde, W., van der Mei, H. C. 2008. "Specific molecular recognition and nonspecific contributions to bacterial interaction forces", *Applied Environmental Microbiology*, 74, 2559–2564.
- Camesano, T. A., Abu-Lail, N. I. 2002. "Heterogeneity in bacterial surface polysaccharides, probed on a single-molecule basis", *Biomacromolecules*, 3, 661–667.
- Chen, Y. Y., Wu, C. C., Hsu, J. L., Peng, H. L., Chang, H. Y., Yew, T. R. 2009. "Surface rigidity change of *Escherichia coli* after filamentous bacteriophage infection", *Langmuir*, 25, 4607–4614.
- Christensen, L. D., van Gennip, M., Rybtke, M. T., Wu, H., Chiang, W.C., Tolker-Nielsen, T. 2013. "Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* foreign-body biofilm infections through reduction of the cyclic Di-GMP level in the bacteria", *Infection and Immunity*, 81, 2705–2713.
- Chua, S. L., Liu, Y., Yam, J. K. H., Chen, Y., Vejborg, R. M., Tan, B. G. C., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Yang, L. 2014. "Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles", *Nature Communications*, 5, 4462.
- Chua, S. L., Hultqvist, L. D., Yuan, M., Rybtke, M., Nielsen, T. E., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Yang, L. 2015. "In vitro and in vivo generation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-dispersed cells via c-di-GMP manipulation", *Nat Protoc.*, 8, 1165-80.
- Colville, K., Tompkins, N., Rutenberg, A. D., Jericho, M. H. 2010. "Effects of poly(L-lysine) substrates on attached *Escherichia coli* bacteria", *Langmuir*, 26, 2639–2644.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. 1995. "Microbial Biofilms", *Annual Review of Microbiology*, 49, 711-745.
- Dario, A. F., de Paula, R.C.M., Paula, H.C.B., Feitosa, J.P.A., Petri, D.F.S. 2010. Effect of solvent on the adsorption behavior and on the surface properties of *Sterculia striata* polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 81, 284–290.

- Das, T., Sharma, P. K., Krom, B. P., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. 2011. "Role of eDNA on the adhesion forces between *Streptococcus mutans* and substratum surfaces: influence of ionic strength and substratum hydrophobicity", *Langmuir*, 27, 1011310118.
- Davies, D. 2003. "Understanding biofilm resistance to antibacterial agents", *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 114–122.
- Deliorman, M., Gordesli Duatepe, F. P., Davenport, E. K., Fransson, B. A., Call, D. R., Beyenal, H., Abu-Lail, N. I. 2019. "Responses of *Acinetobacter baumannii* Bound and Loose Extracellular Polymeric Substances to Hyperosmotic Agents Combined with or without Tobramycin: An Atomic Force Microscopy Study", *Langmuir*, 35, 9071-9083.
- Díaz, C., Schilardi, P. L., Salvarezza, R. C., Fernández Lorenzo de Mele, M. 2011. "Have flagella a preferred orientation during early stages of biofilm formation?: AFM study using patterned substrates", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82, 536–542.
- Di Martino, P. 2018. "Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype", *AIMS microbiology*, 4, 274-288.
- Donlan, R. M. 2002. "Biofilms: Microbial Life on Surfaces", *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881–890.
- Dorobantu, L. S., Bhattacharjee, S., Foght, J. M., Gray, M. R. 2009. "Analysis of force interactions between AFM tips and hydrophobic bacteria using DLVO theory", *Langmuir*, 25, 6968–6976.
- Driks A. 1999. "Bacillus subtilis spore coat", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 1-20.
- Dufrêne, Y. F. 2004. "Using nanotechniques to explore microbial surfaces", *Nature Reviews Microbiology*, 2, 451–460.
- Dupres, V., Menozzi, F. D., Locht, C., Clare, B. H., Abbott, N. L., Cuenot, S., Bompard, C., Raze, D., Dufrêne, Y. F. 2005. "Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria", *Nature Methods*, 2, 515–520.
- Fabbri, S., Johnston, D. A., Rmaile, A., Gottenbos, B., De Jager, M., Aspiras, M., Starke, E. M., Ward, M. T., Stoodley, P. 2016. "Streptococcus mutans biofilm transient viscoelastic fluid behaviour during high-velocity microsprays", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 59,197-206.
- Fleming, D., Chahin, L., Rumbaugh, K. P. 2016. "Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e01998-16.
- Fleming, D., Rumbaugh, K. P. 2017. "Approaches to Dispersing Medical Biofilms", *Microorganisms*, 5, 15.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Griegbe, T., Mayer, C. 2000. "Physico-chemical properties of biofilms", *Harwood Academic Publishers*, 19-34.
- Flemming, H. C., Wingender, J. 2010. "The biofilm matrix", *Nat. Rev. Microbiol.*, 8, 623-633.

Gaboriaud, F., Dufrêne, Y. F. 2007. "Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54, 10–19.

Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F. 2018. "Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods", *Frontiers in Microbiology*, 9, 898.

Gerber, C., Lang, H. P. 2006. "How the doors to the nanoworld were opened", *Nature Nanotechnology*, 1, 3-5.

Gordesli, F. P., Abu-Lail, N. I. 2012a. "Combined Poisson and soft-particle DLVO analysis of the specific and nonspecific adhesion forces measured between *L. monocytogenes* grown at various temperatures and silicon nitride", *Environmental Science and Technology*, 46, 10089-10098.

Gordesli, F. P., Abu-Lail, N. I. 2012b. "Impact of ionic strength of growth on the physiochemical properties, structure, and adhesion of *Listeria monocytogenes* polyelectrolyte brushes to a silicon nitride surface in water", *Journal of Colloid and Interface Science*, 388, 257-267.

Gordesli, F. P., Abu-Lail, N. I. 2012c. "The Role of Growth Temperature in the Adhesion and Mechanics of Pathogenic *L. monocytogenes*: An AFM Study", *Langmuir*, 28, 1360-1373.

Gordesli-Duatepe, F. P., Park, B. J., Kawas, L. H., Abu-Lail, N. I. 2020. "Atomic Force Microscopy Investigation of the Contributions of *Listeria monocytogenes* Cell-Wall Biomacromolecules to Their Adherence and Mechanics", *The Journal of Physical Chemistry B*, 124, 5872-5883.

Guilhen, C., Miquel, S., Charbonnel, N., Joseph, L., Carrier, G., Forestier, C., Balestrino, D. 2019. "Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells", *NPJ biofilms and microbiomes*, 5, 1-11.

Gutierrez, J. A., Crowder, T., Rinaldo-Matthis, A., Ho, M. C., Almo, S.C., Schramm, V. L. 2009. "Transition state analogs of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing", *Nature Chemical Biology*, 5, 251–257.

Hamadi, F., Latrache, H., Zahir, H., Elghmari, A., Timinouni, M., Ellouali, M. 2008. "The relation between *Escherichia coli* surface functional groups' composition and their physicochemical properties", *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 10-15.

Hayhurst, E. J., Kailas, L., Hobbs, J. K., Foster, S. J. 2008. "Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*", *PNAS*, 105, 14603-14608.

Hengge, R. 2011. "The General Stress Response in Gram-Negative Bacteria". *Bacterial Stress Responses*, Second Edition. Editor: Storz, G., Hengge, R. Washington, DC: ASM Press.

Howlin, R. P., Cathie, K., Hall-Stoodley, L., Cornelius, V., Duignan, C., Allan, R. N., Fernandez, B. O., Barraud, N., Bruce, K. D., Jefferies, J., Kelso, M., Kjelleberg, S., Rice, S. A., Rogers, G. B., Pink, S., Smith, C., Sukhtankar, P. S., Salib, R., Legg, J., Carroll, M., Daniels, T., Feelisch, M., Stoodley, P., Clarke, S. C., Connett, G., Faust, S. N., Webb, J. S. 2017. "Low-dose nitric oxide as targeted anti-biofilm adjunctive therapy to treat chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis", *Molecular Therapy*, 25, 2104–2116.

Israelachvili, J. N. 1992. *Intermolecular and Surface Forces*. New York: Academic Press.

- Kaplan, J. B. 2010. "Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses", *J. Dent. Res.*, 89, 205-218.
- Kaplan, J. B. 2014. "Biofilm matrix-degrading enzymes", *Methods in Molecular Biology*, 1147, 203–213.
- Katsu, T., Tsuchiya, T., Fujita, Y. 1984. "Dissipation of membrane potential of *Escherichia coli* cells induced by macromolecular polylysine", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 401–406.
- Koo, H., Raymond, N. A., Howlin, R. P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. 2017. "Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies", *Nature Reviews Microbiology*, 15, 740–755.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S. J. 2013. "Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era", *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3, a010306-a010306.
- Lauderdale, K. J., Malone, C. L., Boles, B. R., Morcuende, J., Horswill, A. R. 2010. "Biofilm dispersal of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on orthopedic implant material", *Journal of Orthopaedic Research*, 28, 55–61.
- Li, K., Whitfield, M., Van Vliet, K. 2013. "Beating the bugs: Roles of microbial biofilms in corrosion", *Corrosion Reviews*, 31, 73-84.
- Liu, S. B., Wei, L., Hao, L., Fang, N., Chang, M. W., Xu, R., Yang, Y. H., Chen, Y. 2009. "Sharper and Faster "Nano Darts" Kill More Bacteria: A Study of Antibacterial Activity of Individually Dispersed Pristine SingleWalled Carbon Nanotube", *ACS Nano*, 3891–3902.
- Liu, S., Ng, A. K., Xu, R., Wei, J., Tan, C. M., Yang, Y., Chen, Y. 2010. "Antibacterial action of dispersed single-walled carbon nanotubes on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* investigated by atomic force microscopy", *Nanoscale*, 2744-2750.
- Marino, M., Maifreni, M., Baggio, A., Innocente, N. 2018. "Inactivation of Foodborne Bacteria Biofilms by Aqueous and Gaseous Ozone", *Frontiers in Microbiology*, 9, 2024.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., Kjelleberg, S. 2011. "Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal", *Nat. Rev. Microbiol.*, 10, 39-50.
- Mertens, J., Cuervo, A., Carrascosa, J. L. 2019. "Nanomechanical detection of *Escherichia coli* infection by bacteriophage T7 using cantilever sensors", *Nanoscale*, 11, 17689-17698.
- Moore, C. M., Nakano, M. M., Wang, T., Ye, R.W., Helmann, J. D. 2004. "Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside", *J. Bacteriol.*, 186, 4655-64.
- Muñoz-Egea, M. C., García-Pedrazuela, M., Mahillo, I., García, M. J., Esteban, J. 2013. "Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented rapidly growing *Mycobacteria*", *Applied Environmental Microbiology*, 79, 1065–1067.
- Müller, D. J., Dufrene, Y. F. 2010. "Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology", In *Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals: World Scientific*, 269-277.

- Obst, M., Dittrich, M. 2005. "Living under an atomic force microscope", *Geobiology* 3, 179–193.
- Okshevsky, M., Regina, V. R., Meyer, R. L. 2015. "Extracellular DNA as a target for biofilm control", *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 73–80.
- Ördek, A., 2021. "Molecular Mechanisms of Adhesion of Planktonic and Biofilm-Dispersed *Escherichia coli* Cells to Silicon Nitride", Yüksek Lisans Tezi, İzmir Ekonomi Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İzmir.
- Park, B. J., Abu-Lail, N. I. 2011. The role of the pH conditions of growth on the bioadhesion of individual and lawns of pathogenic *L. monocytogenes* cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 358, 611–620.
- Park, B. J., Gordesli, F. P., Abu-Lail, N. I. 2014. "The role of pH conditions of growth in the specificity of interaction forces measured between pathogenic *L. monocytogenes* and silicon nitride", *Journal of Bionanoscience*, 8, 473–484.
- Petrova, O. E., Sauer, K. 2017. "High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP", *Methods in Molecular Biology*, 1657, 33–43.
- Pleszczynska, M., Wiater, A., Janczarek, M., Szczodrak, J. 2015. "(1,3)- α -D-Glucan hydrolases in dental biofilm prevention and control: a review", *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 761–778.
- Potthoff, E., Ossola, D., Zambelli, T., Vorholt, J. A. 2015. "Bacterial Adhesion Force Quantification by Fluidic Force Microscopy", *Nanoscale*, 7, 4070-4079.
- Povolotsky, T. L., Hengge, R. 2012. "Life-style control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP", *J. Biotechnol.*, 160, 10-6.
- Romling, U., Galperin, M. Y., Gomelsky, M. 2013. "Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger", *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 77, 1-52.
- Ruhal, R., De Winter, F., de Jonger, B., Xavier, B. B., Goossens, H., Singh, S. K., Malhotra-Kumar, S. 2019. "Comparison of biofilm dispersal approaches in *Pseudomonas aeruginosa* and evaluation of dispersed cells in acute infection mouse model", *bioRxiv*, 689646.
- Schaer-Zammaretti, P., Ubbink, J. 2003. "Imaging of lactic acid bacteria with AFM elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data", *Ultramicroscopy*, 97, 199–208.
- Skotnicka, D., Smaldone, G. T., Petters, T., Trampari, E., Liang, J., Kaefer, V., Malone, J. G., Singer, M., Søgaard-Andersen, L. 2016. "A Minimal Threshold of c-di-GMP Is Essential for Fruiting Body Formation and Sporulation in *Myxococcus xanthus*", *PLoS Genet.*, 23, e1006080.
- Serro, A. P. V., Fernandes, A. C., de J. Vieira Saramago, B. 1997. Dynamic interfacial behaviour of bovine serum albumin solutions on titanium surfaces. *Colloids and Surfaces A*, 125, 209–219.
- Spangler, C., Böhm, A., Jenal, U., Seifert, R., Kaefer, V. 2010. "A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate", *Journal of Microbiological Methods*, 81, 226–231.

- Srivastava, K.K., Siddique, I.H. 1973. Quantitative chemical composition of peptidoglycan of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 7, 700–703.
- Sternberg, C., Tolker-Nielsen, T. 2006. “Growing and analyzing biofilms in flow cells”, *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 1: Unit 1B.2.
- Stukalov, O., Korenevsky, A., Beveridge, T. J., Dutcher, J. R. 2008. “Use of atomic force microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules”, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5457–5465.
- Thompson, G. L., Reukov, V. V., Nikiforov, M. P., Jesse, S., Kalinin, S. V., Vertegel, A. A. 2012. “Electromechanical and elastic probing of bacteria in a cell culture medium”, *Nanotechnology*, 23, 245705.
- Tong, M., Long, G., Jiang, X., Kim, H. N. 2010. “Contribution of extracellular polymeric substances on representative gram negative and gram positive bacterial deposition in porous media”, *Environmental Science and Technology*, 44, 2393–2399.
- Touhami, A., Jericho, M. H., Boyd, J. M., Beveridge, T. J. 2006. “Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* pili by using atomic force microscopy”, *Journal of Bacteriology*, 188, 370–377.
- Vadillo-Rodriguez, V., Schooling, S. R., Dutcher, J. R. 2009. “In situ characterization of differences in the viscoelastic response of individual Gram-negative and Gram-positive bacterial cells”, *Journal of Bacteriology*, 191, 5518–5525.
- Van Houdt, R., Michiels, C. W. 2005. “Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation”, *Research in Microbiology*, 156, 626-633.
- Van Houdt, R., Michiels, C. W. 2010. “Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface”, *J. Appl. Microbiol.*, 109, 1117-1131.
- Walker, S. L., Redman, J. A., Elimelech, M. 2004. Role of cell surface lipopolysaccharides in *Escherichia coli* K12 adhesion and transport”, *Langmuir*, 20, 7736-7746.
- Wang, Y. K., Krasnopeevea, E., Lin, S. Y., Bai, F., Pilizota, T., Lo, C.-J. 2019. “Comparison of *Escherichia coli* surface attachment methods for single-cell microscopy”, *Nature Scientific Reports*, 9, 19418.
- Wood, T. K. 2009. “Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling”, *Environmental Microbiology*, 11, 1–15.
- Wu, S. 1971. “Calculation of interfacial tension in polymer systems”, *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*, 34, 19.
- Wu, Y.-K., Cheng, N.-C., Cheng, C.-M. 2019. “Biofilms in chronic wounds: pathogenesis and diagnosis”, *Trends in Biotechnology*, 37, 505-517.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., He, J. 2019. “Biofilms: The microbial protective clothing in extreme environments”, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3423.
- Zhao, G., Usui, M. L., Lippman, S. I., James, G. A., Stewart, P. S., Fleckman, P., Olerud, J. E. 2013. “Biofilms and Inflammation in Chronic Wounds”, *Advances in Wound Care*, 2, 389-399.



**Planktonik Ve Biyofilmden-Dağılmış Hücrelerin Yüzeyle
Adhezyon Kuvvetleri Ve Hücre Yüzeyi Fizyokimyasal Özellikleri**

Program Kodu:3501

Proje No:118M404

Proje Yürütücüsü:

Dr. Öğr. Üyesi FATMA PINAR GÖRDESLİ DUATEPE

Bursiyer(ler)

GAMZE NUR ASPAR

AYŞE ÖRDEK

HAZİRAN 2021

ANKARA

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Dr. Öğr. Üyesi FATMA PINAR GÖRDESLİ DUATEPE
Proje No:	118M404
Proje Başlığı:	Planktonik Ve Biyofilmden-Dağılmış Hücrelerin Yüzeyle Adhezyon Kuvvetleri Ve Hücre Yüzeyi Fizyokimyasal Özellikleri
Proje Türü:	3501 - Kariyer
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR EKONOMİ Ü. MÜHENDİSLİK F.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/11/2018 - 15/01/2021
Onaylanan Bütçe:	317572.0
Harcanan Bütçe:	290054.14
Öz:	<p>Biyofilm oluşumu, planktonik bakterilerin bir yüzeye nano-ölçekte adhezyonuyla başlayan ve biyofilmin dağılmasıyla tamamlanan gelişimsel bir süreçtir. Biyofilmden-dağılmış bakteriyel hücrelerin planktonik muadillerine kıyasla daha öldürücü özellik gösterip farklı fizyolojide olmaları, biyofilmden-dağılmış bakterilerin oluşturacağı yeni biyofilmlerle mücadelede farklı stratejilerin uygulanmasını gerekli kılmıştır. NO-donörü sodyum nitroprussid (SNP) kullanarak, c-di-GMP yolaklarının hedeflenmesi ve böylece biyofilm dağılımının sağlanması biyofilmlerle mücadelede yaygın olarak kullanılan etkili bir stratejidir. Bu sebeple, projede farklı konsantrasyonlarda SNP ilavesiyle statik ve dinamik sistemlerde büyütülen biyofilmlerden dağılmış Gram-negatif E. coli ve Gram-pozitif B. subtilis hücreleri ile planktonik muadillerinin su içinde silikon nitrat yüzeyine uyguladıkları adhezyon kuvvetleri atomik kuvvet mikroskopuyla (AFM) ölçülerek karşılaştırılmıştır. Buna göre statik sistemde 5 µM SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış E.coli ve B. subtilis hücrelerinin adhezyon kapasitelerinin planktonik hücrelerine benzer veya düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca statik sistemde biyofilmden-dağılmış E. coli hücrelerinin adhezyon kapasitelerinin ve yüzey heterojenliklerinin ilave edilen SNP konsantrasyonuna bağlı olduğu, özellikle 0.5 µM ve 2.5 mM (toksik) konsantrasyonlarda SNP kullanımının biyofilmden-dağılmış hücrelerin moleküler adhezyonunda ve c-di-GMP miktarlarında önemli artışlara neden olduğu görülmüştür. Dinamik sistemde 5 µM SNP ilavesiyle biyofilmden-dağılmış E. coli hücrelerinin adhezyon kapasitelerinin planktonik hücrelerden daha yüksek olduğu ve bu durumun yüzey hidrofobisiteleriyle ilişkili olduğu gözlenmiştir. Dinamik sistemde 5 µM SNP ile biyofilmden-dağılmış B. subtilis hücrelerinin adhezyon kapasiteleri, statik sistemde olduğu gibi, planktonik hücrelere kıyasla daha düşük bulunmuştur. Tüm koşullarda hücrelerin adhezyon kapasiteleri ile içerdikleri c-di-GMP miktarları arasında pozitif ilişki gözlenmiş, bu durumun da SNP ilavesiyle açığa çıkan NO konsantrasyonuna ve ortam koşullarına bağlı olarak değişen nitrosatif stres ve açlık stresine bağlı olabileceği düşünülmüştür. 5 µM SNP ilavesiyle biyofilmlerden dağılan hücrelerin planktonik hücrelere kıyasla daha hidrofobik oldukları ve bakteriyel adhezyonu spesifik hidrojen bağı kuvvetlerinin domine ettiği bulunmuştur. Projeden elde edilen sonuçların biyofilmlerle mücadelede daha etkili stratejilerin geliştirilmesine büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir.</p>

Abstract:	<p>Biofilm formation is a developmental process that begins with nano-scale adhesion of planktonic cells to a surface and is eventually completed by the dispersal of the biofilm. The fact that biofilm-dispersed cells are more lethal and have different physiology compared to their planktonic counterparts necessitated the application of different strategies to combat biofilms. Targetting c-di-GMP pathways by NO-donor sodium nitroprusside (SNP), thereby inducing biofilm dispersal, is a widely used strategy in combating biofilms. Therefore, in this project, the adhesion forces of Gram-negative E. coli and Gram-positive B. subtilis dispersed from biofilms grown in static and dynamic systems with the addition of different concentrations of SNP, and those of their planktonic counterparts to silicon nitrate surface in water were measured by atomic force microscopy (AFM). The adhesion capacities of biofilm-dispersed E. coli and B. subtilis at 5 μM SNP in the static system, were found to be similar or lower than that of planktonic cells. The adhesion capacity and surface heterogeneity of biofilm-dispersed E. coli were found to be depended on the added SNP concentration. The use of SNP at 0.5 μM and 2.5 mM (toxic) concentrations, resulted in significant increases in molecular adhesion and cellular c-di-GMP amounts. In dynamic system, the adhesion capacity of biofilm-dispersed E. coli at 5 μM SNP was higher than that of planktonic cells, but dispersed B. subtilis showed lower adhesion capacity. A positive correlation was observed between the adhesion capacities and amounts of intracellular c-di-GMP, and linked to the released NO concentration and possible nitrosative and starvation stresses. Dispersed cells were found to be more hydrophobic than planktonic cells, and bacterial adhesion was dominated by specific-hydrogen bonds at all investigated. It is thought that the results obtained from the project will contribute greatly to the development of more effective strategies to combat biofilms.</p>
Anahtar Kelimeler:	biyofilm dağılımı, adhezyon kuvveti, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), SNP, c-di-GMP
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Evet
Projeden Yapılan Yayınlar:	<p>1- Comparison of Nanoscale Adhesion Energies, Forces, Pull-off Distances and Repulsion Energies Measured between Bacterial Cells and Silicon Nitride under Water by AFM (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),</p> <p>2- Role of Growth Phase in Physicochemical properties and Adhesion Capacities of Escherichia coli and Bacillus subtilis Cells at the Nano- and Macro-Scales (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),</p> <p>3- Molecular Mechanisms of Adhesion of Planktonic and Biofilm-Dispersed Escherichia coli Cells to Silicon Nitride (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),</p>