



**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN
ARAŞTIRILMASI**

Tuğçe AKMAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Tuğçe AKMAN

30/07/2024

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğçe AKMAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2024

ÖZET

Bu tez çalışmasında, 96 laktik asit bakterisi (LAB)'nin temel biyofilm özellikleri incelenerek, planktonik ve biyofilm formları arasında biyofilm matriksi bileşenlerinden olan ekzopolisakkaritlerin (EPS) farklı büyüme evrelerinde (erken, ara ve olgun faz) profil ve miktar farklılıklarının tespit edilmesi, LAB-EPS'lerinin biyofilm oluşturan *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 bakterisi üzerindeki antibiyofilm aktivitelerinin belirlenmesi ve önemli bir matriks bileşeni olan eDNA'nın varlığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda LAB'nin biyofilm oluşturabildikleri tespit edilerek, bakteriler arasında güçlü biyofilm oluşturduğu tespit edilen ve en yüksek EPS üretim miktarına ($984,0 \pm 3,0$ mg/L) sahip *Ligilactobacillus salivarius* KC27L bakterisi seçilmiş ve ileri düzey çalışmalarda kullanılmıştır. *L. salivarius* KC27L suşunun lag fazı, logaritmik fazı, durgunluk fazı ve ölüm fazına denk gelen saatler belirlenmiştir. En yüksek EPS üretimini logaritmik fazda (12. saat) ($1033,8 \pm 1,0$ mg/L) gösterirken, en düşük EPS üretimini ise lag fazı sonu/logaritmik faz başlangıcında (6. saat) ($486,7 \pm 2,0$ mg/L) göstermiştir. Bakterinin gelişim süreleri ile EPS üretimi arasında çok güçlü pozitif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bakterinin hangi saatte erken, ara ve olgun biyofilm yaşam formlarına sahip olduğu ve EPS üretim miktarlarındaki artışının, biyofilm oluşturma yeteneğine bağlı olduğu ön görülmüştür ($p < 0,01$). MRSA 43300'ün oluşturmuş olduğu biyofilmi, KC27L'nin biyofilm yaşam formundan izole edilen EPS'leri %15,6-54,4 oranında; planktonik yaşam formu EPS'lerinin ise %30,6-60,7 arasında değişen oranlarda engellendiği belirlenmiştir. KC27L bakterisinin olgun biyofilmlerinin (28. saat) DNaz I enzimi ile muamele sonrasında, DNaz I'in biyofilm miktarında azalmaya neden olduğu tespit edilerek, KC27L bakterisinin biyofilm matriksinde yer alan eDNA'nın varlığı ortaya koyulmuştur. Tez kapsamında, KC27L'nin biyofilm oluşturma kapasiteleri, matriks bileşenleri ve biyofilm kontrol yetenekleri ilk kez detaylandırılmış olup ileri de yapılabilecek biyofilm çalışmaları için kaynak niteliği taşımaktadır.

Bilim Kodu : 20309
Anahtar Kelimeler : Laktik asit bakterisi, biyofilm
Sayfa Adedi : 132
Danışman : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ
İkinci Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Tuğba KILIÇ

INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION IN LACTIC ACID BACTERIA

(M. Sc. Thesis)

Tuğçe AKMAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2024

ABSTRACT

In this thesis, the basic biofilm properties of 96 lactic acid bacteria (LAB) were investigated and exopolysaccharides (EPS), which are components of the biofilm matrix between planktonic and biofilm forms, were analyzed at different growth stages (early, intermediate and mature phase) profile and quantity differences, to determine the antibiofilm activity of LAB-EPS on biofilm-forming *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 bacteria and to determine the presence of eDNA, an important matrix component. In line with the results obtained, it was determined that LAB can form biofilms and *Ligilactobacillus salivarius* KC27L, which was found to form strong biofilms among the bacteria and had the highest EPS production amount ($984,0 \pm 3,0$ mg/L), was selected and used in further studies. The hours corresponding to the lag phase, logarithmic phase, stagnation phase and death phase of *L. salivarius* KC27L strain were determined. The highest EPS production was observed in the logarithmic phase (12th hour) ($1033,8 \pm 1,0$ mg/L), while the lowest EPS production was observed at the end of the lag phase/start of the logarithmic phase (6th hour) ($486,7 \pm 2,0$ mg/L). There was a very strong positive correlation between the growth time of the bacteria and EPS production ($p < 0,05$). The time at which the bacteria had early, intermediate and mature biofilm life forms and the increase in the amount of EPS production were found to be dependent on the biofilm formation ability ($p < 0.01$). It was determined that the biofilm formed by MRSA 43300 was inhibited by EPSs isolated from the biofilm life form of KC27L at a rate of 15,6-54,4%, and planktonic life form EPSs at rates ranging from 30,6-60,7%. After treatment of mature biofilms of KC27L bacteria (28th hour) with DNase I enzyme, it was determined that DNase I caused a decrease in the amount of biofilm and the presence of eDNA in the biofilm matrix of KC27L bacteria was revealed. Within the scope of the thesis, the biofilm formation capacities, matrix components and biofilm control capabilities of KC27L have been detailed for the first time and will be a source for future biofilm studies.

Science Code : 20309

Key Words : Lactic acid bacteria, biofilm

Page Number : 132

Supervisor : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

Co-Supervisor : Dr. Lect. Tuğba KILIÇ

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimden bu zamana kadar değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve hayatım boyunca bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a teşekkürü bir borç biliyor ve en içten şükranlarımı sunarım. Tez konumun belirlendiği ilk andan itibaren yardımlarını esirgemeyen, bilgi, tecrübe ve fikirlerini benimle paylaşarak bana yol gösteren, tezin ortaya çıkmasında büyük katkı ve emek vererek bu süreçte bana rehberlik eden değerli ikinci danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuğba KILIÇ'a en içten saygılarımla teşekkürlerimi sunarım. Bu zorlu ve heyecan verici süreç boyunca karşılaştığım tüm zorluklarda beni motive edip yanımda olan, deneysel çalışmalarındaki bilgi birikimimde üzerimde büyük emeği olan çok değerli hocam Öğr. Gör. Dr. Berat ÇINAR ACAR'a teşekkür eder ve saygılarımı sunarım. Bu devirde birine iyi ki demek bu kadar zorken bana tüm kalbimle iyi ki dedirten, her daim büyük destekçim olan, varlığı ve dostluğu benim için en büyük bir şans olan çok kıymetli ekip arkadaşım, dostum Ezgi Mürüvvet AKBAŞ'a ve bu süreçte fiziksel olarak yanımda olamasa da her daim mutluluğumu ve üzüntümü paylaşarak yanımda olduğunu hissettiğim, varlığı ile dünyamı renklendiren can dostum Gülferi KARAGÖZOĞLU'na teşekkürlerimi iletiyorum ve çalışmalarında bana yardımcı olan Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yer alan ekip arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Her konuda sorgusuz sualsiz güveniyle yanımda ve sonsuz sevgiyle dağ gibi arkamda duran ve hayallerimi kovalamam için bana ilham kaynağı olan biricik annem Öznur AKMAN ve babam Yücel AKMAN'a, karşılaştığım her zorlukta bana inanan ve pes etmemem için beni cesaretlendiren, hayatımın her alanında bana ışık tutan canım ağabeyim Emre AKMAN'a, her daim yüzümü güldüren, varlığı ile bana güç ve her şeyin üstesinden gelebileceğime dair inanç veren canım kardeşim İsmail AKMAN'a, bana böylesi eşsiz duyguları yaşattıkları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım, sizi her zaman kalbimde taşıyacak ve sonsuz sevgiyle anacağım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Biyofilm ve Laktik Asit Bakterileri	5
2.2. Biyofilm Oluşan Yüzeyler	7
2.3. Biyofilm Yapısı ve Yaşam Döngüsü.....	9
2.4. Biyofilm Matriks Bileşenleri.....	10
2.4.1. Hücre dışı DNA (eDNA)	15
2.5. Biyofilm ve Quorum Sensing.....	17
2.6. Laktik Asit Bakterilerinde EPS ve Biyosentezi	20
2.7. Laktik Asit Bakteri EPS (LAB-EPS)'lerinin Fonksiyonları	22
2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Biyofilmlerdeki Diğer Mikroorganizmalarla Etkileşimi	24
2.9. Laktik Asit Bakterilerinin Patojen Mikroorganizmalara Karşı Uygulamaları	26
2.10. Laktik Asit Bakterisi Biyofilmlerinin Antibakteriyel Mekanizması.....	27
2.11. Biyofilm Oluşumu ve EPS Üretimi Arasındaki İlişki.....	31
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	33

Sayfa

3.2. Besiyeri ve Çözeltiler	34
3.3. Bakterilerin Aktifleştirilmesi	35
3.4. Bakterilerin Muhafazası	36
3.5. Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi	37
3.5.1. Kongo kırmızısı katı besiyeri (congo red agar, CRA)	37
3.5.2. Polistiren mikroparka yöntemi	38
3.5.3. Kalkoflor beyazı içeren katı besiyeri yöntemi	40
3.6. EPS Üretim Miktarlarının Belirlenmesi	41
3.7. Büyüme Eğrisi	42
3.8. Farklı Saatlerde EPS Üretim Miktarlarının Belirlenmesi	42
3.9. Biyofilm Evrelerinin Belirlenmesi	42
3.10. Planktonik ve Biyofilm Bileşenlerinin İzolasyonu	43
3.11. EPS İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması	43
3.11.1. Toplam karbonhidrat miktar tayini	44
3.11.2. Toplam protein miktar tayini	45
3.11.3. EPS'lerin monomer kompozisyonu	46
3.11.4. EPS'lerin molekül ağırlığının belirlenmesi	47
3.12. Antibiyofilm	47
3.13. DNaz I Enzimi İle Biyofilm Matriksinde Yer Alan eDNA'nın Belirlenmesi ..	48
3.14. İstatistiksel Analizler	48
4. DENEYSEL BULGULAR	51
4.1. Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi	51
4.2. EPS Üretim Miktarlarının Belirlenmesi	59
4.3. <i>L. salivarius</i> KC27L Suşunun Büyüme Eğrisi	61
4.4. <i>L. salivarius</i> KC27L Suşunun Farklı Saatlerde EPS Üretim Miktarlarının Belirlenmesi	62

Sayfa

4.5. <i>L. salivarius</i> KC27L Suşunun Biyofilm Evrelerinin Belirlenmesi	63
4.6. <i>L. salivarius</i> KC27L Suşunun Planktonik ve Biyofilm Bileşenlerinin İzolasyonu	65
4.7. EPS'lerin Monomer Kompozisyonunun HPLC İle Araştırılması.....	67
4.8. EPS'lerin Molekül Ağırlıklarının SEC ile Araştırılması	67
4.9. <i>L. salivarius</i> KC27L Suşunun Antibiyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi	68
4.10. <i>L. salivarius</i> KC27L'nin DNaz I Enzimi ile Biyofilm Matriksindeki eDNA'nın Belirlenmesi	70
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	131

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bakteriyel biyofilmlerde EPM'in fonksiyonları	13
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin ve referans suşların kodları.....	33
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri, tampon ve çözelti içerikleri.....	35
Çizelge 3.3. Biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde kullanılan cut-off optik yoğunluk (OD _C) değerleri.....	39
Çizelge 4.1. Bakterilerin üç farklı yöntem ile biyofilm oluşturma yetenekleri ve EPS üretimleri.....	51
Çizelge 4.2. Polistiren mikrolakalarındaki planktonik (OD _{600nm}) ve biyofilm (OD _{570nm}) hücrelerin oluşturduğu optik yoğunluk değerleri.....	57
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki EPS'lerin % biyofilm inhibisyonu	69

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Biyofilm yaşam döngüsü	10
Şekil 2.2. Biyofilm matriks bileşenleri	11
Şekil 2.3. Gram negatif bakterilerde QS'nin genel mekanizması	18
Şekil 2.4. Gram pozitif bakterilerde QS'nin genel mekanizması	19
Şekil 2.5. LAB biyofilmlerinin patojen gelişimine karşı etki mekanizmaları	28
Şekil 2.6. LAB biyofilmlerinin patojen bakterilere karşı rekabetçi dışlama etki mekanizması	29
Şekil 2.7. LAB biyofilmlerinin patojen bakterilere karşı konumsal olarak rekabetçi dışlama etki mekanizması	30
Şekil 3.1. Tez sürecinde yürütülen çalışmaların yöntemsel akış şeması	36
Şekil 3.2. Kongo kırmızısı içeren katı besiyeri yöntemi.....	38
Şekil 3.3. Polistiren mikropilaya yöntemi.....	40
Şekil 3.4. Kalkoflor beyazı içeren katı besiyeri yöntemi.....	41
Şekil 3.5. Glikoz standart grafiği	45
Şekil 3.6. BSA standart grafiği	46
Şekil 4.1. 96 LAB'sinin polistiren mikropilaya yöntemine göre kantitatif değerlendirme sonuçları	56
Şekil 4.2. Planktonik (OD _{600nm}) ve biyofilm (OD _{570nm}) hücrelerin optik yoğunlukları (OD)	58
Şekil 4.3. Biyofilm oluşturan bakterilerin EPS üretim miktarları (mg/L)	60
Şekil 4.4. <i>L. salivarius</i> KC27L suşunun büyüme eğrisi	62
Şekil 4.5. <i>L. salivarius</i> KC27L suşunun farklı saatlere göre EPS üretim miktarları (mg/L)	63
Şekil 4.6. <i>L. salivarius</i> KC27L suşunun biyofilm evreleri	64
Şekil 4.7. <i>L. salivarius</i> KC27L bakterisinin biyofilm oluşumu (OD _{570nm}), EPS üretim miktarı (mg/L) ve büyüme eğrisi (OD _{600nm}).....	65
Şekil 4.8. Planktonik ve biyofilm hücrelerinin protein miktarları	66

Şekil	Sayfa
Şekil 4.9. Planktonik ve biyofilm hücrelerin karbonhidrat miktarları	67
Şekil 4.10. Planktonik ve biyofilm EPS'lerinin % biyofilm inhibisyonu.....	69
Şekil 4.11. Olgun biyofilmlerin (28. saat) DNaz I enzimi ile muamele edilmeleri sonrası mikropalakalarda ölçülen biyofilm miktarları	70
Şekil 4.12. Olgun biyofilmlerin (28. saat) DNaz I ile muamele edilmeleri sonrası biyofilm miktarlarındaki yüzde azalma grafiği.....	71



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde oluşan koloni görüntüleri.....	55
Resim 4.2. Kalkoflor beyazı içeren katı besiyerinde oluşan koloni görüntüleri.....	59



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
kob (cfu)	Koloni Oluşturan Birim
Da	Dalton
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
°C	Santigrad Decere
OD	Optikal Yoğunluk
OD _c	Cut-Off Optik Yoğunluk Değeri
pH	Asitlik Bazlık Birimi
rpm	Dakikada Devir Sayısı
α	Alfa
β	Beta
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklamalar
AHL	Açıl Homoserin Lakton
AI-2	Otoindüktör
AIP	Otoindükleyici Peptitler
ATR-FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi

Kısaltmalar**Açıklamalar**

BSA	Bovin Serum Albumin
CFS	Hücre dışı Süpernatant
CRA	Kongo Kırmızısı Katı Besiyeri
DNA	Deoksiribonükleik asit
eDNA	Hücre Dışı Deoksiribonükleik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPM	Hücre dışı polimerik madde
EPS	Ekzopolisakkarit
eRNA	Hücre Dışı Ribonükleik asit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ISAPP	Uluslararası Bilimsel Probiyotik ve Prebiyotik Birliği
LAB	Laktik asit bakterisi
MRS	De Man Rogosa Sharpe
NB	Nutrient Sıvı Besiyeri
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
QPS	Nitelikli Güvenlik Varsayımı
QS	Quorum Sensing
RNA	Ribonükleik asit
SEC	Boyut Eleme Kromatografisi
SF	Serum Fizyolojik
sp.	Tür
subsp.	Alt tür
TCA	Trikloroasetik Asit
TG	Tavuk Gaitası
TGIS	Tavuk Gastrointestinal Sistemi
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), karbonhidrat fermantasyonunun önemli bir metabolik son ürünü olarak laktik asit üreten Gram pozitif, katalaz negatif, aerotolerant, *Sporolactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmeyen, morfolojik olarak çubuk veya kok şeklinde olan mikroorganizmalardır (Mokoena, Omatola ve Olaniran, 2021; Mgomi, Yang, Cheng ve Yang, 2023).

Biyofilm, kendi ürettikleri hücre dışı polimerik madde (EPM)'leri içeren matriks içine gömülmüş hücrelerin birbirlerine ve/veya bir yüzeye yapıştığı mikroorganizma kümesi olarak (Flemming ve diğerleri, 2016; Aung ve Kim, 2024) ya da başka bir ifade ile mikroorganizmanın kendi ürettiği matriksin, genellikle çeşitli yapısal formlardaki hücre dışı biyopolimerlerden oluşan polimerik bir kümelenme olarak tanımlanmaktadır (Vert ve diğerleri, 2012). Mikrobiyal hücreler, zorlu ortam şartlarına dayanabilmek için biyotik veya abiyotik yüzeylere küme halinde tutunarak biyofilm yapısı oluşturmaktadırlar (Yin ve diğerleri, 2019).

Genel olarak biyofilmler bozulma etkenidir ve zararlı biyofilmlerin kontrol altına alınması ve ortadan kaldırılmasına yönelik önemli çabalar gösterilmektedir. Biyofilmler bozulma ve kontaminasyona neden olarak kötü tat, kötü koku, patojenik bakteri oluşumu gibi istenmeyen özellikler oluşturabilir (Gong ve diğerleri, 2021). Biyofilmlerin insan sağlığı ve diğer hususlar üzerindeki olumsuz etkisi göz önüne alındığında, uzun süredir zararlı biyofilmlerin önlenmesi ve kontrolü üzerine odaklanılmıştır (Muhammad ve diğerleri, 2020). Dezavantajlarına rağmen biyofilmlerin çevre koruma, tarım ve biyoteknoloji alanlarında çok sayıda faydalı etkileri vardır (Aung ve Kim, 2024). Biyofilmlerin bu faydalı özelliklerinden yararlanarak, bitkisel üretimi artırmak için fitopatogenlere karşı biyolojik kontrol ajanları ve biyogübre olarak (Timmusk, Behers, Muthoni, Muraya ve Aronsson, 2017), tehlikeli kirleticilerin biyoremediasyonunda (Irakhah ve diğerleri, 2019), atık su arıtımında (Ali ve diğerleri, 2018), deniz ekosisteminin korunması ve korozyonun önlenmesi gibi çok çeşitli alanlarda biyofilmler kullanılmaktadır (Naidoo ve Olaniran, 2014). Biyofilmler, gıda fermantasyonunda, fermente ürünlerin kalitesini ve işlevini, maliyet verimliliğini, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerini arttırmak (Gong ve diğerleri, 2021) için kullanılmasının yanı sıra biyomalzeme ve biyotıp alanında da potansiyel olarak geniş bir

uygulama alanına sahiptir. Bu nedenle biyofilmlerin potansiyel olarak birçok uygulaması bulunmaktadır (Han ve diğerleri, 2020).

LAB biyofilmleri, patojenik biyofilmlerin aksine, LAB'nin bulunduğu hemen hemen her yerde bulunmaktadır. Buna gıda ortamları (gıda işleme tesisleri, gıda ürünleri, süt, et ve bitkiler), gastrointestinal sistem, insan mukozaları, evsel ve endüstriyel ortamlar dahildir. Bu nedenle LAB biyofilmlerinin birbirleriyle çapraz aşılandığı düşünülen çok çeşitli habitatları kapsadığı görülmektedir (Mgomi ve diğerleri, 2023).

Biyofilmin bir bütün olarak, tek bir hücre düzeyinde ve çevresindeki ortamlarla nasıl etkileşime girdiğine dair, zararlı biyofilmleri (klinik biyofilmler, gıda kontaminasyonu, endüstriyel ekipmanlarda ve gemi gövdelerinde biyolojik kirlenme) kontrol etmek veya faydalı olanları (atık su arıtma, biyoremediasyon ve biyo-filtrasyon) geliştirmek ve modüle etmek için etkili yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir (Azeredo ve diğerleri, 2017). Bu yaklaşım ile patojenlerin biyofilmleriyle mücadelede anahtar olabilen, LAB gibi faydalı probiyotik bakterilerin biyofilmleri, koruyucu biyofilmler olması açısından incelenmektedir. LAB ile ilgili antibakteriyel çalışmaların çoğu planktonik faza odaklanmıştır ve bu yaklaşım, potansiyel antibakteriyel LAB için son derecede önemlidir. Ancak, biyofilm bazlı yaklaşım kullanılarak biyofilm oluşturan LAB, patojenlerin kalıcı biyofilmine karşı koruyucu biyofilm olarak kullanılabilir. LAB'nin biyofilm fenotipinin incelenmesi, antibakteriyel aktiviteleri için yeni bir bakış açısı sağlayabilir (Kumar, Saad, Mohamad ve Rahim, 2017; Mgomi ve diğerleri, 2023).

Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmada;

1. Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı stok kültür koleksiyonunda mevcut olan, tavuk gastrointestinal sistemi (TGIS) ve tavuk gaitası (TG)'ndan izole edilmiş toplam 96 LAB'nin temel biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi,
2. Biyofilm oluşturduğu tespit edilen bakterilerin ekzopolisakkarit (EPS) üretim miktarlarının tespit edilmesi,
3. Biyofilm oluşumu ve EPS üretimi en yüksek bakterinin seçilerek, bu bakterinin büyüme eğrisinin çıkarılması ve farklı sürelerde (saat) EPS üretim miktarlarının ve biyofilm evrelerinin belirlenmesi,

4. Seçilen bakterinin planktonik ve biyofilm matriks bileşenlerinin izolasyonun gerçekleştirilmesi ve kimyasal analizlerin yapılması,
5. Seçilen bakterinin biyofilm matriks biyopolimeri olan eDNA'nın varlığının tespit edilmesi,
6. Biyofilm matriksinden ve planktonik hücrelerden saflaştırılan EPS'lerin Büyüklükçe Ayırma Kromatografisi (SEC) ile moleküler ağırlığı ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile monosakkarit bileşiminin tayin edilmesi,
7. Bakterinin planktonik ve biyofilm yaşam formundan farklı faz düzeylerinde izole edilecek EPS'lerinin antibiyofilm özelliklerinin belirlenmesi,
8. Bakterinin EPS üretim miktarları ile biyofilm oluşumu arasında bir ilişki olup olmadığının istatistiksel olarak tespit edilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyofilm ve Laktik Asit Bakterileri

Biyofilm, polisakkarit bir matriks tarafından çevrelenen, farklı yapıda mikroorganizmaları içerisinde bulunduran, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak tutunma sağlayabilen, mikroorganizmaların aralarında iletişim kurarak haberleşme sağlayabilen, kompleks yapıdaki polimikrobiyal bir topluluk olarak tanımlanmaktadır (Moreno Osorio, Pollio, Frunzo, Lens ve Esposito, 2021; Zhao, Sun ve Liu, 2023). Biyofilm esas olarak yüzey, matriks ve mikroorganizma olarak üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenlerinden birinin olmaması durumunda biyofilm tabakası oluşmaz. Matriks, yani EPM, literatürde “hücre dışı polimerik maddeler”, ya da “ekzopolimerler” terimlerinin karşılığı olarak kullanılmaktadır (Türetgen, 2005).

Biyofilmler, ilk olarak Van Leeuwenhoek'un on yedinci yüzyılda kendi ağız ve diş eti örneklerini incelemesi sonucu burada bulunan mikroorganizmaların kümeler halinde yaşadığından bahsetmesinden bu yana pek çok sistemde tanımlanmıştır (Donlan ve Costerton, 2002). Louis Pasteur (1822-1895), pastörizasyon ile ilgili yaptığı çalışmalar sonucunda şarabın asetik hale gelmesinin (şarabın tadının ve aromasının bozulması) nedeninin bakteri kümeleri olduğunu keşfetmiş ve görselleştirmek amacıyla taslağını çizmiştir (Høiby, 2017). ZoBell ve Allen, 1935 yılında yaptıkları bir çalışmada, bazı deniz bakterilerinin ışık mikroskobu altında cam yüzeylere tutunarak mikrokoloniler oluşturduğunu gözlemlemişlerdir (ZoBell ve Allen, 1935). Tıp alanında ilk kez 1970-1972 yıllarında kronik akciğer enfeksiyonu olan kistik fibrozis hastalarından alınan örneklerin mikroskopik incelenmesi sırasında, *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin kümeler halinde bulunması ile biyofilmlerden söz edilmiştir (Hoiby, 2017). Bununla birlikte, mikroorganizmaların yeterli besin maddelerini bulunduran canlı ve cansız bir yüzeye tutunarak bir matriks ile çevrili biyofilm içinde çoğaldığı belirtilmiş ve böylece “biyofilm” terimi ortaya koyulmuştur (Donlan ve Costerton, 2002).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, probiyotik bakteri biyofilmlerinin, probiyotikleri kullanmanın güvenli ve etkili bir yolu olduğunu ve gıda işleme, biyoteknoloji ve fermentasyon mühendisliği endüstrilerinde yüksek bir kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Tan ve diğerleri, 2020; Carvalho, Teixeira-Santos, Mergulhao ve

Gomes, 2021; Rezaei, Salari, Khanzadi, Rhim ve Shamloo, 2023). Uluslararası Bilimsel Probiyotik ve Prebiyotik Birliği (ISAPP) tarafından, probiyotikler FAO/WHO onaylı olarak "Yeterli miktarda uygulandığında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalar" şeklinde tanımlanmaktadır (Hill ve diğerleri, 2014). LAB, yaygın probiyotik bakteriler arasında yer almaktadır (Ferdouse ve diğerleri, 2023). Sıklıkla kullanılan probiyotikler *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait olan Gram pozitif bakterilerdir (Romero-Luna, Hernández-Mendoza, González-Córdova ve Peredo-Lovillo, 2022; Mugwanda ve diğerleri, 2023).

LAB, homofermentatif veya heterofermentatif yol kullanarak karbonhidratlardan laktik asit üreten, çeşitli gıda ürünlerinin fermantasyonunda başrol oynayan, aerotolerant, spor oluşturmeyen (*Sporolactobacillus inulinus* hariç), Gram pozitif bir bakterileri grubudur (Fijan, 2023). LAB, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından genellikle güvenli (GRAS) mikroorganizmalar olarak ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından Nitelikli Güvenlik Varsayımı (QPS) olarak kabul edilmektedir (Agriopoulou, Stamatelopoulou, Sachadyn-Król ve Varzakas, 2020). LAB'nin sağlık ve beslenme açısından faydaları ve fermente gıda ve içeceklerin tüketiminde güvenli kullanımı mevcuttur (Garcia, Guerin, Souidi ve Remize, 2020). Tat ve doku, LAB ilavesiyle zenginleştirilen fermente gıdaların ana kalite özellikleridir. Süt ürünleri, fermente meyve ve sebzeler, et bazlı ürünler ve fermente içecekler LAB içeren başlıca fermente gıdalardır (Garcia ve diğerleri, 2020; Liu, Pang, Zhang ve Cai, 2014). LAB, fermentatif aktiviteleri, biyolojik korumaları ve probiyotik özellikleri sayesinde gıda kalitesine katkıda bulunur. Buna ek olarak LAB, gıdalarda potansiyel bozulma ve patojen mikroorganizmaların büyümesini önleyerek gıdanın güvenliğini ve raf ömrünü artırır (Fessard ve Remize, 2019). Probiyotik LAB, bağırsak mukozasında patojen mikroorganizmaların yapışmasını veya kolonizasyonunu önlemek (Zhang ve diğerleri, 2019) ve antibiyotik tedavisi sırasında patojen mikroorganizmaların büyümesini inhibe eden antimikrobiyaller üretme yeteneği (Valdés-Varela, Hernandez-Barranco, Ruas-Madiedo ve Gueimonde, 2016) gibi farklı etki mekanizmaları yoluyla sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotasının korunmasına yardımcı olur (Diez-Gutiérrez, San Vicente, Barrón, Del Carmen Villarán ve Chávarri, 2020). Probiyotik LAB izolatları antikanser, anti-alerjik veya antidiyabetik etkilere de sahip olabildiği bildirilmiştir (Ferdouse ve diğerleri, 2023).

LAB'nin önemli bir özelliği olan biyofilm oluşturma yeteneği, LAB'ni birçok farklı alanda faydalı hale getirmektedir. LAB'nin oluşturmuş olduğu biyofilm matriksi, LAB'ni çevresel streslerden (pH, sıcaklık, kimyasallar) ve antibiyotiklerden korur. Biyofilm, LAB'nin besin maddelerine daha kolay erişmesini ve daha verimli kullanmasını sağlar ve LAB arasında gen transferinin ve adaptasyonunun hızlanmasına katkıda bulunur. Aynı zamanda biyofilm oluşturma yeteneği, bazı LAB türlerinin patojenik hale gelmesine ve enfeksiyonlara yol açmasına neden olabilir (Lebeer, Vanderleyden ve De Keersmaecker, 2008; Mgomi ve diğerleri, 2023). LAB'in biyofilm oluşturma yeteneği, fermente ürünlerin üretiminde ve raf ömrünün uzatılmasında da önemli rol oynar. Biyofilm oluşturan LAB, bitkilerin köklerini kolonize eder ve hastalıklara karşı koruma sağlar. LAB sahip olduğu biyofilm oluşturma yeteneği ile probiyotik uygulamalarda ve tıbbi doku mühendisliğinde kullanılabilir (Prete ve diğerleri, 2021; Kavutake ve diğerleri, 2023).

2.2. Biyofilm Oluşan Yüzeyler

Bakteriyel biyofilm oluşumu, canlı organizmaların yanı sıra cansız yüzeylerde ve çeşitli dokularda hakim olan mikrobiyal yaşam tarzıdır ve tüm yüzey tiplerinde meydana gelmektedir. Biyofilmler canlı (bitki, hayvan ve insan vücudu gibi) ve cansız (cam, metal ve polistren yüzeyler gibi) birçok yüzeyde bulunabilir (Lindsay ve Von Holy, 2006; Thomas ve Nakaishi, 2006). Klinik ortamlarda biyofilm gelişimine eğilimli olabilecek yüzey türleri (yapay ses protezleri, yedek eklemler, protez kalp kapakçıkları, kalp pilleri, beyin omurilik sıvısı şantları, endotrakeal tüpler, kateterler, kontakt lensler ve implante protez cihazları) çoktur (Silverstein ve Donatucci, 2003; Tenke, Kovacs, Jäckel ve Nagy, 2006; Li, Yin, Cheng ve Lin, 2023). Biyofilm tabakası özellikle su bulunan yüzeylerde bulunabilmektedir. Su ortamlarındaki yüzeyler bakteriyel açıdan çok önemlidir, çünkü hem inorganik hem de organik besinler bu arayüzlerde yoğunlaşmıştır ve bakterilerin tercihen bu yüzeylerde büyüdüğü gösterilmiştir (Huang ve diğerleri, 2019). Endüstriyel veya evsel su sistemleri, ısı değiştiriciler, su iletim boruları, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesisleri, soğutma kuleleri, kağıt makineleri ve diş yüzeyi gibi tüm doğal ekosistemlerde büyüyen bakterileri hücrelerinin her zaman bir tür glikokaliks ile çevrili olduğu ve genellikle yüzeylere yapışık glikokaliksle çevrili mikrokolonilerde büyüdüğü gösterilmiştir (Walker, Surman ve Jass, 2000; Huang ve diğerleri, 2019).

LAB, fermente gıda ürünleri, süt, toprak, silajlar, ekmek, lahana turşusu ve soslar (Mgomi ve diğerleri, 2023) dahil olmak üzere küresel gıda zinciri boyunca çeşitli kaynaklardan ve hem insan (Kaya ve diğerleri, 2022) hem de hayvan (Mann ve diğerleri, 2014) gastrointestinal sisteminden izole edilmiştir. Gıda ortamları (gıda işleme tesisleri, gıda ürünleri, süt, et ve bitkiler), gastrointestinal sistemi, insan mukozaları, hayvan vajinaları, evsel ve endüstriyel ortamlar gibi hemen hemen her yerde bulunan LAB biyofilmleri geniş bir habitat yelpazesini kapsamaktadır (Sun ve diğerleri, 2020; Mgomi ve diğerleri, 2023).

Genel olarak biyofilm oluşumu, mikrobiyal yaşamda doğal olarak oluşan bir aşama olarak kabul edilir (Percival, Malic, Cruz ve Williams, 2011). Sonuçta bu teori şu önemli soruyu gündeme getirebilir: “Bütün bakteriler biyofilm oluşturma yeteneğine sahip midir?” Bu sorunun cevabı oldukça tartışmalıdır ancak temel kural olarak farklı mikroorganizmaların farklı biyofilm oluşturma kapasitelerine sahip olduğu bir gerçektir (Kumar ve diğerleri, 2017). Yapılan çalışmalar, mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneğinin çeşitli ekstrem ortamlarda mikroorganizmaların büyümesi için önemli olduğunu ve biyofilm oluşumunun mikroorganizmaların çeşitli çevresel streslere yanıt olarak seçtiği bir büyüme modu olduğunu göstermiştir (Kubota ve diğerleri, 2008; Yin ve diğerleri, 2019; Fazeli-Nasab ve diğerleri, 2022). Biyofilm, mikroorganizmaları çevresel stres koşullarına karşı koruma sağlar ve onların antimikrobiyal ajanlara karşı direncini artırarak mikrobiyal kalıcılığa ve toksisiteye katkıda bulunur (Liu, Yao, Zhao ve Ge, 2023). Dolayısıyla bakteriyel biyofilm oluşumu bakterilerin hayatta kalma mekanizmasının bir parçasıdır. Biyofilmler bir anlamda "koruyucu giysi, kalkan" görevi görerek mikroorganizmaları ultraviyole (UV), radyasyon (De Carvalho, 2017), aşırı sıcaklık (Koerdt, Gödeke, Berger, Thormann ve Albers, 2010), aşırı pH, yüksek tuzluluk (Marsden, Grudzinski, Ondrey, DeLoney-Marino ve Visick, 2017), yüksek basınç, besin kıtlığı, antibiyotikler vb. etkilere koruyabilir (Liu ve diğerleri, 2023).

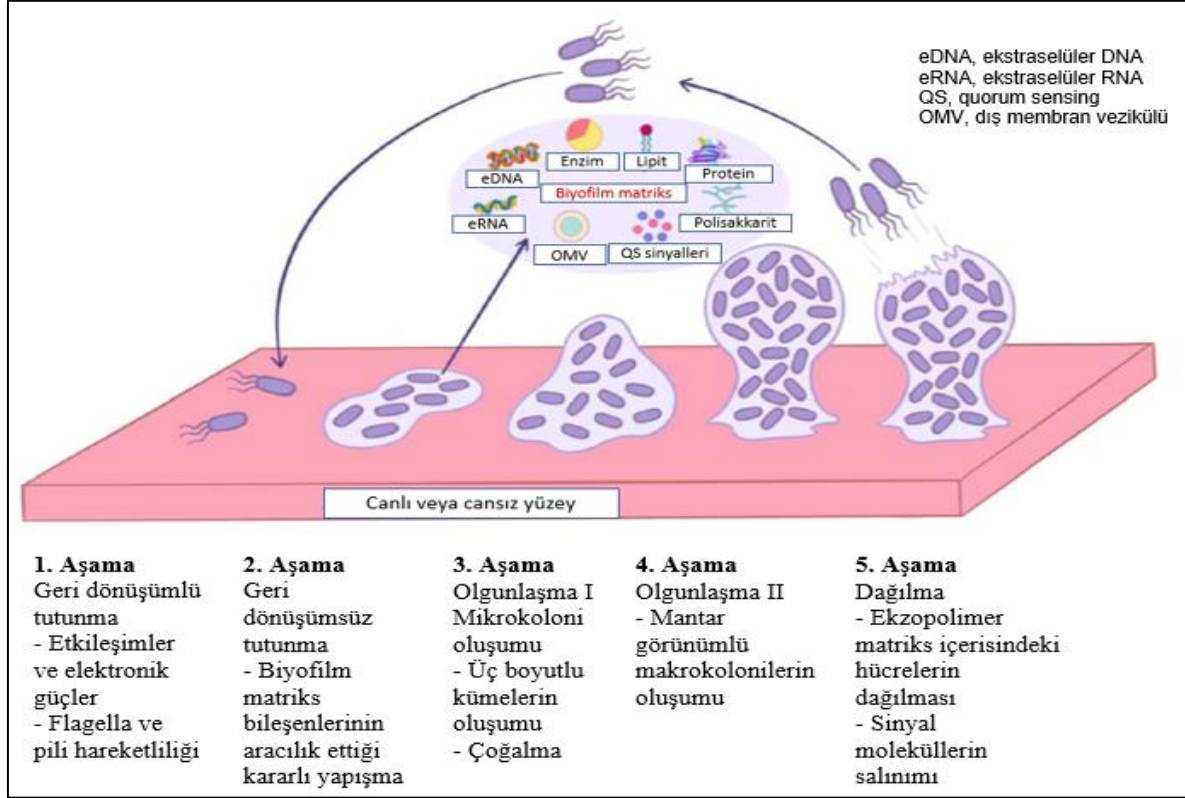
Probiyotikler, biyofilm adı verilen farklı abiyotik veya biyotik streslere karşı direnç gösteren ve mikrobiyal popülasyonun gelişimi için faydalı olan çeşitli özelliklere sahip kompleks yapılar oluşturur (Salas-Jara, Ilabaca, Vega ve García, 2016). Ayrıca, probiyotik bakteriler, çevresel koşullara direnmeyi sağlayan ve popülasyonlarının başarılı bir şekilde kolonizasyonunu ve korunmasını sağlamak için biyofilm oluşturma yeteneklerine sahiptirler (Salas-Jara ve diğerleri, 2016). Bakteri kolonizasyonunun, bağırsak mukozası gibi belirli bir epitele yapışmasını gerektirdiği, epitelde kalış sürelerini uzattığı ve stabilize ettiği, rekabetçi

inhibisyon yoluyla patojenik bakterilerin dışlanması yardımcı olduğu ve konakçı hücrenin bağışıklık tepkisini tetikleme olasılığına sahip olduğu bildirilmiştir (Saxelin, Tynkkynen, Mattila-Sandholm ve De Vos, 2005). Biyofilmler, antibiyotiklere ve enzimlere karşı koruma sağlamaya yardımcı olan (Lewis, 2001) ve popülasyonun metabolik etkileşimi için bir mikro ortam oluşturulmasını destekleyen hücre dışı bir polisakkarit matriksini oluşturmaktadırlar. Bakteriler arasında gen ifadesini düzenleyebilen bir süreç olan Quorum Sensing (QS)'in aracılık ettiği iletişim de mevcuttur (Salas-Jara ve diğerleri, 2016). Ek olarak gıda endüstrisinde, LAB'nin varlığı bakterilerin zorlu çevresel koşullara dayanmasını sağlar ve LAB türleri, biyofilmler oluşturarak çeşitli stres koşullarında hayatta kalabilir (Mgomi ve diğerleri, 2023). *Lactobacillus* türleri gibi probiyotik bakteriler tarafından biyofilm oluşumu, patojenik bakterilerin kolonizasyonunu önleyerek konağın mukozasında daha uzun kalıcılığını destekleyebildiği için faydalı bir özellik olarak kabul edilmektedir (Terraf, Juárez Tomás, Nader-Macías ve Silva, 2012).

2.3. Biyofilm Yapısı ve Yaşam Döngüsü

Biyofilm yaşam döngüsü beş basamaktan oluşur (Şekil 2.1) (Kilic ve Bali, 2023). İlk basamakta, planktonik hücreler hareketlerini yavaşlatıp yüzeye yaklaşarak, yüzeye, yüzeye daha önceden tutunmuş olan organik maddelerle veya diğer mikroorganizmalarla geçici bir ilişki (geri dönüşümlü tutunma) kurarak kendilerine uygun bir yer bulurlar. İkinci aşamada (geri dönüşümsüz tutunma), yüzeye tutunan bu bakteri hücreleri çoğalır ve az sayıda hücreden oluşan mikrokoloniler oluşturmak üzere toplanır. Mikrokoloni oluşumu sırasında hücreler, hücrelerin bağlanmasını ve kümelenmesini destekleyen ekstraselüler polimerik maddeler (EPM)'i üretmeye başlar. Böylece, mikroorganizmalar yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunarak biyofilmin ilk tabakasını oluşturmaya başlar. Bu EPM, biyofilm kütesinin %90'ından fazlasını oluşturan ana bileşendir (Dunne, 2002; Alim, Sircaik ve Panwar, 2018; Abe, Nomura ve Suzuki, 2020). Üçüncü aşamada (olgunlaşma I), mikrokoloniler, daha fazla hücre büyümesi ve EPM'in üretimiyle olgun biyofilmlere dönüşür ve dördüncü basamakta (olgunlaşma II) mikroorganizmalar mantar görünümlü üç boyutlu yapısına kavuşurlar. Beşinci aşamada, biyofilmlerin gelişimi ve devamı sırasında bazı hücreler, dış (sürtünme kuvveti, basınç ve hızlı su akışı gibi) ve iç etkenler nedeniyle biyofilmlerden kendilerini ayırır. Dahası, çoğu bakteri biyofilmi, biyofilm yapısını düzenleyen veya biyofilm yaşam döngüsünün dağılma aşaması sırasında hücrelerin biyofilmlerden salınmasına aracılık eden QS sinyalleri, sürfektanlar, enzimler ve polisakkaritler gibi moleküller salgılar. Bu aşamada,

biyofilm matriksinin yapısal polimerlerinin depolimerizasyonu ve ardından hücrelerin salınması ile biyofilm bakterileri dağılır ve yeni bölgelerde kolonize olabilir. Ayrılan hücreler, planktonik formlarına dönerek yeni nişler bulabilir (Allison, 2003; Bendaoud ve diğerleri, 2011; Abe ve diğerleri, 2020; Kilic ve Bali, 2023).

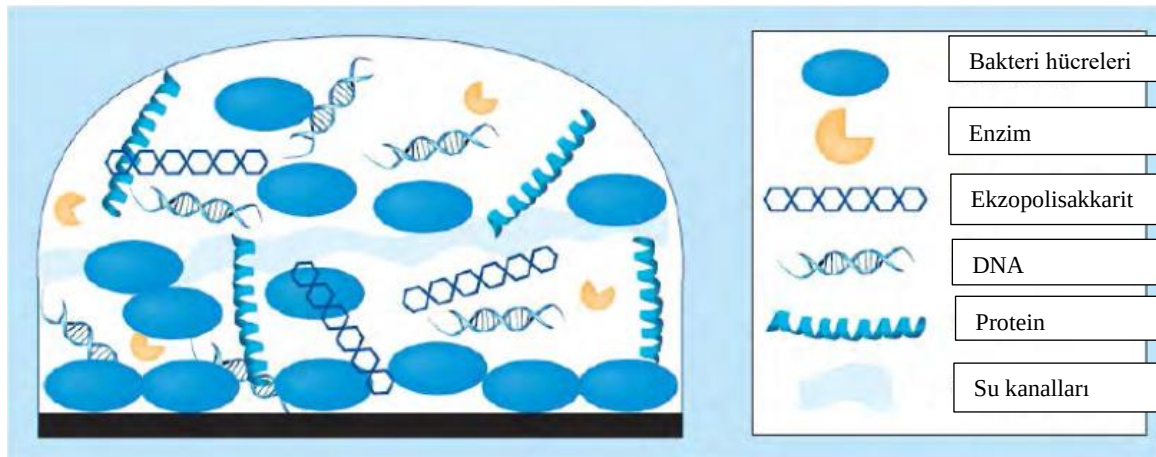


Şekil 2.1. Biyofilm yaşam döngüsü (Kilic ve Bali, 2023).

2.4. Biyofilm Matriks Bileşenleri

Biyofilm matriksi, biyofilm yaşam tarzı için temel olan mekanik olarak kararlı ve karmaşık kimyasal mikro ortamlar sağlamaktadır. Ekstraselüler matriks (biyofilm matriks) biyofilmlerin ortaya çıkan özellikleri için gerekli olan kilit yapısal ve işlevsel roller oynadığı oldukça karmaşık ve dinamik olayları içerir. Ekstraselüler matriks biyotik ve abiyotik yüzeylere mikrobiyal yapışmayı teşvik eder. Bir kez tutunduktan sonra, daha fazla EPM'nin üretimi, hücreleri çevreleyen ve birbirine yapıştıran, onları yakın tutan ve sınırlı bir alanda hücreler arası etkileşime izin veren bir matriks oluşturur. Biyofilm matriksi, yapısal stabilite ve işlevsel bir ortam sunmanın yanı sıra, antimikrobiyallere ve bağışıklık hücrelerine karşı biyofilm toleransını da artırır (Koo, Allan, Howlin, Stoodley, ve Hall-Stoodley, 2017; Karygianni, Ren, Koo, ve Thurnheer, 2020).

LAB tarafından üretilen biyofilm matriksini oluşturan bileşenler, LAB'in işlevlerini ve çevreleriyle etkileşimlerini önemli ölçüde etkiler. Biyofilm matriks; ekzopolisakkarit (EPS), nükleik asitler (eDNA ve eRNA), proteinler, lipitler ve diğer biyomoleküllerden oluşur (Karygianni ve diğerleri, 2020). Şekil 2.2'de biyofilm matriks bileşenlerinin şematize görünümü yer almaktadır. EPM'in, genel olarak fiziksel ve kimyasal özelliklere bölünebilen biyofilmin yapısal ve fonksiyonel özellikleri için hayati öneme sahip olduğu gösterilmiştir (Dragoš ve Kovács, 2017). Bakteriyel biyofilmlerde yer alan EPM'in fonksiyonları Çizelge 2.1' de verilmiştir.



Şekil 2.2. Biyofilm matriks bileşenleri (Sangwan, Pratibha ve Hemender, 2019).

Biyofilm oluşumu ve işlevi ile ilgili olarak, LAB'nin ürettiği EPM'ler bakterileri, antibiyotikler, dezenfektanlar ve predatörlerden korumak ve bakterilerin ihtiyaç duydukları besin maddelerini hapsederek besin alımını kolaylaştırmak, hücrel toksisiteyi önlemek, bakteriler arasında sinyal iletimi (QS) ve gen aktarımı için bir ortam sağlamak ve LAB'nin yüzeylere daha kolay bağlanmasını ve kolonileşmesini sağlamak gibi önemli rolleri bulunmaktadır (Van Ba ve diğerleri, 2019). Biyofilm matriksinin bileşimi ve yapısı, mikroorganizmaların türüne, yerel kayma gerilimine, besin/substratların mevcudiyetine ve konakçı ortamına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilir (Flemming ve diğerleri, 2016). EPM'in sentezi tek tür ve çok tür içeren mikrobiyal topluluklar arasında da farklılık göstermektedir (Bowen, Burne, Wu ve Koo, 2018). Tek tür mikroorganizmalardan oluşan topluluklar, genellikle homopolimerik EPM olarak adlandırılan, tek bir monomer türünden oluşan EPM üretirler. Bu tür EPM'ler, çeşitli işlevler görerek mikrobiyal topluluklar için hayati önem taşır. *Acetobacter xylinum* bakterisi tarafından üretilen selüloz, biyofilm oluşumuna, mekanik destek sağlamaya ve besin maddelerinin depolanmasına yardımcı olur

(Ullah ve diğlerleri, 2019). Çok türlü mikrobiyal topluluklar, daha karmaşık ve çeşitli EPM türleri üretebilirler. Bu EPM'ler, birden fazla monomer türünden oluşan heteropolimerik EPM'ler veya farklı monomer türlerinin rastgele veya belirli bir sırayla dizildiği kopolimerik EPM'ler olabilir (Huang ve diğlerleri, 2018; Morozkina ve diğlerleri, 2022).



Çizelge 2.1. Bakteriyel biyofilmlerde EPM'in fonksiyonları (Flemming ve Wingender, 2010)

Fonksiyon	Biyofilmler için fonksiyon	İlgili EPM bileşenleri
Yapışma/Adezyon	Planktonik hücreler tarafından abiyoetik ve biyoetik yüzeylerin kolonizasyonunda ilk adım olarak ve tüm biyofilmlerin yüzeylere uzun süreli bağlanmasına izin verir.	Polisakkaritler, proteinler, DNA
Bakteri hücrelerinin kümelenmesi	Hücreler arasında köprü kurulmasını, bakteri popülasyonlarının geçici olarak hareketsizleştirilmesini, yüksek hücre yoğunluklarının geliştirilmesini ve hücre-hücre tanınmasını sağlar.	Polisakkaritler, proteinler ve DNA
Biyofilmlerin kohezyonu	Bir biyofilm matriksi oluşturur, biyofilmlerin mekanik stabilitesine aracılık eder ve EPS aracılığıyla biyofilm mimarisini belirler ve hücre-hücre iletişimine izin verir.	Nötr ve yüklü polisakkaritler, proteinler ve DNA
Su tutma	Mikroorganizmaların etrafında yüksek oranda hidratlı bir mikro ortam sağlayarak su eksikliği olan ortamlarda susuzluğa tolerans göstermelerini sağlar.	Hidrofilik polisakkaritler ve proteinler
Koruyucu bariyer	Enfeksiyon sırasında konakçı savunmalarına karşı direnç sağlar ve antimikrobiyal ajanlara karşı tolerans kazandırır.	Polisakkaritler ve proteinler
Organik bileşiklerin absorpsiyonu	Çevreden gelen besin maddelerinin birikmesine ve ksenobiyotiklerin emilmesine izin verir.	Yüklü veya hidrofobik polisakkaritler ve proteinler
İnorganik iyonların absorpsiyonu	Polisakkarit jel oluşumunu, iyon değişimini, mineral oluşumunu ve toksik metal iyonlarının birikimini teşvik eder.	Proteinler
Enzimatik aktivite	Besin alımı için makromoleküllerin sindirilmesini ve EPS'nin parçalanmasını sağlayarak hücrelerin biyofilmlerden salınmasına olanak tanır.	Tüm EPM bileşenleri
Besin kaynağı	Biyofilm bileşenleri tarafından kullanılmak üzere karbon, azot ve fosfor içeren bileşiklerin kaynağını sağlar.	DNA
Genetik bilgi alışverişi	Biyofilm hücreleri arasında yatay gen transferini kolaylaştırır.	Proteinler
Elektron vericisi veya alıcısı	Biyofilm matriksinde redoks aktivitesine izin verir.	Nükleik asitler, enzimler, lipopolisakkaritler ve membran vezikülleri
Hücre bileşenlerinin salınması	Metabolik döngünün bir sonucu olarak hücrel materyali serbest bırakır.	Polisakkaritler
Fazla enerji için depolama	Dengesiz karbon/azot oranları altında fazla karbonu depolar.	Polisakkaritler ve enzimler
Enzimlerin bağlanması	Polisakkaritlerle etkileşimleri yoluyla enzimlerin birikmesi, tutulması ve stabilizasyonu ile sonuçlanır.	

Şimdiye kadar tanımlanan biyomoleküller iki ana kategoriye ayrılabilir: (i) hücre yüzeyiyle ilişkili ve (ii) hücre dışı olarak salgılananlar (flagella, tip IV pili gibi hücreyle ilişkili uzantılar ve bakteriyel yapışmayı, mekanik stabiliteyi ve otoimmün tepkileri modüle eden fonksiyonel amiloidler vb.). Salgılanan EPS'ler, proteinler, eDNA ve eRNA ise matriks yapısı ve işlevine katkıda bulunur (Bowen ve diğerleri, 2018). Bakteriyel pililinin (bakteriyel uzantıların), LAB biyofilm oluşumunun ilk adımına katkıda bulunduğu ve hücre yapışmasını etkilediği bildirilmiştir. *Lactococcus lactis*'in, bazı suşlarının yüzeylerinde pili olmasından dolayı, heterojen yapıda kompakt bir biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir (Drame ve diğerleri, 2021). Protein sortaz A, bakteriyel hücre duvarı proteinindeki LPxTG motifini tanıyarak ve hücre duvarı sıralama reaksiyonunu ve biyofilm oluşumunu katalize ederek *Pediococcus pentosaceus* MR001'de hücre duvarı yapışma sürecine de dahil olur (Wanna, Surachat, Kaitimonchai ve Phongdara, 2021). Ek olarak, LPxTG işaretlerinden oluşan "adhezyon ve biyofilm modülatörü" (MabA) olarak bilinen bir proteinin, *Lactobacillus rhamnosus* GG'nin biyofilm oluşumunun yanı sıra fare gastrointestinal sistemindeki yapışmadan sorumlu olduğu keşfedilmiştir (Vélez ve diğerleri, 2010). Konak proteinleri ve glikoproteinlerin matriks yapısına katkıda bulundukları ve mikrobiyal besin kaynağı olarak mikrobiyal bağlanmaya yardımcı oldukları rapor edilmiştir (Marsh, Do, Beighton ve Devine, 2016).

Biyofilm matriks bileşenlerinden nükleazlar gibi hücre dışı enzimlerin, eDNA'nın kontrolü ve dolayısıyla biyofilmin oluşumunda veya bileşiminde rolü vardır. *Vibrio cholerae*'de hücre dışı nükleazların, eDNA'nın modülasyonu yoluyla biyofilmlerin yapısını, ayrılmasını ve dağılımını etkileyebildiği (Seper ve diğerleri, 2011), *S. aureus*'taki bir termonükleazın ise liziz ve eDNA'nın kontrolünde rol oynadığı ve biyofilm gelişimi sırasında biyofilm dağılımının desteklenmesinde salındığı bildirilmiştir (Mann ve diğerleri, 2009). George ve Halami (2019), tavuk sosislerinden izole edilen *Lactobacillus plantarum*'un olgun biyofilm (>24saat) hücrelerinde eDNA'nın varlığını DNaz I muamelesi ile tespit etmiştir. *S. aureus* biyofilmleri, beta-toksin, nötr bir sfingomiyelinaz ve bir virülans faktörü ile kovalent olarak etkileşime giren eDNA'dan oluşan bir iskelet çerçevesi ile yapılandırılmıştır (Huseby ve diğerleri, 2010). Ayrıca, *E. faecalis* biyofilm gelişimini etkilemek için eDNA salınımını otoliz yoluyla düzenleyebilir (Thomas, Thurlow, Boyle ve Hancock, 2008; Thomas ve diğerleri, 2009). Ek olarak, iki hücre dışı endonükleaz olan, ExeS ve ExeM, *Shewanella*

oneidensis MR-1 tarafından oluşturulan biyofilmlerde eDNA bozunmasına katılır ve böylece hücre ayrılmasını mümkün kılabilir (Gödeke ve diğerleri, 2011).

2.4.1. Hücre dışı DNA (eDNA)

Biyofilm matriksi içerisinde bulunan moleküller bakteri türleri arasında farklılık gösterebilir, ancak hücre dışı DNA (eDNA) her yerde mevcuttur (Goodman ve Bakaletz, 2022). Özellikle bakteriyel biyofilmler içerisinde, türler arası iletişim, gen aktarımı ve biyofilm olgunlaşması gibi çeşitli işlevler için ortak bir platform sağlayabilir (Ibáñez de Aldecoa, Zafra ve González-Pastor, 2017). eDNA'nın, yüzeye ilk tutunmaya aracılık ettiği, stabil biyofilm matriksinin yapısal parçası olarak rol oynadığı veya besin kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Berne, Kysela, Brun, 2010). eDNA'nın birçok mikroorganizma türünde salınma ve düzenlenme mekanizmaları hala aydınlatılamamasına rağmen, biyofilmlerdeki eDNA'nın hücreler arası yapışmayı teşvik ederek bakteriyel agregasyona katkıda bulunması, abiyotik yüzeylere bağlanmaya aracılık etmesi ve farklı polimerik bileşenleri birbirine bağlayarak biyofilm mimarisini stabilize etmesi ile fizyolojik görevlerinin çok amaçlı olduğu görülmektedir (Seper ve diğerleri, 2011; Blakeman ve diğerleri, 2019; Campoccia, Montanaro ve Arciola, 2021). Biyofilm oluşumunun ilk fazında, eDNA'nın hücre-yüzey adezyonunda ve/veya hücre-hücre adezyonunda işlev görebildiği belirtilmektedir (Whitchurch, Tolker-Nielsen, Ragas ve Mattick, 2002). *Staphylococcus epidermidis*'te eDNA'nın, asit-baz etkileşimleri yoluyla yapışmayı ve agregasyonu arttırdığı (Das ve diğerleri, 2010) ve *Streptococcus mutans*'ta, eDNA'nın hidrofobik bir yüzeye yapışmaya aracılık edebildiği bilinmektedir (Das ve diğerleri, 2011). *Listeria monocytogenes*'te, eDNA'nın peptidoglikana bağlanması yapışmada rol oynamaktadır (Harmsen ve diğerleri, 2010) ve *Bacillus cereus*'ta planktonik bir kültür tarafından üretilen eDNA hücre yüzeyiyle birleşir ve biyofilm oluşumunu başlatan ve bazı antimikrobiyallere karşı koruyucu kalkan görevi gören substrat ile yapışmaya aracılık eder (Vilain ve diğerleri, 2009). eDNA, aynı zamanda dinamik bir gen havuzudur. Bakteriler bu yolla yatay gen transferi sonucu genetik bilgi alışverişi yapabilir (Vlassov, Laktionov ve Rykova, 2007). Ayrıca, *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinde eDNA'nın antibiyotik direncini indüklediği gözlemlenmiştir (Mulcahy, Charron-Mazenod ve Lewenza, 2008). *Lactiplantibacillus plantarum* türlerinde, özellikle klinik ortamlarda biyofilm aracılı antibiyotik direnci olasılığı vardır (George ve Halami, 2019). Bir çalışmada, probiyotik

Limosilactobacillus reuteri DSM 17938 eDNA'sı, PicoGreen kullanılarak tespit edilmiştir (Grande ve diğerleri, 2017).

LAB'leri, otoliz veya dış etkenler (antibiyotikler, pH, UV vb.) tarafından tetiklenen lizis yoluyla eDNA'larını salabilirler. Bakterinin kendi kendini yok etmesi anlamına gelen otoliz de DNA da dahil olmak üzere hücresel bileşenler dışarıya salınır (Mgomi ve diğerleri, 2023). Otoliz (hücre lizisi), çevresel stres veya diğer tetikleyicilerin neden olduğu hücre zarının parçalanmasını ifade eder. Parçalanma, bakteri hücre duvarı zayıfladığında meydana gelir ve ozmotik basıncın hücre zarını parçalamasına izin verir (Panlilio ve Rice, 2021). Ancak, matriks bileşenlerinin polisakkarit ve protein ile kompleks bir yapı oluşturmamasından dolayı, bakteriyel lizis ile artan nükleik asit, biyofilm matriksinden kolaylıkla kurtulamayabilir (Adiningrat ve diğerleri, 2023). Otoliz mekanizması için iki model vardır; (i) programlanmış hücre ölümüyle bakterinin kendi kendine veya (ii) bakterinin bir alt popülasyonu hücrelerinin parçalanması yoluyla salınmasıdır (Montanaro ve diğerleri, 2011; Allesen-Holm ve diğerleri, 2016). *Enterococcus faecalis*'de iki ekstraselüler proteaz ve *S. aureus*'da Cid/Lrg operonları otolize bağlı eDNA salınımında gerekmektedir. Cid/Lrg operonu, *S. aureus*'ın programlanmış hücre ölümünün aktivasyonunda rol oynar (Thomas ve diğerleri, 2008, Mann ve diğerleri, 2009; Abee, Kovács, Kuipers ve Van der Veen, 2011). *Neisseria meningitidis*'de biyofilm oluşumunun başlaması için eDNA önemli olduğu ve otolizinin azaldığı ampD mutantlarında, biyofilm oluşumunun azalmasında önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (Lappann ve diğerleri, 2010). Bazı LAB türleri ise, özel proteinler veya veziküller aracılığıyla eDNA'yı aktif olarak dışarı salgılayabilirler. Bu mekanizma, QS gibi hücre-hücre iletişimi süreçlerinde rol oynayabilir (Ibáñez de Aldecoa ve diğerleri, 2017). eDNA'nın veziküller aracılığıyla salınması *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* ve *N. gonorrhoeae*'de gözlemlenmiştir (Dorward, Garon ve Judd, 1989; Yaron, Kolling, Simon ve Matthews, 2000; Renelli, 2003). *L. plantarum* WCFS1 biyofilm hücrelerinin floresan mikroskobu ile cps1 mutantlarında artan hücre duvarı otoliz aktivitesine karşılık olarak daha yüksek miktarda eDNA varlığının ortaya çıktığı saptanmıştır (Ramirez ve diğerleri, 2015, 2018).

eDNA'nın biyofilm dağılımında da rolü vardır. *Caulobacter crescentus*'ta, eDNA'nın hücrelerin birikmesini, bunların mevcut bir biyofilme değil, yeni bir konuma yerleşmesini sağlayacak şekilde engelleyebildiği tespit edilmiştir (Berne ve diğerleri, 2010). Biyofilmlerle ilgili olarak eDNA, savunma mekanizmalarında ve dolayısıyla patojenik

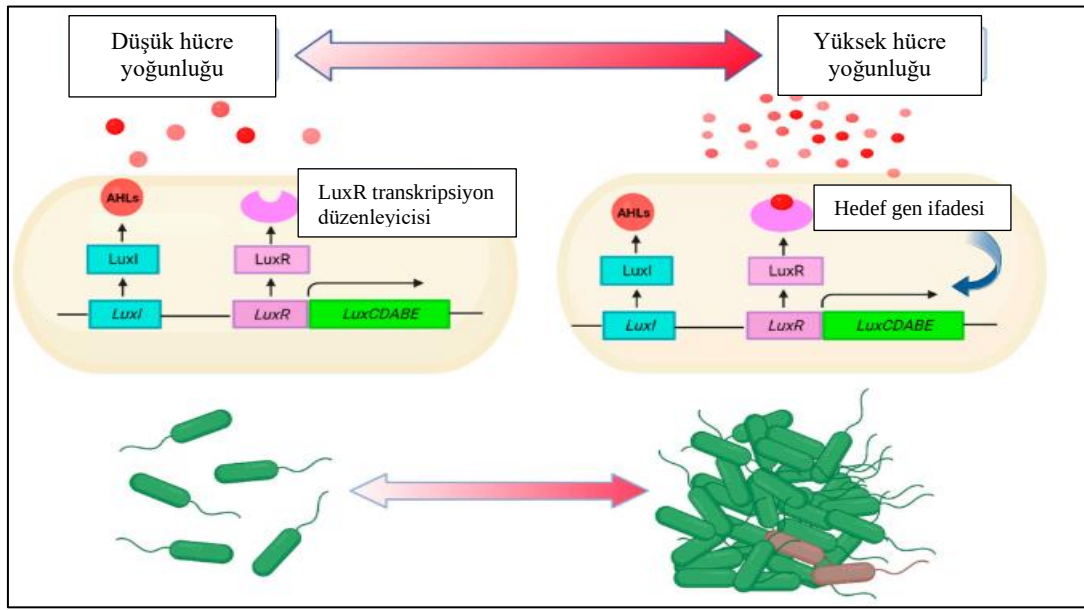
mikroorganizmaların virölansında rol oynayabilir. eDNA, antimikrobiyallerin matriks yoluyla taşınmasını azaltarak veya diğer matriks bileşikleriyle etkileşime girerek koruyucu rol oynar (Flemming ve Wingender, 2010). Ancak, eDNA aynı zamanda katyonları şelatlayabilir. *P. aeruginosa*'da magnezyum şelatlandığında, yüzeyini değiştiren ve patojeniteyi veya antimikrobiyal direnci artırabilecek bir genetik programın tetiklendiği, ayrıca, eDNA'nın yıkımı sonucu oluşan asidik ortam, antimikrobiyal peptitlere karşı direnci indükleyen bir sinyal olduğu bildirilmiştir (Mulcahy ve diğerleri, 2008; Lewenza, 2013; Wilton, Charron-Mazenod, Moore ve Lewenza, 2016).

2.5. Biyofilm ve Quorum Sensing

Bakteriler bağımsız olarak büyüeyebilen, bölünebilen, algılayabilen ve çevresel sinyallere uyum sağlayabilen temel, tek hücreli organizmalardır. Kendi kendine yeterliliklerine rağmen bakteriler, biyoluminesans üretimi, biyofilm oluşumu ve ekzoenzim salgılanması gibi iş birlikçi faaliyetleri gerçekleştirmek için etrafındaki mikroorganizmalar ile çabalarını koordine ederler. Bu koordinasyon, Quorum Sensing (Çoğunluğu algılama, QS) adı verilen hücreden hücreye iletişim mekanizması yoluyla gerçekleşir (Solano, Echeverz ve Lasa, 2014).

Biyofilm oluşumu ve QS birbiriyle yakından bağlantılı süreçlerdir. Biyofilmin başlatılması ve olgunlaşması kısmen çoğunluğu algılamayla, yani bakteriyel hücrelerin çevresinde sinyal moleküllerinin birikmesiyle düzenlenen hücre yoğunluğu algılama mekanizmasıyla düzenlenir. QS, bakterilere, topluluk üyelerinin salgıladığı belirli bir sinyal molekülünün birikimini ölçerek popülasyon yoğunluğunu tanıma kapasitesi kazandırır. Yalnızca popülasyon yoğunluğu yüksek olduğunda sinyalin hücre dışı ortamda birikmesi, yanıtı aktive etmek için yeterlidir (Parga, Manoil, Brundin, Otero ve Belibasakis, 2023). QS sinyal molekülleri düşük moleküler ağırlığa sahiptir ve açıl homoserin laktonlar (AHL), otoindüktörler (AI-2), cis-doymamış yağ asitleri ve peptitler de dahil olmak üzere çok çeşitli kimyasal sınıflara ayrılırlar (Fuqua ve Greenberg, 2002; Williams ve Cámara, 2009). Çoğunluğu algılayan düzenleyici ağlar yalnızca çok karmaşık olmakla kalmaz, aynı zamanda bakteri türleri arasında da farklılık gösterir (Solano ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, QS'in biyofilm oluşumu üzerindeki düzenleyici mekanizmaları genel olarak tanımlanamaz. Bununla birlikte, kullanılan AI türlerine bağlı olarak QS sistemleri, AHL sistemi, AIP sistemi (bu iki sistem daha önce AI-1 sistemi olarak biliniyordu), AI-2 sistemi ve AI-3

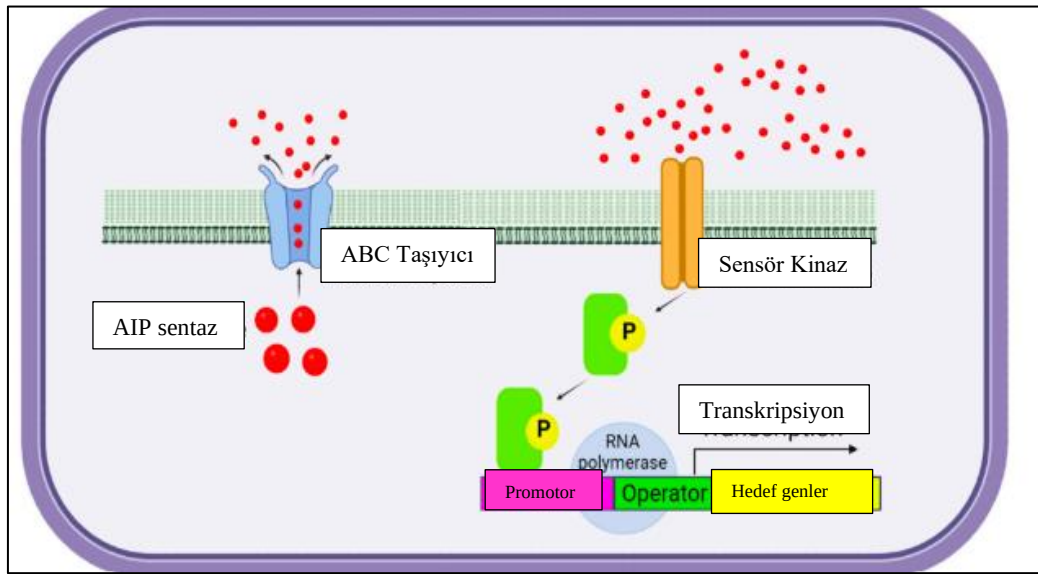
sistemi olmak üzere çeşitli kategorilere ayrılmıştır (Zhou, Zhang ve Zhu, 2020). Gram negatif bakterilerdeki birincil sinyal molekülleri, AI-1 otoindüktörleri olarak bilinen, AHL olarak adlandırılan homoserin laktonlardır. AI-1, biyofilm oluşturan bakterilerin intraspesifik iletişimde kullanılır, ancak bazı bakteriler çevredeki ortamda rakip bakteri türlerini tespit edebilir. Gram negatif bakterilerde, AHL'lere dayalı QS, bakteriyel hücrelerin yoğunluğuna yanıt olarak global gen ekspresyonunun düzenlenmesinde hayati bir rol oynar (Juszcuk-Kubiak, 2024). Gram negatif bakterilerdeki en iyi bilinen AHL aracılı QS mekanizması, ilk kez *Vibrio fischeri*'de açıklanan LuxI/LuxR sistemidir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Gram negatif bakterilerde QS'nin genel mekanizması (Juszcuk-Kubiak, 2024).

LuxI tipi proteinler, hücre zarına pasif olarak nüfuz eden ve hücreler arasında bir sinyal iletimi sağlayan, AI-1'in sentezinden sorumludur (Smirnova, Didenko, Azizbekyan ve Romanova, 2010). Bu moleküller bakteri hücre zarına nüfuz eder ve çoğalan hücrelerin sayısı bakteri popülasyonunun yoğunluğunu belirler. Uygun eşik konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra LuxR reseptör proteini aktive edilir ve hedef efektör genlerin transkripsiyonu gerçekleşir (Paluch ve diğerleri, 2020). AIP sisteminde otoindükleyici peptitler (AIP'ler) kullanılır ve bu sistem yalnızca Gram pozitif bakterilerde bulunur (Irie ve Parsek, 2008; Paluch ve diğerleri, 2020). Gram pozitif bakteriler, kısa oligopeptit sinyalleri ve membrana bağlı sensör kinaz reseptörlerinden ve gen ifadesinin değiştirilmesinden sorumlu sitoplazmik transkripsiyon faktörlerinden oluşan iki bileşenli sistemler kullanır (Papenfort ve Bassler, 2016). LuxI/LuxR ve AIP'ler arasındaki en büyük farklardan biri aynı

kökenli reseptörlerin konumudur. Gram pozitif bakterilerde LuxR tipi reseptörler sitoplazmiktir (Okada ve diğerleri, 2005). API reseptörleri ise membrana bağlıdır ve ikili sinyal proteinleri olarak bilgiyi bir dizi fosforilasyon olayıyla iletir. Daha sonra, API'ler, hedef genlerin ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerek özel ATP bağlayıcı kaset taşıyıcıları yoluyla hücre dışına taşınırlar. Tipik bir Gram pozitif QS sistemi, membrana bağlı bir histidin kinaz reseptöründen ve bir transkripsiyon düzenleyicisi olarak görev yapan ilgili bir sitoplazmik yanıt düzenleyiciden oluşur (Şekil 2.4) (Rutherford ve Bassler, 2012).



Şekil 2.4. Gram pozitif bakterilerde QS'nin genel mekanizması (Juszcuk-Kubiak, 2024).

AHL çekirdek tespit sistemlerinde olduğu gibi, salgılanan AIP otoindüktörlerinin konsantrasyonu hücre yoğunluğunun artmasıyla birlikte artar. Fosforile edilmiş düzenleyici proteinler, hedef genlerin ekspresyonunu modüle etmek için DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörleri olarak görev yapar. Çoğu durumda, otoindüktör öncüsünü, histidin kinaz reseptörünü ve düzenleyici proteini kodlayan genler bir operon oluşturur ve bunun ekspresyonu, QS tespiti ile otomatik olarak indüklenir. Bu konfigürasyon pozitif geri bildirim üretir ve gen ekspresyonunun çekirdek bağımlı modu olan düşük hücre yoğunluğundan yüksek hücre yoğunluğuna geçişi hızlandırır (Juszcuk-Kubiak, 2024). QS sistemini kullanan bir Gram pozitif bakteri örneği, ekzotoksinler veya biyofilm gibi virülans faktörlerinin üretimini kontrol eden bir agr sistemine sahip *S. aureus*'tur (LaSarre ve Federle, 2013). Agr sistemi, *L. plantarum*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *C. difficile*, *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecalis* dahil Gram pozitif bakterilerde evrimsel

olarak korunur (Mangwani, Dash, Chauhan ve Das, 2012). Günümüzde bu iki sistem (AHL sistemi ve AIP sistemi) üzerinde çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Zhou ve diğerleri, 2020; Prazdnova ve diğerleri, 2022; Xiao ve diğerleri 2022). QS, belirli genleri düzenleyerek LAB'ın popülasyon yoğunluklarına göre çevrelerini algılamasını ve bunlara uyumlarını sağlar. Ayrıca, *Lactobacillus* türlerinde biyofilm oluşumunu etkilediği bildirilen LuxS'den türetilmiş otoindüktör-2 (AI-2) ve transkripsiyon sonrası olmak üzere iki sinyal molekülünün LAB biyofilm oluşumunu etkilediği gösterilmiştir. LuxS geninin aşırı ekspresyonunun AI-2 üretimini arttırdığı ve bu artışında *L. paraplantarum* L-ZS9'un biyofilm oluşumunu teşvik ettiği tespit edilmiştir (Liu, Zhang ve Li, 2018). LuxS geninin, *L. plantarum* KLDS1.0391'in gastrointestinal ortam toleransı ve yapışma yeteneğinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Jia ve diğerleri, 2018). LAB biyofilm oluşumunu etkileyen çeşitli faktörlerin gösterilmesine rağmen, biyofilm oluşumunun suşa özgü ve ekstrapolatif olmayan bir özellik olduğu da belirtilmektedir (Mgomi ve diğerleri, 2022).

2.6. Laktik Asit Bakterilerinde EPS ve Biyosentezi

Ekzopolisakkarit (EPS)'ler, çeşitli mikroorganizmalar tarafından hücre dışına salgılanan yüksek moleküler ağırlıklı karbonhidratlardır. Kimyasal olarak çeşitlilik gösteren biyolojik aktiviteleri, yapıları ve kaynaklarıyla ilgilidir (Rajoka, Wu, Mehwish, Bansal ve Zhao, 2020). LAB, homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler dahil olmak üzere iki tip EPS sentezler (Nguyen ve diğerleri, 2020). Homopolisakkarit sentezi, spesifik bir glukansükraz veya fruktansükraz ve hücre dışı bir şeker donörünü (glukanların sentezi için sükröz, fruktanların sentezi için fruktoz içeren oligosakkarit) içeren nispeten basit bir biyokimyasal işlemdir (Van Hijum ve diğerleri, 2006; Galle ve Arendt, 2014). Heteropolisakkarit sentezi, EPS gen kümesi ve housekeeping genleri tarafından kodlanan çeşitli gen ürünlerinin spesifik rolünü içeren karmaşık bir süreçtir. Bu gen ürünleri işlevlerine göre dört modüle ayrılabilir: Polisakkarit birleştirme makineleri (hazırlayıcı glikosiltransferazlar, Wzx veya flippaz, Wzy veya polimeraz ve EpsA), polisakkarit birleştirme işlemi yöneten fosfor düzenleyici sistem (*EpsB*, *EpsC* ve *EpsD*), glikosiltransferazlar, şeker nükleotid biyosentetik yolları ve EPS'lerin kimyasal dekorasyonunda yer alan asetil ve piruvil transferazı kodlayan genler (Zeidan ve diğerleri, 2017).

Genel olarak EPS biyosentezi 3 ana adımda özetlenir. Birincisi, tekrarlayan birimler için aktifleştirilmiş şeker öncüllerinin (veya üridin difosfat glikoz ve timidin difosfat glikoz gibi

şeker nükleotitlerinin) üretilmesidir. Şeker nükleotidleri, glikolitik ara maddelerden, genellikle glikoz-6-fosfat veya fruktoz-6-fosfattan çok adımlı yollarda sentezlenir. Bu karmaşık süreç, fosfoglukomutaz (glikoz-6-fosfatı glikoz-1-fosfata dönüştürür) (Laws, Gu, Marshall, 2001) ve UDP-glikoz pirofosforilaz ve dTDP-glikoz pirofosforilaz (glikoz-1-fosfatı sırasıyla şeker nükleotidleri UDP-glikoz ve dTDP-glikoza dönüştürür) (Welman ve Maddox, 2003) gibi çeşitli housekeeping gen ürünlerinin fonksiyonunu gerektirir. Farklı şeker nükleotidlerinin üretim potansiyeli, her LAB'nin gen içeriği tarafından belirlenir ve sonuçta EPS'lerde bulunan monomerlerin tipi belirlenir. LAB tarafından üretilen EPS'ler genellikle iki veya daha fazla (genellikle 3-8) tipte monosakkaritten oluşan tekrarlanan birimlerden oluşur (Neves ve diğerleri, 2005; Nguyen ve diğerleri, 2020). İkinci olarak, tekrarlayan birimlerin sentez süreci, ilk şeker nükleotidinin hücrenin sitoplazmik membranına bağlı olan izoprenoid lipid taşıyıcıya, undekaprenil fosfata bağlanması ve priming glikoziltransferaz tarafından katalize edilmesiyle başlar. Bunu, tekrar eden birimleri oluşturmak için şeker nükleotidlerinin sırayla eklenmesi takip eder ve *eps* gen kümeleri tarafından kodlanan glikosiltransferazlar bu işlemi katalize eder (Nguyen ve diğerleri, 2020). Daha sonra, tekrarlanan birimlerin hücre zarının iç kısmından dış kısmına polimerizasyonu ve hücre zarının iç kısmından dış kısmına aktarılmasıdır. Temel olarak *eps* gen kümesinde de kodlanan üç farklı protein, polimerizasyon ve dışa aktarma işlemini gerçekleştirir: Bir flippaz (*wzx* veya *cpsJ* tarafından kodlanan) veya bir translokaz, lipid taşıyıcı tekrarlayan birim kompleksini sitoplazma zarının iç yüzeyinden periplazmik bölgeye taşır. Daha sonra, bir polimeraz (*wzy* veya *cpsH* tarafından kodlanan) tekrar eden birimlerin bağlanmasını katalize eder (Laws ve diğerleri, 2001). Son olarak, bir zincir uzunluğu belirleme proteini, polimerizasyonu durdurmak için lipid taşıyıcı-tekrarlayan birim kompleksini ayırarak nihai EPS'lerin zincir uzunluğunu belirler (Laws ve diğerleri, 2001; Nguyen ve diğerleri, 2020).

LAB'deki EPS molekülünün ağırlığı 4×10^4 Da ile 6×10^6 Da arasında değişmektedir (Caggianiello, Kleerebezem ve Spano, 2016; Du, Yang, Bian ve Xu, 2017; Bibi ve diğerleri, 2021). LAB tarafından üretilen EPS'lerin verimi ve bileşimi, kültür ve fermantasyon koşullarından (pH, sıcaklık, inkübasyon süresi ve ortam bileşimi) önemli ölçüde etkilenmektedir (Torino, Font de Valdez ve Mozzi, 2015; Zannini, Waters, Coffey ve Arendt, 2016). Genel olarak, homopolisakkarit monomerleri çoğunlukla α -D-Glikopiranozil ve β -D-Glikopiranozil'dir. Glikozidik bağlarının türleri esas olarak α -(1 $\rightarrow$ 3), α -(1 $\rightarrow$ 6) ve β -(1 $\rightarrow$ 3) glikozidik bağlarıdır. Heteropolisakkaritlerin yapıları daha karmaşıktır ve farklı polimerizasyon derecelerine sahip tekrar eden birimlerden oluşur (Zannini ve

diğerleri, 2016). Tekrarlayan birimler genellikle 4-10 monosakkaritten oluşur, glikoz ve galaktoz; ramnoz, mannoz, N-asetil glukozamin, N-asetil galaktozamin ve diğer monosakkaritlerle karşılaştırıldığında EPS tekrarlayan birimlerinde en sık görülenlerdir (Zhou, Cui ve Qu, 2019).

2.7. Laktik Asit Bakteri EPS (LAB-EPS)'lerinin Fonksiyonları

EPS üretimi, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. plantarum* dahil olmak üzere *Lactobacillus* cinsine ait türlerde ve *Streptococcus thermophilus* ve *Lactococcus lactis* türlerinde yaygın olarak incelenmiştir (Wei ve diğerleri, 2018; Rajoka ve diğerleri, 2019). EPS'ler LAB hücre duvarının önemli yapısal bileşenidir (Kleerebezem ve diğerleri, 2010). EPS'ler, hücreleri dehidrasyon, aşırı sıcaklık, asit, ozmotik stres, fagositoz, makrofajlar ve antibiyotikler gibi olumsuz çevresel koşullara karşı korumak için hücreleri çevreleyen bir katman oluşturur. EPS'lerin diğer rolleri arasında biyofilm oluşumu, hücre yapışma mekanizmaları (Caggianiello, Kleerebezem ve Spano, 2016) ve konakçı etkileşiminde suşa özgü özelliklerin belirleyicisi yer almaktadır (Lee ve diğerleri, 2016). LAB-EPS'leri, bakteri hücresinde yüzey yapışmasını ve biyofilm oluşumunu arttırmanın yanı sıra onu ağır metallerden koruma işlevi görür (Limoli, Jones ve Wozniak, 2015). LAB-EPS'leri mükemmel biyoyoumluluk, yüksek viskozite ve emülsiyon stabilizasyon kapasitesi sergiler. Emülsifiye edici özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde biyo-kalınlaştırıcı olarak kullanılırlar (Bhat ve Bajaj, 2019). Ayrıca kolesterol seviyelerini düşürürler, patojen yapışmasına müdahale ederler, anti-tümör ve immünomodülatör özelliklere sahiptirler (Roobab ve diğerleri, 2020).

LAB, çevresel streslere uyum sağlamak için daha fazla EPS üreterek hücre yüzeyini değiştirebilir (Nguyen ve diğerleri, 2014). Artan EPS üretimi, daha kalın ve daha sıkı hücre duvarlarına neden olur. Böylece LAB'nin streslere karşı direncini arttırır. Bu özellik, probiyotik başlatıcıların dayanıklılığının yanı sıra LAB'nin EPS üretme yeteneğinin geliştirilmesi için kullanılması yararlı olabilir (Nguyen ve diğerleri, 2020). Hücre koruma fonksiyonu ile birlikte, EPS'lerin pozitif avantajları, prebiyotik, antikoagülan, antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, kolesterol düşürücü etkileri ve hatta antikanser aktivitesi gibi insan sağlığına önemli katkıları olduğu bilinmektedir (Vurmaz, Sahin ve Dertli, 2019). Bir çalışmada, sırasıyla *L. plantarum* 47FE (EPS47FE) ve *Lactiplantibacillus pentosus* 68FE (EPS68FE) tarafından salgılanan EPS'lerin güçlü antikoagülan ve fibrinolitik aktivite

sergilediği gösterilmiştir (Abo Saif ve Sakr, 2020). Bakterilerin bir EPS'yi enerji olarak kullanması pek olası değildir, ancak bazı LAB suşlarının *Lactobacillus* tarafından üretilen polisakkaritleri kullanabildiği bildirilmiştir (Tsuda ve Miyamoto, 2010). LAB tarafından üretilen EPS'lerin prebiyotik olarak kullanılması mümkündür ve EPS üreten bir LAB suşunun starter kültür olarak kullanılması sinbiyotik ürünlerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir. LAB'nin EPS'lerinin prebiyotik potansiyeli birçok çalışmada gösterilmiştir (Yuksekdag, Sahin ve Aslim, 2014; Khalil ve diğerleri, 2018; Wang ve diğerleri, 2021; Bikric ve diğerleri, 2022). *L. plantarum* tarafından sentezlenen α -D-glukan probiyotik bakterilerin büyümesini uyarabildiği, yapay mide suyu tarafından düşük oranda sindirilebildiği ve *Enterobacteriaceae*'nin temsili bir örnek olduğu probiyotik olmayan bakterilerin büyümesini engellediği de yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (Das, Baruah ve Goyal, 2014). *Weissella cibaria*, *W. confusa*, *L. plantarum* ve *Pediococcus pentosaceus* tarafından üretilen EPS'ler, bağırsak mikrobiyotasını sağlık yararları doğrultusunda modüle etmek için gıda endüstrisinde prebiyotik bir bileşen olarak önerilmiştir (Hongpattarakere, Cherntong, Wichienchot, Kolida ve Rastall, 2012).

LAB tarafından üretilen EPS'lerin sağlığı teşvik eden bir diğer işlevi de kolesterol düşürücü etkileridir. *In vitro* bir çalışmada, *L. plantarum* BR2 tarafından üretilen EPS'lerin kolesterol düşürücü (%45) özellikleri gösterilmiştir. Kolesterol düşürme mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber bu tür EPS'lerin gıda preparatlarına dahil edilmesi, artan kan kolesterol seviyesinin bir dereceye kadar azaltılmasına yardımcı olabileceği belirtilmiştir (Sasikumar, Vaikkath, Devendra ve Nampoothiri, 2017). LAB'den elde edilen birçok EPS, çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteriyel patojenlere karşı iyi bir antibakteriyel aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Jeong ve diğerleri, 2017; Rahnema Vosough ve diğerleri, 2021; Tarannum ve diğerleri, 2024). *L. reuteri* ve *L. vaginalis*'ten (bir tavuğun bağırsak çekumundan izole edilmiş) elde edilen iki tip EPS, *in vitro* yöntemle *E. coli* ve *Salmonella typhimurium* gibi patojenik bakterilere karşı güçlü antibakteriyel aktivite göstermiştir (Rajoka ve diğerleri, 2019). EPS'nin antagonistik aktivitesinin fonksiyonel mekanizması esas olarak hücre duvarını bozarak ve DNA'yı parçalayarak patojenlerin hücre bölünmesini bozmaya bağlıdır (He, Yang, Yang ve Yu, 2010; Kavitate ve diğerleri, 2023). EPS, antibiyofilm bileşiği olarak potansiyel bir role sahip olabilir. Çeşitli bulgular, EPS'nin farklı patojenik bakterilere karşı antibiyofilm potansiyelini göstermiştir (Sarıkaya, Aslim ve Yuksekdağ, 2017; Masebe ve Thantsha, 2022; Soliemani, Salimi ve Rezaei, 2022; Che ve diğerleri, 2024). *Lactobacillus helveticus*'tan elde edilen EPS, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve

E. coli biyofilmlerini sırasıyla %65,82, %43,58 ve %33,41 oranında önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (Li ve diğerleri, 2014). LAB tarafından üretilen EPS, kaliteyi, işlevselliği ve gıda muhafazasını geliştirmek için çeşitli gıda sistemlerinde (ekmek, peynir, reçel, dondurma, yoğurt vb.) hem yerinde hem de *ex-situ* uygulamalarla kullanılmaktadır (Kavitake ve diğerleri, 2023). LAB'den elde edilen EPS'nin biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik olmayan, farklı özelliklere ve kimyasal yapılaraya sahip olması, gıdalarda çeşitli işlevler sunabilir (Prete ve diğerleri, 2021). LAB elde edilen EPS, yalnızca gıdanın korunması, muhafazası ve güvenliği açısından değil, aynı zamanda deriden ve bağırsaktan mikrobiyal, mantar ve viral kökenli insan patojenlerini inhibe ederek insan sağlığının iyileştirilmesinde de potansiyel rol sağlar. Dolayısıyla, LAB'den elde edilen bu tür biyoaktif EPS'lerin gıda, ilaç ve biyomedikal sektörlerinde çeşitli yollarla geniş bir uygulama yelpazesi vardır (Kavitake ve diğerleri, 2023).

2.8. Laktik Asit Bakterilerinin Biyofilmlerdeki Diğer Mikroorganizmalarla Etkileşimi

Karışık türlerden oluşan bir biyofilm içindeki mikrobiyal hücreler, planktonik hücrelerle karşılaştırıldığında antibiyotik tedavisi, oksidatif stres ve besin açlığı gibi çevresel koşullara karşı daha fazla direnç gösterir (Rao, Shang, Yang, Zhou ve Rao, 2020). Karışık tür topluluklarının hücre çoğalması ve biyofilm olgunlaşması sırasındaki fizyolojik olaylar karmaşıktır (Fan, Huang, Chen ve Han, 2020). Biyofilm matriksinin bileşenlerindeki değişiklik ve gelişmiş mikrobiyal etkileşimler nedeniyle, karışık tür biyofilmlerinde artan direncin birincil mekanizmaları tam olarak açık değildir. Karışık türlerden oluşan biyofilmlerde artan dirençle ilgili çeşitli teoriler öne sürülmüştür. İlk olarak, bazı türler, belirli türler tarafından uzamsal olarak düzenlenmiş üç boyutlu yapı içinde diğer suşlarla kümelenerek diğerlerini koruyabilir (Lee ve diğerleri, 2014). İkinci mekanizma, karışık türlerden oluşan bir biyofilmin matriksini içerir. Farklı türler tarafından üretilen EPS arasındaki kimyasal etkileşimler, ilgili mikrobiyal türlere ve çevresel koşullardaki değişikliklere göre değişen kalın bir matriksle sonuçlanabilir (Flemming ve Wingender, 2010). Matriksin kalınlığının, risk faktörlerinin aktif mikroorganizmaların alt katmanlarına erişimini engelleyerek karışık türlerin biyofilm direncinde işlev gördüğü öne sürülmektedir (Guillonnet, Baraquet, Bazire ve Molmeret, 2018). Ayrıca, EPS'nin aminoglikozidler gibi pozitif yüklü antibiyotiklere bağlanarak bunların mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkilerini engellediği deneysel olarak kanıtlanmıştır (Rao ve diğerleri, 2020).

Yakın zamanda yapılan bir araştırmada, *Saccharomyces cerevisiae*'nin, *Lactobacillus* türleri ile bir arada bulunduğu, geleneksel bir Çin fermantasyon başlatıcısı olan Daqu'da biyofilm oluşumu için karşılıklı bir ilişki sergilediği keşfedilmiştir. Karışık bir biyofilmde *S. cerevisiae* biyokütlesinin azalmasına rağmen metabolik aktivitede baskın olduğu buna karşılık *Lactobacillus* suşlarının biyokütlesi artarken, metabolik aktivitelerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Biyofilm tabakasında, *S. cerevisiae* üst tabakayı planktonik hücrelerle kaplama eğilimindeyken, *Lactobacillus* türleri sınırlı besin koşulları altında alt tabakayı oluşturduğu tespit edilmiştir (Fan ve diğerleri, 2020). Karışık biyofilm oluşumu, karmaşık bir ortamda diğer mikrobiyal topluluklarda kültürlenemeyen mikroorganizmaların varlığını tanımlayabilir. Bu nedenle, karışık tür biyofilmindeki araştırmalar, başlatıcı topluluğun yeniden inşası, süksesyon ve fermantasyon mekanizması hakkındaki belirsiz sorunu çözmek için önemli olmaktadır (Mgomi ve diğerleri, 2023). Karışık tür biyofilmlerdeki iş birliği mikrobiyal etkileşimler, ortaklar tarafından üretilen matriksin oluşumunun artırılmasına veya diğer üyelerin büyümesini destekleyen metabolik ürünlerin çapraz beslenmesine dayanabilir. *L. lactis* ve *Pseudomonas fluorescens* tarafından oluşturulan çift tür biyofilmler, bakteriyel yapışmanın sırasıyla 20.000 ve 100 kata kadar artmasına neden olmuştur (Yuan ve diğerleri, 2020). Literatür çalışmaları, zayıf biyofilm oluşturan *L. lactis*'in, güçlü biyofilm matriks üreten *P. fluorescens* tarafından desteklenen gelişmiş yapışma yeteneğinden yararlanabileceğini ve bunun yanında, *L. lactis* kaynaklı bazı metabolitlerin, *P. fluorescens* tarafından besin kaynağı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Yuan ve diğerleri, 2020). *S. thermophilus* ve dört LAB suşunun (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. kefiranofaciens*, *L. helveticus* ve *L. paracasei*) büyüme ilişkisinin ve biyofilm oluşumunun belirlendiği bir çalışmada sonuçlar, dört *Lactobacillus* suşunun da *S. thermophilus*'un büyümesini önemli ölçüde desteklediğini, *S. thermophilus*'un ise *L. helveticus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. paracasei* üzerinde hiçbir etki göstermediğini, ancak *L. kefiranofaciens*'in büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir. Ek olarak, suşların sinbiyotik bir ilişkisi olup olmadığına bakılmaksızın, karışık tür ortamında tek bir suşa göre daha fazla biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular, ortak kültüre alınan suşlarda biyofilm oluşumunun, suşlar arasındaki sinbiyoz ilişkisinden bağımsız olduğunu göstermektedir (Yao ve diğerleri, 2022).

2.9. Laktik Asit Bakterilerinin Patojen Mikroorganizmalara Karşı Uygulamaları

Uzun yıllardır, çeşitli LAB kültürleri ve bunların bakteriyosinleri, organik asitleri, biyosülfaktanları, hidrojen peroksit, reuterin ve diasetil içeren hücresiz süpernatantları (CFS), patojenik bakterilerin ve bunlarla ilişkili biyofilmlerin büyümesini engellemek ve kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Giaouris, 2020). LAB'leri, antimikrobiyal ajana, konsantrasyonuna ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak, patojenik hücre zarının işlevini bozan, membran geçirgenliğine, hücre lizisine, hücre içeriğinin kaybına ve son olarak ölüme neden olan bakteriyostatik ve bakterisidal etkiler gösterebilir (Mgomi ve diğerleri, 2023). LAB'den üretilen EPS'nin de antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Abdalla ve diğerleri, 2021). EPS inhibitör potansiyelinin, hücre-hücre yüzey etkileşimini zayıflatarak veya monosakkarit kompozisyonları ve EPS'lerin fonksiyonel gruplarındaki farklılıklar yoluyla otoagregasyona ve bakteriyel hücre tutunmasına bağlı olduğu rapor edilmiştir (Kanmani ve diğerleri, 2013). *Lactobacillus* suşları tarafından üretilen biyofilmler genel olarak güvenli olarak kabul edilmektedir ve sayısız faydalı özelliklerinden dolayı patojenik biyofilmlerin oluşumuna müdahale etme konusunda umut verici bir araç olabilirler. Bu faydalı LAB biyofilmlerinin patojenik bakterilerin büyümesini, yapışmasını, yüzey kolonizasyonunu ve biyofilm oluşumunu engelleyebileceği ortaya koyulmuştur (Kim ve diğerleri, 2022). *Lactobacillus sakei* ve *P. pentosaceus* tarafından oluşturulan ve gıda kaynaklı patojenlerin büyümesini engelleyebilen biyofilmlere odaklanan bir çalışmada test edilen LAB tarafından oluşturulan biyofilmlerin *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes* ve *Salmonella enterica*'ya karşı geniş spektrumlu antibakteriyel aktivite sergilediği bulunmuştur (Kim ve diğerleri, 2022).

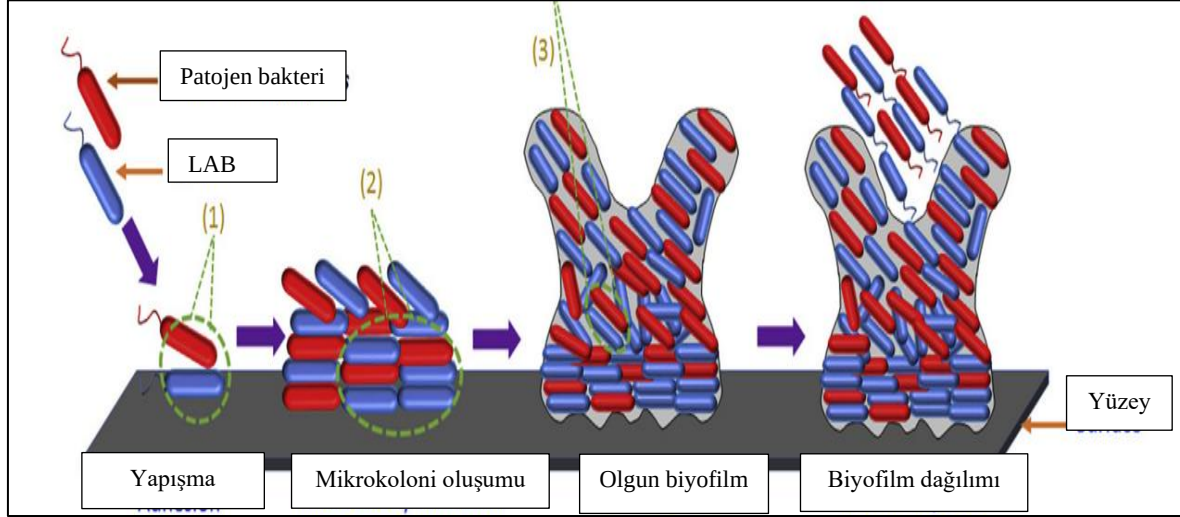
LAB biyofilmlerinin faydaları yalnızca bakteriyel patojenlere karşı değil aynı zamanda özellikle klinik ortamlarda mantarlara karşı da fark edilmiştir. Özellikle insan vücudunda LAB biyofilminin oluşumu, işlevselliği etkileyebileceği ve mikrobiyal kalıcılığı iyileştirebileceği için sağlık açısından önemlidir. Ayrıca, LAB biyofilmlerinin antifungal aktiviteleri de mantar hastalıklarına yönelik tedavi yaklaşımlarının genişletilmesi açısından önemlidir (Parolin ve diğerleri, 2021). Yıllardır, gıda ve yemdeki mikotoksinleri adsorbe etmek veya azaltmak için biyolojik, kimyasal ve fiziksel yaklaşımlar gibi çeşitli detoksifikasyon süreçleri uygulanmaktadır (Muhialdin, Saari ve Meor Hussin, 2020). Mikotoksinlerin azaltılmasında bazı olumlu sonuçları olduğu gösterilmiş olsa da kimyasal ve fiziksel süreç onları tamamen adsorbe edememekte ve sınırlı uygulama, yüksek maliyet,

gıdanın besin değerine etkisi, güvenliği ve önemsizliği gibi pek çok sakıncayı bünyesinde barındırmaktadır. Bugüne kadar LAB biyofilmleri, gıda ve yemdeki mikotoksinlerin azaltılmasına yönelik biyolojik bir yaklaşım olarak araştırılmıştır. Sütteki bir aflatoksin olan AFM1'i *L. rhamnosus* biyofilmi kullanılarak ortadan kaldırmak için geliştirilen yöntemde *L. rhamnosus* biyofilminin AFM1'i %60,74'e kadar bağlayabildiği gösterilmiştir. Mikotoksinlere karşı LAB biyofilmleri üzerine araştırmalar henüz başlangıç aşamasında olmasına rağmen, gıda endüstrilerindeki yararlılığını desteklemek için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir (Assaf, Khoury, Chokr, Louka ve Atoui, 2019). Dirençli patojenik bakterilerin gıda zinciri yoluyla bulaşması ve ortaya çıkmasındaki son eğilimler, dezenfeksiyon için çeşitli alternatiflerin araştırılması ihtiyacını güçlendirmektedir. Bu nedenle özellikle gıda endüstrisinde yüzeyler veya ekipmanlarla ilişkili patojenlerin kalıcılığını kontrol etmek için doğal ürünleri kullanan yeni stratejilerin geliştirilmesine büyük ilgi vardır. Zararlı biyofilm oluşumunu kontrol etmek çok önemlidir, ancak endüstriyel bakteriler tarafından oluşturulan faydalı biyofilmler yeni biyoteknolojik süreçlerin geliştirilmesine katkıda bulunabilirler. Bu nedenle gıdalarda, tarım ürünlerinde veya gastrointestinal sistemde bulunan ve gıda üretiminde başlatıcı olarak kullanılan LAB tarafından oluşturulan biyofilmler, patojenik biyofilmlerin oluşumunu engellemek için umut verici bir araç sunabileceği bildirilmiştir (Winkelströter ve diğerleri, 2013; Gomez-Mejia, Orlietti, Tarnutzer, Mairpady Shambat ve Zinkernagel, 2024).

2.10. Laktik Asit Bakterisi Biyofilmlerinin Antibakteriyel Mekanizması

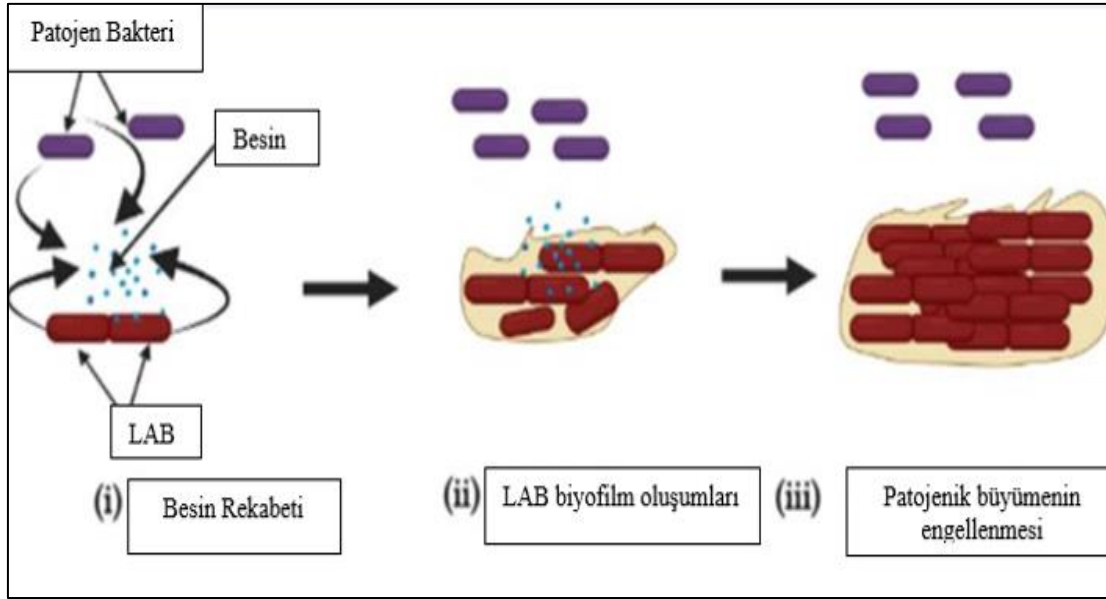
LAB biyofilmlerinin antibakteriyel fonksiyonlarının spesifik mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak, LAB biyofilmleri diğer bakterilerin büyümesini üç mekanizmadan biriyle engelleyebilir; (1) patojen bakteri yapışmasının inhibisyonu, (2) patojen mikroorganizmalarına karşı rekabetçi dışlama yaklaşımı, (3) patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal maddelerin üretimi (Hossain ve diğerleri, 2019).

Patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm gelişimine karşı LAB biyofilmlerinin etkisinin varsayımsal mekanizmaları Şekil 2.5’de gösterilmiştir.



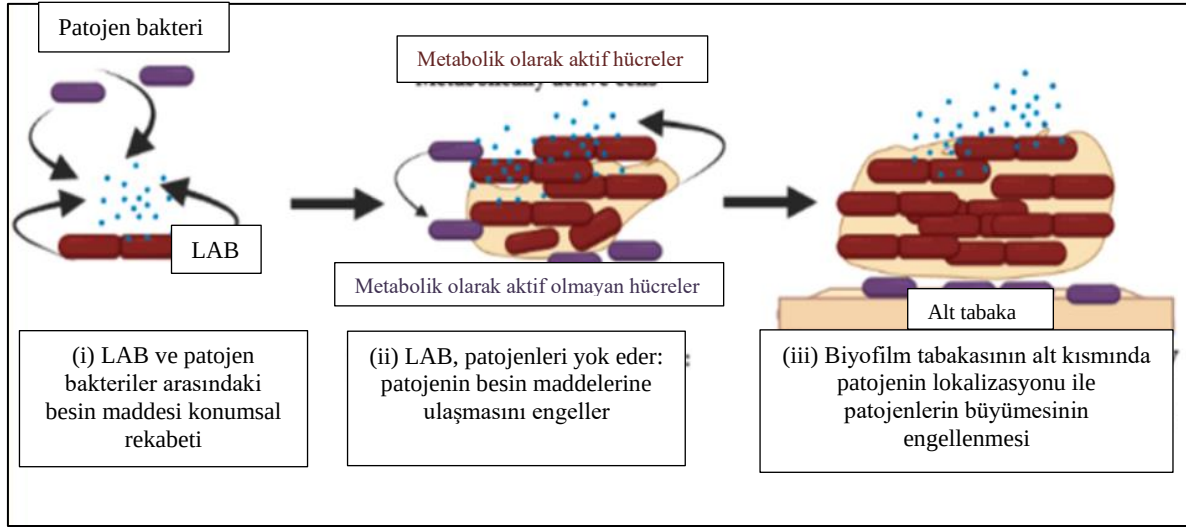
Şekil 2.5. LAB biyofilmlerinin patojen gelişimine karşı etki mekanizmaları (Hossain ve diğerleri, 2019).

LAB biyofilmleri, rekabetçi dışlama mekanizmaları (Jameson etkisi) sağlar. Kültür ortamında hem LAB hem de patojenler besin mevcudiyeti için rekabet eder ve LAB patojenik besin alımını engelleyen biyofilmler üreterek yüzey kolonizasyonu kurar; LAB’nde hücre popülasyonu artar ve biyofilmler olgunlaşma aşamasına ulaşarak besin eksikliği nedeniyle patojenik hücre büyümesinin engellenmesine neden olur ve sonunda bakteriyel hücre ölümüne neden olabilir. Jameson etkisi, mikrobiyal türler arasında besin maddeleri için bir “yarış” olarak nitelendirilebilir. Bu yarışta, hem başlangıç inokulum seviyeleri hem de büyüme parametreleri, hangi türlerin diğerlerini yenebileceğini belirleyen önemli faktörlerdir (Guillier, Stahl, Hezard, Notz ve Briandet, 2008). LAB biyofilmlerinin patojen bakterilere karşı sunduğu rekabetçi dışlama etki mekanizması (Jameson etkisi) Şekil 2.6’da verilmiştir. Bu mekanizmada, (i) patojenik bakteriler ve LAB’nin her ikisi de besinler için rekabet eder, (ii) LAB bu rekabeti kazanır ve patojenik besin tüketimini önleyen biyofilmler geliştirir, (iii) sonuç olarak besin eksikliği nedeniyle patojenik hücre ölümü meydana gelir (Guillier ve diğerleri, 2008). Öte yandan, başka bir rekabetçi dışlama yaklaşımı, LAB biyofilmlerinin, patojenik hücreleri biyofilm alt tabanına konumsal olarak sınırlayabildiğini, dolayısıyla büyümelerini engelleyebildiğini göstermektedir (Habimana, Guillier, Kulakauskas ve Briandet, 2011).



Şekil 2.6. LAB biyofilmlerinin patojen bakterilere karşı rekabetçi dışlama etki mekanizması (Mgomi ve diğerleri, 2023).

LAB ve patojen bakteriler arasındaki konumsal rekabet Şekil 2.7’de gösterilmektedir. Bu yaklaşımda; (i) LAB ve patojen bakteriler arasındaki besin maddesi konumsal rekabeti, (ii) metabolik olarak aktif LAB hücresi biyofilm oluşturur ve biyofilmin alt katmanındaki patojenik bakterileri kısıtlar, yetersiz besin kaynağı nedeniyle inaktif patojen bakteri hücreleri gelişir, (iii) patojenik büyümenin inhibisyonu meydana gelir. Besin maddelerinin sürekli yenilenmesi ile yönetilen koşullar altında biyofilm oluşumu aşamalarında konfokal lazer tarama mikroskobu ile izlenen *L. monocytogenes* ve rekabetçi bir konakçı suşu olan *L. lactis* arasındaki etkileşimleri araştırıldığı çalışmada, *L. monocytogenes* hücreleri, *L. lactis*’in varlığıyla inhibe edilmiş ve alt tabaka ile temas halindeki biyofilm katmanlarının tabanında lokalize olmuştur. Ayrıca, bireye dayalı modelleme ile yapılan analiz sonucunda, iki bakterinin büyüme parametrelerinin biyofilm oluşumunun erken aşamalarında meydana gelen konumsal rekabet tarafından yönetildiği öne sürülmüş ve biyofilmin üst katmanında bulunan besinler, tabana kıyasla yüksek oranda kullanılmıştır (Habimana ve diğerleri, 2011).



Şekil 2.7. LAB biyofilmlerinin patojen bakterilere karşı konumsal olarak rekabetçi dışlama etki mekanizması (Mgomi ve diğerleri, 2023).

LAB biyofilmlerinin diğer bakterilerin büyümesini engelleyen diğer bir mekanizma ise bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler gibi antimikrobiyal maddelerin salgılanmasıdır. Bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler, lipid-II molekülleriyle etkileşime giren ve ayrışmasını teşvik eden sitoplazmik membran bozucular olarak işlev görür. Bakteriyosinler lipid-II hücre duvarı bileşeniyle etkileşime girer (tanıma çapası görevi görür) ve lipid-II moleküllerinin ayrışmasını teşvik etmek için sitoplazmik membran bozucuları olarak çalışır. Bu eylemler, hedeflenen hücrenin normal hücre döngüsünü ve hücre duvarı sentezini inhibe eder ve bakteriyel sitoplazmik membranda porların oluşmasına neden olarak bakteriyel sistemin proton hareket gücünün dağılması yoluyla hücre ölümüne yol açar. Ayrıca, bakteriyosinler DNA replikasyonunu inhibe eder ve DNA hasarına neden olur, sonuçta DNA giraz, RNA polimeraz ve Aspartil-tRNA sentetaz inhibisyonu ile hücre ölümüne yol açar. Organik asitler, patojen büyümesini engelleyebilecek ve bakteriyel sistemin proton hareket gücünün dağılması yoluyla hücre ölümüne yol açabilecek elverişsiz bir asidik durum sağlar. Hidrojen peroksit hedeflenen bakteriyel DNA, RNA ve protein metabolizmasına müdahale ederek DNA hasarı yoluyla hücre ölümüne neden olur (Lobos, Padilla ve Padilla, 2009; Hossain ve diğerleri, 2019). Nisin, gıda koruyucu olarak en yaygın kullanılan bakteriyosinlerin bir örneğidir. Çalışmalar, nisin biyofilm matriksinin en derin katmanına bile nüfuz edebilen bakterisidal etkiler içerdiğini göstermiştir (Field ve diğerleri, 2016; Shivaee, Rajabi, Farahani ve Fooladi, 2021). Bahsedilen yaklaşımların LAB biyofilmlerinin antibakteriyel mekanizması üzerinde etki göstermesine rağmen, araştırma gerektiren diğer alanda QS'in antibakteriyel aktivite üzerindeki mekanizmasıdır. QS,

biyofilm oluşumunda ve antibakteriyel aktivitede önemli bir rol oynamasına rağmen, antibakteriyel aktivitenin kesin rolü hala belirsizdir. Ek olarak, sıcaklık, pH ve besin varlığı gibi faktörler LAB biyofilmlerinin oluşumunu ve yapısını etkileyebilir ve bu da antibakteriyel özelliklerini etkileyebilir (Gómez ve diğerleri, 2016; Mgomi ve diğerleri, 2023).

2.11. Biyofilm Oluşumu ve EPS Üretimi Arasındaki İlişki

EPS molekülleri mikrobiyal biyofilm oluşum sürecini etkileyen başlıca faktör olarak kabul edilmektedir. Hücre dışı bileşikler, spesifik yapışma aşaması veya geri dönüşümsüz tutunma aşaması olarak adlandırılan hücre bağlanma süreçlerinin daha gelişmiş aşamasını teşvik eder. EPS üretimi, spesifik yapışma aşaması sırasında daha yoğun bir şekilde gerçekleşir. EPS molekülleri mikroorganizmalar arasındaki etkileşimleri güçlendirir ve sonuç olarak katı yüzeyde hücre kümelerinin oluşum sürecini belirler (Branda, Vik, Friedman ve Kolter, 2005; Czaczyk ve Myszka, 2007). Biyofilm matriksinin mimarisi ve morfolojisinden çoğunlukla hücre dışı proteinleri, EPS'ler ve hücre dışı DNA sorumludur (Langille, Geesey ve Weiner, 2000). Hücre dışında salgılanan polisakkaritler farklı katı yüzeylere mikrobiyal bağlanma sürecini belirler. İlk olarak bu makromoleküller hücre yüzeyinde biriktirilir. Dış ortama salgılanma sürecinden sonra, polisakkaritler temas yüzeylerine adsorbe edilebilir. Katı yüzeyde oluşan bir polisakkarit tabakası bakteriyel yapışma sürecine yardımcı olur. Adsorbe edilmiş polisakkarit tabakası, katı ortam ara yüzeyini, bakteri yüzeylerindeki diğer spesifik polimerlerin etkileşime girebileceği jel benzeri bir bölgeye dönüştürebilir (Flemming ve Wingender, 2001; Czaczyk ve Myszka, 2007). Mikrobiyal yapışma sürecinin daha ileri aşamalarında, EPS'in *in situ* salgılanması da gözlemlenebilir. Bu, tek hücreleri temas yüzeyine sabitleyerek mikrobiyal bağlanma sürecinin yoğunlaşmasına yol açar (Martinelli, Bachofen ve Brandl, 2002). Polisakkarit tabakası ve mikrobiyal yapışma süreci arasındaki ilişki Van der Waals etkileşimleri, elektrostatik kuvvetler ve yüzeylerin hidrofobikliği ile ilgilidir. EPS'in ve temas yüzeylerinin adsorpsiyon özellikleri, ilk olarak yüklü grupların arayüzeyde yeniden dağılımına ve ikinci olarak da polisakkaritlerin, hücre yüzeylerinin ve temas yüzeylerinin hidrasyon değişikliklerine dayanmaktadır (Czaczyk ve Myszka, 2007).

EPS, "yapışkan polimerler" olarak adlandırılmaktadır. Bu makromoleküllerin katı yüzeylerde mikrobiyal biyofilm oluşum sürecini belirleyen önemli faktörler olduğuna inanılmaktadır (Liu, Liu ve Tay, 2004). Hücre dışı salgılanan polisakkaritler, hem adezyon

hem de kohezyon etkileşimlerinden sorumlu ve biyofilmlerin yapısal bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. EPS yüzeyin ön koşullandırılmasını teşvik ederek yapışma sürecini daha elverişli hale getirerek mikrobiyal agregasyonu ve biyofilm oluşumunu kolaylaştırmak için hücre-hücre uyumunu teşvik eder (Flemming ve diğerleri, 2016). Biyofilm içerisinde yer alan EPS'ler, antimikrobiyalere ve konakçının bağışıklığına karşı fiziksel stabilite ve direnç sağlamaktır. Olgun biyofilmlerin EPS ile ilişkili viskoelastikliği, sürekli sıvı kayma gerilimi veya yüksek mekanik basınç altında bile alt tabakadan ayrılmalarını zorlaştırır (Peterson ve diğerleri, 2015). İlginç bir şekilde, artan EPS üretimi aynı zamanda biyofilmlerin, tribometri ile birleştirilmiş Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Dönüşümü Kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi ile ortaya konduğu gibi yüksek kesme gibi çevresel stres faktörlerine karşı oldukça uyarlayıcı/koruyucu tepkisini de yansıtmaktadır (Hou ve diğerleri, 2018; Karygianni ve diğerleri, 2020).

Biyofilm matriksi, biyofilm yapısını koruyan bir oluşumdan daha fazlasıdır. EPS, sinyalleme, genetik değişim, mikro ortamların oluşturulması, mekanik stabilite ve antimikrobiyal tolerans gibi biyofilm oluşumu, kalıcılık, kolektif davranış ve virülans için gerekli olan fonksiyonel özelliklere aktif olarak katılır. EPS, biyofilmin yaşam döngüsü boyunca yapı ve işlevi etkileyecek şekilde sürekli olarak oluşturulmakta ve yeniden modellenmektedir (Karygianni ve diğerleri, 2020).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu tez çalışması kapsamında, Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı stok kültür koleksiyonunda mevcut olan, 54 tavuk gastrointestinal sistemi (TGIS) ve 42 tavuk gaitası (TG)'ndan izole edilmiş 80 *Lactobacillus* ve 16 *Streptococcus* cinsine ait toplam 96 LAB'si kullanılmıştır. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 referans suşu, negatif kontrol olarak ise *Escherichia coli* ATCC 35218 referans suşu kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan bakterilerin ve referans suşların kodları

No	Bakteri	İzolasyon Kaynağı	No	Bakteri	İzolasyon Kaynağı
1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	TGIS	49	<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM 133	TGIS
2	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> ZYN31	TGIS	50	<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM134	TGIS
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ29	TGIS	51	<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM141	TGIS
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ36	TGIS	52	<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN13	TGIS
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ51	TGIS	53	<i>Lactobacillus</i> sp. KC11L	TG
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ54	TGIS	54	<i>Lactobacillus</i> sp. KC16L	TG
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ59	TGIS	55	<i>Lactobacillus</i> sp. KC17L	TG
8	<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ61	TGIS	56	<i>Lactobacillus</i> sp. KC23L	TG
9	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ZYN9	TGIS	57	<i>Lactobacillus</i> sp. KC45L	TG
10	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ZYN15	TGIS	58	<i>Lactobacillus</i> sp. KC47L	TG
11	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ZDM2132	TGIS	59	<i>Lactobacillus</i> sp. KC55L	TG
12	<i>Lactobacillus fermentum</i> ZYN17	TGIS	60	<i>Lactobacillus</i> sp. KC56L	TG
13	<i>Lactobacillus</i> sp. 30	TGIS	61	<i>Lactobacillus</i> sp. KC86L	TG
14	<i>Lactobacillus</i> sp. 116	TGIS	62	<i>Lactobacillus</i> sp. KC96L	TG
15	<i>Lactobacillus</i> sp. 312	TGIS	63	<i>Lactobacillus</i> sp. KC106L	TG
16	<i>Lactobacillus</i> sp. 412	TGIS	64	<i>Lactobacillus</i> sp. KC116L	TG
17	<i>Lactobacillus</i> sp. 713	TGIS	65	<i>Lactobacillus</i> sp. KC126L	TG
18	<i>Lactobacillus</i> sp. 716	TGIS	66	<i>Lactobacillus</i> sp. KC136L	TG
19	<i>Lactobacillus</i> sp. 721	TGIS	67	<i>Lactobacillus</i> sp. KC17S	TG
20	<i>Lactobacillus</i> sp. 722	TGIS	68	<i>Lactobacillus</i> sp. KC27S	TG
21	<i>Lactobacillus</i> sp. 724	TGIS	69	<i>Lactobacillus</i> sp. KC37S	TG
22	<i>Lactobacillus</i> sp. 820	TGIS	70	<i>Lactobacillus</i> sp. KC45S	TG
23	<i>Lactobacillus</i> sp. 911	TGIS	71	<i>Lactobacillus</i> sp. KC57S	TG
24	<i>Lactobacillus</i> sp. D1	TGIS	72	<i>Lactobacillus</i> sp. KC77S	TG
25	<i>Lactobacillus</i> sp. D16	TGIS	73	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> KC12L	TG
26	<i>Lactobacillus</i> sp. D38	TGIS	74	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> KC26L	TG
27	<i>Lactobacillus</i> sp. D39	TGIS	75	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> KC37L	TG

Çizelge 3.1. (devam) Çalışmada kullanılan bakterilerin ve referans suşların kodları

No	Bakteri	İzolasyon Kaynağı	No	Bakteri	İzolasyon Kaynağı
28	<i>Lactobacillus</i> sp. U4	TGIS	76	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> KC43L	TG
29	<i>Lactobacillus</i> sp. U5	TGIS	77	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> KC21L	TG
30	<i>Lactobacillus</i> sp. U6	TGIS	78	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> KC27L	TG
31	<i>Lactobacillus</i> sp. U10	TGIS	79	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> KC76L	TG
32	<i>Lactobacillus</i> sp. U11	TGIS	80	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> KC66L	TG
33	<i>Lactobacillus</i> sp. U12	TGIS	81	<i>Streptococcus</i> sp. DZM 131	TGIS
34	<i>Lactobacillus</i> sp. U15	TGIS	82	<i>Streptococcus</i> sp. 731	TGIS
35	<i>Lactobacillus</i> sp. U18	TGIS	83	<i>Streptococcus</i> sp. KC13L	TG
36	<i>Lactobacillus</i> sp. U19	TGIS	84	<i>Streptococcus</i> sp. KC14L	TG
37	<i>Lactobacillus</i> sp. U20	TGIS	85	<i>Streptococcus</i> sp. KC24L	TG
38	<i>Lactobacillus</i> sp. U25	TGIS	86	<i>Streptococcus</i> sp. KC65L	TG
39	<i>Lactobacillus</i> sp. U34	TGIS	87	<i>Streptococcus</i> sp. KC33L	TG
40	<i>Lactobacillus</i> sp. U35	TGIS	88	<i>Streptococcus</i> sp. KC11S	TG
41	<i>Lactobacillus</i> sp. U36	TGIS	89	<i>Streptococcus</i> sp. KC12S	TG
42	<i>Lactobacillus</i> sp. U37	TGIS	90	<i>Streptococcus</i> sp. KC13S	TG
43	<i>Lactobacillus</i> sp. U38	TGIS	91	<i>Streptococcus</i> sp. KC14S	TG
44	<i>Lactobacillus</i> sp. U39	TGIS	92	<i>Streptococcus</i> sp. KC16S	TG
45	<i>Lactobacillus</i> sp. U40	TGIS	93	<i>Streptococcus</i> sp. KC21S	TG
46	<i>Lactobacillus</i> sp. GLK3	TGIS	94	<i>Streptococcus</i> sp. KC47S	TG
47	<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM121	TGIS	95	<i>Streptococcus</i> sp. KC55S	TG
48	<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM122	TGIS	96	<i>Streptococcus</i> sp. KC67S	TG
Patojen Bakteriler					
Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300			<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218		

3.2. Besiyeri ve Çözeltiler

TGIS ve TG’ndan izole edilmiş *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsine ait LAB’lerinin geliştirilmesi için De Man Rogosa Sharpe (MRS) sıvı besiyeri kullanılmıştır. Araştırma sürecinde kullanılan patojen mikroorganizmaların gelişiminde ise Nutrient sıvı besiyeri kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Çizelge 3.2’de belirtilen maddeler tartılıp, bir miktar distile su ile maddelerin çözülmesi sağlandıktan sonra son hacim 1000 mL’ye tamamlanmış ve uygun pH değerine ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerlerinin katı formunun hazırlanmasında ise besiyeri içeriğine %1,5 oranında Agar- agar (Merck) eklenmiş ve aynı koşullarda otoklavda steril edilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan tüm besiyerleri ve çözeltiler 121°C’de 15 dakika otoklavda (Nüve), ek olarak kullanılacak tüm cam malzemeler Pasteur fırınında (Nüve) steril edilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri, tampon ve çözelti içerikleri

Besiyerleri, Çözeltiler ve Tampon	İçerik (g/L)
De Man Rogosa Sharpe Sıvı Besiyeri (MRS)	Glikoz 20 g Pepton 10 g Et ekstraktı 10 g Sodyum asetat 5 g Maya ekstraktı 5 g Amonyum sitrat 2 g Dipotasyum fosfat 2 g Magnezyum sülfat 0,2 g Mangenez sülfat 0,05 g Tween 80 1,08 mL pH 6,2 ± 0,2
Nutrient Sıvı Besiyeri (NB)	Pepton 10 g Et ekstraktı 10 g Sodyum klorür 5 g pH 7,0 ± 0,2
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)	%0,02 KCl %0,144 Na ₂ HPO ₄ %0,8 NaCl %0,024 KH ₂ PO ₄ pH 7,2 ± 0,2
Serum Fizyolojik (SF)	NaCl 8,5 g

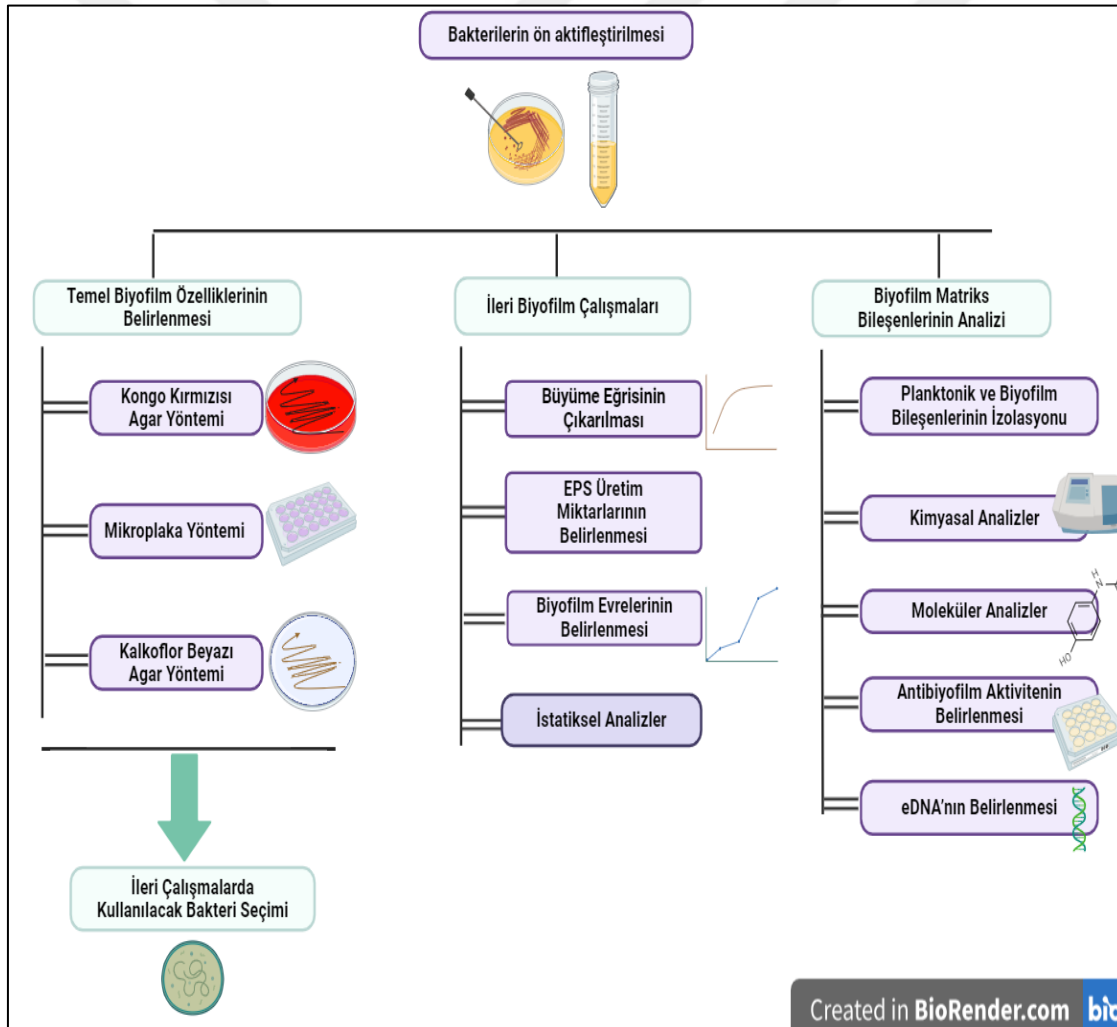
3.3. Bakterilerin Aktifleştirilmesi

Çalışmada kullanılan bakterilerinin aktifleştirme işlemi için, -80°C’de gliserol (Merck) stok kültürlerinde bulunan bakteriler %2 oranında uygun (MRS; Laktik asit bakterileri, NB; Patojen bakteriler) besiyerine inoküle edilerek 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir (De Man, Rogosa ve Sharpe, 1960; Ohta ve Hattori, 2018). İki kez aktifleştirilmiş bakteri süspansiyonunun bulanıklığı 7 McFarland standardına ayarlanmış olup bütün çalışmalarda bu son aktif kültür kullanılmıştır.

3.4. Bakterilerin Muhafazası

Kullanılan bakteri kültürlerinin uygun besiyerinde aktifleştirilmesi gerçekleştirildikten sonra, uzun süreli muhafazası için 2 mL'lik kriyo tüpler içerisine 1 mL gliserol (Merck) eklenerek 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiş kriyo tüplere 1 mL bakteri süspansiyonu ilave edilmiş ve vortekslenerek homojen hale getirildikten sonra -80°C'de muhafaza edilmiştir (Harrigan ve McCance, 1976).

Bakterilerin ön aktifleştirme işlemi tamamlandıktan sonra yapılacak olan çalışmaların akış şeması Şekil 3.1'de verilmiştir.



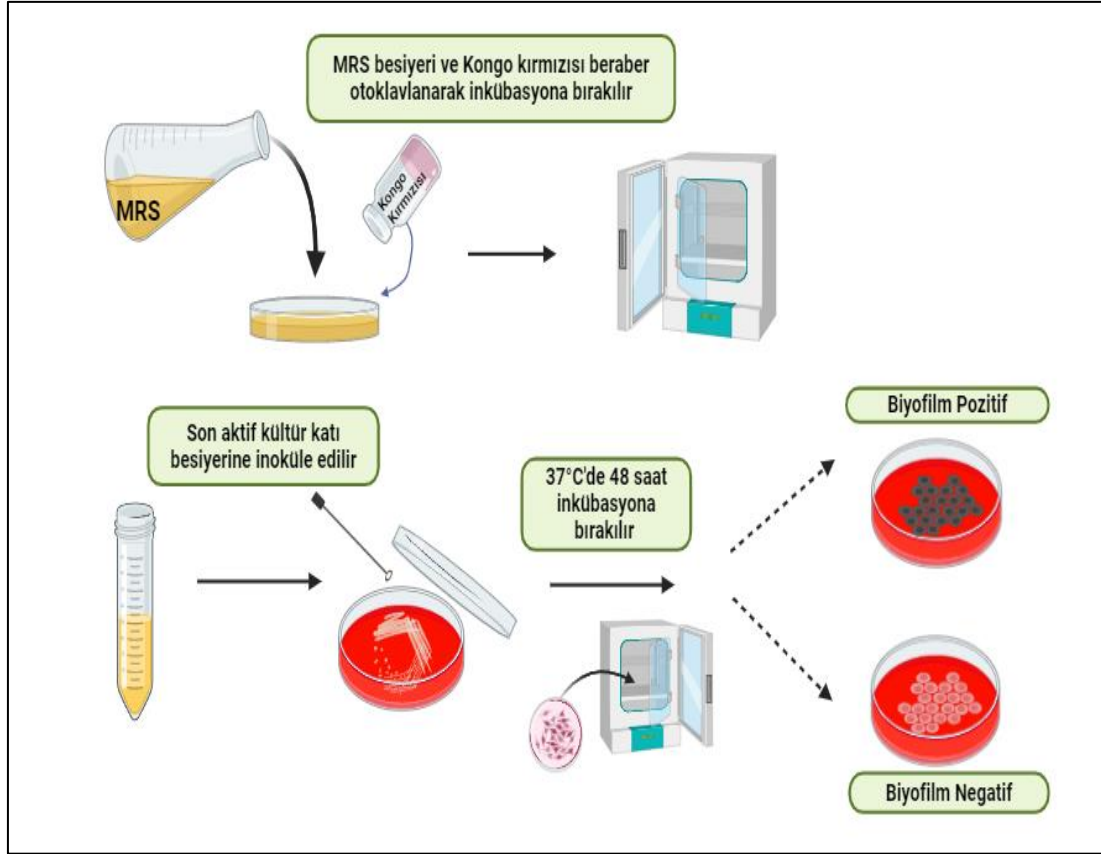
Şekil 3.1. Tez sürecinde yürütülen çalışmaların yöntemsel akış şeması (BioRender.com programında oluşturulmuştur).

3.5. Bakterilerin Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan bakterilerin temel biyofilm oluşturma yetenekleri kalitatif ve kantitatif olarak incelenmiştir. Bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin kalitatif olarak tespit etmek amacıyla kongo kırmızısı ve kalkoflor beyazı içeren katı besiyerleri kullanılırken, bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin kantitatif olarak belirlenmesinde ise mikroplaka yöntemi kullanılmıştır.

3.5.1. Kongo kırmızısı katı besiyeri (congo red agar, CRA)

Doksan altı LAB'sinin biyofilm oluşturma yeteneği, ilk olarak kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde değerlendirilmiştir. Aktif kültür, 0,8 g/L kongo kırmızısı (Merck) ilave edilerek hazırlanan MRS katı besiyerine çizgi ekimi yöntemiyle inoküle edilmiştir. Daha sonra, örnekler, 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda besiyerinde siyah renkte koloni oluşturan bakteriler biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir. Besiyerinde siyah renkte koloni oluşturmayanlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2) (Landeta, Curiel, Carrascosa, Muñoz ve De Las Rivas, 2013; Niederle ve diğerleri, 2019). Bu yöntemde pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturma yeteneği gösteren Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 referans suşu, negatif kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 35218 referans suşu kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Kongo kırmızısı içeren katı besiyeri yöntemi (BioRender.com programında oluşturulmuştur).

3.5.2. Polistiren mikropilaka yöntemi

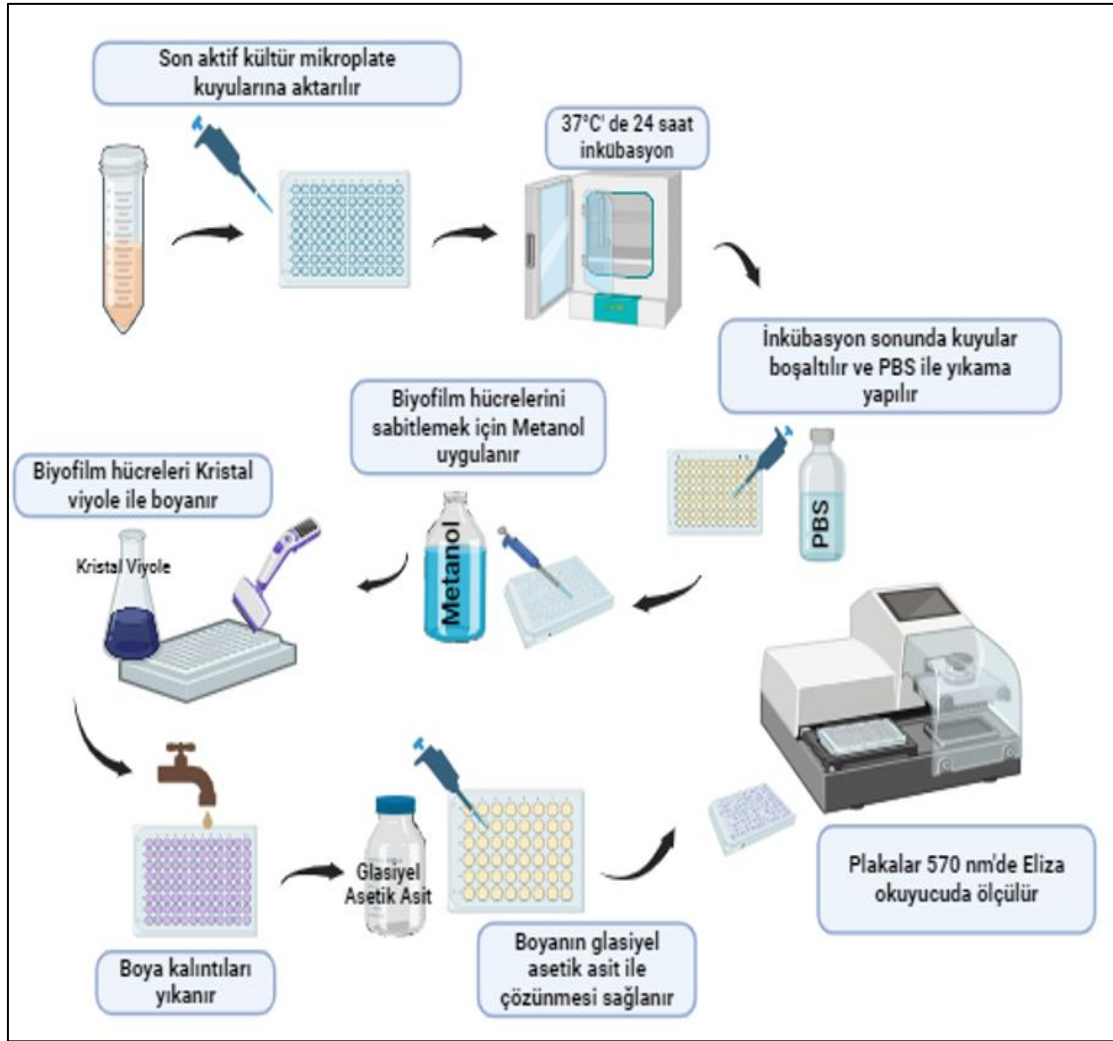
Bakterilerin polistiren mikropilakalarda kristal viyole yöntemi ile kantitatif olarak biyofilm oluşum miktarları düz-tabanlı 96-kuyucuklu polistiren mikropilakalarda (Lp Italiana Spa) belirlenmiştir. Mikropilakalara LAB için, 190 μ L MRS sıvı besiyeri ve 10 μ L aktif kültürden eklenirken referans suşlar için, 190 μ L Nutrient sıvı besiyeri ve 10 μ L aktif kültürden eklenmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda planktonik hücrelerin optikal yoğunlukları (OD) mikropilaka okuyucusu (Epoch, Biotek) ile OD_{600nm}'de ölçülmüştür. Absorbans ölçümü sonrası Stepanović ve diğerleri (2000 ve 2007) tarafından önerilen metoda göre bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri belirlenmiştir. Plakaların kuyucukları boşaltılarak biyofilm oluşturmamış hücreleri ortamdan gidermek için üç kez fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkama işlemi yapılmıştır. Oluşan biyofilm hücrelerinin kuyu duvarlarına sabitlenmesi amacı ile 150 μ L %99'luk metanol (Merck) kuyulara eklenerek 20 dakika süresince oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından, kuyular boşaltılmıştır. Biyofilm hücrelerinin boyanması için, kuyulara %1'lik (v/v) kristal viyole

(Merck) çözeltisinden 150 µL eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Boya fazlası hafif akan çeşme suyu altında dikkatli bir şekilde yıkanmış ve ardından ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. Kristal viyole boyasının çözünmesi için 150 µL %33'lük glasiyel asetik asit (Merck) eklenerek 15 dakika bekletilmiş ve mikropalakalar Eliza okuyucuda (OD_{570nm}) ölçülmüştür (Şekil 3.3). Çalışmada, pozitif kontrol olarak MRSA ATCC 43300 referans suşu, negatif kontrol olarak ise MRS besiyeri kullanılmıştır.

Bakterilerin biyofilm oluşturma kapasiteleri cut-off optik yoğunluk (OD_C) değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. Bu hesaplama sonucuna göre bakteriler Çizelge 3.3'te biyofilm oluşturmayan, zayıf, orta düzey ve güçlü biyofilm oluşturan şekilde 4 kategoriye ayrılmıştır (Stepanović ve diğerleri 2000, 2007).

Çizelge 3.3. Biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesinde kullanılan cut-off optik yoğunluk (OD_C) değerleri (Stepanović ve diğerleri, 2000, 2007).

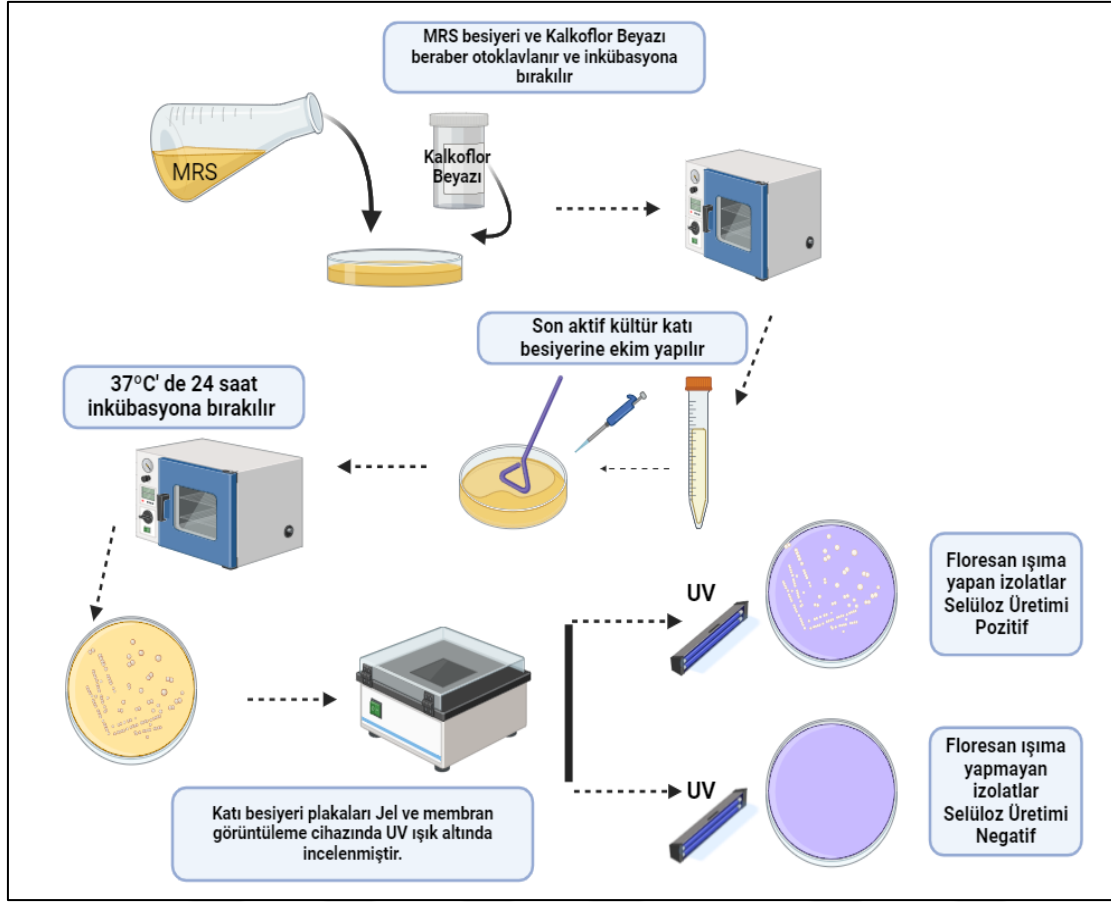
Optik yoğunluk (OD) değerleri	Biyofilm oluşturma kapasiteleri
$OD \leq OD_C$	Biyofilm oluşturmayan
$OD_C < OD \leq 2 \times OD_C$	Zayıf biyofilm oluşturan
$2 \times OD_C < OD \leq 4 \times OD_C$	Orta düzey biyofilm oluşturan
$4 \times OD_C < OD$	Güçlü biyofilm oluşturan
OD_C (cut-off optik yoğunluk) = Negatif kontrolün OD ortalaması + (3 X Negatif kontrolün standart sapması) OD (bakteri optik yoğunluk) = Bakterinin OD ortalaması – OD_C	



Şekil 3.3. Polistiren mikropilaka yöntemi (BioRender.com programında oluşturulmuştur).

3.5.3. Kalkoflor beyazı içeren katı besiyeri yöntemi

Bakterilerin, selüloz indikatörü olan kalkoflor beyazı içeren MRS besiyerinde hücre dışı matriks bileşeni olan selüloz veya onun türevi karbonhidratları üretip üretmedikleri incelenmiştir (Zogaj, Nimtz, Rohde, Bokranz ve Römling, 2001). Aktif kültürden 10 μ L alınarak, kalkoflor beyazı (0,05 g/L, Sigma) eklenerek hazırlanan MRS katı besiyerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, bakteri kolonilerinin UV ışık altında görüntülenmesi Jel ve membran görüntüleme cihazı (Gel Doc™ XR+ Imaging System) ile yapılmış ve floresan ışımaya yapan bakteriler selüloz üretimi pozitif (+) ve ışımaya yapmayanlar ise selüloz üretimi negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.4). Bu yöntemde pozitif kontrol olarak MRSA ATCC 43300, negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 35218 referans suşu kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Kalkoflor beyazı içeren katı besiyeri yöntemi (BioRender.com programında oluşturulmuştur).

3.6. EPS Üretim Miktarlarının Belirlenmesi

Kongo kırmızısı içeren katı besiyeri yönteminde pozitif sonuç vererek biyofilm oluşturduğu tespit edilen 37 bakterinin EPS üretim miktarları Marshall ve Rawson (1999) ve Frengova ve diğerleri (2000), metotlarında bazı değişiklikler yapılarak tespit edilmiştir. McFarland cihazı (Densimat) kullanılarak aktif kültürlerin optik yoğunlukları McFarland 7 ($2,1 \times 10^9$ kob/mL) olacak şekilde hazırlanmıştır. Kültür süspansiyonu MRS sıvı besiyerine %2 olacak şekilde inoküle edilmiş ve daha sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, kültürlerden 1 mL mikrofüt tüplerine alınarak sıcak su banyosunda (Mermert) 95°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Örnekler soğutulduktan sonra üzerine 1,7 µL %85'lik TCA (Trikloroasetik Asit, Merck) çözeltisi eklenerek 13000 rpm'de 25 dakika santrifüj (Eppendorf Minispin) edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant yeni mikrofüt tüplerine alınarak, üzerine 1:3 oranında etanol (Merck) eklenerek, aynı hız ve sürede yeniden santrifüj edilmiştir. Pelletin üzerine 500 µL etanol (Merck) eklenerek, 13000 rpm'de 15

dakika santrifüjün ardından mikrofüj tüpleri 24 saat etüvde bekletilmiştir. Alkolün uçması sağlandıktan sonra 500 µL'lik örneklerin üzerine 500 µL distile su ilave edilerek, toplam hacim 1 mL olacak şekilde tek bir mikrofüj tüpünde örnekler toplanmıştır.

EPS'lerin miktar tayini için fenol-sülfürik asit metodu uygulanmıştır. Bu amaçla, cam tüplere 1 mL örnek, 0,5 mL fenol (%5, Merck) ve 5 mL sülfürik asit (%96-98, Merck) eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra, 1-2 dakika iyice vorteks ile karıştırılarak 37°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) OD_{490nm} dalga boyunda ölçüm yapılarak örneklerin optik yoğunlukları belirlenmiştir (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers ve Smith, 1956).

3.7. Büyüme Eğrisi

Kongo kırmızısı ve kalkoflor beyazı içeren katı besiyerinde pozitif sonuç veren, biyofilm oluşum formülü ile güçlü biyofilm oluşturduğu tespit edilen ve en yüksek EPS üretim miktarına sahip bakteri olarak seçilen *Ligilactobacillus salivarius* KC27L'nin ileri biyofilm çalışmaları yapılmıştır. Ön aktifleştirme işlemi yapılan bakteri, MRS sıvı besiyerine %2 oranında inoküle edilerek 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu şartlarda ilk iki saatlik inkübasyonun ardından bakteri büyümesi spektrofotometrede OD_{600nm}'de ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda OD_{600nm}'de ölçülen değerler kullanılarak büyüme eğrisi grafiği oluşturulmuş ve bakterinin büyüme eğrisindeki lag fazı, log fazı, durgunluk fazı, ölüm fazına denk gelen saatler belirlenmiştir (Ağyar ve Üçkardeş, 2014; Yang ve diğerleri, 2018).

3.8. Farklı Saatlerde EPS Üretim Miktarlarının Belirlenmesi

Bu çalışmada, büyüme eğrisinde belirlenmiş olan lag fazının sonu/log fazı başlangıcı (6. saat), log fazı (8., 12., 24. ve 28. saat), log fazı sonu/durgunluk fazı başlangıcı (34. saat), durgunluk fazı sonu/ölüm fazı (48. ve 54. saat) aşamalarına denk saatlerde *L. salivarius* KC27L'nin EPS üretim miktarları Bölüm 3.6'da verilen fenol-sülfürik asit metodu ile tespit edilerek karşılaştırılmıştır.

3.9. Biyofilm Evrelerinin Belirlenmesi

L. salivarius KC27L'nin büyüme eğrisindeki lag fazının sonu/log fazı başlangıcı, log fazı, log fazı sonu/durgunluk fazı başlangıcı, durgunluk fazı sonuna denk gelen saatleri de

kapsayacak şekilde 0-48 saat arası bakterilerin biyofilm oluşum miktarları Bölüm 3.5.2’de verilen polistiren mikrolaka yöntemine göre tespit edilmiştir (Stepanović ve diğerleri, 2000, 2007). KC27L suşunun bu saatlerde ürettikleri biyofilm miktarına göre biyofilmin erken, ara ve olgun faz düzeyleri belirlenmiştir. KC27L’nin büyüme eğrisi, biyofilm evreleri ve EPS üretim miktarlarının belirlenerek bakterinin büyüme eğrisi, biyofilm evreleri ve bu saatlerde üretilen EPS miktarı arasındaki ilişki yorumlanmıştır.

3.10. Planktonik ve Biyofilm Bileşenlerinin İzolasyonu

L. salivarius KC27L suşunun biyofilm evreleri arasında yer alan erken biyofilm (6. saat), ara biyofilm (12. saat) ve olgun biyofilm (28. saat) fazlarına denk gelen süreler içinde planktonik ve biyofilm hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Planktonik hücrelerin izolasyonu için bakteri kültürü, MRS sıvı besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, bakteri kültürü, +4°C’de 4500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılarak, pellet kısmı kullanılmıştır. Pellet kısmı, cam boncuk içeren 1 mL fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisine alınarak en yüksek devirde 2 dakika vortekslenerek iyice çözülmüştür (Giaouris ve Nychas, 2006; Brian-Jaisson ve diğerleri, 2016). Biyofilm hücrelerinin izolasyonu (koloni biyofilm ekstrakt) için ise, katı besiyeri üzerinde gelişen *L. salivarius* KC27L’nin hücresiz (cell-free) süpernatantı kullanılmıştır. Ön aktifleştirme işlemi sonrası, aktif kültürden MRS katı besiyerine 200 µL ekim yapılarak 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda, MRS katı besiyeri yüzeyinden hücreler steril kazıyıcı ile toplanmıştır. Daha sonra, bu hücreler cam boncuk içeren 1 mL PBS içerisine alınarak en yüksek devirde 2 dakika vortekslenerek iyice çözülmüştür. Çözülen pellet, daha sonra +4°C’de 14000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant kısmı 0,22 µm’lik membran filtrelerden geçirilerek tamamen hücrelerden arındırılmıştır (Giaouris ve Nychas, 2006; Silva ve diğerleri, 2009; Bendaoud ve diğerleri, 2011; Chiba ve diğerleri, 2015). Filtre edilen bu süpernatant kısmı, gevşek-bağlı ekstraselüler polimerik madde (EPM) olarak adlandırılmaktadır (Brian-Jaisson ve diğerleri, 2016). Analizler yapılana kadar bu örnekler -20°C’de saklanmıştır.

3.11. EPS İzolasyonu ve Kısmi Saflaştırılması

Planktonik hücrelerinin izolasyonunda elde edilen pellet kısmı (EPS), cam boncuk içeren 1 mL PBS içerisinde en yüksek devirde 2 dakika vortekslenerek iyice çözüldükten sonra

100°C'de 30 dakika kaynatılmıştır. Biyofilm hücrelerinin izolasyonunda ise MRS katı besiyeri yüzeyinden bakteri pelleti steril kazıyıcı ile toplanarak, cam boncuk içeren 1 mL PBS içerisine alınıp en yüksek devirde 2 dakika vortekslenerek iyice çözülmüştür. Çözülen pellet, daha sonra 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı 0,22 µm'lik membran filtrelerden geçirildikten sonra tamamen hücrelerden arındırılmıştır. Bu örnekten 1 mL alınarak 100°C'de 30 dakika kaynatılmıştır. İki farklı yaşam formundaki hücreler kaynatıldıktan sonra, oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulmuş, proteinlerin ve nükleik asitlerin çöktürülmesi için 1,7 µL %85'lik trikloroasetik asit (TCA) ile muamele edilerek, +4°C'de 2 saat çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ardından, +4°C'de 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi bakteri hücrelerinin, protein ve genomik nükleik asitlerin pellet kısmında kalması sağlamıştır. Çalışmada kullanılacak süpernatant kısmına ise EPS'lerin çökmesi için iki kat hacimde saf (%100 v/v) soğuk etanol (-20°C) eklenerek, +4°C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonra, +4°C'de 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek, süpernatant kısmı atılmış, EPS'i de içeren çöken polimerlerin bulunduğu pellet kısmı ise distile su ile çözülmüştür. Besiyerindeki laktoz kalıntısının giderilmesi için distile suda +4°C'de 24 saat diyaliz membran kullanılarak (cut-off 12–14 kDa) diyaliz edilmiştir. Diyalizden sonra, örneklerin yaş ağırlıkları tartılarak tespit edilmiştir. Daha sonra, örnekler -80°C'de dondurularak EPS'ler liyofilizatör (CHRIST alpha 2-4 LD plus) ile liyofilize edilerek çözücü tamamen uzaklaştırılmıştır. Analitik çalışmalar için örnekler +4°C'de saklanmıştır (Marshall ve Rawson, 1999; Yuksekdag ve Aslim, 2008; Yu ve diğerleri, 2016; Abid ve diğerleri, 2018; Kibar ve diğerleri, 2020).

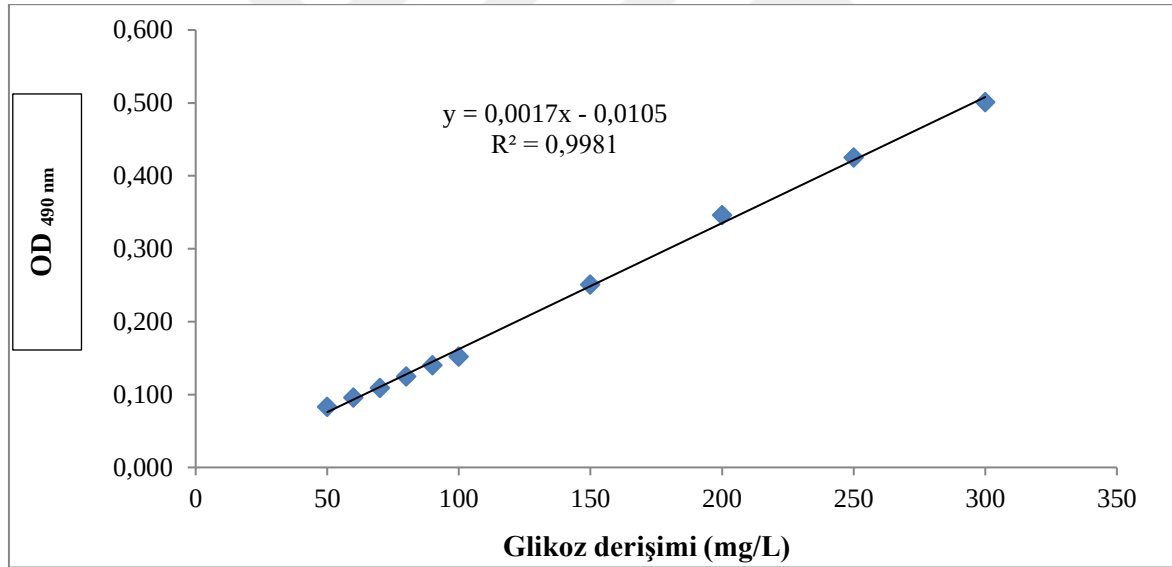
3.11.1. Toplam karbonhidrat miktar tayini

Serbest metil eterleri veya potansiyel olarak serbest indirgeyici gruplar içeren basit şekerler, oligosakkaritler, polisakkaritler ve onların türevleri, fenol ve konsantre sülfürik asit ile muamele edildiğinde portakal-sarı renk vermektedir. Bu reaksiyon çok duyarlı olup renk sabit kalmakta ve kullanılan bu metot şekerlerin ve ilgili maddelerin çok düşük miktarlarını dahi saptayabilmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada, elde edilen EPS'in toplam karbonhidrat miktarı Dubois ve diğerleri (1956)'nin yöntemi ile belirlenmiştir. Örneklerin üzerine 0,5 mL fenol (Merck) ve 5 mL sülfürik asit (Merck) eklenerek, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra, iyice karıştırılmış ve 37°C'de 15-20 dakika bekletilmiştir. Meydana gelen portakal-sarı renk değişimi, OD_{490nm} dalga boyunda spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) okunmuştur (Marshall ve Rawson 1999; Chiba ve diğerleri, 2015;

Xu ve diğerkleri, 2020). Standart eğri elde etmek için 0-500 mg/L arasında değişen farklı konsantrasyonlarda glikoz çözeltileri hazırlanarak fenol-sülfürik asit metodu uygulanmıştır. Standart eğri yardımıyla spektrofotometrede okunan absorbens değerine karşılık gelen toplam karbonhidrat miktarı mg/L olarak hesaplanmıştır. Kontrol olarak distile su kullanılmıştır.

Glikoz standardının hazırlanması

Standart olarak kullanılan glikoz (Merck), 0-500 mg/L arasında değişen farklı konsantrasyonlarda tartılarak, Dubois ve diğerklerinin (1956) fenol-sülfürik asit metodu uygulanmıştır. Hazırlanan glikoz konsantrasyonlarının OD_{490nm} dalga boyunda absorbens değerleri ölçülerek standart eğri oluşturularak Şekil 3.5’de verilen formül elde edilmiş ve bu formül toplam karbonhidrat miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Glikoz standart grafiği

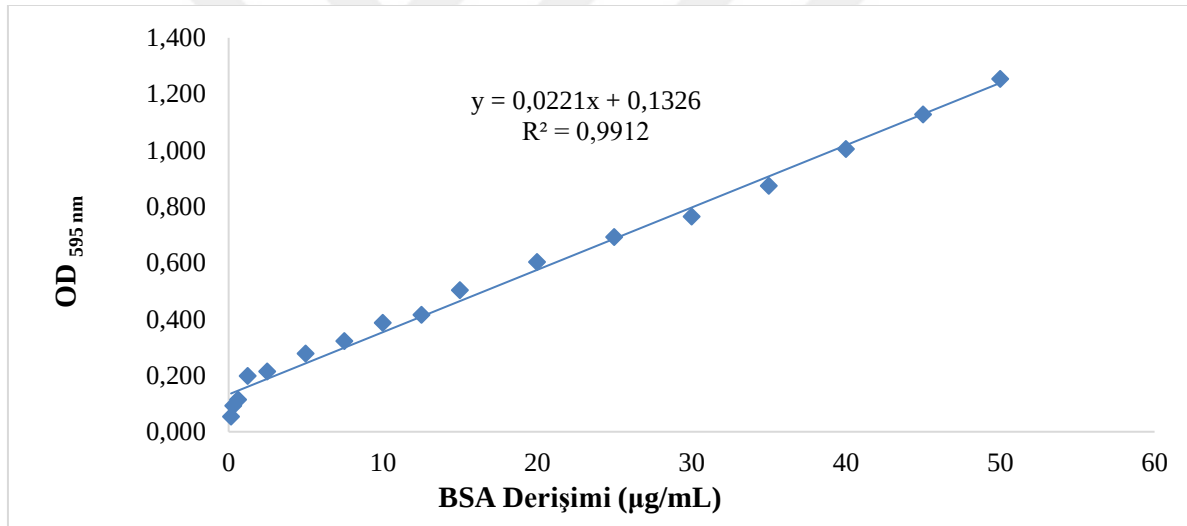
3.11.2. Toplam protein miktar tayini

Bu çalışma elde edilen EPS'deki protein miktarı Bradford yöntemine göre belirlenmiştir (Bradford, 1976). Çalışmada, Amresco Protein Assay Bradford Method E35-KIT kullanılmış olup, üretici firmanın kit prosedürüne göre çalışma yapılmıştır. Deney tüplerine 100 µL örnek ve üzerine 1 mL Bradford Reaktifi eklenerek karıştırılmıştır. Tüpler 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir ardından OD_{595nm}'de absorbens değerleri spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) ölçülmüştür. Standart eğri yardımıyla spektrofotometrede ölçülen

absorbans değerine karşılık gelen toplam protein miktarı $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.6). Kontrol olarak distile su kullanılmıştır.

BSA standardının hazırlanması

Standart grafiğın oluşturulması için bovin serum albumin (BSA) kullanılmıştır. 0,1562-50 $\mu\text{g/mL}$ BSA içeren örnekler hazırlanarak üzerine 1 mL Bradford Reaktifi eklenerek vortekslenmiştir. Kör için distile su kullanılarak aynı işlem uygulanmıştır. Örneklerin absorbansları $\text{OD}_{595\text{nm}}$ dalga boyunda spektrofotometrede (Digilab Hitachi U-1800) okutulmuştur. Absorbanstaki değişim ile protein miktarı arasında $\mu\text{g/mL}$ cinsinden korelasyon grafiğı oluşturulmuştur (Ertan ve Arda, 1999). Her standart farklı iki günde üçer tekrarlı yapılmıştır.



Şekil 3.6. BSA standart grafiğı

3.11.3. EPS'lerin monomer kompozisyonu

Biyofilm matriksinden ve planktonik hücrelerden saflaştırılan EPS'lerin monomer bileşiminin belirlenmesinde Dilna ve diğerleri (2015) ve Tukenmez, Aktas, Aslim ve Yavuz (2019) tarafından belirtilen metodlar uygulanmıştır. 20 mg örnekler 1 mol/L H_2SO_4 ile 100°C'de 2 saat hidrolize edildikten sonra hidroliz çözeltisi 1 mol/L NaOH ile nötralize edilmiştir. Örneklerdeki yabancı maddeler santrifüjleme (4500 rpm, 10 dakika) yoluyla uzaklaştırıldıktan sonra 0,45 μm membran filtresiyle (Whatman) filtrelenmiş ve numune HPLC kolonuna yerleştirilmiştir. Hidroliz işleminden sonra, EPS'in monosakkarit bileşimi HPLC refraktif indeks dedektör (RID) ile ODTÜ Merkez Laboratuvarında hizmet alımı ile

yapılmıştır. Glikoz, arabinoz, mannoz ve süktroz olacak şekilde toplam 4 şekerin varlığı analiz edilmiştir.

3.11.4. EPS'lerin molekül ağırlığının belirlenmesi

Biyofilm matriksinden ve planktonik hücrelerden saflaştırılan EPS'lerin molekül ağırlığının belirlenmesi SEC (Size Exclusion Chromatography, Boyut Eleme Kromatografisi) analizi ile Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)'nde hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. SEC analizi için, 1 mg/mL EPS örnekleri ultra distile saf su içinde çözündürülerek ve mikrofiltasyon (Whatman 0,45 µm) yolu ile steril edilerek hazırlanmıştır.

3.12. Antibiyofilm

KC27L bakterisinin planktonik ve biyofilm yaşam formlarından elde edilen erken, ara ve olgun EPS'lerinin MRSA ATCC 43300 patojen mikroorganizması üzerindeki antibiyofilm özellikleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Çalışmada, 96-kuyucuklu polistiren mikrotitrasyon plakalarına 180 µL MRSA ATCC 43300 mikroorganizma kültürü eklenmiş ve üzerine bakterinin planktonik ve biyofilm formlarından izole edilen erken, ara ve olgun EPS'leri saf (su ile çözülmemiş) ve farklı konsantrasyonlarda distile su içerisinde çözülerek [1:1 (10 µL distile su: 10 µL EPS), 1:2 (6,5 µL distile su: 13,5 µL EPS), 1:3 (5 µL distile su: 15 µL EPS), (v/v)], son hacim 20 µL olacak şekilde kuyucuklara eklenmiştir. Ardından, plakalar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak PBS kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyular boşaltılarak, Bölüm 3.5.2'de açıklanan kristal viyole deneyi uygulanmıştır (Stepanović ve diğerleri, 2000, 2007). Örneklerin optikal yoğunlukları Eliza okuyucuda (OD_{570nm}) ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri (A) ile inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır (Abid ve diğerleri, 2018).

$$\% \text{ Mikrobiyal inhibisyon} = [1 - (A_{\text{ö}}/A_{\text{k}})] \times 100$$

$A_{\text{örnek}} (A_{\text{ö}})$: EPS içeren kuyuların absorbans değeri (bakteri+EPS)

$A_{\text{kontrol}} (A_{\text{k}})$ (Pozitif kontrol): EPS içermeyen kuyuların absorbans değeri (bakteri)

3.13. DNaz I Enzimi İle Biyofilm Matriksinde Yer Alan eDNA'nın Belirlenmesi

Bu analiz, biyofilm matriksinin yapısal bütünlüğünde ve stabilitesinde önemli role sahip olan eDNA'nın varlığını belirlemek ve eDNA'nın DNaz I enzimi ile muamelesi sonucunda biyofilm miktarında meydana gelebilecek değişimleri gözlemlemek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, Grande ve diğerleri (2011), tarafından önerilen yöntemle göre analizler gerçekleştirilmiştir. Mikrotitrasyon plakalarına, toplam hacim 200 µL olacak şekilde, MRS sıvı besiyerinden 190 µL ve aktif kültürden 10 µL eklenerek, 37°C'de 28 saat (KC27L için olgun biyofilm evresi) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, kuyular boşaltılarak, planktonik bakteri hücrelerini uzaklaştırmak amacıyla SF ile kuyular yıkanmıştır. Çalışmada Transgen GD201-01 DNaz I enzimi kullanılmış olup, üretici firmanın kit prosedürüne göre konsantrasyon ayarlanarak, yıkaması gerçekleştirilen ve biyofilm hücrelerini içeren kuyulara, 33 µL DNaz I enzimi (100 µg/mL), 20 µL 10X DNaz I Reaction Buffer ve 147 µL distile su eklenmiştir. Kontrol örnekleri (yalnızca biyofilm hücrelerini içeren örnek) için kuyulara yalnızca, 20 µL 10X DNaz I Reaction Buffer ve 180 µL distile su ilave edilmiştir. Örnekler, 37°C'de 1, 2 ve 4 saat olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyular yavaşça boşaltılarak, enzimi uzaklaştırmak amacıyla 2 kez SF ile yıkama yapılmıştır ve sonrasında kuyulara Bölüm 3.5.2'de açıklanan kristal viyole boyama yöntemi uygulanmıştır (Stepanović ve diğerleri 2000, 2007). DNaz I enzimine bağlı olarak biyofilm miktarında meydana gelecek olası değişimler aşağıda verilen formül kullanılarak belirlenmiştir (Pitts ve diğerleri, 2003).

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

C: Yalnızca olgun biyofilm içeren kontrol kuyuları (pozitif kontrol),

B: Yalnızca besiyeri içeren kontrol kuyuları (negatif kontrol),

T: KC27L olgun biyofilmi+enzim uygulaması

3.14. İstatistiksel Analizler

Tez kapsamında yapılan tüm çalışmalar, bağımsız iki günde (biyolojik tekrar) üç tekrar (teorik tekrar) olacak şekilde yapılmıştır. Analizlerde, SPSS Inc. Yazılım (sürüm 22.0; SPSS Inc.; Chicago; IL) kullanılmıştır. Veriler SPSS 22 istatistik programı ile değerlendirilmiş

olup, grup içi karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve tekrarlanan ölçümler için bağımsız t-testi ve farklı grup ortalamaları arasındaki farkların anlamlılığını karşılaştırmak için Tukey testi kullanılmıştır. Sonuçlar, p -değeri belirtilen anlamlılık düzeyi olan 0,01/0,05'ten küçükse anlamlı kabul edilmiştir. Ayrıca, bakterilerin biyofilm oluşum miktarları ve büyüme eğrisinde belirlenen saatlerdeki EPS üretimi arasında bir ilişki olup olmadığı, planktonik ve biyofilm faz düzeylerinden elde edilen EPS'lerin protein miktarları arasındaki korelasyon ve planktonik ve biyofilm faz düzeylerinden elde edilen EPS'lerin karbonhidrat miktarları arasındaki korelasyon belirlenmiştir.





4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi

LAB'nin temel biyofilm yetenekleri kongo kırmızısı içeren katı besiyeri, polistiren mikropalakalarda kristal viyole deneyi ile biyofilm oluşum miktarı ve kalkoflor beyazı içeren katı besiyeri ile tespit edilmiştir. Bakterilerin üç farklı yöntem ile kalitatif ve kantitatif olarak biyofilm oluşturma yeteneklerinin karşılaştırmalı sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Bakterilerin üç farklı yöntem ile biyofilm oluşturma yetenekleri ve EPS üretimleri

Bakteriler	Kongo kırmızı (96 bakteri)	Kalkoflor beyazı (96 bakteri)	Kristal viyole (96 bakteri)		EPS üretim miktarı (mg/L) (37 bakteri)
			OD±SD	Biyofilm yeteneği	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> ZYN31	+	+	0,54±0,03	Üretici Değil	359,4±1,5
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> KC12L	+	+	0,30±0,01	Üretici Değil	295,5±1,9
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> KC43L	+	+	0,15±0,01	Üretici Değil	341,5±2,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ29	+	+	6,23±0,50	Güçlü	572,6±1,5
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> KC27L	+	+	6,58±0,02	Güçlü	984,0±3,0
<i>Lactobacillus fermentum</i> ZYN17	+	+	0,16±0,00	Üretici Değil	310,9±2,5
<i>Lactobacillus</i> sp. 713	+	+	3,38±0,14	Güçlü	536,2±1,0
<i>Lactobacillus</i> sp. D1	+	-	0,30±0,03	Üretici Değil	247,9±2,0
<i>Lactobacillus</i> sp. D38	+	+	0,17±0,06	Üretici Değil	283,2±2,5
<i>Lactobacillus</i> sp. U39	+	+	0,16±0,01	Üretici Değil	251,5±2,0
<i>Lactobacillus</i> sp. U40	+	+	0,14±0,01	Üretici Değil	192,1±2,0
<i>Lactobacillus</i> sp. GLK3	+	+	4,01±0,11	Güçlü	634,4±4,0
<i>Lactobacillus</i> sp. KC11L	+	+	2,65±0,37	Orta	361,4±1,0
<i>Lactobacillus</i> sp. KC16L	+	+	1,60±0,46	Orta	480,9±2,6

Çizelge 4.1. (devam) Bakterilerin üç farklı yöntem ile biyofilm oluşturma yetenekleri ve EPS üretimleri

Bakteriler	Kongo kırmızı (96 bakteri)	Kalkoflor beyazı (96 bakteri)	Kristal viyole (96 bakteri)		EPS üretim miktarı (mg/L) (37 bakteri)
			OD±SD	Biyofilm yeteneği	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC23L	+	+	0,26±0,03	Üretici Değil	283,8±1,5
<i>Lactobacillus</i> sp. KC45L	+	+	0,15±0,01	Üretici Değil	303,8±2,0
<i>Lactobacillus</i> sp. KC47L	+	+	0,15±0,05	Zayıf	440,3±1,0
<i>Lactobacillus</i> sp. KC77S	+	+	1,10±0,01	Orta	363,8±1,2
<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM121	+	-	3,87±0,60	Güçlü	503,2±1,0
<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM141	+	+	0,27±0,13	Zayıf	410,3±1,7
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN13	+	+	0,94±0,01	Zayıf	418,5±2,0
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> KC66L	+	+	1,70±0,60	Orta	322,6±1,5
<i>Streptococcus</i> sp. DZM 131	+	-	2,35±0,02	Güçlü	532,1±1,0
<i>Streptococcus</i> sp. KC13L	+	+	6,55±0,79	Güçlü	496,8±1,0
<i>Streptococcus</i> sp. KC14L	+	+	0,53±0,03	Üretici Değil	241,5±1,0
<i>Streptococcus</i> sp. KC24L	+	+	1,19±0,12	Zayıf	256,2±2,5
<i>Streptococcus</i> sp. KC65L	+	+	0,29±0,03	Üretici Değil	284,4±2,5
<i>Streptococcus</i> sp. KC21S	+	+	1,52±0,08	Zayıf	317,9±1,0
<i>Streptococcus</i> sp. KC47S	+	+	0,87±0,21	Üretici Değil	323,2±1,6
<i>Streptococcus</i> sp. KC55S	+	+	0,94±0,07	Üretici Değil	356,2±2,0
<i>Streptococcus</i> sp. KC67S	+	+	0,511±0,08	Üretici Değil	292,1±3,0
<i>Streptococcus</i> sp. KC11S	+	+	2,75±0,25	Orta	364,4±1,5
<i>Streptococcus</i> sp. KC12S	+	+	0,50±0,02	Üretici Değil	246,8±1,0
<i>Streptococcus</i> sp. KC13S	+	+	0,27±0,07	Üretici Değil	282,1±1,2
<i>Streptococcus</i> sp. KC14S	+	+	0,27±0,04	Üretici Değil	273,8±1,5
<i>Streptococcus</i> sp. KC16S	+	+	0,14±0,01	Üretici Değil	247,4±1,0
<i>Streptococcus</i> sp. KC33L	+	+	0,57±0,03	Üretici Değil	316,2±2,0
<i>Lactobacillus</i> sp. U4	-	-	0,23±0,02	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC57S	-	+	5,10±0,15	Güçlü	

Çizelge 4.1. (devam) Bakterilerin üç farklı yöntem ile biyofilm oluşturma yetenekleri ve EPS üretimleri

Bakteriler	Kongo kırmızı (96 bakteri)	Kalkoflor beyazı (96 bakteri)	Kristal viyole (96 bakteri)		EPS üretim miktarı (mg/L) (37 bakteri)
			OD±SD	Biyofilm yeteneği	
<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM122	-	-	0,51±0,05	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM133	-	-	0,45±0,05	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ51	-	+	3,71±0,16	Orta	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ54	-	+	3,53±0,38	Orta	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ59	-	+	5,34±0,11	Güçlü	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ61	-	+	3,43±0,33	Orta	
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> KC76L	-	+	2,44±0,35	Zayıf	
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ZYN9	-	+	3,52±0,14	Orta	
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ZYN15	-	+	2,55±0,30	Orta	
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> ZDM2132	-	+	3,62±0,33	Orta	
<i>Lactobacillus</i> sp. 30	-	+	2,25±0,18	Zayıf	
<i>Lactobacillus</i> sp. 116	-	-	3,36±0,36	Orta	
<i>Lactobacillus</i> sp. 312	-	-	2,63±0,32	Orta	
<i>Lactobacillus</i> sp. 412	-	-	1,67±0,32	Zayıf	
<i>Lactobacillus</i> sp. 716	-	-	3,72±0,11	Orta	
<i>Lactobacillus</i> sp. 721	-	-	3,51±0,33	Orta	
<i>Lactobacillus</i> sp. 722	-	-	3,64±0,16	Orta	
<i>Lactobacillus</i> sp. 724	-	-	0,47±0,09	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. 820	-	-	0,39±0,09	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. 911	-	-	0,25±0,02	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. D16	-	-	0,36±0,08	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. D39	-	-	0,24±0,01	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. U11	-	-	0,38±0,08	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. U12	-	-	0,29±0,08	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. U15	-	-	0,36±0,05	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ36	-	+	2,74±0,08	Orta	
<i>Lactobacillus</i> sp. U20	-	+	0,43±0,04	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. U25	-	+	0,39±0,07	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. U34	-	+	0,33±0,05	Üretici Değil	

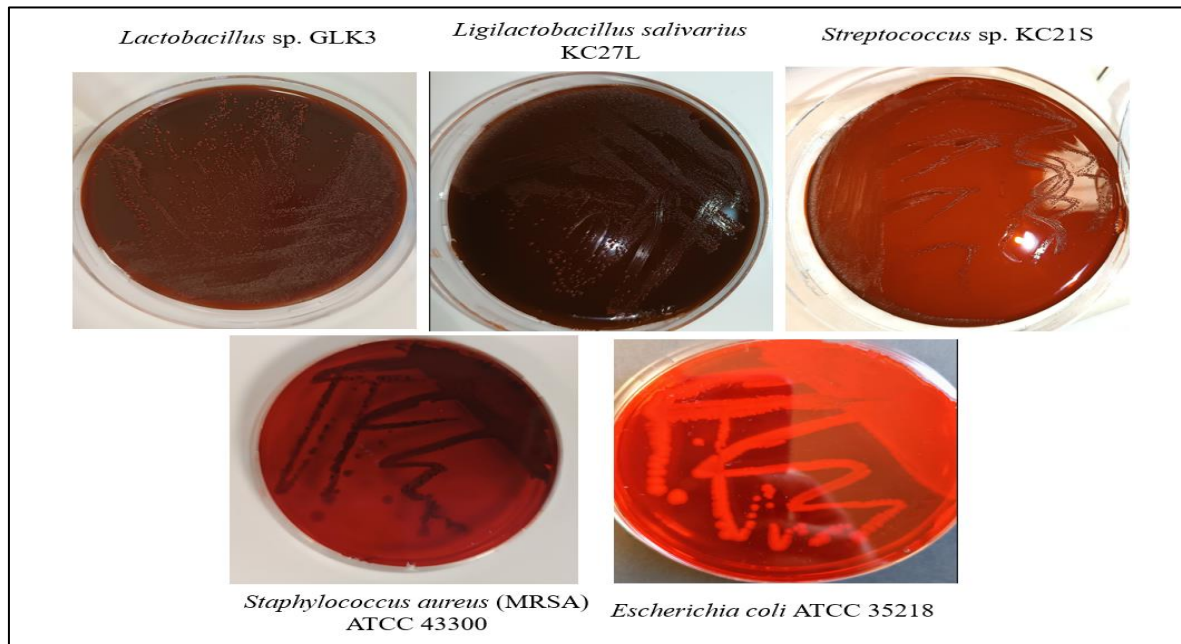
Çizelge 4.1. (devam) Bakterilerin üç farklı yöntem ile biyofilm oluşturma yetenekleri ve EPS üretimleri

Bakteriler	Kongo kırmızı (96 bakteri)	Kalkoflor beyazı (96 bakteri)	Kristal viyole (96 bakteri)		EPS üretim miktarı (mg/L) (37 bakteri)
			OD±SD	Biyofilm yeteneği	
<i>Lactobacillus</i> sp. U35	-	+	0,40±0,08	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. U36	-	+	0,32±0,04	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. U37	-	+	0,39±0,06	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. U38	-	-	0,50±0,05	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC17L	-	-	2,60±0,03	Güçlü	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC55L	-	+	1,09±0,15	Zayıf	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC56L	-	-	0,85±0,02	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC86L	-	-	0,49±0,02	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC96L	-	-	0,38±0,03	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC106L	-	-	0,36±0,03	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC116L	-	-	0,35±0,11	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC126L	-	-	0,55±0,05	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC136L	-	-	1,17±0,25	Zayıf	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC17S	-	-	0,97±0,05	Zayıf	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC27S	-	+	1,25±0,18	Zayıf	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC37S	-	+	0,73±0,12	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. U5	-	-	0,23±0,04	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. U6	-	+	3,71±0,11	Güçlü	
<i>Lactobacillus</i> sp. U10	-	+	0,32±0,05	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM134	-	-	0,55±0,05	Üretici Değil	
<i>Lactobacillus</i> sp. KC45S	-	+	4,76±0,15	Güçlü	
<i>Streptococcus</i> sp. 731	-	+	1,18±0,11	Zayıf	
<i>Lactobacillus</i> sp. U18	-	-	0,48±0,01	Zayıf	
<i>Lactobacillus</i> sp. U19	-	-	0,49±0,01	Üretici Değil	
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> BAZ32	-	-	3,58±0,39	Orta	

Çizelge 4.1. (devam) Bakterilerin üç farklı yöntem ile biyofilm oluşturma yetenekleri ve EPS üretimleri

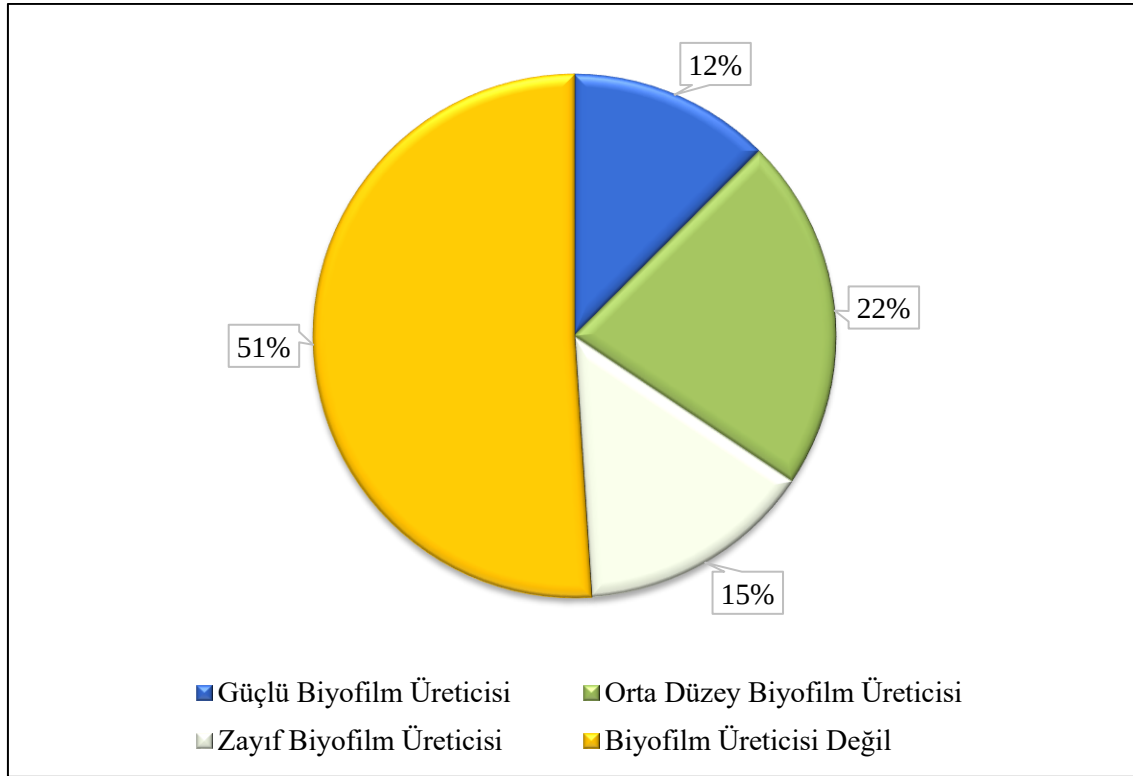
Bakteriler	Kongo kırmızı (96 bakteri)	Kalkoflor beyazı (96 bakteri)	Kristal viyole (96 bakteri)		EPS üretim miktarı (mg/L) (37 bakteri)
			OD±SD	Biyofilm yeteneği	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> KC26L	-	-	3,37±0,26	Orta	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> KC37L	-	+	3,64±0,21	Orta	
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> KC21L	-	+	2,62±0,26	Orta	

Çalışmamızda, tavuk gastrointestinal sistemi (TGIS) ve tavuk gaitasından (TG) izole edilmiş 80 *Lactobacillus* cinsinden 22 bakteri, 16 *Streptococcus* cinsinden ise 15 bakteri olmak üzere toplam 37 bakteri kongo kırmızısı içeren MRS katı besiyerinde siyah renk koloni oluşturmuştur. Bu durum, 37 bakterilerinin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Besiyerinde siyah renkte koloni oluşturmayan 59 bakteri ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol referans suşu olan MRSA ATCC 43300 kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde siyah koloniler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Negatif kontrol referans suşu olan *E. coli* ATCC 35218'de ise kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde siyah kolonilere rastlanılmamıştır (Resim 4.1).



Resim 4.1. Kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde oluşan koloni görüntüleri

TGIS ve TG'ndan izole edilen 96 LAB'lerinin biyofilm oluşturma kapasiteleri 96-kuyucuklu polistiren mikropalakalar üzerinde kristal viyole boyama yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilmiş ve bakterilerden, 12'si güçlü, 21'i orta düzey, 14'ünün zayıf biyofilm oluşturduğu ve 49'unun ise biyofilm oluşturmadığı belirlenmiş olup Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



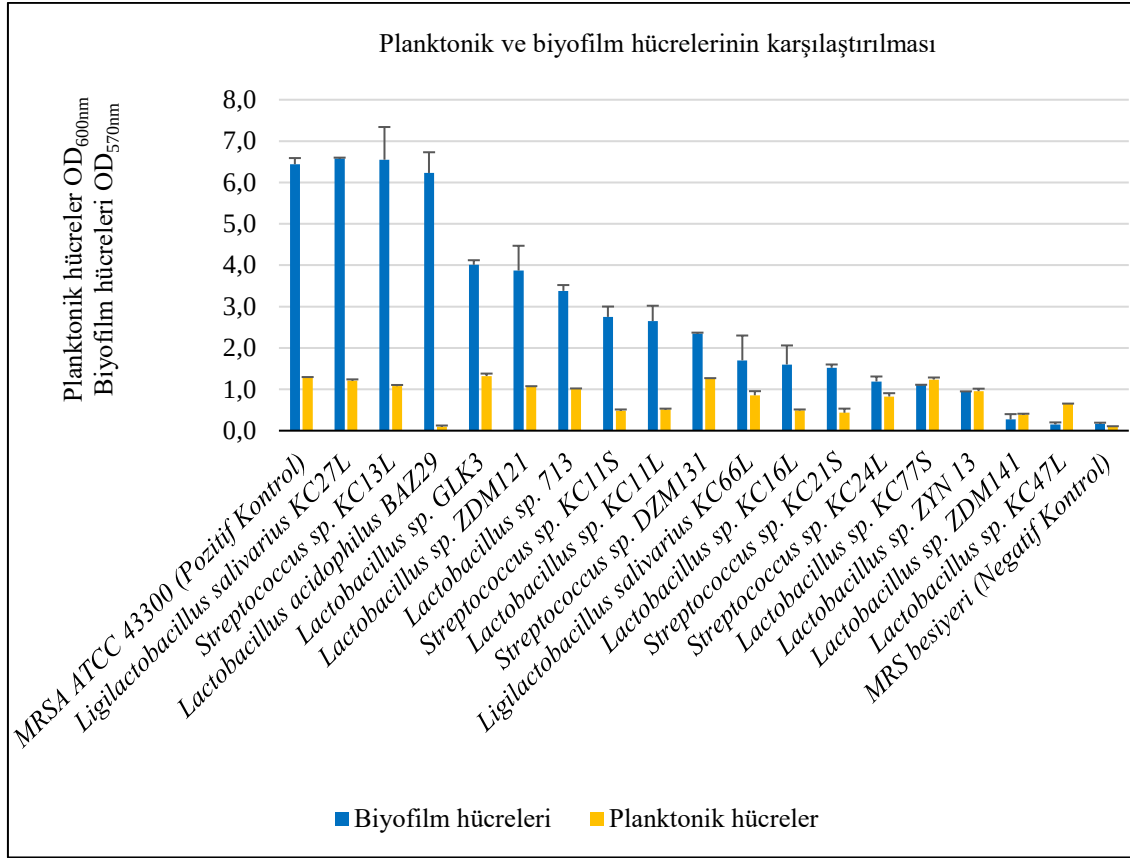
Şekil 4.1. 96 LAB'sinin polistiren mikropalaka yöntemine göre kantitatif değerlendirme sonuçları

Kongo kırmızısı içeren katı besiyeri üzerinde pozitif sonuç veren 37 LAB'sinin biyofilm oluşturma yetenekleri incelendiğinde bakterilerden, 7'si güçlü, 5'i orta düzey ve 5'inin zayıf biyofilm oluşturduğu ve 20'sinin ise biyofilm oluşturmadığı tespit edilmiştir. İki yöntem arasında karşılaştırma yapılabilmesi için, polistiren mikropalaka yöntemi ile kongo kırmızısı içeren besiyerinde biyofilm oluşturma yeteneği olan 17 bakterinin biyofilm ve planktonik hücrelerinin sonuçları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de sunulmuştur. Bu bakteriler arasından en yüksek değere *Ligilactobacillus salivarius* KC27L ($OD\ 6,58 \pm 0,02$)'nin, en düşük değere ise *Lactobacillus* sp. KC47L ($OD\ 0,15 \pm 0,05$)'in sahip olduğu belirlenmiştir. KC27L bakterisinin, pozitif kontrol olarak kullanılan patojen *S. aureus* MRSA ATCC 43300 referans suşundan ($OD\ 6,44 \pm 0,15$) daha yüksek miktarda biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Streptokok izolatları arasında ise en yüksek biyofilm oluşumu *Streptococcus* sp. KC13L

(OD $6,55 \pm 0,79$) tespit edilmiş ve bu bakterinin de referans suştan yüksek miktarda biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Polistiren mikropalakalarındaki planktonik (OD_{600nm}) ve biyofilm (OD_{570nm}) hücrelerin oluşturduğu optik yoğunluk değerleri

Bakteriler	Planktonik hücreler (OD _{600nm})	Biyofilm hücreleri (OD _{570nm})	Biyofilm oluşturma yetenekleri
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> KC27L	1,21±0,03	6,58±0,02	Güçlü
<i>Streptococcus</i> sp. KC13L	1,08±0,03	6,55±0,79	Güçlü
<i>Lactobacillus acidophilus</i> BAZ29	0,99±0,03	6,23±0,50	Güçlü
<i>Lactobacillus</i> sp. GLK3	1,32±0,06	4,01±0,11	Güçlü
<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM121	1,06±0,01	3,87±0,60	Güçlü
<i>Lactobacillus</i> sp. 713	1,02±0,00	3,38±0,14	Güçlü
<i>Streptococcus</i> sp. DZM131	1,26±0,01	2,35±0,02	Güçlü
<i>Streptococcus</i> sp. KC11S	0,48±0,03	2,75±0,25	Orta
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> KC66L	0,86±0,10	1,70±0,60	Orta
<i>Lactobacillus</i> sp. KC11L	0,51±0,02	2,65±0,37	Orta
<i>Lactobacillus</i> sp. KC16L	0,49±0,02	1,60±0,46	Orta
<i>Lactobacillus</i> sp. KC77S	1,24±0,05	1,10±0,01	Orta
<i>Streptococcus</i> sp. KC21S	0,43±0,10	1,52±0,08	Zayıf
<i>Streptococcus</i> sp. KC24L	0,83±0,08	1,19±0,12	Zayıf
<i>Lactobacillus</i> sp. ZYN13	0,96±0,06	0,94±0,01	Zayıf
<i>Lactobacillus</i> sp. ZDM141	0,39±0,02	0,27±0,13	Zayıf
<i>Lactobacillus</i> sp. KC47L	0,65±0,00	0,15±0,05	Zayıf
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300 (Pozitif Kontrol)	1,29±0,01	6,44±0,15	

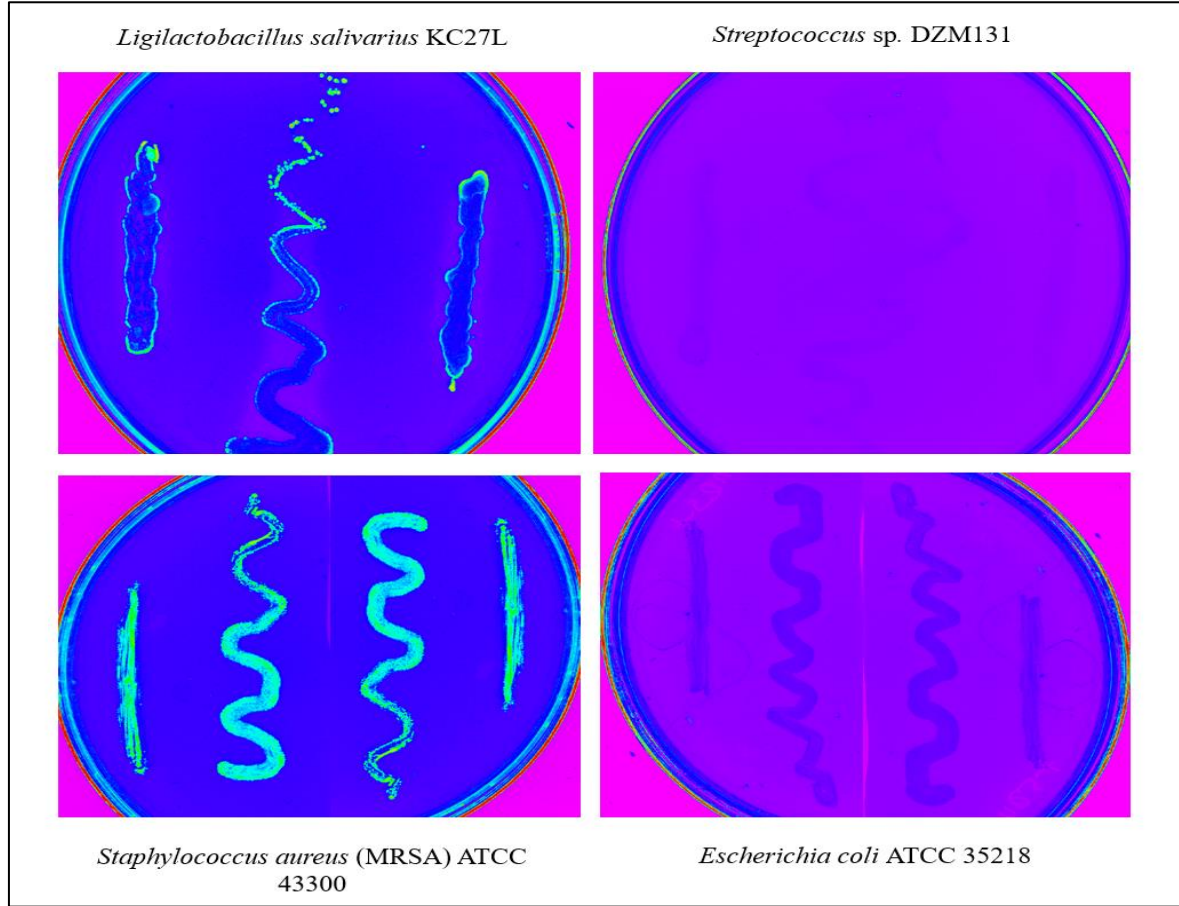


Şekil 4.2. Planktonik (OD_{600nm}) ve biyofilm (OD_{570nm}) hücrelerin optik yoğunlukları (OD)

Tez çalışmasında kullanılan 96 LAB'sinin kalkoflor beyazı içeren MRS katı besiyerinde biyofilm yapısına kalkoflor bağlama yeteneği incelenmiştir. Bakterilerin 60'ında biyofilm yapısında selüloz varlığı nedeniyle kalkoflorun bağlandığı ve UV ışına yapabildiği, 36'sında biyofilm yapısına kalkoflorun bağlanamadığı dolayısıyla yapıda selülozun bulunmadığı ve herhangi bir ışımının gözlenmediği belirlenmiştir.

Kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde pozitif sonuç veren ve mikropilaka yöntemiyle güçlü biyofilm oluşturduğu belirlenen 7 bakterinin (*L. salivarius* KC27L, *L. acidophilus* BAZ29, *Lactobacillus* sp. GLK3, *Lactobacillus* sp. ZDM121, *Lactobacillus* sp. 713, *Streptococcus* sp. KC13L, *Streptococcus* sp. DZM131) kalkoflor beyazı içeren katı besiyeri yöntemi ile biyofilm yapısı incelendiğinde; bakterilerin 5'inin (*L. salivarius* KC27L, *L. acidophilus* BAZ29, *Lactobacillus* sp. 713, *Streptococcus* sp. KC13L, *Lactobacillus* sp. GLK3) biyofilm yapısında selüloz varlığı nedeniyle UV ışık altında floresan ışına yapabildiği, 2'sinin (*Lactobacillus* sp. ZDM121, *Streptococcus* sp. DZM131) biyofilm yapısında selüloz bulunmadığı için herhangi bir ışımının gözlenmediği tespit edilmiştir. Resim 4.2'de kalkoflor beyazı içeren katı besiyeri yöntemi ile biyofilm yapısına kalkoflor bağlama

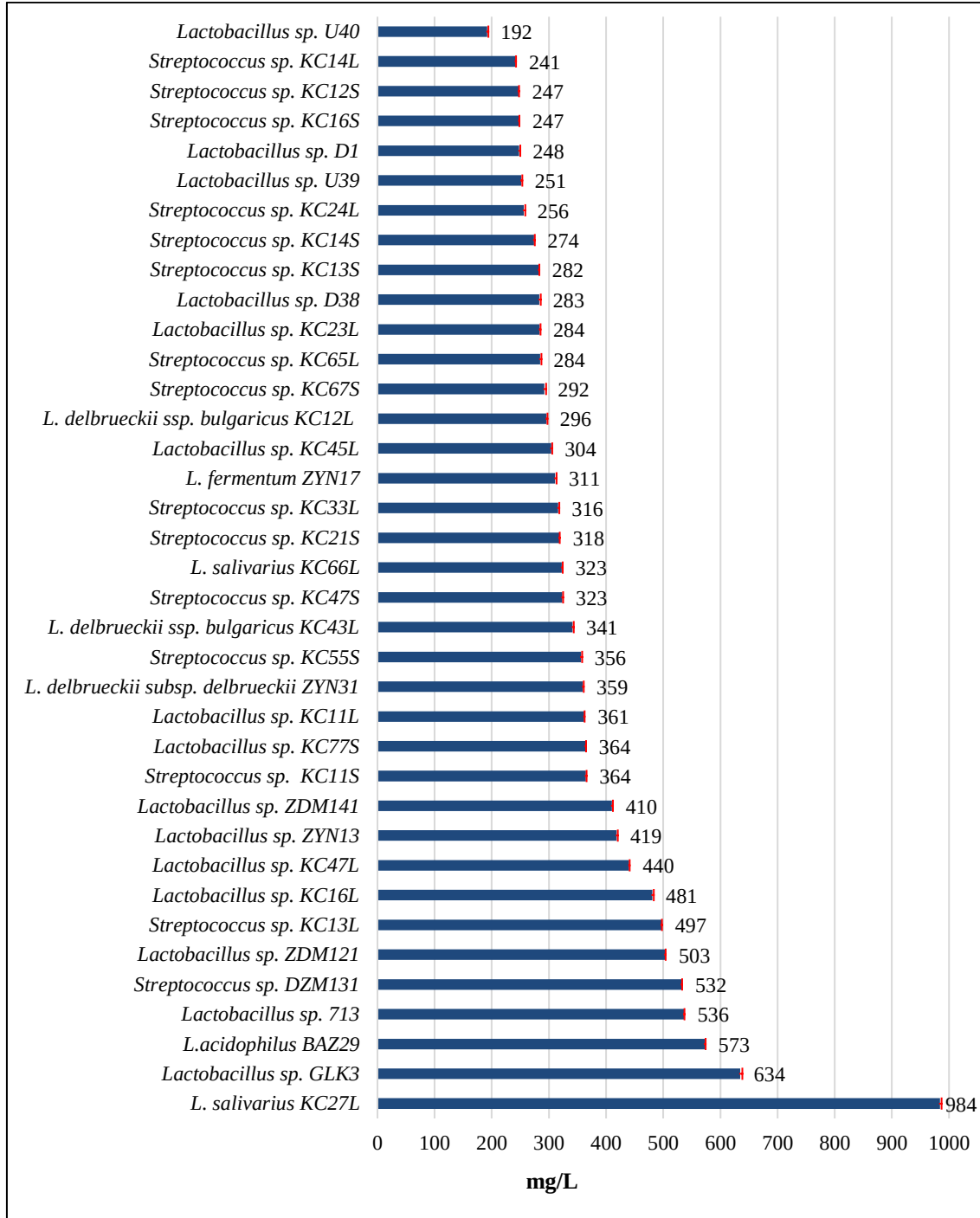
özellikleri belirlenen bakterilerin ve pozitif, negatif kontrol referans suşlarının UV ışık altında katı besiyerindeki görüntüleri verilmiştir.



Resim 4.2. Kalkoflor beyazı içeren katı besiyerinde oluşan koloni görüntüleri

4.2. EPS Üretim Miktarlarının Belirlenmesi

Yapılan tez çalışması kapsamında, TGIS ve TG kaynaklı *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsine ait 96 LAB'sinin biyofilm oluşturma özellikleri kongo kırmızı içeren katı besiyeri ve kalkoflor beyazı içeren katı besiyerleri ile kalitatif olarak, polistiren mikropalakalar üzerinde kristal viyole boyama yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Çalışmada kongo kırmızısı içeren katı besiyeri üzerinde siyah koloni oluşturarak pozitif sonuç veren ve kongo kırmızısı katı besiyeri yöntemine göre biyofilm oluşturduğu tespit edilen 37 bakterinin EPS üretim miktarları tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Biyofilm oluşturan bakterilerin EPS üretim miktarları (mg/L)

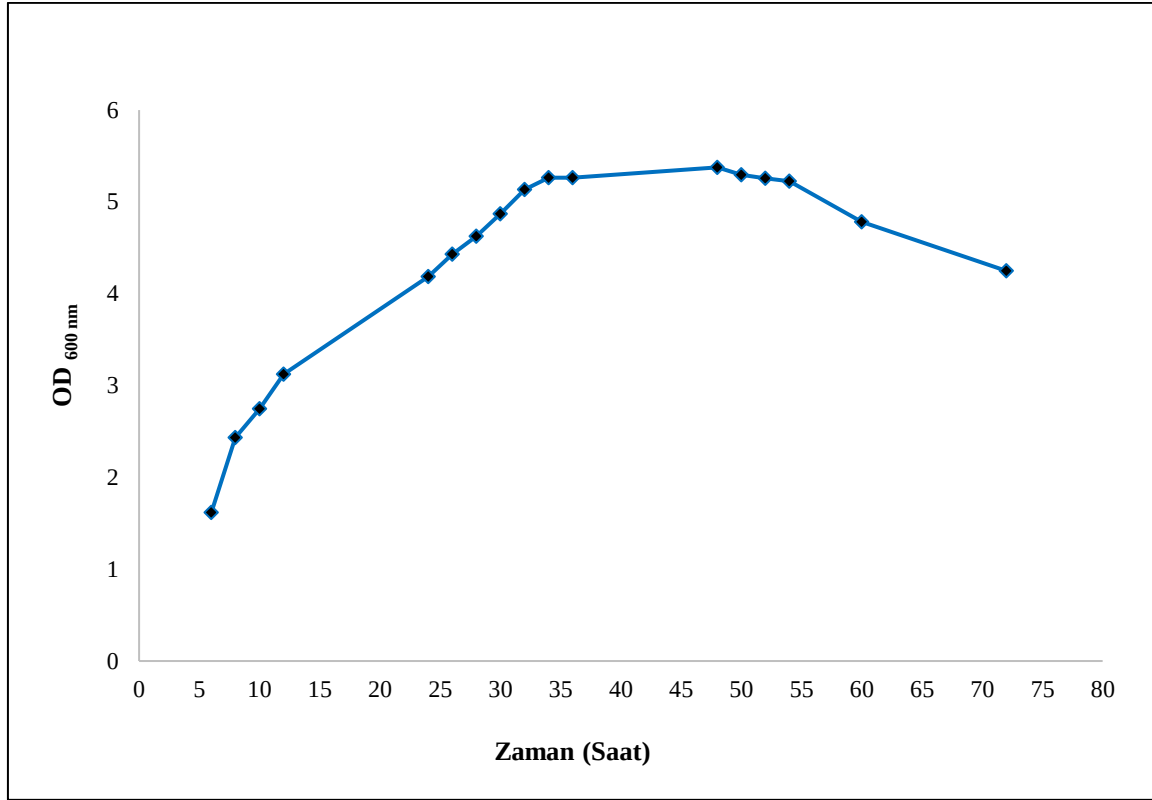
Kongo kırmızısı katı besiyeri yöntemine göre biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlenen 37 bakterinin EPS üretim miktarlarının 192-984 mg/L arasında değiştiği tespit edilmiştir. *L. salivarius* KC27L (984,0±3,0 mg/L) ve *Lactobacillus* sp. GLK3 (634,4±4,0 mg/L) bakterilerinin EPS üretim miktarı yüksek olarak belirlenirken, *Lactobacillus* sp. U40 (192,1±2,0 mg/L) ve *Streptococcus* sp. KC14L (241,5±1,0 mg/L) bakterilerinde düşük EPS ürettiği tespit edilmiştir. EPS üretimi yüksek olan *L. salivarius* KC27L (OD 6,58±0,02) ve

Lactobacillus sp. GLK3 (OD $4,01\pm0,11$) bakterilerinin güçlü biyofilm oluşturduğu; bakteriler arasında en düşük EPS üretim yeteneğine sahip *Lactobacillus* sp. U40 (OD $0,14\pm0,01$) ve *Streptococcus* sp. KC14L (OD $0,53\pm0,03$)'nin ise polistiren mikropalakalar üzerinde kristal viyole boyama yöntemi ile incelendiğinde biyofilm oluşturmadığı gözlenmiştir.

Analizler sonucunda yapılacak olan tüm ileri biyofilm çalışmalarında kullanılmak üzere, kongo kırmızı ve kalkoflor beyazı içeren katı besiyerlerinde pozitif sonuç veren, biyofilm oluşturma yeteneğinin belirlendiği formül ile güçlü biyofilm oluşturduğu tespit edilen ve en yüksek EPS üretim yeteneğine sahip olan, *Ligilactobacillus salivarius* KC27L bakterisi seçilmiştir. Bu aşamadan sonraki bütün çalışmalar *L. salivarius* KC27L bakterisi ile devam edilmiştir.

4.3. *L. salivarius* KC27L Suşunun Büyüme Eğrisi

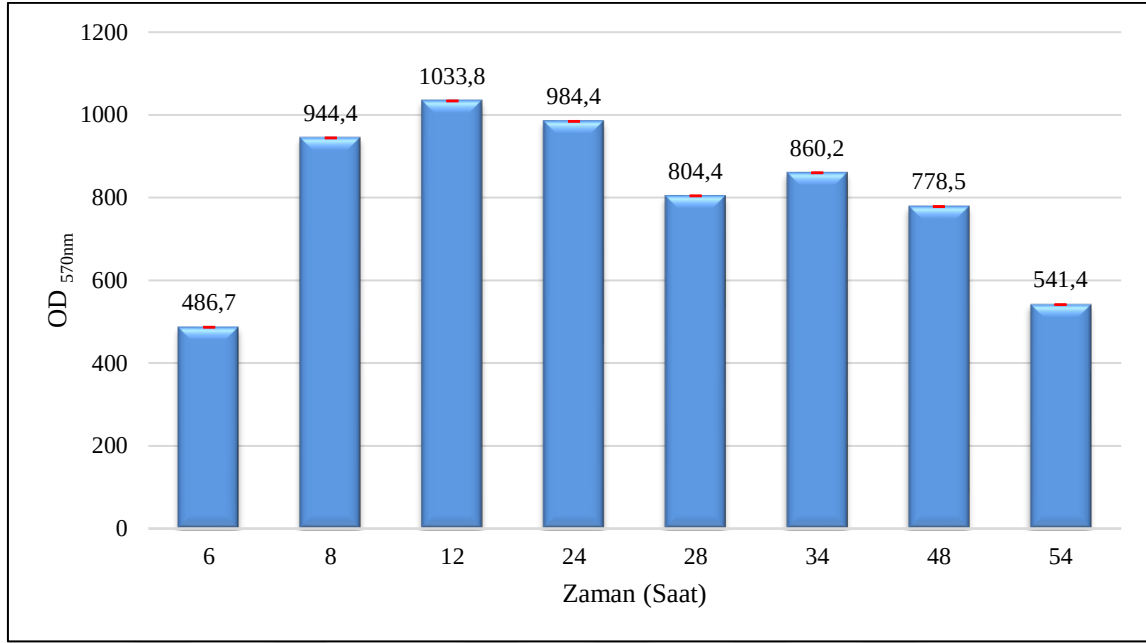
Büyüme eğrisi, bakteri popülasyonunun zamanla nasıl değiştiğini gösteren bir grafikdir ve bakterilerin çoğalmasını ve çevresel koşullara nasıl tepki verdiklerini anlamak için önemli bir araçtır. Bu amaçla, kongo kırmızısı ve kalkoflor beyazı içeren katı besiyerinde pozitif sonuç veren, güçlü biyofilm oluşturduğu belirlenen ve EPS üretim miktarı tespit edilen bakteriler arasında en yüksek EPS üretim yeteneğine sahip *L. salivarius* KC27L'nin büyüme eğrisi ile lag fazı, log fazı, durgunluk fazı ve ölüm fazına denk gelen saatler belirlenmiştir. *L. salivarius* KC27L suşunun lag fazının 0-6. saatler, logaritmik fazının 6-34. saatler, durgunluk fazının 34-48. saatler ve ölüm fazının ise 48. saatten sonra olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *L. salivarius* KC27L suşunun büyüme eğrisi

4.4. *L. salivarius* KC27L Suşunun Farklı Saatlerde EPS Üretim Miktarlarının Belirlenmesi

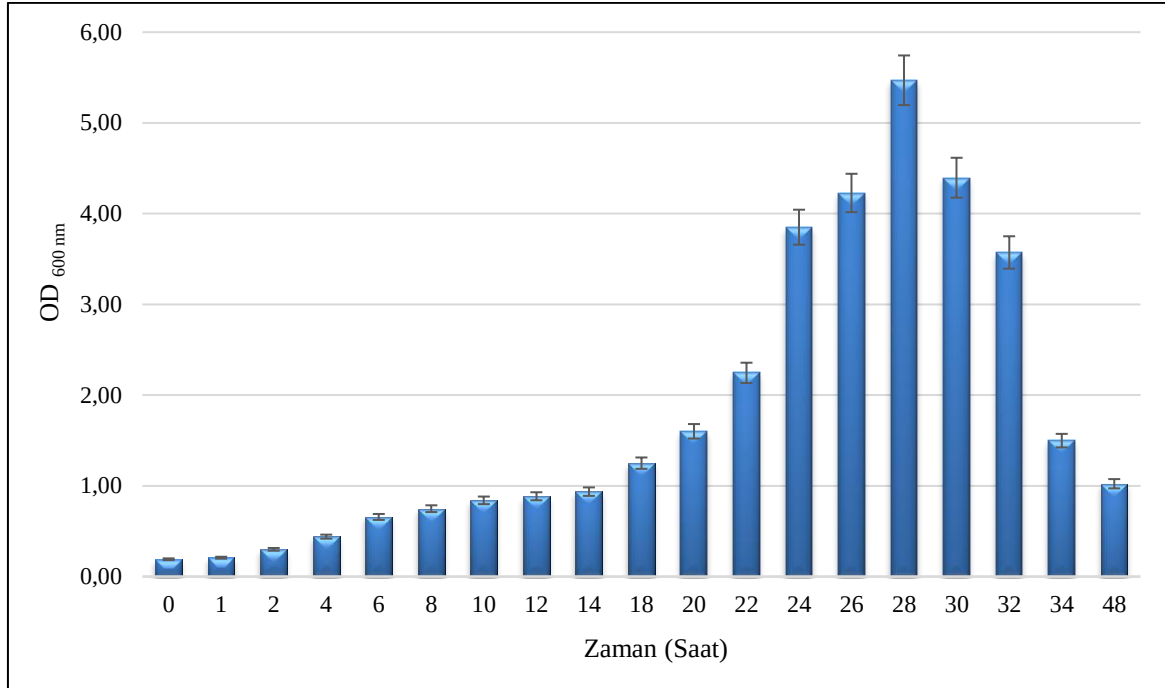
L. salivarius KC27L suşunun büyüme eğrisinde belirlenmiş olan lag fazının sonu/log fazı başlangıcı (6. saat), log fazı (8., 12., 24. ve 28. saat), log fazının sonu/durgunluk fazı başlangıcı (34. saat), durgunluk fazı sonu (48. saat) ve ölüm fazına (54. saat) denk gelen saatlerde EPS üretim miktarları belirlenmiştir. Şekil 4.5’de *L. salivarius* KC27L suşunun farklı saatlerde ürettiği EPS miktarları verilmiştir. *L. salivarius* KC27L suşu en yüksek EPS üretim miktarına 12. (logaritmik faz) ($1033,8 \pm 1,0$ mg/L) ve 24. (logaritmik faz) ($984,0 \pm 3,0$ mg/L) saatler de sahip olduğu belirlenmiştir. En düşük EPS miktarı ise 6. saat (lag fazı sonu/logaritmik faz başlangıcı) ($486,7 \pm 2,0$ mg/L) de görülmüştür. EPS üretim miktarı ile bakterinin gelişim süreleri arasındaki ilişki Pearson korelasyonuna göre analiz edilmiş ve Pearson korelasyon katsayısı (r) 0,954 olarak hesaplanmıştır. Bakterinin gelişim süreleri ve EPS üretim miktarları arasında çok güçlü pozitif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. İki değişken arasındaki değişimlerin birbiriyle oldukça yakından ilişkili olduğunu, bakterinin gelişim süresi arttıkça EPS üretiminin de arttığı belirlenmiştir (p -değeri 0,000).



Şekil 4.5. *L. salivarius* KC27L suşunun farklı saatlere göre EPS üretim miktarları (mg/L)

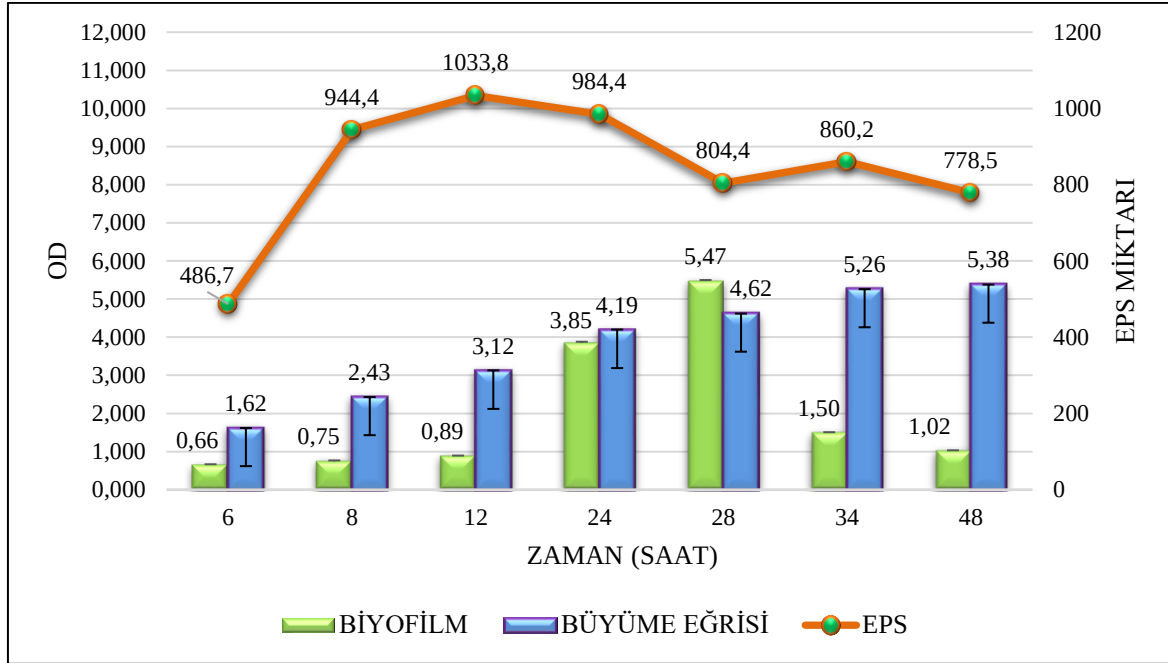
4.5. *L. salivarius* KC27L Suşunun Biyofilm Evrelerinin Belirlenmesi

L. salivarius KC27L suşunun büyüme eğrisindeki lag fazının sonu/log fazı başlangıcı, log fazı, log fazı sonu/durgunluk fazı başlangıcı, durgunluk fazı sonuna denk gelen saatleride kapsayacak şekilde 0-48 saat arası biyofilm oluşum miktarları tespit edilerek, bakterinin bu saatlerde oluşturdukları biyofilm miktarına göre biyofilmin erken, ara ve olgun faz düzeyleri belirlenmiştir. *L. salivarius* KC27L'nin erken biyofilm formunu 6. saat ($OD\ 0,66 \pm 0,01$), ara biyofilm formunu 12. saat ($OD\ 0,88 \pm 0,01$), olgun biyofilm formu ise 28. saatte ($OD\ 5,47 \pm 0,03$) oluşturduğu belirlenmiştir. Şekil 4.6'da *L. salivarius* KC27L bakterisinin farklı saatlerde biyofilm oluşum kapasiteleri gösterilmiştir.



Şekil 4.6. *L. salivarius* KC27L suşunun biyofilm evreleri

L. salivarius KC27L bakterisinin EPS üretimi, büyüme eğrisi, biyofilm evrelerinin karşılaştırılmalı sonucu Şekil 4.7’de verilmiştir. Biyofilm oluşumu, bakteri gelişim süresi arttıkça artmıştır. 6. saatte biyofilm oluşumu en düşük seviyede (OD 0,66±0,01), 28. saatte en yüksek seviyeye (OD 5,47±0,03) ulaşmıştır. EPS üretimi de bakteri gelişim süresiyle artmış ve 6. saatte EPS üretimi 486,7±2,0 mg/L ile en düşük seviyede, 1033,8±1,0 mg/L ile 12. saatte en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Büyüme eğrisi, tipik bir bakteri büyüme eğrisini takip etmiş ve lag fazı 6 saat sürerken, logaritmik faz 28 saat sürmüştür. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, biyofilm oluşturma yeteneği ile EPS üretimi arasında pozitif yönde güçlü ve anlamlı bir korelasyon olduğu ($r=0,814$) ve aralarındaki korelasyonun $p<0,01$ düzeyinde anlamlı olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, EPS üretim miktarındaki artışının, biyofilm oluşturma yeteneğine bağlı olduğu ön görülmüştür.

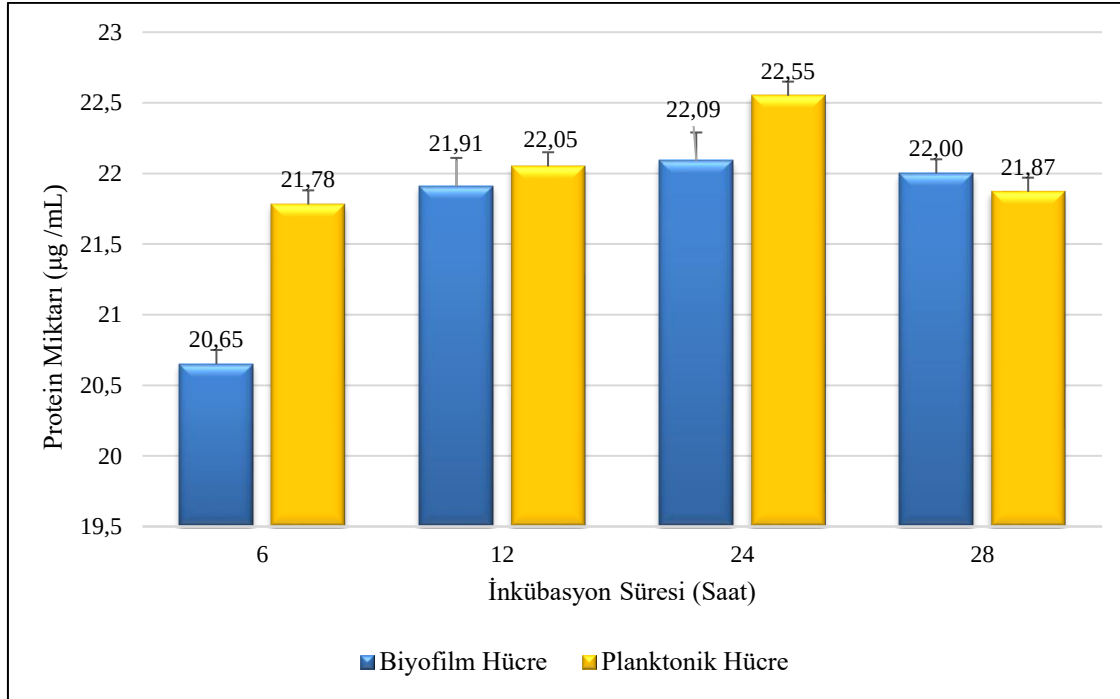


Şekil 4.7. *L. salivarius* KC27L bakterisinin biyofilm oluşumu (OD_{570nm}), EPS üretim miktarı (mg/L) ve büyüme eğrisi (OD_{600nm})

Tez çalışması kapsamında yapılacak olan diğer ileri çalışmalarda EPS üretimi, biyofilm oluşumu ve suşun büyüme eğrisi grafiklerinden elde edilmiş olan üç farklı biyofilm faz düzeyini yansıtacak şekilde 6., 12. ve 28. saatler seçilmiştir. Bundan sonra yapılacak tüm çalışmalarda bu saatler üzerinden devam edilmiştir.

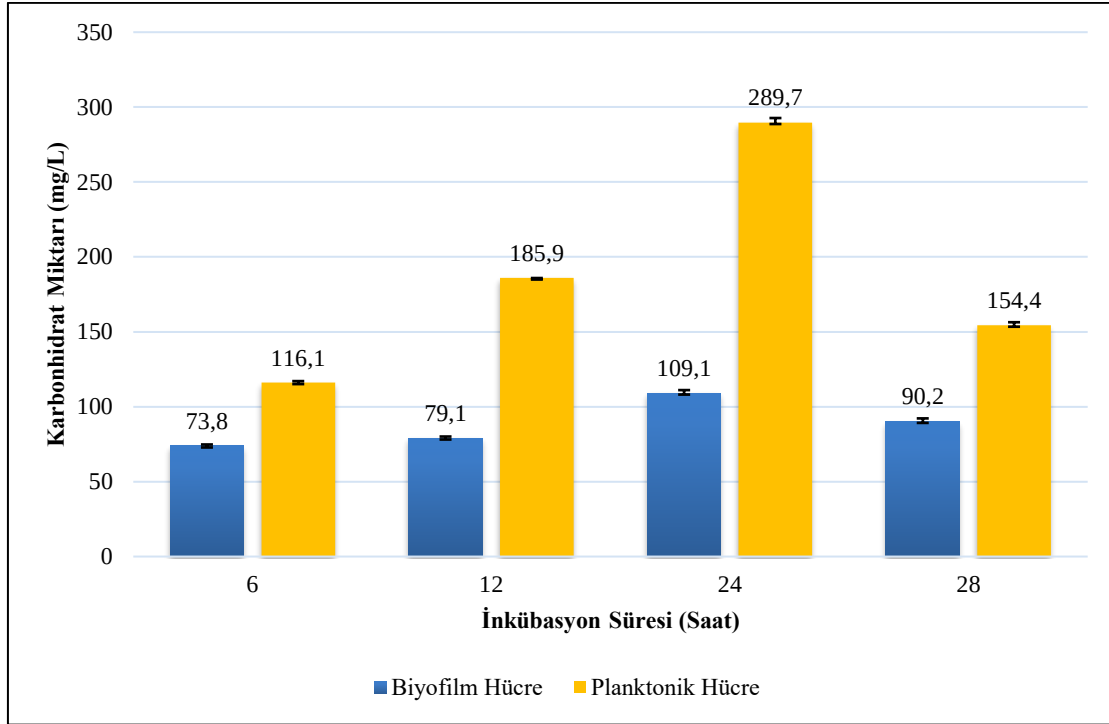
4.6. *L. salivarius* KC27L Suşunun Planktonik ve Biyofilm Bileşenlerinin İzolasyonu

L. salivarius KC27L suşunun planktonik ve biyofilm hücrelerinin izolasyonu bakterinin biyofilm evreleri arasında yer alan erken biyofilm (6. saat), ara biyofilm (12. saat) ve olgun biyofilm (28. saat) fazlarına denk gelen süreler içinde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, izole edilen bileşenlerin protein (Şekil 4.8) ve karbonhidrat (Şekil 4.9) miktarları belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Planktonik ve biyofilm hücrelerinin protein miktarları

KC27L suşunun biyofilm ve planktonik hücre bileşenlerinin protein miktarları hesaplandığında, biyofilm hücrelerinin en düşük protein miktarına 6. saatte ($20,65 \pm 0,10$ µg/mL) en yüksek protein miktarına ise 24. saatte ($22,09 \pm 0,20$ µg/mL) rastlanılmıştır. Planktonik hücrelerde biyofilm hücrelerinde olduğu gibi en düşük protein miktarı $21,78 \pm 0,10$ µg/mL ile 6. saatte, en yüksek protein miktarı ise $22,55 \pm 0,30$ µg/mL ile 24. saatte tespit edilmiştir. Planktonik ve biyofilm matriks bileşenlerinin en düşük karbonhidrat miktarına 6. saatte (sırasıyla; $116,1 \pm 1,0$ ve $73,8 \pm 1,0$ mg/L) en yüksek karbonhidrat miktarına ise 24. saatte (sırasıyla; $289,7 \pm 3,0$ ve $109,1 \pm 2,0$ mg/L) sahip olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.9. Planktonik ve biyofilm hücrelerin karbonhidrat miktarları

4.7. EPS'lerin Monomer Kompozisyonunun HPLC İle Araştırılması

Ligilactobacillus salivarius KC27L bakterisinin planktonik ve biyofilm matriks bileşenlerinden elde edilen EPS'lerinin monomer kompozisyonu tayini HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile yapılmıştır. KC27L bakterisinin planktonik ve biyofilm matriks bileşenlerinden elde edilen EPS'nin monosakkarit kompozisyonunda glikoz, arabinoz, mannoz ve sükroz şekerlerinin varlığı taranmıştır. Ancak, planktonik ve biyofilm matriks bileşenlerinden elde edilen EPS'lerde bu şekerlerin varlığına rastlanılmamıştır. EPS'lerin monosakkarit bileşenlerinin belirlenmesi için daha farklı şekerlerin taranması gerekmektedir.

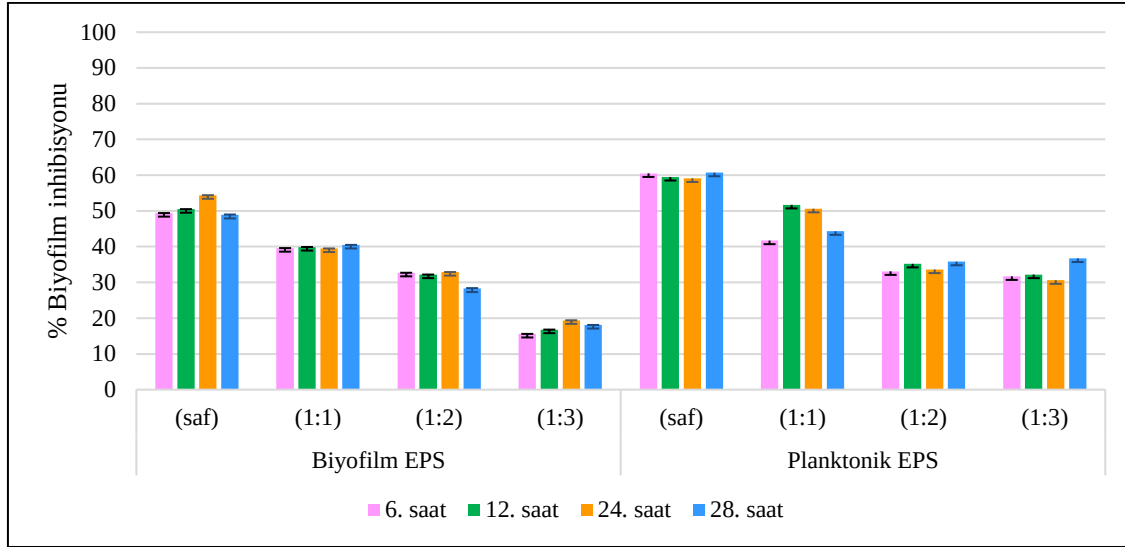
4.8. EPS'lerin Molekül Ağırlıklarının SEC ile Araştırılması

Ligilactobacillus salivarius KC27L bakterisinin planktonik ve biyofilm hücrelerinden elde edilen EPS'lerinin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi için SEC (Büyükölçek Ayırma Kromatografisi) analizi yapılmıştır. Bakterinin planktonik EPS'lerinin ve biyofilm EPS'lerinin SEC analizi ile moleküler ağırlıkları tespit edilememiştir. SEC analizi düşük moleküler ağırlığa sahip moleküllerin moleküler ağırlığının tespit edilmesinde kullanılmadığından, EPS'lerin moleküler ağırlığının belirlenmesinde düşük moleküler

ağırlıkların tespit eden yöntem/yöntemlerin (gaz kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, elektrosprey iyonizasyon, viskozimetri) kullanılması gerekmektedir.

4.9. *L. salivarius* KC27L Suşunun Antibiyofilm Özelliklerinin Belirlenmesi

L. salivarius KC27L bakterisinin, saf (su ile çözülmemiş) ve 1:1, 1:2, 1:3 (v/v) oranlarında distile su içerisinde çözülerek hazırlanmış planktonik ve biyofilm yaşam formlarının erken (6. saat), ara (12. saat) ve olgun (28. saat) EPS'lerinin, biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olan ve tez çalışmasında pozitif kontrol olarak kullanılan MRSA ATCC 43300 üzerindeki antibiyofilm özellikleri mikropilaka yöntemine göre değerlendirilmiştir. Mikrobiyal yapışma inhibisyonu (%) Bölüm 3.13'de verilen formüle göre hesaplanmıştır. *L. salivarius* KC27L bakterisinin biyofilm yaşam formlarından elde edilen EPS'ler arasında, 24. saatte elde edilen EPS'nin (saf EPS, su ile çözülmemiş) %54,4 ile MRSA ATCC 43300 bakterisinin oluşturmuş olduğu biyofilmi en yüksek oranda engellerken 6. saatte edilen EPS'nin 1:3 (5 µL distile su: 15 µL EPS) konsantrasyonunda en düşük (%15,6) oranda engellediği görülmüştür. Planktonik formdaki EPS'lerin antibiyofilm etkileri incelendiğinde; *L. salivarius* KC27L bakterisinin 28. saatte üretmiş olduğu EPS'lerin (saf EPS, su ile çözülmemiş) biyofilm oluşumunu en yüksek oranda (%60,7) engellediği, 24. saatte üretilen EPS'nin 1:3 (5 µL distile su: 15 µL EPS) konsantrasyonda biyofilm oluşumunu en düşük oranda (%30,6) engellediği tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, KC27L'nin saf olarak (suda çözülmemiş) ve 1:1, 1:2, 1:3 (v/v) oranında distile su içerisinde çözülerek hazırlanmış planktonik ve biyofilm yaşam formlarının erken (6. saat), ara (12. saat) ve olgun (28. saat) EPS'leri MRSA ATCC 43300 bakterisinin oluşturduğu biyofilmi, hazırlanan konsantrasyonlara ait biyofilm formdaki EPS'lerin %15,6-54,4 oranında; planktonik yaşam formu EPS'lerinin ise %30,6-60,7 arasında değişen oranlarda engellendiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Her iki yaşam formunda da en uygun EPS konsantrasyonunun saf EPS (su ile çözülmemiş) olduğu saptanmış olup, EPS konsantrasyon oranı arttıkça, patojen bakterinin biyofilm kontrol yüzdesinin daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır. MRSA ATCC 43300'in kontrolü için KC27L'nin iki yaşam formunun (biyofilm ve planktonik yaşam formu) su ile çözülmemiş EPS'leri (saf EPS) 4 saat içinde yaklaşık %50 giderim sağlamıştır. Suda çözülmemiş saf biyofilm EPS'leriyle çok bir farkı olmamasının yanı sıra, planktonik EPS'ler %5-10 oranında patojen bakteri üzerinde daha iyi inhibisyon oluşturmuştur.



Şekil 4.10. Planktonik ve biyofilm EPS'lerinin % biyofilm inhibisyonu

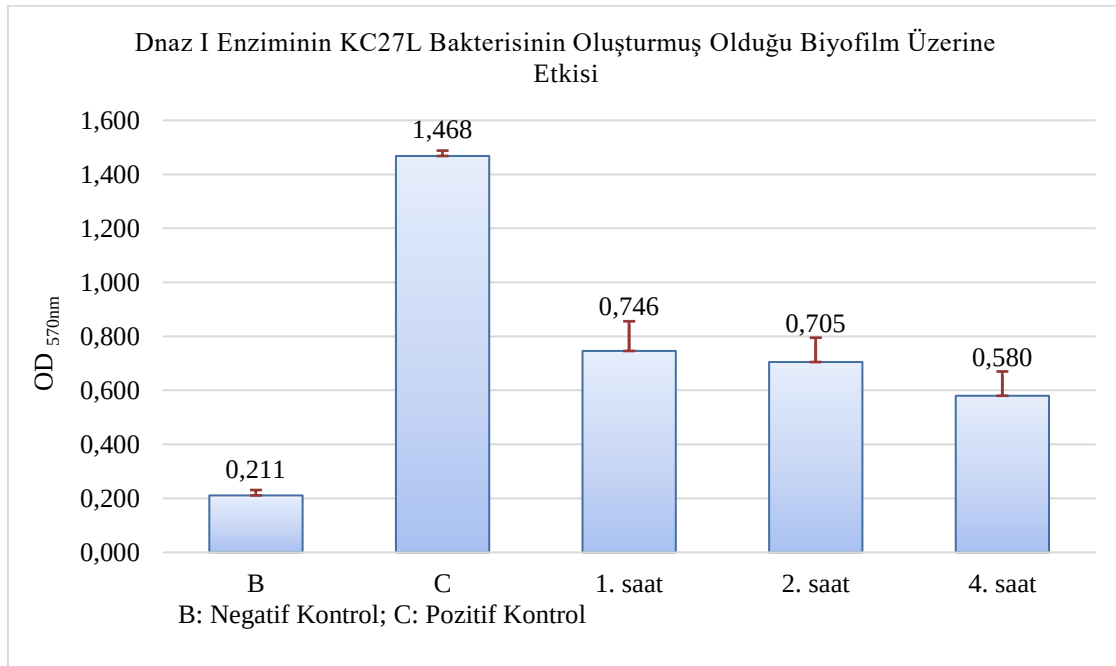
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki EPS'lerin % biyofilm inhibisyonu

Patojen Bakteri	% Biyofilm inhibisyonu							
	Oran							
	6. saat Biyofilm EPS				6. saat Planktonik EPS			
MRSA ATCC 43300	Saf EPS	1:1	1:2	1:3	Saf EPS	1:1	1:2	1:3
	49,4±1,0	39,6±2,0	32,7±4,0	15,6±0,7	60,5±2,0	41,7±1,0	33,1±2,0	31,7±2,0
	12. Saat Biyofilm EPS				12. saat Planktonik EPS			
	Saf EPS	1:1	1:2	1:3	Saf EPS	1:1	1:2	1:3
	50,5±1,0	39,9±1,0	32,2±3,0	16,8±1,0	59,5±1,0	51,7±2,0	35,2±1,0	32,2±1,0
	24. saat Biyofilm EPS				24. saat Planktonik EPS			
	Saf EPS	1:1	1:2	1:3	Saf EPS	1:1	1:2	1:3
	54,4±2,0	39,5±1,0	32,9±2,0	19,4±1,0	59,1±3,0	50,6±3,0	33,6±2,0	30,6±4,0
	28. saat Biyofilm EPS				28. saat Planktonik EPS			
	Saf EPS	1:1	1:2	1:3	Saf EPS	1:1	1:2	1:3
	48,9±1,0	40,5±3,0	28,3±2,0	18,1±1,0	60,7±4,0	44,3±1,0	35,8±2,0	36,7±4,0

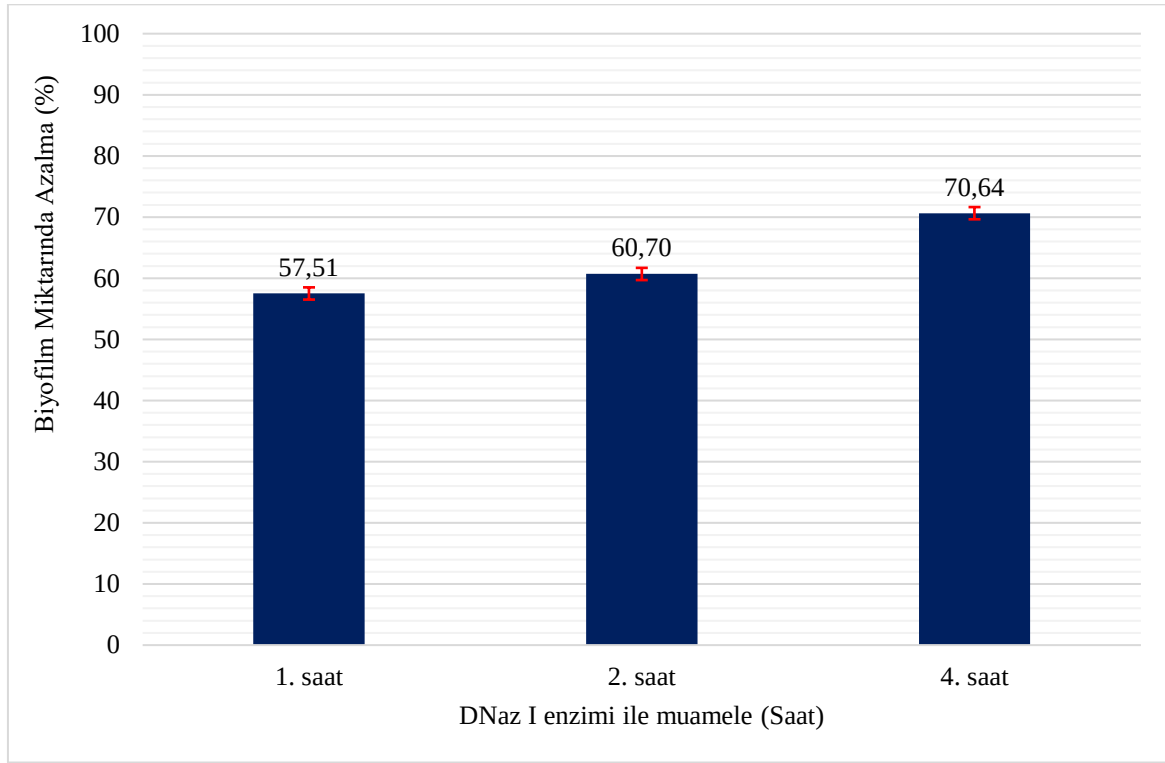
Farklı konsantrasyonlarda biyofilm ve planktonik EPS'lerin uygulamasında, MRSA ATCC 43300 tarafından oluşturulan biyofilmin % inhibisyonu ile EPS konsantrasyonları arasındaki ilişki regresyon analizi ile tespit edilmiş ve konsantrasyon artışı ile biyofilm inhibisyonu arasında ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Çoklu r değeri 0,885 olması sebebiyle biyofilmin % inhibisyonu ile EPS konsantrasyonları arasında güçlü ve pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir.

4.10. *L. salivarius* KC27L'nin DNaz I Enzimi ile Biyofilm Matriksindeki eDNA'nın Belirlenmesi

KC27L'nin olgun biyofilminin (28. saat) (Olgun biyofilmlerin, erken ve ara biyofilm fazlarına göre daha fazla miktarda eDNA içermesi sebebiyle bu faz düzeyi kullanılmıştır) DNaz I enzimi ile 1, 2 ve 4 saat muamelesi sonucunda, DNaz I enziminin KC27L bakterisinin biyofilmi üzerine etkisi Şekil 4.11'de ve enzimin biyofilm miktarı üzerindeki yüzde azaltma değeri Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, DNaz I ile muamele edilen biyofilm örneklerinin biyofilm matriks bileşenleri arasında yer alan eDNA'larının, DNaz I enzime karşı duyarlı oldukları ve DNaz I enziminin bakterinin biyofilm miktarı üzerinde bir azalmaya sebebiyet verdiği tespit edilmiştir. DNaz I enziminin farklı inkübasyon saatlerinde etkisinin belirlendiği çalışmada, enzimin 1 saat içerisinde etki gösterdiği ve bakterinin biyofilm yapısında %57,51 oranında bir azalma gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, DNaz I'in KC27L bakterisinin olgun biyofilm (28. saat) yapılarını zayıflattığı ve 4 saat sonunda biyofilm yapısını %70,64 oranında giderdiği saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgulara dayanarak KC27L bakterisinin eDNA varlığına sahip olduğu ve eDNA'nın olgun biyofilmler üzerinde matriks bütünlüğünü sağlamada yapısal ve fonksiyonel role sahip olduğu gösterilmiştir. Bu veri, LAB'nde DNaz I ile muamele sonucu eDNA'nın varlığını ortaya koyan nadir çalışmalar arasında yer almaktadır.



Şekil 4.11. Olgun biyofilmlerin (28. saat) DNaz I enzimi ile muamele edilmeleri sonrası mikropalakalarda ölçülen biyofilm miktarları



Şekil 4.12. Olgun biyofilmlerin (28. saat) DNaz I ile muamele edilmeleri sonrası biyofilm miktarlarındaki yüzde azalma grafiği



5. TARTIŞMA

Biyofilmler, proteinler, polisakkaritler ve nükleik asitten (eDNA) oluşan ekstraselüler polimerik maddeler (EPM)'in bulunduğu bir matriksle kaplanmış, genellikle yüzeylerde veya arayüzlerde görülebilen oldukça organize mikrobiyal topluluklardır. Biyofilmlerdeki bakteriler, serbest yaşayan (planktonik) bakterilere kıyasla sosyal etkileşimlerin oluşumuna, besin alışverişi hızının artmasına, kurumaya, antimikrobiyal tedaviye ve biyositlere karşı toleransın artması gibi avantajlara sahiptirler (Schwibbert, Richter, Krüger ve Bonse, 2024). Biyofilmler, paslanmaz çelik, plastik, polistiren ve cam gibi çeşitli malzemeler üzerinde ortaya çıkabilir (Tomé ve diğerleri, 2023). Yaygın varlığı ve çeşitli ekosistemlere olan etkileri nedeniyle önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bu etkiler çevre üzerindeki hem olumlu hem de olumsuz etkileri kapsamaktadır (Kodakkat ve diğerleri, 2024). Biyofilm terimi, genellikle insan hastalıklarından sorumlu olan ilgili riskler, antibiyotik direnci, enfeksiyonlar, dezenfeksiyon ve temizleme işlemlerine karşı direnç göstererek kontrol altına alma güçlükleri ile ilişkilendirilir. Bu komplikasyonlara öncelikle *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *S. enterica*, *Candida albicans* gibi patojen mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmler neden olur (Kim, Kim ve Oh, 2022). Ancak, çeşitli alanlarda gözlemlenen olumsuz zorluklardan tüm biyofilmler sorumlu değildir. Belirli LAB'nin biyofilmleri, patojenlere ve patojenlerin üretmiş olduğu biyofilmlere karşı koruyucu olarak kullanılabilir (Mgomi ve diğerleri, 2023).

LAB, karbonhidrat katabolizmasının son ürünü olarak laktik asit üretir. Bununla birlikte benzersiz organoleptik özelliklerle sonuçlanan tat, doku ve aromaya katkıda bulunan organik maddeler de üretirler (Bintsis, 2018; Ayivi ve diğerleri, 2020; Zapašnik, Sokołowska ve Bryła, 2022). LAB genellikle güvenli olarak kabul edilir ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılır; ayrıca insan bağırsaklarının doğal mikrobiyotasını oluştururlar (Zapašnik ve diğerleri, 2022). Biyokoruma bağlamında LAB, büyüme ve fermantasyon süreci sırasında hidrojen peroksit, laktik asit, asetik asit ve düşük molekül ağırlıklı maddeler (diasetil, yağ asitleri, reuterin, reuterisiklin), antifungal bileşikler (fenil laktat, propiyonat, hidroksifenil laktat) ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal etkiye sahip bir dizi metabolit üretmeleri nedeniyle çok önemli bir rol oynamaktadır (Castellano ve diğerleri, 2017).

Biyofilm iyileştirme stratejilerinin çoğu, biyofilm oluşumunun erken aşamalarını önleyen biyofilm inhibisyon ajanlarını veya biyofilm hücre topluluğunu bozmayı amaçlayan

biyofilm dağıtma ajanlarını içerir (Fleming ve Rumbaugh, 2017; Verderosa, Totsika ve Fairfull-Smith, 2019). Günümüzde geleneksel antibiyotikler yerine probiyotik LAB'nin kullanılması biyofilm giderimi ve biyofilm terapötiklerinin geleceği için heyecan verici beklentiler sunmaktadır (Giordani, Parolin ve Vitali, 2021). LAB'nin belirli süt ürünlerine ve fermente gıdalara dahil edilmesi yalnızca ürün kalitesini yükseltmekle kalmaz, aynı zamanda zararlı mikroorganizmalar tarafından biyofilm oluşumunun azaltılmasına da yardımcı olur (Söderling, Marttinen ve Haukioja, 2011; Hossain ve diğerleri, 2021). Bununla birlikte, biyofilm inhibisyon çalışmalarında, LAB'nin lipoteikoik asit (Ahn, Baik, Yun ve Han, 2018), biyosürefektanlar (Ciandrini ve diğerleri, 2016) ve EPS'ler (Abdalla ve diğerleri, 2021) gibi yüzey bileşenleri ve LAB tarafından üretilen protein ve organik asitler biyofilmi inhibe etmek için antibiyofilm ajanları olarak görev yapabildikleri ve LAB tarafından üretilen biyofilmlerin, bozulma ve patojenik mikroorganizmaların gelişimine karşı bariyer etkileri olduğu rapor edilmiştir (Tatsaporn ve Kornkano, 2020; Li, Zhang, Zhao, Zhang ve Chen, 2024). Yapılan tez çalışmasında, gıda, endüstriyel, çevre mikrobiyolojisi alanlarında büyük bir öneme sahip LAB'nin biyofilm oluşumundaki mekanizmalarını detaylandırmak, kontaminasyon, gıda bozulması ve/veya enfeksiyon gibi büyük problemler yaratan patojen biyofilmleri üzerindeki doğal ve çevre dostu olan LAB'nin etkilerini ve LAB-EPS'lerinin biyofilm oluşturan patojen bakteriler üzerindeki antibiyofilm aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı stok kültür koleksiyonunda bulunan *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinsine ait LAB'nin biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi, biyofilm matriks bileşenleri ile ilgili kimyasal ve moleküler düzeyde yeni bilgilerin edinilmesi, LAB'nin biyofilm oluşturma mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi ve LAB'nin matriks bileşenlerinden EPS'lerin patojen bakterilerin biyofilm kontrolü için antibiyofilm özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

LAB'nin temel biyofilm özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, bakterilerin kongo kırmızısı ve kalkoflor beyazı içeren besiyerinde biyofilm oluşumu ve polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşum miktarları saptanmıştır. Daha sonra, biyofilm oluşturduğu belirlenen bakterilerin EPS üretim miktarları tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Yapılan çalışmalar sonrasında, kongo kırmızısı ve kalkoflor beyazı içeren katı besiyeri yöntemlerinde pozitif sonuç veren kristal viyole yöntemi ile güçlü biyofilm oluşturduğu tespit edilen ve EPS üretim miktarı en yüksek olan bakteri seçilmiştir. Bundan sonra yapılan ileri çalışmalar bu bakteri üzerinden devam etmiştir. Seçilen bakterinin, planktonik ve biyofilm yaşam formları

arasındaki farklılıkları anlamak için iki hücre formunun farklı büyüme evrelerindeki (erken, ara ve olgun faz) EPS'leri izole edilerek miktarının, monomer profillerinin ve moleküler ağırlıklarının tespiti ve EPS'lerin biyofilm oluşturduğu bilinen patojen bakteriye karşı antibiyofilm ajanı olarak kullanılabilirliği spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Biyofilmlerin tespiti ve miktarının belirlenmesi için kongo kırmızısı içeren katı besiyeri yöntemi, kalkoflor beyazı ve mikropilaka yöntemi (kristal viyole ile boyama) gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Lee, Bae, Han ve Lee, 2016; Monteiro ve diğerleri, 2021). Literatürde, bakterilerin biyofilm oluşturup oluşturmadığının tespiti için kristal viyole boyama tekniğinin uygulanmasının yeterli olduğu bildirilmektedir (Lee ve diğerleri, 2016). Ancak, yapılan tez çalışmasında, biyofilm oluşumu için gerekli temel biyofilm çalışmalarını bir arada uygulayarak detaylı incelemelerle çalışmanın özgün değerini arttırmak ve en doğru sonucu elde etmek amaçlanmıştır. Biyofilm ile ilgili yapılan çalışmalarda kristal viyole boyama ve kongo kırmızısı metodlarının kullanıldığı çalışmalarda LAB'nin izolasyon kaynağı olarak peynir (Akoğlu, 2020), insan tükürüğü ve gaitası (Rashtchi ve diğerleri, 2022), süt (Rezaei ve diğerleri, 2023), keçi, koyun ve inek kolostrumu (Dbeibia ve diğerleri, 2023), meyve-sebze (Banik ve diğerleri, 2023), ekşi maya (Nami ve diğerleri, 2024) örnekleri kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan LAB'leri bu kaynaklardan farklı olarak TGIS ve TG'dan elde edilmiştir. LAB'nin biyofilm oluşturma yeteneğinin suştan suşa değiştiği bilgisi doğrultusunda (George ve Halami, 2019), izolasyon kaynağından dolayı oluşabilecek farklı sonuçlar elde edebilme potansiyeli mevcut olduğundan üç yöntemle elde edilen sonuçların literatüre kazandırılması amaçlanmıştır.

Kongo kırmızısı, benzidin-diazo-bis-1-naftilamin 4-sülfonik asidin sodyum tuzudur. Mikrobiyal selüloza karşı güçlü afiniteye sahiptir (Bhowmick ve diğerleri, 2011). Boyanın moleküler yapısı, iki aromatik halka ve bunların arasında bir azo grubu içerir. Bu azo grubu, polisakkaritlerin hidroksil grupları ile hidrojen bağı oluşturabilir. Kongo kırmızısı boyası, EPM'deki polisakkaritlere bağlanır. Bu bağlanma, boyanın renginde değişikliğe neden olur ve koloniyi siyaha dönüştürür (Wood, Erfle, Teather, 1988; Furtuna, Debora, Wasito, 2018). Kongo kırmızısı içeren katı besiyeri yöntemine göre inkübasyon sonucunda besiyerinde siyah renkte koloni oluşturan bakteriler biyofilm pozitif, oluşturmayanlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmektedir (Landeta ve diğerleri, 2013; Niederle ve diğerleri, 2019). Araştırmacılar, kongo kırmızısının biyofilm matriksindeki protein ve polisakkaritlerle kompleks oluşturarak koloniyi siyah bir renk verdiğini ve renk

yoğunluğunun, biyofilm matriksinin yoğunluğuna bağlı olduğunu belirlemişlerdir (Rollefson ve diğerleri, 2011; Reichhardt ve diğerleri, 2016; Lima ve diğerleri, 2017). Bu çalışmada, TGIS ve TG'dan izole edilmiş 96 LAB'nin biyofilm oluşturma yeteneklerini belirlemek için kongo kırmızısı içeren katı besiyeri yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada, 96 LAB'den 37'sinin kongo kırmızısı içeren MRS katı besiyerinde siyah renk koloni oluşturarak biyofilm oluşumu gösterdikleri kalitatif olarak tespit edilmiştir. Idicula ve diğerleri (2023), çalışmalarında insan bağırsağında yer alan probiyotik LAB'ni (*L. fermentum*, *L. plantarum* ve *L. salivarius*) kongo kırmızısı içeren besiyerinde geliştirmişler ve bakterilerin siyah koloni oluşturmaları sonucunda biyofilm oluşumu gerçekleştirdiklerini tespit etmişlerdir. Ayrıca, biyofilm oluşturmalarından dolayı bu bakterilerin bağırsak mukozasındaki kolonizasyonunu arttırdığını ve mukozada daha uzun süre kaldıklarını bildirmişlerdir. *Pediococcus acidilactici* ve *L. plantarum*'un biyofilm oluşumunun incelendiği başka bir çalışmada, suşların kongo kırmızı içeren MRS katı besiyeri üzerindeki morfolojileri incelenmiş ve hem *P. acidilactici* hem de *L. plantarum*'un hücre yüzeyinde EPS üretebildikleri belirlenmiştir (Nguyen ve diğerleri, 2020). Rappai, Beena, James ve Aparna (2020), yaptıkları çalışmada, anne sütünden izole ettikleri *P. pentosaceus*'un kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde siyah renkte koloni oluşturarak EPS üretimini gerçekleştirdiğini tespit etmişler ve yapılan *in vitro* çalışmalar sonucunda iyi bir probiyotik adayı olduğunu bildirmişlerdir. Niederle ve diğerleri (2019), kongo kırmızısı içeren katı besiyeri yöntemini uygulayarak çalışmada kullandıkları bakterilerden %59,7'sinin besiyerinde koyu renk koloni oluşturarak biyofilm oluşturma yeteneği gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler ve diğer araştırmacıların yayımlamış olduğu veriler doğrultusunda LAB'nin biyofilm oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

Kristal viyole deneyi, canlı ve ölü hücreleri içeren matriksin boyanmasına dayanan biyofilm biyokütle deneylerini içermektedir (Shukla ve Rao, 2017). Kristal viyole boyası hem canlı hem de ölü hücrelere bağlanabildiği için, bakterinin oluşturduğu toplam biyofilmin nicel olarak belirlenmesini sağlamaktadır. Kongo kırmızısı içeren katı besiyeri ile biyofilm oluşumunun kalitatif olarak değerlendirilmesi, ayrıca mikropilaka yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilerek elde edilen verilerin daha güvenilir olması sağlanmıştır. Bu amaçla, yaptığımız çalışmada, kullanılan 96 LAB'nin mikropilaka yöntemi kullanılarak biyofilm oluşturma kapasiteleri polistiren yüzeylerde incelenmiş ve bakterilerin, 12'si güçlü, 21'i orta düzey ve 14'ünün zayıf biyofilm oluşturduğu ve 49'unun ise biyofilm oluşumu gerçekleştirmediği belirlenmiştir (Şekil 4.1). Literatürdeki benzer çalışmalar incelendiğinde,

Idicula ve diğerleri (2023), çalışmalarında kullandıkları bakterilerin biyofilm oluşumunu değerlendirmek amacıyla mikropilaka yöntemini kullanmışlardır. Araştırmacılar, ortalama OD değeri, OD_C değerinden yüksek çıkan bakterilerin, biyofilm oluşturduğunu kabul etmişlerdir. Çalışmada kullanılan tüm *Lactobacillus* suşlarının, OD değeri, OD_C değerinden daha yüksek bulunmuş ve güçlü biyofilm oluşturma yeteneği gösterdikleri rapor edilmiştir. Polistiren mikropilaka yöntemi kullanılarak LAB suşlarının biyofilm oluşumunun incelendiği bir çalışmada, *Lactobacillus* cinsine ait suşların biyofilm oluşturma yetenekleri teflon yüzeylerde kristal viyole deneyi ile incelenmiş ve *Levilactobacillus brevis* suşunun biyofilm oluşturma kapasitesinin oldukça yüksek olduğu (OD_{590nm} 1,336), buna karşın *L. plantarum* (OD_{590nm} 0,127), *L. acidophilus* (OD_{590nm} 0,115) ve *L. rhamnosus*'un (OD_{590nm} 0,107) biyofilm oluşturma yeteneklerinin zayıf olduğu ifade edilmiştir (Klimko ve diğerleri, 2020). Benzer şekilde, Ait Ouali ve diğerleri (2014), süt tankları ve sağım makineleri yüzeylerinden izole ettikleri 130 LAB'nin 96 kuyucuklu polistiren mikropilakalarda biyofilm oluşturma yeteneklerini incelemişler ve bakterilerden sadece 5'inin biyofilm oluşturabildiği, bunlar içerisinde de *L. brevis* (OD_{595nm} 0,78) ve *L. pentosus* (OD_{595nm} 0,75) suşlarının güçlü biyofilm oluşturdukları rapor etmişlerdir. Mikropilakalarda yapılan başka bir çalışmada, probiyotik *L. rhamnosus* suşunun belirli koşullar altında biyofilm oluşturabildiği ve bu suşta yer alan *luxS* geninin büyüme ve biyofilm oluşumunda önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Lebeer ve diğerleri, 2007). Araştırmalar, çalışmamızla benzerlik göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre, çalışmamızda kullanılan LAB'lerinin abiyotik yüzey üzerinde güçlü biyofilm oluşturma yeteneklerine sahip olması nedeniyle, patojen mikroorganizmalar ile rekabet ortamı sunacağı ön görülmektedir.

Kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde siyah renkte koloni oluşturarak biyofilm oluşturduğu tespit edilen 37 LAB'nin mikropilaka yöntemi kullanılarak biyofilm oluşturma kapasiteleri polistiren yüzeylerde incelendiğinde bu bakterilerin, %18,9'unun güçlü, %13,5'inin orta, %13,5'inin zayıf biyofilm oluşturduğu, %54,1'inin ise biyofilm oluşturmadığı tespit edilmiştir. Kullanılan 96 LAB'nden en yüksek biyofilm değerine *L. salivarius* KC27L (OD 6,58±0,02)'nin sahip olduğu ve güçlü biyofilm oluşturduğu belirlenirken en düşük biyofilm değerine ise *Lactobacillus* sp. KC47L (OD 0,15±0,05)'in sahip olduğu ve biyofilm oluşturmadığı tespit edilmiştir. Bakteriler arasından *L. salivarius* KC27L'nin (OD 6,58±0,02), çalışmada kullanılan pozitif kontrol olan MRSA ATCC 43300 suşu (OD 6,44±0,15) ile yakın değerler göstererek potansiyel güçlü biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Elde edilen sonuçlar, biyofilm oluşumunun aynı tür içerisindeki farklı suşlara

göre bile değişiklik gösterdiği ve biyofilm oluşturma yeteneği yüksek olan bakterilere karar verebilmek için türlerin yanında suşların da önemli olduğunu göstermektedir (Klimko, Cherdyntseva, Brioukhanov ve Netrusov, 2020). 96 LAB'nin kongo kırmızısı içeren katı besiyeri ve mikroplaka yöntemi kullanılarak biyofilm oluşturma kapasiteleri arasındaki korelasyon Pearson korelasyonuna göre değerlendirilmiş ve $r=0,23$ tespit edildiğinden iki parametre arasındaki ilişkinin zayıf ($p=0,028$, $p<0,05$) olduğu belirlenmiştir.

Bakteriyel selüloz, *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Komagataeibacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Sarcinia*, *Lactobacillus* (Adetunji ve Adegoke, 2007) ve *Gluconacetobacter* (Avcioglu, 2022) cinslerine ait çeşitli bakteriler tarafından hücre dışı biyopolimer olarak sentezlenerek, hücre yapışması ve biyofilm oluşumunda rol oynar (Adetunji ve Adegoke, 2007). Selüloz, β -(1→4) glikozidik bağlarla bağlanan glikoz monomerlerinden oluşan bir primer metabolit olarak sentezlenir (Quintana-Quirino ve diğerleri, 2019). Kalkoflor beyazı hem selüloz hem de saf β -(1→3)-D ve β -(1→4)-D glukanolara bağlanan (Prete ve diğerleri, 2021), besiyeri içersine eklendiğinde β -(1→3)-D ve β -(1→4)-D glukopiranozil bağlarını bulunduran yüzey polisakkaritlerin saptanmasında kullanılan çok kuvvetli bir indikatördür (Zogaj ve diğerleri, 2001; Monteiro ve diğerleri, 2021). Kalkoflorun bağlara bağlanması sonucu ultraviyole radyasyonla uyarıldıklarında floresan ışımaya yaptıkları gözlenmektedir (McLennan ve diğerleri, 2008; Monteiro ve diğerleri, 2021; Prete ve diğerleri, 2021). 96 LAB'nin kalkoflor beyazı içeren MRS katı besiyerinde biyofilm yapısına kalkoflor bağlama yeteneğinin incelendiği bu tez çalışmasında, 60 bakterinin biyofilm yapısındaki selüloz veya türevi bir karbonhidratın kullanımına bağlı olarak UV ışığı altında floresan ışımaya yapabildiği, 36 bakterinin ise biyofilm yapısında selüloz veya türevinin bulunmaması dolayısıyla kalkoflorun bağlanamadığı ve UV ışığı altında herhangi bir ışımının söz konusu olmadığı tespit edilmiştir. Solano ve diğerleri (2002), biyofilm oluşumunda kalkoflor beyazını kullandıkları bir çalışmada, *Salmonella enteritidis* izolatının kalkoflor içeren katı besiyerinde ve floresan boyanın β -glukanları bağladığı ve selüloz türevi EPS'leri sentezleyemeyen izolatların biyofilm oluşturmadıklarını rapor etmişlerdir. Lauer Cruz ve de Souza da Motta (2019), EPS üretiminin değerlendirilmesinde kullandıkları kalkoflor beyazı içeren katı besiyerinde, çiğ süttten izole edilen *P. fluorescens* PL5.4 suşunun 365 nm dalga boyunda UV ışığına maruz bırakıldığında floresan ışımaya gösterdiğini, ancak *P. fluorescens* PL7.1 suşunun floresan ışımaya yapamadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar, kalkoflor içeren besiyerinde geliştirilen bakterilerin mavi-yeşil bir floresan ışımaya sergilemesini EPS üretiminin bir

göstergesi olarak bildirmişlerdir. Şimdiye kadar yaptığımız literatür taramaları sonucunda LAB'lerinin kalkoflor beyazı içeren katı besiyeri kullanılarak EPS üretiminin nitel olarak incelendiği ve önemli bir biyofilm matriks bileşeni olan selüloz ve türevlerinin LAB biyofilmlerinde varlığını ortaya koyan çalışmaların kısıtlı olduğu görülmektedir. Bu çalışma ile birlikte LAB'nin, biyofilm matriks bileşeni olan selüloz veya onun türevi karbonhidratları üretilbildiklerine dair kanıtlar ortaya koyulmaktadır.

Analiz edilen iki yöntemde (kongo kırmızısı içeren katı besiyeri ve mikropilaka yöntemleri) biyofilm oluşumunun kalitatif ve kantitatif değerlendirilmesi ile pozitif sonuç veren ve güçlü biyofilm oluşturduğu kabul edilen 7 bakterinin (*L. salivarius* KC27L, *L. acidophilus* BAZ29, *Lactobacillus* sp. GLK3, *Lactobacillus* sp. ZDM121, *Lactobacillus* sp. 713, *Streptococcus* sp. KC13L, *Streptococcus* sp. DZM131) kalkoflor beyazı içeren katı besiyerinde *L. salivarius* KC27L, *L. acidophilus* BAZ29, *Lactobacillus* sp. 713, *Streptococcus* sp. KC13L ve *Lactobacillus* sp. GLK3 suşlarının (%71,4) EPS üretimleri sonucu UV ışıkta ışıma yapabildiği ve biyofilm yapısında selüloz bulunduğu; *Lactobacillus* sp. ZDM121 ve *Streptococcus* sp. DZM131 suşlarının (%28,6) biyofilm yapısında selüloz bulunmadığı ve katı besiyeri yüzeyinde EPS üretmedikleri için herhangi bir ışıma gözlemlenmemiştir.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen yüksek moleküler ağırlıklı polimer olan EPS'ler (Zhang, Che ve Wu, 2022), mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasında, biyofilm matriksinin temel yapısını oluşturmada ve su ile iyonların tutulmasında önemli rol oynarlar (Ruijgrok, Wu, Overkleeft ve Codée, 2024). EPS üreten önemli LAB arasında *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Enterococcus* cinslerine ait türler yer almaktadır (Angelin ve Kavitha, 2020). Çalışmamızda, kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde biyofilm oluşturduğu tespit edilen 37 LAB'nin kültür ortamındaki EPS üretim miktarları fenol-sülfürik asit metodu ile belirlenmiştir. Bakterilerin EPS üretim kapasitesinin 192-984 mg/L arasında değişirken, en yüksek EPS üretim miktarının 984,0±3,0 mg/L ile *L. salivarius* KC27L ve 634,4±4,0 mg/L ile *Lactobacillus* sp. GLK3 bakterilerinde, en düşük EPS üretim miktarının ise 192,1±2,0 mg/L ile *Lactobacillus* sp. U40 ve 241,5±1,0 mg/L ile *Streptococcus* sp. KC14L bakterilerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3). EPS üretimi suşa özgü olduğu ve EPS üretiminin ortam kültür ortamının pH'ı, sıcaklığı, inkübasyon süresi ve kültür ortamının bileşimi gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği bildirilmektedir (Ruas-Madiedo ve De Los Reyes-Gavilán, 2005). Yapılan çalışmalar EPS'lerin üretimi sırasında çeşitli koşulların optimizasyonunun, EPS

veriminde bir artışa yol açabileceğini göstermektedir (Almansoori, Al-Baldawi, Hazaimah, 2020; Rabiya ve Sen, 2022). LAB suşları tarafından EPS'lerin üretimi, üretim süreci optimize edilmemiş ortamlarda 10 mg/L ile 400 mg/L arasında değiştiği rapor edilmiştir (Jurášková, Ribeiro ve Silva, 2022). Fuso ve diğerleri (2023), çalıştıkları üç farklı *Lactobacillus* türü (*L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*) için karbon kaynağı olarak beş farklı mono ve disakkarit kullanılarak EPS üretme yeteneklerini inceledikleri çalışmada test edilen mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarında (laktoz, fruktoz, glikoz, maltoz ve süktroz) üretmiş oldukları EPS miktarlarının 0,71 g/L ile 2,38 g/L arasında değişmekte olduğunu ve EPS üretiminin hem suşlar hem de karbon kaynakları arasında önemli ölçüde farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, EPS üretimini maksimuma çıkarmak için karbon kaynağı seçiminin ve suşa özgü tutumların dikkate alınmasının önemini vurgulamışlardır (Fuso ve diğerleri, 2023). Farklı fermente gıda ürünlerinden (peynir, lor, fermente pirinç suyu, yoğurt ve ayran) izole edilen LAB'nin, standart protokol izlenerek kantitatif olarak EPS üretiminin tespit edildiği bir çalışmada, en yüksek EPS üretimi 690 mg/L ile *Lactobacillus delbrueckii* GRIPUMSK suşunda, ardından 620 mg/L ile *Lactococcus hircilactis* CH4 ve 570 mg/L ile *Lactobacillus johnsonii* PUMSKGRI'de kaydedilmiştir. Bununla birlikte, en düşük üretim 480 mg/L EPS ile *Lactobacillus leichmannii* PUMSKGRI'de bulunmuştur (Srinivash, Krishnamoorthi, Mahalingam, Malaikozhundan ve Keerthivasan, 2023). LAB'nin EPS üretme yeteneğinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, optimize koşullar kullanılarak MRS besi ortamında %5 oranında inokulum ve 24 saat fermente edilen bakterilerin farklı kapasitelerde EPS sentezleyebildikleri (*L. plantarum* 1513,1 mg/L, *Lacticaseibacillus casei* 1064,6 mg/L) ve *L. plantarum*'un şu ana kadar rapor edilen bakteriler arasında en yüksek EPS üreten suş olduğunu rapor etmişlerdir (Tao ve diğerleri, 2022). Yapılan literatür taraması sonuçlarına göre, çalışmamızda kullandığımız bakterilere ait EPS üretim miktarlarının diğer çalışmalar ile farklılık göstermesinin nedeninin farklı izolasyon kaynağından elde edilmiş olmasından, izolat bazında oluşan farklılıklardan, farklı karbon kaynaklarından, inkübasyon süresinden ve inokülasyon yüzdesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Kalkoflor beyazı içeren katı besiyeri, kongo kırmızı içeren katı besiyeri ve mikropilaka okumaları arasında ortalama EPS üretim miktarları bakımından değerlendirmek için tek yönlü ANOVA testi ardından Tukey testi uygulanmıştır. Bu istatistik ile kalkoflor beyazı ve kongo kırmızı içeren katı besiyerlerinin kullanıldığı yöntemlerde pozitif sonuç veren ve mikropilaka yöntemine göre OD değeri yüksek bakteriler arasında istatistiksel olarak anlamlı

farklar olduğu (F değeri 12,45) ve kalkoflor beyazı ve kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde pozitif olarak değerlendirilen bakterilerin daha fazla EPS ürettiği ve bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Ek olarak, mikropilaka yönteminde OD değeri yüksek olan bakterilerin daha fazla EPS ürettiği ve bu farkın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($r=0,654$; $p=0,00$; $p<0,05$) görülmüştür.

Yapılan tez çalışmasının bundan sonraki ileri düzey biyofilm incelemelerinde kullanılmak üzere, 96 LAB'sinden kongo kırmızısı içeren katı besiyerinde siyah koloni oluşturarak pozitif sonuç veren, kristal viyole boyama yönteminde elde edilen verilere göre güçlü biyofilm oluşturan, kalkoflor beyazı içeren katı besiyerinde biyofilm yapısındaki selüloz ve türevlerinin varlığı nedeniyle UV ışık altında floresan ışıma yapan ve buna ek olarak biyofilm oluşturan bakteriler arasında EPS üretim yeteneği en yüksek suş olarak tespit edilen *L. salivarius* KC27L seçilmiştir. Bu aşamadan sonra bütün çalışmalarda KC27L kullanılmıştır.

Bakteriyel büyüme eğrisi, belirli bir zaman aralığında bir bakteri popülasyonunun sayısındaki değişimleri gösteren grafiksel bir temsildir. Bu eğri, bakterilerin çoğalma ve hayatta kalma yeteneklerini anlamak için önemli bir araçtır (Yang, Ke ve Li, 2021). Bu amaç doğrultusunda, ileri analizler için seçilen KC27L'nin büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Tipik bir mikrobiyal popülasyondaki zamana bağlı artışın şematik olarak gösterildiği egride; uyum aşaması (lag fazı), üstel büyüme aşaması (logaritmik faz), durağan aşama (durgunluk fazı) ve ölüm aşaması (ölüm fazı) olmak üzere 4 aşama vardır (Peleg ve Corradini, 2011). Lag fazında hücreler yeni bir ortama uyum sağlamak amacıyla hücre içi değişikliklere uğrar ve hücre çoğalması çok az gerçekleşir veya hiç gerçekleşmez. Logaritmik faz sırasında hücreler, hücre sayısı ile orantılı bir oranda çoğalır ve bu da hücre sayısında üstel bir artışa yol açar. Besinler sınırlı olduğunda veya diğer çevresel koşullar hücre sayısını kısıtladığında, durağan faz başlar. Son olarak, çevre popülasyonu sürdüremediği zaman hücre ölüm ve azalan bir popülasyon meydana gelir (Yates ve Smotzer, 2007).

Çalışma bulgularımıza göre, 0-72 saat aralığında 37°C'de MRS sıvı besiyerinde gelişimi spektrofotometrik olarak ölçülerek gözlemlenmiş *L. salivarius* KC27L'de, lag fazının 0-6. saat, logaritmik fazının 6-34. saat ve durgunluk fazının 34-48. saatler arasında belirlenmiştir (Şekil 4.4). Literatürde LAB'nin büyüme eğrilerinin oluşturulduğu bir çalışmada, 2-26 saat zaman aralıklarında ölçülen optik yoğunluk değerlerine göre, LAB'nin uyum süresi (lag

fazı) 0-2. saat, logaritmik büyüme süresi 2-8. saat ve 8-26. saatte ise stabil dönem olarak belirlenmiştir (Yang ve diğerleri, 2021). Ren, Ji, Teng ve Zhang (2017) tarafından endüstriyel probiyotik olan *L. casei*'nin büyüme eğrisinin çıkarılması amacıyla 0-30 saatlik zaman aralığında, 2 saat aralıklarla 600 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlenmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre, 1-4. saat lag fazı, 8-14. saat log fazı ve 18-30. saat durgunluk faz olarak belirlenmiştir. Ayrıca, log fazındaki bakteri hücrelerinin, durağan fazdaki bakteri hücreleriyle örtüşmekte olduğu, log ve durağan fazlar arasındaki hücre büyümesinin son aşamaları için zayıf grup ayrımı, farklı büyüme aşamalarında giderek daha heterojen bir hücre popülasyonunun bulunduğunu, bazı hücrelerin hala aktif olarak metabolik değişiklikler geçirdiği sonucuna varmışlardır (Ren ve diğerleri, 2017). LAB'nde büyüme eğrisinin oluşturulması ile ilgili başka bir çalışmada turşudan izole edilen *L. pentosus* DZ35'in MRS besiyerinde ve 30°C'de 78 saatlik fermantasyon süreci boyunca ilk 12 saatte lag fazı, 12 saatten 36 saate kadar log fazı ve 36 saatten sonra durağan faz ile tipik bir büyüme eğrisi sergilediği belirtilmiştir (Yi, Qi, Hong, Deng ve Zeng, 2020). Yapılan analizlerdeki inkübasyon şartlarındaki değişiklikler ve farklı suşlardan dolayı LAB'nin lag fazı, log fazı, durağan faz ve ölüm fazı sürelerinde değişikliklere sebep olduğu ön görülmüştür. Statik koşullar altında bakterilerin ortama uyumunu lag fazının 0-12 saat arasında sürdüğü, optimizasyon çalışmaları ile bu sürenin kısaltılabileceği bildirilmiştir. Logaritmik evreye geçiş süresi bakterinin gelişimi için kullanılan besiyerine ve inkübasyon şartlarına göre değişiklik gösterebilmektedir (Aydın ve Aksoy, 2015).

LAB'de rutin olarak çalışılan EPS üretimlerinin, biyofilm oluşumu ve bakteri gelişimi ile bağlantısının kurulması ve veri analizlerinin yorumlanarak literatüre kazandırılması amaçlandığı için tez çalışmasında, *L. salivarius* KC27L'nin büyüme eğrisi üzerindeki 4 farklı faz düzeyinde üretmiş olduğu EPS miktarları fenol-sülfürik asit metoduna göre tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, KC27L'nin EPS üretiminin zamanla artmakta olduğu belirlenmiştir. 6. saatte (lag fazı sonu/logaritmik faz başlangıcı) EPS üretimi ($486,7 \pm 2,0$ mg/L) en düşük seviyede gözlemlenmesi ile beraber 12. saatte (logaritmik faz) EPS üretimi ($1033,8 \pm 1,0$ mg/L) en yüksek seviyeye ulaşmaktadır (Şekil 4.5). Büyüme eğrisinden (Şekil 4.4) elde edilen sonuçlarına göre KC27L bakterisinin, lag fazından sonra logaritmik faza girdiklerinde daha fazla EPS üretmeye başladıkları doğrulanmıştır. EPS üretiminin zamanla artmasının birkaç olası nedeni; (i) büyüme eğrisinin logaritmik fazında bakterilerin daha fazla besin alması ve daha fazla EPS üretmek için bu besinleri kullanmaları, (ii) EPS'lerin bakterileri çevresel streslerden koruması ve (iii) bakteriler büyüdükçe ve çoğaldıkça çevresel

strese karşı daha fazla korumaya ihtiyaç duymaları olabilir (Padmanabhan ve diğerleri, 2018; Nguyen ve diğerleri, 2020; Tiwari, Sasmal, Kataria ve Devi, 2020). Bakteriler durağan faza girdiğinde, besin eksikliği yaşadıklarından daha az EPS üretmeye başlarlar. EPS, bakterileri çevresel streslerden korur ve durgunluk fazda bakteriler logaritmik faza göre daha az çevresel strese maruz kaldıklarından daha az EPS üretebilirler (Galli, Venturi, Coda, Maina ve Granchi, 2020; Chen ve diğerleri, 2021; Khalid, Asgher, Hussain ve Iqbal, 2022). Bu sebeplerin, KC27L'nin EPS üretiminin durgunluk fazının başlangıcı olan 34. saatten sonra azalmasının nedeni olduğu ön görülmüştür.

LAB'lerinin logaritmik fazın başında, log fazı sırasında veya sonunda ve/veya durgunluk faz sırasında EPS üretebildikleri bulunmuştur. Ayrıca, aynı türün farklı suşlarının, farklı büyüme evrelerinde EPS ürettiği de bildirilmiştir (Lin ve Chien, 2007; Laws ve diğerleri, 2009). Abid ve diğerleri (2018), probiyotik LAB'leri biyokütle büyümesinin kinetiği ve EPS üretimi çalışmalarında lag fazını 4 saat olarak gözlemlemişlerdir. Suşların biyokütlesi yaklaşık 34 saatte maksimuma ulaşırken, *P. pentasaceus* DPS'nin maksimum büyümesine ulaşması yalnızca 29 saat sürmüştür. Durgunluk fazın sonunda, canlı sayımlar 53 saatlik inkübasyonun ardından önemli ölçüde azalmıştır. LAB için EPS üretimi genellikle büyüme ile ilişkilendirilmiştir (Nachtigall ve diğerleri, 2020). Hücre büyümesi ve EPS salgılanması arasındaki korelasyonlar birçok çalışmada rapor edilmiştir (Gerbersdorf ve Wieprecht, 2015; Jayathilake ve diğerleri, 2017). Literatürde bildirilen sonuçlara göre, EPS üretimi, hücre büyümesine paralel olarak, logaritmik faz ile birlikte arttığı ve durağan faz sırasında azaldığı belirtilmiştir. EPS konsantrasyonun, logaritmik faz sırasında büyüme süresi ile azaldığı, ancak durağan faz sırasında sabit kaldığı ifade edilmiştir (More, Yadav, Yan, Tyagi ve Surampalli, 2014).

Tez çalışması ve literatür verileri doğrultusunda bakteri büyüme eğrisi boyunca EPS üretiminin incelendiği çalışmalar ile benzer sonuçlar göstermektedir. Bakteri popülasyonu logaritmik (üstel) büyüme aşamasındayken EPS üretiminin en yüksek seviyede olması, bu aşamada bakterilerin aktif olarak çoğalmasından (Wang, Fan, Chen, Terentjev, 2015) ve yeni hücre duvarlarının oluşumu için polisakkaritlere ihtiyaç duyulmasından (Flemming, 2016) kaynaklanabilir. Büyüme eğrisi durgunluk fazına geçtiğinde ise besinlerin tükenmeye başlaması ile birlikte EPS üretiminin azaldığı ve ölüm aşaması ile birlikte EPS üretiminin sonlandığı ifade edilmektedir (Mishra ve Jha, 2013; Ergene ve Avcı, 2016).

Biyofilm oluşumu erken, ara ve olgun aşamalardan oluşmaktadır (Mohammed ve diğerleri, 2018; Zou ve Liu, 2020). Erken aşama biyofilm, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz tutunma aşamalarını içerir (Karygianni ve diğerleri, 2020). Tutunma aşamasında planktonik hücreler flagella ve pili gibi yüzey uzantıları aracılığıyla yüzeye yaklaşır ve bağlanır. Ancak, bakterilerin hareketliliği, bakteri-yüzey etkileşimini kolayca aşarak planktonik duruma geri dönebilir. Geri dönüşü olmayan tutunma aşamasında, başlangıçta bağlanan bakteriler, yüzeye kovalent olarak bağlanmak için EPS salgılar ve yavaş yavaş geri dönüşümsüz tutunma gerçekleşir. Ayrıca, erken biyofilm aşamasında, *P. aeruginosa* gibi bazı bakteriler tip IV pilinin aracılığı ile yüzeye ilişkili hücrelere yapışmak için EPS'leri kullanabilir (Rabin ve diğerleri, 2015; Wang ve diğerleri, 2021). Ara biyofilm aşamasında ise mikrokoloni ve kolonilerin oluşumu yer alır. Bakterilerin birikmesiyle salgılanan EPS'ler artar ve bakteri yüzeyinde bir film tabakası oluşması ile mikrokoloniler oluşur. Daha sonra, mikrokoloniler daha büyük kolonilere dönüşerek makrokoloniler oluşur. Son aşama ise biyofilmlerin olgunlaşması ve ayrılmasıdır. Olgun biyofilmler, kompakt yapıya ve koordineli işlevlere sahip üç boyutlu bir ağ yapısı olarak görünür. Olgunlaşmanın ardından biyofilmler dağılır ve bakteriler yeni bir biyofilm yaşam döngüsünü başlatmak için planktonik formlara dönüşür (Fu ve diğerleri, 2021). Bu bilgiler doğrultusunda tez çalışmasında, büyüme eğrilerindeki lag fazının sonu/log fazı başlangıcı, log fazı, log fazı sonu/durgunluk fazı başlangıcı, durgunluk fazı sonu/ölüm fazı başlangıcı aşamalarına denk gelen saatleri de içinde kapsayacak şekilde 48 saat boyunca KC27'nin biyofilm oluşum miktarları tespit edilmiştir. Belirlenen saatlerde (erken, ara ve olgun faz) biyofilm hücreleri, OD_{570nm}'de ölçülerek, KC27L'nin bu saatlerde ürettikleri biyofilm miktarına göre biyofilmin erken, ara ve olgun faz düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmanın amacı, KC27L'nin biyofilm yaşam döngüsünün farklı evreleri arasındaki ilişkileri ve fizyolojik özelliklerinin (yapısal ve metabolik değişiklikler) ortaya çıkarılmasıdır. *L. salivarius* KC27L'nin saatlere göre biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi ve biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi için kullanılan cut-off optik yoğunluk (OD_C) değerlerinin hesaplanması sonucu KC27L'nin biyofilm oluşumu erken, ara ve olgun biyofilm olmak üzere üç aşamadan oluştuğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, KC27L'nin erken biyofilm evresi 6. saat (OD 0,66±0,01) olarak değerlendirilmiştir. Bu evrede, KC27L'nin biyofilm oluşumu ve EPS üretiminin (486,7±2,0 mg/L) en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bakterinin bu aşamada yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlanmış olduğu ve bu evrede yüzeye tek tek veya küçük gruplar halinde dağılmış olduğu (Fu ve diğerleri, 2021) düşünülmüştür. Bakterinin, geri dönüşümsüz olarak yüzeye bağlanması ile mikrokoloniler oluşturmaya başladığı ve

yüzeye daha sıkı bir şekilde bağlandığı faz olan ara biyofilm evresi olarak 12. saat ($OD\ 0,88\pm0,01$) kabul edilmiştir. Bu evrede, KC27L'nin biyofilm oluşumunun ve EPS üretiminin ($1033,8\pm1,0\ mg/L$) artmakta olduğu belirlenmiştir. Daha sonra, bakterinin 28. saatte biyofilm oluşumunun en yüksek seviyeye ulaştığı ($OD\ 5,47\pm0,03$) (bu sebeple 28. saat KC27L'nin olgun biyofilm evresi olarak değerlendirilmiştir) ve EPS üretiminin ($804,4\pm3\ mg/L$) azaldığı belirlenmiştir. Bu evrede, mikrokolonilerin büyümesi ve birleşmesi sonucu birbirleriyle bağlantılı bir ağ oluşturarak olgun bir biyofilm oluştuğu görülmektedir (Fu ve diğerleri, 2021; Sauer ve diğerleri, 2022). 28. saat sonrasında KC27L'nin biyofilm oluşturma yeteneğinin azalmaya başlaması ile birlikte biyofilm oluşum sürecinin dağılma aşamasına girdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bilgiler ışığında bu saatten sonra, biyofilmdeki bakterilerin dağıldığı ve yeni bir yüzeye kolonileşmek için serbest kaldığı (Sauer ve diğerleri, 2022) belirlenmiştir (Şekil 4.7).

Tipik olarak, inkübasyon süresinin LAB'nin biyofilm oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, *L. casei* Y1 ve *L. plantarum* KF'nin biyofilm oluşumunun 48. saatte maksimum değere ulaştığı tespit edilmiştir. Her iki izolat içinde en düşük biyofilm oluşumu 12. saat olarak belirlenmiştir. Yazarlar, tüm LAB izolatlarında biyofilm oluşumunun 12. ve 24. saatlerde en düşük, 48. saatte ise en yüksek olduğunu belirtmişler ve bu saatler arasında artan bir eğilim gözlemlemişlerdir (Kumar ve diğerleri, 2017). Yapılan incelemeler neticesinde, LAB'nin biyofilm yaşam döngüsü evrelerinin zamana, ortam koşullarına ve türüne bağlı olarak değişebileceği, ayrıca her evrenin süresine, kullanılan ölçüm yöntemlerine ve deneysel koşullarına göre değişebileceği ön görülmektedir (Martinez ve diğerleri, 2020).

Tez çalışması kapsamında, KC27L'nin biyofilm ve EPS üretimi, büyüme eğrisi arasındaki ilişkinin ortak olarak değerlendirilmesi sonucunda (Şekil 4.7), erken biyofilm olarak tespit edilen 6. saatte biyofilm oluşumu ($OD\ 0,66\pm0,01$) ve EPS üretiminin ($486,7\pm2,0\ mg/L$) en düşük seviyede olduğu gözlemlenmiş ve 6. saatte bakterinin büyüme eğrisinin ($OD\ 1,62\pm0,01$) ortam şartlarına adaptasyon aşaması olan lag fazında olduğu tespit edilmiştir. Büyüme eğrisinin 12. saatinde bakteri popülasyonun hızla artması ($OD\ 3,12\pm0,02$) bakterinin logaritmik faza girmesi şeklinde yorumlanmıştır. 12. saat bakterinin EPS üretiminin ($1033,8\pm1,0\ mg/L$) en yüksek seviyeye ulaşması ve biyofilm oluşumunun ($OD\ 0,88\pm0,01$) artmaya başlaması ile bu saat ara biyofilm faz düzeyi olarak değerlendirilmiştir. 24. saatte biyofilm oluşumu ($OD\ 3,85\pm0,03$) önemli ölçüde artmıştır (yaklaşık 4 kat) ve EPS

üretimi azalmaya başlamıştır ($984,0 \pm 3,0$ mg/L). Büyüme eğrisinin log fazında aşamasında yer alan 28. saatte bakterinin biyofilm oluşumunun ($OD\ 5,47 \pm 0,03$) en yüksek seviyeye ulaşmasından dolayı bu saat olgun biyofilm evresi olarak belirlenmiştir. 28. saatte EPS üretiminin ($804,4 \pm 3$ mg/L) ise hala yüksek seviyede olduğu ancak EPS üretiminin 12-24 saat aralığındaki kadar yüksek olmadığı belirlenmiştir. Bu da bize 28. saatte bakterilerin hala aktif olarak biyofilm oluşturduğunu ve EPS ürettiğini göstermiştir. Biyofilm oluşumu ve EPS üretimi arasındaki ilişki Pearson korelasyonuna göre belirlenmiştir. Çoklu r değeri 0,815 olduğu için biyofilm oluşumu ve EPS üretimi arasındaki ilişkinin güçlü ve pozitif yönde anlamlı olduğu tespit edilmiş ($p=0,000$; $p<0,05$) ve bakterinin biyofilm oluşum yeteneklerinin EPS üretiminde etkisi olduğu ön görülmüştür.

Biyofilm ve planktonik fenotip birbiriyle bütünleşmiş bir yaşam biçimidir. Biyofilm yaşam formu, planktonik (serbest halde yaşayan) yaşam formundan farklı özellikler sunmaktadır (Stoodley, Stoodley, Sauer, Davies ve Costerton, 2002). Biyofilm hücrelerini çevreleyen ekstraselüler matriks nedeniyle, biyofilm hücreleri, planktonik hücrelerden farklı fenotip, genotipik ve metabolik özellik gösterir (Costerton, 1995; Rossi ve diğerleri, 2022). İki yaşam formu aynı proteom veya transkriptomları içermediğinden dolayı fenotipik farklılıklar oluşturur. Ayrıca, biyofilm oluşturan mikroorganizmalar yüzey üzerinde uygun bir niş bulduklarında pH, sıcaklık, tuz gibi çevresel şartların oluşturduğu stres ortamlarına planktonik hücrelere oranla daha fazla direnç gösterirler (Stewart, 2002; Hall ve Mah, 2017). *In vitro* deneylerin çoğunluğu planktonik hücreler, katı besiyeri üzerindeki koloniler ve/veya sürekli akış sistemlerinde oluşan biyofilm hücreleri ile gerçekleştirilir. Birçok çalışmada, planktonik ve biyofilm hücreleri arasındaki ilişki araştırılmış ve iki yaşam formu arasında büyük farklılıkların olduğu rapor edilmiştir (Mikkelsen, Duck, Lilley ve Welch, 2007; Bystrianský ve diğerleri, 2019; Rumbaugh ve Sauer, 2020; Römling, 2023). Bu amaçla tez çalışmasında planktonik ve biyofilm yaşam formları arasındaki farklılıklar ortaya koyulmuştur. LAB biyofilmlerinin, patojen-biyofilmleri ile rekabetin nasıl arttırılacağı belirlenmesi için oluşturdıkları biyofilm matriks bileşenlerinden EPS'in kullanılması ve 28 saatlik olgun biyofilmlerin DNaz I enzimi ile muamelesi sonucu eDNA'nın varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, matriks yapısı bileşenlerinin ve biyofilm yaşam döngüsü basamaklarının çeşitliliği nedeniyle her basamakta hangi bileşenlerin veya mekanizmaların ortaya çıktığının belirlenmesi gerekmektedir. Yapılan tez çalışmasında, literatür çalışmalarına farklı bir bakış açısı sunmak amacıyla planktonik ve biyofilm yaşam formları arasındaki monomer kompozisyonu ve EPS'lerin moleküler ağırlıkları

karşılaştırılmıştır. Ayrıca, bildiğimiz kadarıyla, şimdiye kadar yapılan çalışmalarda LAB'nin hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinin farklı büyüme kinetiğinde ürettikleri EPS'lerinin miktarının, monomer yapılarındaki ve moleküler ağırlıklarındaki farklılıkların tamamıyla ele alındığı bir çalışma olmaması tez çalışmasının özgün yanlarından birini oluşturmaktadır.

Literatür çalışmalarında, LAB'nin çözünür EPS (sol-EPS, soluble-EPS)'leri sıklıkla çalışılmıştır. Çalışmamızın özgün değerini arttırmak amacıyla, pellet kısmındaki planktonik hücrelerin ve biyofilm hücrelerin gevşek bağlı EPS'leri (LB-EPS, loosely bound-EPS) (Brian-Jaisson ve diğerleri, 2016) arasındaki farklar ortaya koyulmuştur. Tek hücreler veya küçük hücre grupları bireysel kolonilere yol açar ve katı besiyeri yüzeyine yayılır (Costerton, 2007). Biyofilm hücrelerinin izolasyonu (koloni biyofilm ekstraktı) için katı besiyeri ortamı, biyofilm matrisinin gelişmesi için gerekli besinleri ve mekanik desteği sağladığı için katı besiyeri yüzeyinde gelişen LAB biyofilm kültürlerinin hücresiz (cell-free) süpernatantları çalışılmıştır. Bu amaçla, planktonik hücre izolasyonu için sıvı besiyeri kullanımı kolay, hızlı ve verimli bir yöntem olduğu için sıvı besiyerinde geliştirilen kültürün pellet kısmı, biyofilm hücrelerinin izolasyonu için katı besiyeri yüzeyi üzerinden toplanan bakteri kolonilerinin filtre edilen süpernatantı kullanılmıştır. Tez çalışmasında, KC27L'nin erken (6. saat), ara (12. saat) ve olgun (28. saat) faza denk gelen büyüme saatlerinde ve yapılan tüm çalışmalarda kullanılmış olan 24 saatlik inkübasyon süresi içinde hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Planktonik ve biyofilm yaşam formlarının EPS'lerinin izolasyonu ve kısmi olarak saflaştırılması gerçekleştirilerek, bunların içermiş oldukları karbonhidrat miktarı fenol-sülfürik asit yöntemi ile, protein miktarı ise Bradford yöntemine göre tespit edilmiştir. Ayrıca, 24 saatlik inkübasyondan elde edilen EPS'lerin HPLC ile monomer profilleri ve SEC analizi ile moleküler ağırlıkları belirlenmiştir.

Planktonik ve biyofilm formları arasında biyofilm matriksi bileşenlerinden olan EPS'lerin farklı büyüme evrelerinde (6., 12., 24. ve 28. saat) protein miktarlarının hesaplanması sonucu, KC27L'nin her iki formda farklı protein miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm yaşam formunda en düşük protein miktarına sahip evrenin $20,65 \pm 0,10$ $\mu\text{g/mL}$ ile 6. saat ve en yüksek protein miktarının ise 24. saatte ($22,09 \pm 0,20$ $\mu\text{g/mL}$) sahip olduğu belirlenmiştir. Planktonik hücrelerde ise en düşük protein miktarı, biyofilm formunda olduğu gibi 6. saatte ($21,78 \pm 0,10$ $\mu\text{g/mL}$), en yüksek miktarın ise 24. saatte ($22,55 \pm 0,30$ $\mu\text{g/mL}$)

olduğu görülmüştür. KC27L'nin 6. saatte EPS üretiminin en düşük seviyede ($486,7 \pm 2,0$ mg/L) olduğu ve biyofilm oluşum evrelerinden, erken biyofilm evresinde ($OD\ 0,66 \pm 0,01$) olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bakterinin ortam şartlarına adaptasyon aşaması olan lag fazında (6. saat) EPS üretimi ve biyofilm oluşumunun en düşük seviyede olduğu bununla beraber biyofilm matriksi bileşenlerinden olan EPS'lerin her iki yaşam formunda da (planktonik ve biyofilm) protein miktarlarının en düşük seviyede olduğu gözlemlenmiştir. Bakterinin olgun biyofilme geçiş evresi olan 24. saat itibari ile EPS üretimi ($984,0 \pm 3,0$ mg/L), biyofilm oluşumu ($OD\ 3,85 \pm 0,03$) ve planktonik ve biyofilm yaşam formlarında yer alan protein miktarının da arttığı belirlenmiştir. Yapılan tez çalışması ile, bakterinin farklı büyüme evrelerinde belirlenen farklılıkların literatüre kazandırılması sağlanarak biyofilm oluşum sürecine yeni bakış açısı getirmek amaçlanmıştır.

Resch, Rosenstein, Nerz ve Götz (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, *S. aureus*'un planktonik hücrelerinin biyofilm hücrelerine kıyasla daha fazla protein ürettiğini belirterek planktonik hücrelerin, biyofilm hücrelerine kıyasla daha hızlı büyüdüğü ve planktonik hücrelerin protein sentezi için daha fazla enerjiye sahip olmasına ve dolayısıyla daha fazla protein üretmesine neden olabileceğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda yapılan istatistiksel analizler sonucu planktonik ve biyofilm formları için protein miktarları arasında istatistiksel olarak pozitif ve anlamlı bir fark olduğu ($r=0,24$; $p<0,05$), zaman arttıkça protein miktarının da arttığı ve ortalama protein miktarının planktonik hücrelerde biyofilm hücrelerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Farklı çevresel koşullar, protein sentezini düzenleyen genlerin ekspresyonunu etkileyebilir, bu nedenle planktonik ve biyofilm hücreleri farklı çevresel koşullara maruz kalabilir ve bu da protein miktarlarındaki farklılıklara yol açabilir (Song, Lou, Liu, Xiang ve Shang, 2021).

Fenol-sülfürik asit metoduna göre karbonhidrat miktarlarının belirlendiği çalışmamızda planktonik ve biyofilm hücrelerinin her ikisinin de en düşük karbonhidrat miktarına 6. saatte (sırasıyla, $116,1 \pm 1,0$ mg/L; $73,8 \pm 1,0$ mg/L), en yüksek karbonhidrat miktarına ise 24. saatte (sırasıyla, $289,7 \pm 3,0$ mg/L; $109,1 \pm 2,0$ mg/L) sahip olduğu belirlenmiştir. Lag fazında, planktonik ve biyofilm hücreleri aktif olarak büyüdüğünden, hücreler enerji kaynağı olarak karbonhidratları tüketirler (Kubota ve diğerleri, 2008). Bu nedenle, 6. saatte en düşük karbonhidrat miktarı gözlemlendiği düşünülmüştür. 24. saate gelindiğinde, hücreler büyüme ve metabolizma için gerekli olan besin maddelerini depolamaya başlar (Tiwari ve diğerleri, 2020). Karbonhidratlar, hücreler için önemli bir enerji kaynağı olduğundan çalışmamızda

24. saatte en yüksek karbonhidrat miktarı gözlemlendiği düşünülmektedir. Verilerin Spearman's Korelasyon'una göre incelenmesi sonucu biyofilm ve planktonik hücrelerde karbonhidrat miktarı arasında güçlü ($r=0,75$) pozitif yönde anlamlı bir korelasyon ($p<0,05$) olduğu bulunmuştur. Ek olarak biyofilm yaşam formunda, karbonhidrat miktarı ile EPS ve biyofilm miktarı arasında güçlü bir pozitif korelasyon olduğunu belirlenmiştir. Spearman's korelasyon katsayısı 2,287 olarak belirlenerek biyofilm hücrelerinde karbonhidrat miktarı arttıkça EPS ve biyofilm oluşum miktarlarının da arttığı belirlenmiştir.

HPLC yöntemi LAB'nden elde edilen EPS'lerin kimyasal bileşiminin niteliksel ve niceliksel olarak araştırılması için en çok kullanılan tekniklerden biridir. Bu tekniğin yaygın olarak kullanılması HPLC'nin yüksek gücü, saflığı ve performans özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Moradi, Molaei ve Guimarães, 2021). LAB türlerinin farklı şeker bileşimi, yük, zincir uzunluğu ve dallanma derecesine sahip EPS sentezlediği bilinmektedir (Sánchez, Martínez, Guillén, Jiménez-Díaz ve Rodríguez 2006). Pachekrepapol, Lucey, Gong, Naran ve Azad (2017) tarafından yapılan çalışmada, *S. thermophilus* suşları tarafından üretilen EPS'lerin monosakkarit bileşimlerinin temel olarak glikoz ve galaktozdan oluştuğu, düşük seviyelerde ise ramnoz ve N-asetil galaktozamin içerdiği rapor edilmiştir. Aslim, Beyatli ve Yuksekdağ (2006), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* bakterileri tarafından üretilen EPS içeriğinde mannoz monomerinin baskın olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan, Korcz ve Varga (2021), *L. bulgaricus*'un, galaktoz, glikoz ve ramnoz, *S. thermophilus*'un ise çoğunlukla glikoz ve galaktoz, az miktarda ise ramnoz ve N-asetil galaktozamin monomeri içeren EPS sentezlediğini belirtmiştir. Kuschmierz ve diğerleri (2021), *Sulfolobus acidocaldarius* biyofilminden alınan hidrolize EPS örneklerinde; mannoz, riboz, glikozamin, ramnoz, N-asetil glikozamin, glikoz ve galaktozaminin tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, biyofilm EPS'sindeki başlıca monosakkarit bileşenlerinin mannoz (%35), glikoz (%29) ve riboz (%26) olduğunu rapor etmişlerdir. Bu monosakkarit çeşitleri molar oranlar açısından monosakkarit bileşiminin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır. Minör bileşenler ise glikozamin (%5), ramnoz (%3), galaktozamin (%1) ve N-asetil glikozamin (%1) olduğu ifade edilmiştir (Kuschmierz ve diğerleri, 2021). Saflaştırılmış biyofilm EPS'lerinin monomerik bileşiminin HPLC ile belirlendiği başka bir çalışmada, *E. faecalis* suşlarının tanımlanan ana karbonhidratları stakiyoz, mannoz ve maltoz olmuştur. Oligosakkarit stakiyoz tüm EPS örneklerinde yüksek konsantrasyonlar göstermiştir. Biyofilm EPS'lerinin şeker bileşiminde farklılıklar olabilmektedir (Ramirez-Mora, Retana-Lobo ve Valle-Bourrouet, 2018).

KC27L'nin her iki yaşam formu (planktonik ve biyofilm) arasında monomer kompozisyonu ve moleküler ağırlık farklılıklarının olup olmadığı incelenmiştir. KC27L'nin planktonik ve biyofilm EPS'lerinin HPLC analizi ile monosakkarit kompozisyonunda glikoz, arabinoz, mannoz ve sükroz şekerlerinin varlığı analiz edilmiş ancak hem planktonik hem de biyofilm EPS'lerinde bu şekerlerin varlığı tespit edilememiştir. Ekip üyelerimizden Çelik (2018)'in tez çalışmasında yer alan KC27L suşunun kültür besiyerinden elde edilen EPS'nin liyofilize edilerek monosakkarit bileşenlerinin analiz edildiği çalışmada, liyofilize EPS'nin %52,99 glikoz, %13,81 mannoz, %18,51 sükroz ve %14,67 arabinoz monomerleri içerdiği rapor edilmiştir. Bu sayede bakterinin kültür ortamından elde edilen EPS'nin monosakkarit bileşimi ile biyofilm matriksinden elde edilen monosakkarit bileşimi arasında bir benzerlik olmadığı ortaya koyulmuştur. Biyofilm metabolizması ve büyüme substratları, EPS'nin kimyasal bileşimini belirgin şekilde etkiler, dolayısıyla EPS'lerin işlevlerini de önemli ölçüde etkileyebilir. EPS bileşimi bakteri türlerine, biyofilme ve biyofilm oluşturan bakterilerin bulunduğu yere göre değişiklik gösterebilmektedir (Das, 2022). Biyofilm ortamında, bakteriler birbirleriyle ve diğer mikroorganizmalarla karmaşık etkileşimler kurar. Bu etkileşimler, EPS üretimine yönelik gen ekspresyonunu ve monosakkarit bileşimini etkileyebilir (Costa ve diğerleri, 2023). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bakteriyel EPS'nin ve biyofilm matriksinden elde edilen EPS'nin monosakkarit bileşimindeki farkların, kültür ortamı ve biyofilm ortamı arasındaki farklı koşullardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu farklılıklar, besinlerin kullanılabilirliği, çevresel stres, düzenleme mekanizmaları (gen ekspresyonu) ve biyofilimde yer alan bakterilerin biribiri ile etkileşimleri gibi çeşitli faktörlerden oluşabileceği bildirilmiştir (Wang, Li, Yin ve An, 2020). Mevcut literatürde LAB'lerinin planktonik ve biyofilm yaşam formlarının EPS'leri arasındaki monomer kompozisyon farklılıklarının ve buna ek olarak bakterinin kültür ortamında elde edilen EPS'lerinin monosakkarit bileşimleri arasındaki farkın incelendiği kısıtlı sayıda çalışma yer almaktadır. Bu çalışmanın, LAB'leri tarafından üretilen EPS'lerin gen yapısı, şeker grupları ve düzenleyici mekanizmaları, EPS'lerin bileşimsel ve üretimsel çeşitliliğine dair yapılacak ileri düzey çalışmaların ilk basamağı olacağı düşünülmektedir.

Polimerin doğasını ve moleküler özelliklerini anlamak, fonksiyonel özelliklerin belirlenmesine yardımcı olacaktır (Behare, Retana-Lobo, Valle-Bourrouet, 2009). Bu amaçla tez çalışmasında, planktonik ve biyofilm hücrelerinin kısmi saflaştırılmış EPS'lerinin moleküler ağırlıkları SEC analizleri ile yapılmış ve elde edilen sonuçlar ile ekip üyelerimizden Çelik (2018)'in tez çalışmasında kullandığı aynı KC27L suşunun kültür besi

ortamından izole edilerek kısmi olarak saflaştırılan liyofilize EPS'sinin moleküler ağırlıkları ile karşılaştırılmıştır. Ancak tez çalışmasında KC27L'nin hem planktonik hem de biyofilm EPS'lerinin düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu tespit edilirken Çelik (2018) kültür besiyerinden elde ettiği liyofilize EPS'inin moleküler ağırlığını $1,6 \times 10^3$ ile $6,4 \times 10^4$ Da arasında değiştiği belirlenmiştir. Bununla birlikte bakterinin kültür ortamından elde edilen EPS'nin moleküler ağırlığı ile biyofilm matriksinden elde edilen EPS'nin moleküler ağırlığı arasında bir farklılık olduğu tespit edilerek, ileri de yapılacak olan çalışmalar ile farklılığa neden olan mekanizmalar ortaya koyulacaktır.

LAB tarafından çok çeşitli monomer kompozisyonlarına, moleküler ağırlığına ve yapılarına sahip EPS üretilmektedir (Torino, Font de Valdez ve Mozzi, 2015; Sanalibaba ve Çakmak, 2016). Genel olarak EPS'ler, homopolisakkaritler ve heteropolisakkaritler olarak sınıflandırılır. Literatür verilerinde homopolisakkaritlerin moleküler ağırlığı 10^6 Da'dan büyük, heteropolisakkaritler için ise 10^4 ile $6,0 \times 10^6$ Da arasında değişmekte olduğu yer almaktadır (Angelin ve Kavitha, 2020). Abid ve diğerleri (2018) çalışmalarında LAB'nin kültür ortamında ürettikleri EPS'lerin moleküler ağırlıklarının $1,2 \times 10^6$ ile $1,9 \times 10^6$ Da arasında olduklarını bildirmiştir. İki farklı *L. suebicus* suşu (CUPV225 ve CUPV226) tarafından kültür ortamında üretilen EPS'lerin molekül ağırlığının belirlenmesi için SEC kullanılmış ve yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerinin (glikoz) sırasıyla $1,5$ ve $7,8 \times 10^6$ g/mol, düşük moleküler ağırlıklı polimerlerin (riboz) ise sırasıyla $1,90$ ile $2,63 \times 10^4$ g/mol arasında değiştiği rapor edilmiştir (Ibarburu ve diğerleri, 2015). Mevcut literatürde LAB'lerinin biyofilm matriksinde yer alan yaşam formlarının (planktonik ve biyofilm) EPS'lerinin moleküler ağırlığı ile kültür ortamından izole edilen EPS'lerinin moleküler ağırlıklarının karşılaştırılmalı olarak araştırıldığı çalışmanın olmaması bu tez çalışmasının bir diğer özgün yanıdır. Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, planktonik ve biyofilm yaşam formlarının EPS'leri ve bakteriyel EPS'ler arasındaki farkların literatüre kazandırılması ve yapılacak ileri düzey çalışmaların önünün açılması amaçlanmıştır.

Biyofilm oluşturan patojenik bakteriler, tıbbi yüzeylerde ve yaşam alanlarında bulunma kabiliyetleri nedeniyle, antibiyotik direncinin oluşmasından, kronik ve tekrarlayan enfeksiyonlardan sorumludur (Angelin ve Kavitha, 2020). Biyofilmdeki bakteriler, geleneksel antibiyotiklere ve konakçının bağışıklık tepkilerine planktonik bakterilere göre 1000 kat daha dirençli olabilir (Jiang ve diğerleri, 2011; Coughlan, Cotter, Hill ve Alvarez-Ordóñez, 2016). Bu nedenle, aşırı antibiyotik kullanımı biyofilmde dirençli patojenlerin

gelişmesine yol açabilir. LAB'lerinden ekstrakte edilen EPS'ler, biyofilm oluşturan patojenik bakterilerin neden olduğu bulaşıcı hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılabilir. Probiyotik bakterilerin veya bu bakterilerin aktif metabolik bileşiklerinin kullanımı, gıda endüstrisi yüzeylerinde patojenik biyofilm oluşumunu kontrol etmek için umut verici bir yöntemdir (Tatsaporn ve Kornkanok, 2020). Bu etki, bakteriyel hücrelerin ilk oto-agregasyonunun ve hücre bağlanmasının inhibisyonu ya hücre yüzey modifikasyonlarının değiştirilmesi ya da hücreden hücreye etkileşimlerin azaltılması yoluyla gerçekleşmektedir (Kanmani ve diğerleri, 2013; Angelin ve Kavitha, 2020).

LAB-EPS'leri, biyosüpfaktan, laktik asit, asetik asit, formik asit gibi antipatojenik organik asit, hidrojen peroksit, diasetil, bakteriyosin, bakteriyosin benzeri maddeler, reuterin gibi antibakteriyel polipeptitler, enzim, düşük moleküler ağırlıklı ürünler ve belirli hücre yüzeyi moleküllerini üretebilmelerinden dolayı rekabetçi bir ortam yaratarak, patojen bakterilerin oluşturduğu biyofilmin kontrolü/giderimi için çevreye dost potansiyel bir strateji sunabilir. (Khan, Tabassum ve Kim, 2020; Adiningrat ve diğerleri, 2022).

Yapılan tez çalışmasında, LAB'nin biyofilm oluşturma yeteneklerinin detaylı olarak çalışılması için, KC27L'nin planktonik ve biyofilm EPS ürünlerinin *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 bakterisine karşı antibiyofilm özelliklerinin ortaya koyulması amaçlanmaktadır. Bu amaçla, KC27L'nin planktonik ve biyofilm yaşam formlarından elde edilmiş olan EPS'lerin antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, biyofilm yaşam formlarının erken, ara, olgun EPS'leri *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 bakterisinin oluşturduğu biyofilmi, 4 farklı konsantrasyonda [saf olarak (su ile çözülmemiş olarak) ve 1:1, 1:2, 1:3 (v/v) oranlarında distile su içerisinde çözülerek hazırlanmış] %15,6-54,4 oranında; planktonik yaşam formu EPS'lerinin ise %30,6-60,7 arasında değişen oranlarda engellendiği belirlenmiştir (Şekil 4.10, Çizelge 4.3). Planktonik yaşam formu EPS'lerinin daha yüksek antibiyofilm aktiviteye sahip olmasının nedeninin planktonik hücrelerin, biyofilm hücrelerine kıyasla daha fazla EPS üretebilmesi olarak düşünülmektedir (Nerz ve Götz, 2005). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan biyofilm ve planktonik EPS'lerin, biyofilm yapma kapasitesine sahip olan *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300 tarafından oluşturulan biyofilmin % inhibisyonu ile EPS konsantrasyonları arasındaki ilişki regresyon analizi ile belirlenmiş ve konsantrasyon artışının biyofilm inhibisyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir. Değerler arasındaki çoklu *r* değeri 0,885 olarak belirlenerek,

konsantrasyon artışı ile biyofilm inhisyonu arasında güçlü ve pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar Çelik (2018)'in aynı bakteriyi (*L. salivarius* KC27L) kullanarak yapmış olduğu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Çelik (2018), *L. salivarius* KC27L bakterisinin kültür ortamından izole ettiği liyofilize EPS'lerinin 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL konsantrasyonlarında en yüksek antibiyofilm etkiyi *E. coli* ATCC 11229 üzerine yaptığını (sırasıyla %79 ve %87 inhibisyon) tespit etmiştir. Çalışmamız verileri ile karşılaştırıldığında, *L. salivarius* KC27L bakterisinin kültür ortamından elde edilen liyofilize EPS'lerinin, bizim çalışmamızda kullandığımız planktonik ve biyofilm yaşam formlarından izole edilen EPS'den daha yüksek antibiyofilm etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Oluşan bu farklılıkların Çelik (2018)'in çalışmasında kullandığı EPS'leri bakterinin kültür ortamından izole etmesi ve EPS'leri liyofilize ederek antibiyofilm aktivite çalışmalarında kullanmasından kaynaklandığı, aynı zamanda biyofilm oluşumu gerçekleştirdiği bilinen patojen mikroorganizma (*E. coli* ATCC 11229) ile bizim çalışmamızda kullandığımız patojen mikroorganizma (MRSA ATCC 43300) arasındaki farklılıktan kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Mevcut literatürde, probiyotik türlerin hücre yüzeyi polisakkaritleri patojen mikroorganizma çalışmalarına kıyasla çok daha az tanımlanmış ve EPS-antibiyofilm ilişkisi bir bütün olarak daha az ele alınmıştır. Bu nedenle, ilişkinin açığa çıkarılması, suşa ve türe özgü farklılıkları anlamak için büyük önem taşımaktadır. Planktonik kültür süpernatantlarından veya biyofilm hücrelerinden izole edilen polisakkaritler antibiyofilm aktivitesi gösterebilmektedir (Kim ve Kim, 2009; Nithya ve Pandian, 2010; Pompilio ve diğerleri, 2024). Bizim çalışmamıza benzer şekilde, yüksek moleküler ağırlıklı PAM-galakten olarak bilinen galaktofuranoz homopolimeri olan polisakkaritin antibiyofilm aktivitesi, *Kingella kingae* bakterisinin planktonik kültür süpernatantlarında koloni biyofilm ekstraktından çok daha düşük seviyelerde saptanmıştır (Rendueles, Kaplan ve Ghigo, 2013). *L. acidophilus* A4'ün kültür süpernatantlarından izole edilen r-ekzopolisakkarit olarak adlandırılan polisakkarit, *E. coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* ve *B. cereus* tarafından oluşturulan biyofilmi inhibe etmiştir. Ayrıca, çalışmalar bazı bakteriyel EPS'lerin biyofilmi engelleyen işlevleri yerine getirdiğini ortaya koymuştur (Kim ve Kim, 2009). Powell ve diğerleri (2018), düşük molekül ağırlıklı ticari bir aljinat oligomerinin, *P. aeruginosa*'nın biyofilm büyümesini önemli ölçüde bozarak, biyofilm hacmi ve kalınlığında

azalmaya sebep olduğu belirtmişlerdir. *L. plantarum* suşlarına ait EPS'lerin *Shigella flexneri* biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise, EPS'lerin *S. flexneri*'nin EPM'sindeki polisakkarit üretimini azaltabildiğini ve *S. flexneri* tarafından biyofilm oluşumunu inhibe edebildiği gösterilmiştir (Song ve diğerleri, 2020). Başka bir çalışmada, endüstride kullanımı yaygın olan paslanmaz çelik ve polivinil klorür yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturan *L. monocytogenes*'e karşı *L. acidophilus* La14 150B, *L. plantarum* B411 ve *L. rhamnosus* ATCC 53103'un hücre-içermeyen süpernatantlarının antibiyofilm aktivitesi incelenmiş ve LAB-süpernatantlarının bu suşların biyofilm oluşturma yeteneklerini azalttığı ve önceden oluşturulmuş biyofilmlerin bütünlüğünü bozduğu saptanmıştır (Masebe ve Thantsha, 2022). Rezaei, Khanzadi ve Salari, (2021), *P. aeruginosa* ve *L. monocytogenes* gibi gıda patojenlerine karşı *L. rhamnosus* PTCC1712 ve *L. plantarum* PTCC1745 bakterilerinin biyofilm hücrelerinin inhibitör etkisini incelemiştir. Bu çalışmada, planktonik hücrelerin patojen bakteri hücrelerini yaklaşık 1-1,5 log, biyofilm hücrelerini ise 4,5 log azalttığı tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada, *L. acidophilus* ATCC 4356'nın hücre içermeyen süpernatantlarının biyofilm oluşturan, antibiyotiğe dirençli ve enfeksiyonlara neden olan *P. aeruginosa* izolatını %88,6 oranında inhibe ettiği rapor edilmiştir (Elbadri, Fathi, Abdel Hamid ve ElGendy, 2019). Wang ve diğerleri (2015), EPS'nin bakteriyel hücre yüzeylerini değiştirerek, bakteriyel hücrelerin yüzeye ilk bağlanmasını engelleyerek veya bir sinyal molekülü olarak hareket ederek biyofilm oluşumunda yer alan gen ifadesini düzenleyerek biyofilm aktivitesine müdahale edebileceğini öne sürmüştür (Wang ve diğerleri, 2015). Çocuk dışkılarından izole edilen *L. fermentum* LB-69 tarafından üretilen EPS, *B. cereus* RSKK 863 tarafından üretilen biyofilmi inhibe etmiştir. Hücre yüzeyi değişiklikleri veya azalan hücreler arası etkileşimler nedeniyle hücre duvarı bütünlüğünün zayıflamasının, bakteriyel hücrelerin ilk otomatik agregasyonunun ve bağlanmasının engellenmesinden sorumlu olabileceği belirtilmiştir (Kanmani ve diğerleri, 2013). Probiyotik LAB biyofilmleri, konak mukozasında kolonizasyonu ve stabiliteyi artırır, böylece bakteriyel patojen kolonizasyonunu engelleyebilir (Salas-Jara ve diğerleri, 2016). Probiyotik LAB biyofilmleri, yüzey ve besinler için bakteriyel patojenlerle başarılı bir şekilde rekabet edebildikleri için patojenik bakteriler tarafından biyofilm oluşumunu geciktirmek için umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir (Barzegari ve diğerleri, 2020).

Araştırmalar arasında görülen bazı yüzdesel farklılıklar, farklı deneysel koşulların kullanılmasından, inokulum hazırlama prosedürleri, büyüme ortamı, inokulum miktarı,

inkübasyon koşulları ve süresi, değişen doz gibi farklı standartlaştırılmamış metodolojilerin kullanılmasının ardından ve özellikle suş seçimindeki çeşitlilik nedeniyle ortaya çıkabilir (Abdalla ve diğerleri, 2021). Bir probiyotiğin etkisinin suşa özgü olduğu iyi bilinmektedir (Oelschlaeger, 2010); farklı suşlar patojenik bir biyofilm üzerinde farklı bir etkiye sahip olabilir, çünkü bakterilerdeki moleküler sinyalleşme suşa bağlı olma eğilimindedir (Abdalla ve diğerleri, 2021). Ayrıca mevcut literatürde, LAB'lerinin planktonik ve biyofilm yaşam formlarından elde edilen EPS'lerinin antibiyofilm aktivite çalışmalarında kullanılması ve karşılaştırmalı olarak analiz edilmesi ile ilgili çalışma olmaması tez çalışmasının özgün yanlarından birini oluşturmaktadır. Ek olarak kullanılan EPS'lerin antibiyofilm aktivitesinin mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

eDNA, birçok bakteriyel biyofilmin ana matriks bileşenidir (Schlafer, Meyer, Dige ve Regina, 2017). eDNA, biyofilm matriksinin yapısal bütünlüğünün yanı sıra bakteriyel yapışma, metabolik canlılık ve yatay gen transferine de yardımcı olur. Özellikle biyofilm oluşumunun erken aşamalarında biyofilmlerin yüzeylerde bakteriyel tutunması ve toplanmasında kritik öneme sahiptir (Okshevsky ve Meyer, 2015). Seper ve diğerleri (2011), yaptıkları çalışmada, besin alımı, biyofilm yapısından ayrılma ve biyofilm kütlelerinin kolonizasyonu gibi biyofilm yapısının gelişimi süreçlerinde eDNA'nın gerektiğini belirtmektedir.

Nükleazlar nükleik asitleri parçalayan enzimlerdir. Biyofilmin yapısını bozmayı hedefleyerek eDNA'nın tespit edildiği en yaygın yöntem nükleazların kullanılmasıdır. DNA'ya özgü bir endonükleaz olan DNaz I enzimi en yaygın kullanılan nükleazdır (Eun, 1996). DNaz I, tek ve çift sarmallı DNA'yı 5'-fosforillenmiş ve 3'-hidroksillenmiş uçlara sahip oligonükleotidlere ayırır (Hartmann, 2017). Okshevsky, Regina ve Meyer, (2015), biyofilm kontrolü için DNaz I uyguladığı çalışmalarında, DNaz enziminin biyofilm oluşumunu önleyebileceğini öne sürmüşlerdir. Nükleazların doğrudan biyofilmlere uygulanmasıyla eDNA yapısının bozulduğu ve biyofilm matriksinin zayıfladığı belirtilmektedir (Panlilio ve Rice, 2021). Bu bilgidен yola çıkarak, KC27L bakterisinin biyofilm matriksinde yer alan eDNA'nın varlığını ortaya koymak, eDNA'nın biyofilmin yapısal bütünlüğüne ve sağlamlığına olan katkısını tespit etmek amacıyla, bakterinin olgun biyofilmleri (28 saat) DNaz I enzimi ile muamele edilmiştir. Kristal viyole boyama tahlili ile oluşan toplam biyofilmin niceliksel sonuçları gösterilmektedir. DNaz I enzimi ile

muamele sonrasında biyofilm oluşumunu gösteren OD değerlerinde görülen azalmalar, bakterinin oluşturduğu biyofilmlerde eDNA'nın varlığını göstermektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda, eDNA yapısının bozulmasına neden olan DNaz I'in biyofilm oluşumunu kesintiye uğrattığı ve biyofilm miktarında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Yapılan literatür taramalarında, George ve Halami (2019), tavuk sosislerinden izole edilen *L. plantarum*'un olgun biyofilm (>24saat) hücrelerinde eDNA'nın varlığını DNaz I muamelesi ile tespit etmiştir. eDNA'nın biyofilm matriksinin yapısal bileşenleri olup olmadığını kanıtlamak için yapılan başka bir çalışmada olgun biyofilmlerin, DNaz I işlemine tabi tutulduğu zaman *L. plantarum* suşlarının biyofilm hücre sayılarında azalma olduğu gözlemlenmiştir (Ramírez, Smid, Abee ve Groot, 2015). Literatür çalışmaları ve sonuçlarımız benzerlik göstermektedir. Biyofilm matriksindeki eDNA'nın DNaz I ile parçalanması sonucu biyofilm oluşumunun baskılanması, LAB'lerinde eDNA'nın varlığını göstermektedir. LAB'nin biyofilm yapısında bulunan eDNA'nın kökenini ve rolünü aydınlatmak için daha detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyofilmin yaşam döngüsündeki yapı ve işlevlerin bakteri cins ve türlerine özgü olarak ortaya koyulması biyofilm kontrolü çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. Dolayısıyla yapılan tez çalışmaları sonucunda, LAB'nin biyofilm oluşturma potansiyellerinin/yeteneklerinin belirlenmesi, biyofilm matriks bileşenlerinin kimyasal ve moleküler düzeyde (HPLC ve SEC) araştırılması ile yeni bilgilerin ortaya koyulması ve LAB'nin biyofilm oluşturma mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi sağlanmıştır. Her bir farklı parametre sonuçlarının bağlantısı kurularak analiz sonuçları yorumlanmıştır. Bu sayede, suş bazında biyofilm oluşum mekanizmalarını geliştirmek amaçlanmıştır. Ayrıca, aynı amaç doğrultusunda, yapılan tez çalışması ile LAB'lerinin matriks bileşenlerinden EPS'lerin patojen bakterilerin biyofilm kontrolü için antibiyofilm özellikleri belirlenmiştir. Mevcut literatür çalışmaları ışığında ve grubumuz bilgisi kapsamında, bu tez çalışması, LAB ve biyofilm ilişkisinin farklı parametrelerle araştırıldığı ve yorumlandığı detay içeren öncü çalışmalardan birisi olma niteliği taşımaktadır.

Yapılan tez çalışması sonucu elde edilen veriler ve değerlendirme sonuçları/önerileri, aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir;

1. Laboratuvarımız stok kültür koleksiyonunda bulunan tavuk gastrointestinal sistemi ve tavuk gaitasından izole edilmiş *Lactobacillus* ve *Streptococcus* cinslerine ait LAB'lerin temel biyofilm yetenekleri (kongo kırmızısı ve kalkoflor beyazı içeren katı besiyerinde ve polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşumu) belirlenmiştir. Tez çalışmasında, temel biyofilm çalışmalarını bir arada uygulayarak detaylı incelemelerle özgün değeri arttırmak ve ileri çalışmalar için en doğru bakteri seçimini yapmak amaçlanmıştır. Sonuçlar neticesinde LAB'nin biyofilm oluşturma yeteneklerinin olduğu tespit edilmiştir.
2. Biyofilm oluşturan LAB'nin, EPS üretim miktarlarının belirlenmesi sonucundaki elde edilen veriler ile biyofilm oluşumu ile EPS üretimi arasında bir ilişki olduğu doğrulanmıştır ($p<0,01$). EPS üretiminin, biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynadığı ve bakterinin çevreye uyum sağlamasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bu kapsamda, ileri biyofilm çalışmaları için, en yüksek EPS ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahip *Ligilactobacillus salivarius* KC27L bakterisi seçilmiştir.

3. KC27L'nin farklı büyüme aşamalarında (lag fazı, log fazı, durgunluk fazı, ölüm fazı) biyofilm oluşumu ve EPS üretiminin araştırılması sonucunda, bakteri popülasyonunun artması ile biyofilm ve EPS üretiminin arttığı, bakteri popülasyonunun zamanla azalması ile de biyofilm ve EPS üretiminin azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçla, bakterinin büyüme kinetiği, biyofilm ve EPS üretimi arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir.
4. Potansiyel antibiyofilm adayı olan bakterinin, farklı biyofilm faz düzeylerinde, biyofilm hücrelerinin, planktonik hücrelerden farklı fenotipik, genotipik ve metabolik özellik göstermesi sebebiyle, EPS bileşenlerinin kimyasal analizleri yürütülerek iki yaşam formu arasındaki benzerlikler ve farklılıklar ortaya koyulmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda, kimyasal analizler için rutin olarak çalışılan EPS çalışmalarının biyofilm çalışmaları ile bağlantısının kurulması ve veri analizlerinin bu şekilde yorumlanarak literatüre kazandırılması sağlanmıştır.
5. EPS miktarları, monomer kompozisyonu ve moleküler ağırlıkları biyolojik aktiviteleri etkilediğinden, biyofilm yaşam formu ve planktonik hücre formu EPS'lerin miktarları belirlenerek, HPLC ve SEC analizleri yapılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, şimdiye kadar literatür çalışmalarında LAB'lerinin hem planktonik hem de biyofilm hücrelerinin ürettikleri EPS'lerin miktarının, monomer yapılarındaki ve moleküler ağırlıklarındaki farklılıkların ortaya koyulduğu bir deneysel araştırma olmaması çalışmanın özgün yanlarından birini oluşturmaktadır.
6. KC27L bakterisinin biyofilm matriks bileşenlerinde yer alan planktonik ve biyofilm EPS'lerinin biyofilm yaşam döngüsünde bulunan farklı büyüme evrelerinde [erken biyofilm (6. saat), ara biyofilm (12. saat) ve olgun biyofilm (28. saat)] protein ve karbonhidrat miktarlarının farklı olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar ile iki form arasında bir fark olduğu doğrulanmıştır. Planktonik ve biyofilm yaşam formu EPS'lerin SEC analizi ile tespit edilemeyecek kadar düşük moleküler ağırlığa sahip olduğu bulunmuştur. Tez çalışması analiz sonuçları ile LAB'nin biyofilm matriksi hakkında literatüre katkı sağlayacak yeni bilgiler elde edilmiştir.
7. KC27L bakterisinin olgun biyofilmlerinin DNaz I ile muamelesi sonucu biyofilm miktarında azalma tespit edilmiştir ve enzimin biyofilm yapısını bozduğu sonucuna

varılmıştır. Bu bilgiler ışığında, bakterinin biyofilm matriksinde eDNA'nın varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, LAB-biyofilm matriks bileşeni olan eDNA'nın varlığının DNaz I ile ortaya koyulmasına ilişkin ilk çalışmalar arasında yer almaktadır.

8. “Biyofilm matriks bileşenlerinde yer alan planktonik ve biyofilm EPS’lerinin, patojen mikroorganizmalarının yaşam döngüsünü bloke ederek biyofilm oluşumlarını dağıtabilme veya engelleme yeteneği nedir?” sorusuna cevap bulmak amacıyla çalışmalar gerçekleştirilmiş ve planktonik EPS’lerin %60,7 oranında, biyofilm EPS’lerin ise %54,4 oranında patojen biyofilmlerini inhibe edebildikleri görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile LAB’nin biyofilm özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi, dolayısıyla LAB’nin matriks bileşenlerinden elde edilen EPS’lerin patojen bakterilerin biyofilm kontrolü/giderimi için antibiyofilm özelliklerinin aydınlatılması sağlanmıştır.
9. Tez çalışması, patojenlerin kontrolünde kimyasal olmayan çevre dostu LAB-EPS’lerinin kullanımı açısından biyoteknolojik öneme sahip olup, çıktılarının Ar-Ge çalışmaları ile patentlenerek ticari ürün olarak kullanılabilmesinin ilk basamağı olarak büyük önem taşımaktadır. Dolayısıyla, bu tez çalışma sonuçları ileri de yapılabilecek biyofilm/biyofilm kontrolü çalışmaları için kaynak niteliği taşımaktadır.
10. Tez kapsamında, *Ligilactobacillus salivarius* KC27L’nin biyofilm oluşturma kapasiteleri, matriks bileşenleri ve biyofilm kontrol yetenekleri ilk kez detaylandırılmıştır.



KAYNAKLAR

- Abdalla, A. K., Ayyash, M. M., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Shah, N. P., and Holley, R. (2021). Exopolysaccharides as antimicrobial agents: Mechanism and spectrum of activity. *Frontiers in Microbiology*, 12, 664395.
- Abe, K., Nomura, N., and Suzuki, S. (2020). Biofilms: Hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(5), 31.
- Abee, T., Kovács, Á. T., Kuipers, O. P., and Van der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 172-179.
- Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attia, H., and Azabou, S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 719-728.
- Abo Saif, F. A., and Sakr, E. A. (2020). Characterization and bioactivities of exopolysaccharide produced from probiotic *Lactobacillus plantarum* 47FE and *Lactobacillus pentosus* 68FE. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 24, 100231.
- Adetunji, V. O., and Adegoke, G. O. (2007). Bacteriocin and cellulose production by lactic acid bacteria isolated from West African soft cheese. *African Journal of Biotechnology*, 6(22), 2616-2619.
- Adiningrat, A., Kusnadi, R. A., Allam, A. S., Sofiani, E., Maulana, I., and Yumoto, H. (2023). The effect of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and ethanolic propolis compound toward nucleic acid deposition in the extracellular polymeric substance of root canal bacteria. *European Journal of Dentistry*, 17(02), 418-423.
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachdyn-Król, M., and Varzakas, T. (2020). Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. *Microorganisms*, 8(6), 952.
- Ağyar, O. ve Üçkardeş, F. (2014). Probiyotik özellikte üç farklı laktik asit bakterileri grubu suşunun koloni büyüme eğrilerinin modifiye edilmiş Gompertz modeli ile modellenmesi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1(3), 430-434.
- Ahn, K. B., Baik, J. E., Yun, C. H., and Han, S. H. (2018). Lipoteichoic acid inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 327.
- Ait Ouali, F., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., Chihib, N.E. and Drider, D. (2014). Identification of *Lactobacilli* with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 116-124.

- Akoğlu, A. (2020). The effect of some environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation by some lactic acid bacteria isolated from a local cheese in Turkey. *Biotechnology Letters*, 42, 481-492.
- Ali, J., Sohail, A., Wang, L., Rizwan Haider, M., Mulk, S., and Pan, G. (2018). Electro-microbiology as a promising approach towards renewable energy and environmental sustainability. *Energies*, 11(7), 1822.
- Alim, D., Sircaik, S., and Panwar, S. L. (2018). The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: An emerging perspective. *Journal of Fungi*, 4(4), 140.
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1114-1128.
- Allison, D. G. (2003). The biofilm matrix. *Biofouling*, 19(2), 139-150.
- Almansoori, A. F., Al-Baldawi, I. A., and Hazaimah, M. (2020). Optimization of the EPS production of a bacterial floc consortium using different parameters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101466.
- Angelin, J. and Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853-865.
- Aslim, B., Beyatli, Y., and Yuksekdağ, Z. N. (2006). Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional home-made yoghurts and raw milk. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(8), 973-979.
- Assaf, J. C., Khoury, A. E., Chokr, A., Louka, N., and Atoui, A. (2019). A novel method for elimination of aflatoxin M1 in milk using *Lactobacillus rhamnosus* GG biofilm. *International Journal of Dairy Technology*, 72(2), 248-256.
- Aung, T., and Kim, M. J. (2024). A comprehensive review on kombucha biofilms: A promising candidate for sustainable food product development. *Trends in Food Science & Technology*, 144, 104325.
- Avcioglu, N. H. (2022). Bacterial cellulose: Recent progress in production and industrial applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(5), 86.
- Aydın, Y., ve Aksoy, N. D. (2015). *Gluconacetobacter hansenii* p2a ile gerçekleştirilen bakteriyel selüloz üretiminin kinetik modellenmesi. *Anadolu University Journal of Science and Technology A-Applied Sciences and Engineering*, 16(2), 239-247.
- Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., Claro da Silva, R., and Ibrahim, S. A. (2020). Lactic acid bacteria: Food safety and human health applications. *Dairy*, 1(3), 202-232.

- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knøchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., and Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313-351.
- Banik, A., Anjum, H., Habib, H., Abony, M., Begum, A., and Ahmed, Z. (2023). Characterization of lactic acid bacteria isolated from street pickles of Dhaka, Bangladesh. *Heliyon*, 9(6), e17508.
- Barzegari, A., Kheyrolahzadeh, K., Hosseiniyan Khatibi, S. M., Sharifi, S., Memar, M. Y., and Zununi Vahed, S. (2020). The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. *Infection and Drug Resistance*, 13, 659-672.
- Behare, P. V., Singh, R., Kumar, M., Prajapati, J. B., and Singh, R. P. (2009). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A review. *The Journal of Food Science and Technology*, 46(1), 1-11.
- Bendaoud, M., Vinogradov, E., Balashova, N. V., Kadouri, D. E., Kachlany, S. C., and Kaplan, J. B. (2011). Broad-spectrum biofilm inhibition by *Kingella kingae* exopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 193(15), 3879-3886.
- Berne, C., Kysela, D. T., and Brun, Y. V. (2010). A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. *Molecular Microbiology*, 77(4), 815-829.
- Bhat, B., and Bajaj, B. K. (2019). Hypocholesterolemic potential and bioactivity spectrum of an exopolysaccharide from a probiotic isolate *Lactobacillus paracasei* M7. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 19, 100191.
- Bhowmick, P. P., Devegowda, D., Ruwandeepika, H. D., Fuchs, T. M., Srikumar, S., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. (2011). gcpA (stm1987) is critical for cellulose production and biofilm formation on polystyrene surface by *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in both high and low nutrient medium. *Microbial Pathogenesis*, 50(2), 114-122.
- Bibi, A., Xiong, Y., Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Radicetti, E., Umair, M., Shoukat, M., Khan, M. K. I., and Aadil, R. M. (2021). Recent advances in the production of exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus* spp. and its application in the food industry: A review. *Sustainability*, 13(22), 12429.
- Bikric, S., Aslim, B., Dincer, İ., Yuksekdog, Z., Ulusoy, S., and Yavuz, S. (2022). Characterization of exopolysaccharides (EPSs) obtained from *Ligilactobacillus salivarius* strains and investigation at the prebiotic potential as an alternative to plant prebiotics at poultry. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(1), 49-59.
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria: Their applications in foods. *Journal of Bacteriology & Mycology*, 6(2), 89-94.
- Blakeman, J. T., Morales-García, A. L., Mukherjee, J., Gori, K., Hayward, A. S., Lant, N. J., and Geoghegan, M. (2019). Extracellular DNA provides structural integrity to a *Micrococcus luteus* biofilm. *Langmuir*, 35(19), 6468-6475.

- Bowen, W. H., Burne, R. A., Wu, H., and Koo, H. (2018). Oral biofilms: Pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends in Microbiology*, 26(3), 229-242.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Branda, S. S., Vik, A., Friedman, L., and Kolter, R. (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20-26.
- Brian-Jaisson, F., Molmeret, M., Fahs, A., Guentas-Dombrowsky, L., Culioli, G., Blache, Y., Cérantola, S., and Ortalo-Magné, A. (2016). Characterization and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances produced by the marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* strain TC14, *Biofouling*, 32(5), 547-560.
- Bystrianský, L., Hujslová, M., Hřelová, H., Řezáčová, V., Němcová, L., Šimsová, J., Gryndlerová, H., Kofroňová, O., Benada, O., and Gryndler, M. (2019). Observations on two microbial life strategies in soil: Planktonic and biofilm-forming microorganisms are separable. *Soil Biology and Biochemistry*, 136, 107535.
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., and Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 3877-3886.
- Campoccia, D., Montanaro, L., and Arciola, C. R. (2021). Extracellular DNA (eDNA). A major ubiquitous element of the bacterial biofilm architecture. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9100.
- Carvalho, F. M., Teixeira-Santos, R., Mergulhao, F. J., and Gomes, L. C. (2021). Effect of *Lactobacillus plantarum* biofilms on the adhesion of *Escherichia coli* to urinary tract devices. *Antibiotics*, 10(8), 966.
- Castellano, P., Pérez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C., and Vignolo, G. M. (2017). Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: A focus on meat ecosystems and industrial environments. *Microorganisms*, 5(3), 38.
- Che, J., Shi, J., Fang, C., Zeng, X., Wu, Z., Du, Q., Tu, M., and Pan, D. (2024). Elimination of pathogen biofilms via postbiotics from lactic acid bacteria: A promising method in food and biomedicine. *Microorganisms*, 12(4), 704.
- Chen, G. Q., Wu, Y. H., Wang, Y. H., Chen, Z., Tong, X., Bai, Y., Luo L. W., Xu, C., and Hu, H. Y. (2021). Effects of microbial inactivation approaches on quantity and properties of extracellular polymeric substances in the process of wastewater treatment and reclamation: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 413, 125283.
- Chiba, A., Sugimoto, S., Sato, F., Hori, S., and Mizunoe, Y. (2015). A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 392-403.

- Ciandrini, E., Campana, R., Casettari, L., Perinelli, D. R., Fagioli, L., Manti, A., Palmieri, G. F., Papa, S., and Baffone, W. (2016). Characterization of biosurfactants produced by *Lactobacillus* spp. and their activity against oral *Streptococci* biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 6767-6777.
- Costa, R. C., Bertolini, M., Costa Oliveira, B. E., Nagay, B. E., Dini, C., Benso, B., Klein, M. I., Barao, V. A. R., and Souza, J. G. S. (2023). Polymicrobial biofilms related to dental implant diseases: unravelling the critical role of extracellular biofilm matrix. *Critical Reviews in Microbiology*, 49(3), 370-390.
- Costerton, J. W. (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15(3), 137-140.
- Costerton, J. W. (2007). The Biofilm Primer. *Springer Series on Biofilms*. Berlin, Heidelberg. DOI:10.1007/b136878.
- Coughlan, L. M., Cotter, P. D., Hill, C., and Alvarez-Ordóñez, A. (2016). New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7, 194857.
- Czaczyk, K. and Myszka, K. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(6), 799-806.
- Çelik, K. (2018). *Tavuk dışkısından izole edilen laktik asit bakterileri ekzopolisakkaritlerinin antioksidan ve antibiyofilm aktiviteleri*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 103.
- Das, S. (2022). Genetic regulation, biosynthesis and applications of extracellular polysaccharides of the biofilm matrix of bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 291, 119536.
- Das, D., Baruah, R., and Goyal, A. (2014). A food additive with prebiotic properties of an α -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 20-26.
- Das, T., Sharma, P. K., Busscher, H. J., Van Der Mei, H. C., and Krom, B. P. (2010). Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied And Environmental Microbiology*, 76(10), 3405-3408.
- Dbeibia, A., Mahdhi, A., Jdidi, S., A. Altammar, K., Zmanter, T., Mzoughi, R., and Jabeur, C. (2023). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from colostrum of 3 different mammals. *Food Biotechnology*, 37(2), 166-190.
- De Carvalho, C. C. (2017). Biofilms: Microbial strategies for surviving UV exposure. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*, 996, 233-239.
- De Man, J. D., Rogosa, D., and Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23(1), 130-135.

- Diez-Gutiérrez, L., San Vicente, L., Barrón, L. J. R., Del Carmen Villarán, M., and Chávarri, M. (2020). Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market. *Journal of Functional Foods*, 64, 103669.
- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., and Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 1179-1186.
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Dorward, D. W., Garon, C. F., and Judd, R. C. (1989). Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Bacteriology*, 171(5), 2499-2505.
- Dragoš, A., and Kovács, Á. T. (2017). The peculiar functions of the bacterial extracellular matrix. *Trends in Microbiology*, 25(4), 257-266.
- Drame, I., Lafforgue, C., Formosa-Dague, C., Chapot-Chartier, M. P., Piard, J. C., Castelain, M., and Dague, E. (2021). Pili and other surface proteins influence the structure and the nanomechanical properties of *Lactococcus lactis* biofilms. *Scientific Reports*, 11(1), 4846.
- Du, B., Yang, Y., Bian, Z., and Xu, B. (2017). Molecular weight and helix conformation determine intestinal anti-inflammatory effects of exopolysaccharide from *Schizophyllum commune*. *Carbohydrate Polymers*, 172, 68-77.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dunne, W.M. (2002). Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155-166.
- Elbadri, A. S., Fathi, S. M., Abdel Hamid, E. A. and ElGendy, H. A. (2019). The effect of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic against *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation. *Novel Research in Microbiology Journal*, 3(4), 428-439.
- Ergene, E., ve Avcı, A. (2016). Mikrobiyel ekzopolisakkaritler. *Sakarya University Journal of Science*, 20(2), 193-203.
- Ertan, H., ve Arda, N. (1999). Protein Elektroforezi. *Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*, 226.
- Eun, H.M. (1996). Enzymology primer for recombinant DNA technology, *Academic Press*, 1, 145-232.
- Fan, Y., Huang, X., Chen, J., and Han, B. (2020). Formation of a mixed-species biofilm is a survival strategy for unculturable lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in Daqu, a Chinese traditional fermentation starter. *Frontiers in Microbiology*, 11, 510900.

- Fazeli-Nasab, B., Sayyed, R. Z., Mojahed, L. S., Rahmani, A. F., Ghafari, M., and Antonius, S. (2022). Biofilm production: A strategic mechanism for survival of microbes under stress conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102337.
- Ferdouse, J., Paul, S., Chowdhury, T., Ali, F., Islam, S., and Hossain, T. J. (2023). Probiotic characteristics of *Pediococcus pentosaceus* and *Apilactobacillus kunkeei* strains: The lactic acid bacteria isolated from Bangladeshi natural honey. *Applied Food Biotechnology*, 10(1), 33-45.
- Fessard, A., and Remize, F. (2019). Genetic and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from tropically grown fruits and vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 61-72.
- Field, D., O'Connor, R., Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2016). In vitro activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against *Staphylococcus* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 7, 190372.
- Fijan, S. (2023). Probiotics and their antimicrobial effect. *Microorganisms*, 11(2), 528.
- Fleming, D., and Rumbaugh, K. (2017). Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms*, 5(2), 15.
- Flemming, H. C. (2016). EPS-Then and now. *Microorganisms*, 4(4), 41.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, 43(6), 1-8.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
- Frengova, G. I., Simova, E. D., Beshkova, D. M., Simov, Z. I. (2000). Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(12), 1123-1127.
- Fu, J., Zhang, Y., Lin, S., Zhang, W., Shu, G., Lin, J., Li, H., Xu, F., Tang, H., Peng, G., Zhao, L., Chen, S., and Fu, H. (2021). Strategies for interfering with bacterial early stage biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 675843.
- Fuqua, C. and Greenberg, E. P. (2002). Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), 685-695.
- Furtuna, D. K., Debora, K., and Wasito, E. B. (2018). Comparison of microbiological examination by test tube and congo red agar methods to detect biofilm production on clinical isolates. *Folia Medica Indonesiana*, 54(1), 22-28.

- Fuso, A., Bancalari, E., Castellone, V., Caligiani, A., Gatti, M., and Bottari, B. (2023). Feeding lactic acid bacteria with different sugars: Effect on exopolysaccharides (EPS) production and their molecular characteristics. *Foods*, 12(1), 215.
- Galle, S. and Arendt, E. K. (2014). Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 891-901.
- Galli, V., Venturi, M., Coda, R., Maina, N. H., and Granchi, L. (2020). Isolation and characterization of indigenous *Weissella confusa* for in situ bacterial exopolysaccharides (EPS) production in chickpea sourdough. *Food Research International*, 138, 109785.
- Garcia, C., Guerin, M., Souidi, K., and Remize, F. (2020). Lactic fermented fruit or vegetable juices: Past, present, and future. *Beverages*, 6(1), 8.
- George, J. and Halami, P. M. (2019). Presence of extracellular DNA & protein in biofilm formation by gentamicin-resistant *Lactobacillus plantarum*. *Indian Journal of Medical Research*, 149(2), 257-262.
- Gerbersdorf, S. U., and Wieprecht, S. (2015). Biostabilization of cohesive sediments: revisiting the role of abiotic conditions, physiology and diversity of microbes, polymeric secretion, and biofilm architecture. *Geobiology*, 13(1), 68-97.
- Giaouris, E. (2020). Application of lactic acid bacteria and their metabolites against foodborne pathogenic bacterial biofilms. *Recent Trends in Biofilm Science and Technology*, 9, 205–232.
- Giaouris, E. D., Nychas, G. J. E. (2006). The adherence of *Salmonella enteritidis* PT4 to stainless steel: The importance of the air–liquid interface and nutrient availability, *Food Microbiology*, 23(8), 747-752.
- Giordani, B., Parolin, C., and Vitali, B. (2021). Lactobacilli as anti-biofilm strategy in oral infectious diseases: A mini-review. *Frontiers in Medical Technology*, 3, 769172.
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., and de Melo Franco, B. D. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 863.
- Gomez-Mejia, A., Orlietti, M., Tarnutzer, A., Mairpady Shambat, S., and Zinkernagel, A. S. (2024). Inhibition of *Streptococcus pyogenes* biofilm by *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lacticaseibacillus rhamnosus*. *BioRxiv*, 8, 2024-03.
- Gong, C., He, Y., Tang, Y., Hu, R., Lv, Y., Zhang, Q., Tardy, B. L., Richardson, J. J., He, Q., Guo, J., and Chi, Y. (2021). Biofilms in plant-based fermented foods: Formation mechanisms, benefits and drawbacks on quality and safety, and functionalization strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 940-953.
- Goodman, S. D. and Bakaletz, L. O. (2022). Bacterial biofilms utilize an underlying extracellular DNA matrix structure that can be targeted for biofilm resolution. *Microorganisms*, 10(2), 466.

- Gödeke, J., Heun, M., Bubendorfer, S., Paul, K., and Thormann, K. M. (2011). Roles of two *Shewanella oneidensis* MR-1 extracellular endonucleases. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5342-5351.
- Grande, R., Celia, C., Mincione, G., Stringaro, A., Di Marzio, L., Colone, M., Di Marcantonio, M. C., Savino, L., Puca, V., Santoliquido, R., Locatelli, M., Muraro, R., Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2017). Detection and physicochemical characterization of membrane vesicles (MVs) of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1040.
- Grande, R., Di Giulio, M., Bessa, L. J., Di Campli, E., Baffoni, M., Guarnieri, S., and Cellini, L. (2011). Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: A backstairs rumour. *Journal of Applied Microbiology*, 110(2), 490-498.
- Guillier, L., Stahl, V., Hezard, B., Notz, E., and Briandet, R. (2008). Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 51-57.
- Guillonnet, R., Baraquet, C., Bazire, A., and Molmeret, M. (2018). Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 9, 390047.
- Habimana, O., Guillier, L., Kulakauskas, S., and Briandet, R. (2011). Spatial competition with *Lactococcus lactis* in mixed-species continuous-flow biofilms inhibits *Listeria monocytogenes* growth. *Biofouling*, 27(9), 1065-1072.
- Hall, C. W., and Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276-301.
- Han, W., Zhou, B., Yang, K., Xiong, X., Luan, S., Wang, Y., Xu, Z., Lei, P., Luo, Z., Gao, J., Zhan, Y., Chen, G., Liang, L., Wang, R., Li, S., and Xu, H. (2020). Biofilm-inspired adhesive and antibacterial hydrogel with tough tissue integration performance for sealing hemostasis and wound healing. *Bioactive Materials*, 5(4), 768-778.
- Harmsen, M., Lappann, M., Knöchel, S., and Molin, S. (2010). Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(7), 2271-2279.
- Harrigan, W.F., and M.E., McCance. (1976). *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academic Press Inc., London.
- Hartmann, G. (2017). Nucleic acid immunity. *Advances in Immunology*, 133, 121-169.
- He, F., Yang, Y., Yang, G., and Yu, L. (2010). Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control*, 21(9), 1257-1262.

- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., and Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514.
- Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*, 125(4), 272-275.
- Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., and Rastall, R. A. (2012). *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846-852.
- Hossain, M. I., Mizan, M. F. R., Roy, P. K., Nahar, S., Tousehik, S. H., Ashrafudoulla, M., Jahid, I. K., Lee, J. and Ha, S. D. (2021). *Listeria monocytogenes* biofilm inhibition on food contact surfaces by application of postbiotics from *Lactobacillus curvatus* B.67 and *Lactobacillus plantarum* M.2. *Food Research International*, 148, 110595.
- Hossain, M. I., Rahaman Mizan, M. F., Ashrafudoulla, M., Nahar, S., Joo, H.J., Kabir Jahid, I., Park, S. H., Kim, K. S., and Ha, S.D. (2019). Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Listeria monocytogenes* biofilm on lettuce, stainless-steel surfaces, and MBEC™ biofilm device. *LWT- Food Science and Technology*, 118, 108864.
- Hou, J., Veeragowda, D. H., Van De Belt-Gritter, B., Busscher, H. J., and Van Der Mei, H. C. (2018). Extracellular polymeric matrix production and relaxation under fluid shear and mechanical pressure in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1), e01516-17.
- Huang, H., Peng, C., Peng, P., Lin, Y., Zhang, X., and Ren, H. (2019). Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 1115-1129.
- Huang, X., Chen, C., Ren, C., Li, Y., Deng, Y., Yang, Y., and Ding, X. (2018). Identification and characterization of a locus putatively involved in colanic acid biosynthesis in *Vibrio alginolyticus* ZJ-51. *Biofouling*, 34(1), 1-14.
- Huseby, M. J., Kruse, A. C., Digre, J., Kohler, P. L., Vocke, J. A., Mann, E. E., Bayles, K. W., Bohach, G. A., Schlievert, P. M., Ohlendorf, D. H., and Earhart, C. A. (2010). Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14407-14412.
- Ibáñez de Aldecoa, A. L., Zafra, O., and González-Pastor, J. E. (2017). Mechanisms and regulation of extracellular DNA release and its biological roles in microbial communities. *Frontiers in Microbiology*, 8, 258278.
- Ibarburu, I., Puertas, A. I., Berregi, I., Rodríguez-Carvajal, M. A., Prieto, A., and Dueñas, M. T. (2015). Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 54-62.

- Idicula, D. V., Parappilly, S. J., Joy, N., Balan, J. and George, S. M. (2023). Salutory attributes of probiotic human gut *Lactobacilli* for gut health. *Letters in Applied Microbiology*, 76(2), 1-8.
- Iranchah, S., Abdi Ali, A., Mallavarapu, M., Soudi, M. R., Subashchandrabose, S., Gharavi, S., and Ayati, B. (2019). Ecological role of *Acinetobacter calcoaceticus* GSN3 in natural biofilm formation and its advantages in bioremediation. *Biofouling*, 35(4), 377-391.
- Irie, Y. and Parsek, M. R. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Bacterial Biofilms*, 67-84.
- Jayathilake, P. G., Jana, S., Rushton, S., Swailes, D., Bridgens, B., Curtis, T., and Chen, J. (2017). Extracellular polymeric substance production and aggregated bacteria colonization influence the competition of microbes in biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1865.
- Jeong, D., Kim, D. H., Kang, I. B., Kim, H., Song, K. Y., Kim, H. S., and Seo, K. H. (2017). Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*, 78, 436-442.
- Jia, F. F., Zheng, H. Q., Sun, S. R., Pang, X. H., Liang, Y., Shang, J. C., Zhu, Z. T., and Meng, X. C. (2018). Role of luxS in stress tolerance and adhesion ability in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391. *BioMed Research International*, 2018, 1-10.
- Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., and Yu, W. (2011). Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PloS One*, 6(4), 1-11.
- Jurášková, D., Ribeiro, S. C., and Silva, C. C. (2022). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*, 11(2), 156.
- Juszczuk-Kubiak, E. (2024). Molecular Aspects of the functioning of pathogenic bacteria biofilm based on quorum sensing (QS) signal-response system and innovative non-antibiotic strategies for their elimination. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2655.
- Kanmani, P., Suganya, K., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Pattukumar, V., Paari, K. A., and Arul, V. (2013). Synthesis and functional characterization of antibiofilm exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecium* MC13 isolated from the gut of fish. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, 1001-1015.
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., and Thurnheer, T. (2020). Biofilm matrixome: Extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668-681.
- Kavitake, D., Tiwari, S., Shah, I. A., Devi, P. B., Delattre, C., Reddy, G. B., and Shetty, P. H. (2023). Antipathogenic potentials of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and their food and health applications. *Food Control*, 152, 109850.

- Kaya, Y., Erten, T., Vurmaz, M., İspirli, H., Şimşek, Ö., and Dertli, E. (2022). Comparison of the probiotic characteristics of lactic acid bacteria (LAB) isolated from sourdough and infant feces. *Food Bioscience*, 47, 101722.
- Khalid, N., Asgher, M., Hussain, F., and Iqbal, J. (2022). Exopolysaccharides production from marine *Bacillus* strains and their antioxidant and bio-flocculant capacities. *Archives of Microbiology*, 204(5), 250.
- Khalil, E. S., Abd Manap, M. Y., Mustafa, S., Alhelli, A. M., and Shokryazdan, P. (2018). Probiotic properties of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus* strains isolated from tempoyak. *Molecules*, 23(2), 398.
- Khan, F., Tabassum, N., and Kim, Y. M. (2020). A strategy to control colonization of pathogens: Embedding of lactic acid bacteria on the surface of urinary catheter. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 9053-9066.
- Kibar, H., Arslan, Y. E., Ceylan, A., Karaca, B., Haliscelik, O., and Kiran, F. (2020). *Weissella cibaria* EIR/P2-derived exopolysaccharide: A novel alternative to conventional biomaterials targeting periodontal regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2900-2908.
- Kilic, T. and Bali, E. B. (2023). Biofilm control strategies in the light of biofilm-forming microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(5), 131.
- Kim, J. H., Lee, E. S., Song, K. J., Kim, B. M., Ham, J. S. and Oh, M. H. (2022). Development of desiccation-tolerant probiotic biofilms inhibitory for growth of foodborne pathogens on stainless steel surfaces. *Foods*, 11(6), 831.
- Kim, U., Kim, J. H., and Oh, S. W. (2022). Review of multi-species biofilm formation from foodborne pathogens: Multi-species biofilms and removal methodology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(21), 5783-5793.
- Kim, Y., and Kim, S. H. (2009). Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 324-329.
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., and Bron, P. A. (2010). The extracellular biology of the *lactobacilli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(2), 199-230.
- Klimko, A. I., Cherdyntseva, T. A., Brioukhanov, A. L., and Netrusov, A. I. (2020). *In vitro* evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 1139-1148.
- Kodakkat, S., Ch'ng, S., Sultana, T., Leong, M. M., Shaw, Z. L., Nisbet, D. R., Ramsland, P. A., Elbourne, A. and Cheeseman, S. (2024). Biofilm characterization: Imaging, analysis and considerations. *Methods in Microbiology*, 54, 39-79.
- Koerdt, A., Gödeke, J., Berger, J., Thormann, K. M., and Albers, S. V. (2010). Crenarchaeal biofilm formation under extreme conditions. *PloS One*, 5(11), e14104.

- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., and Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), 740-755.
- Korcz, E., and Varga, L. (2021). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 375-384.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., and Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381-386.
- Kumar, L. M., Saad, W. Z., Mohamad, R., and Rahim, R. A. (2017). Influence of biofilm-forming lactic acid bacteria against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA S547). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12), 1107-1115.
- Kuschmierz, L., Meyer, M., Bräsen, C., Wingender, J., Schmitz, O. J., and Siebers, B. (2022). Exopolysaccharide composition and size in *Sulfolobus acidocaldarius* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 13, 982745.
- Landeta, G., Curiel, J. A., Carrascosa, A. V., Muñoz, R. and De Las Rivas, B. (2013). Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*, 95(2), 272-280.
- Langille, S. E., Geesey, G. G., and Weiner, R. M. (2000). Polysaccharide-specific probes inhibit adhesion of *Hyphomonas rosenbergii* strain VP-6 to hydrophilic surfaces. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 81-85.
- Lappann, M., Claus, H., Van Alen, T., Harmsen, M., Elias, J., Molin, S., and Vogel, U. (2010). A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology*, 75(6), 1355-1371.
- LaSarre, B. and Federle, M. J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 73-111.
- Lauer Cruz, K. and De Souza Da Motta, A. (2019). Characterization of biofilm production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw buffalo milk. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 4595-4604.
- Laws, A. P., Leivers, S., Chacon-Romero, M., Chadha, M. J. (2009). Variation in the molecular mass of exopolysaccharides during the time course of extended fermentations of skimmed milk by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 19(12), 768-771.
- Laws, A., Gu, Y., and Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 19(8), 597-625.
- Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C., Verhoeven, T. L., Fadda, A. A., Marchal, K., and Vanderleyden, J. (2007). Functional analysis of luxS in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 860-871.

- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728-764.
- Lee, I. C., Caggianiello, G., Van Swam, I. I., Taverne, N., Meijerink, M., Bron, P. A., Spano, G., and Kleerebezem, M. (2016). Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on *Lactobacillus plantarum*-host interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3959-3970.
- Lee, J. S., Bae, Y. M., Han, A., and Lee, S. Y. (2016). Development of Congo red broth method for the detection of biofilm-forming or slime-producing *Staphylococcus* sp. *LWT- Food Science and Technology*, 73, 707-714.
- Lee, K. W. K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S. and Rice, S. A. (2014). Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *The ISME Journal*, 8(4), 894-907.
- Lewenza, S. (2013). Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 4, 41081.
- Lewis, K. I. M. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999-1007.
- Li, J., Zhang, Q., Zhao, J., Zhang, H., and Chen, W. (2024). *Lactobacillus*-derived components for inhibiting biofilm formation in the food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(4), 1-13.
- Li, P., Yin, R., Cheng, J., and Lin, J. (2023). Bacterial biofilm formation on biomaterials and approaches to its treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11680.
- Li, W., Ji, J., Rui, X., Yu, J., Tang, W., Chen, X., Jiang, M. and Dong, M. (2014). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics in vitro. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2), 732-739.
- Lima, J. L. D. C., Alves, L. R., Paz, J. N. P. D., Rabelo, M. A., Maciel, M. A. V., and Moraes, M. M. C. D. (2017). Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. *Revista Brasileira De Terapia Intensiva*, 29, 310-316.
- Limoli, D. H., Jones, C. J., and Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbial Biofilms*, 11, 223-247.
- Lin, T. Y., and Chien, M. F. C. (2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100(4), 1419-1423.
- Lindsay, D., and Von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 64(4), 313-325.
- Liu, L., Zhang, J., and Li, P. (2018). Overexpression of luxS promotes stress resistance and biofilm formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 by regulating the expression of multiple genes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 423652.

- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., and Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*, 103-203.
- Liu, X., Yao, H., Zhao, X., and Ge, C. (2023). Biofilm formation and control of foodborne pathogenic bacteria. *Molecules*, 28(6), 2432.
- Liu, Y. Q., Liu, Y., and Tay, J. H. (2004). The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 143-148.
- Lobos, O., Padilla, A., and Padilla, C. (2009). In vitro antimicrobial effect of bacteriocin PsVP-10 in combination with chlorhexidine and triclosan against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* strains. *Archives of Oral Biology*, 54(3), 230-234.
- Mangwani, N., Dash, H. R., Chauhan, A., and Das, S. (2012). Bacterial quorum sensing: functional features and potential applications in biotechnology. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 215-227.
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L. H., Smeltzer, M. S., Horswill, A. R., and Bayles, K. W. (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PloS One*, 4(6), e5822.
- Mann, E., Schmitz-Esser, S., Zebeli, Q., Wagner, M., Ritzmann, M., and Metzler-Zebeli, B. U. (2014). Mucosa-associated bacterial microbiome of the gastrointestinal tract of weaned pigs and dynamics linked to dietary calcium-phosphorus. *PLoS One*, 9(1), e86950.
- Marsden, A. E., Grudzinski, K., Ondrey, J. M., DeLoney-Marino, C. R., and Visick, K. L. (2017). Impact of salt and nutrient content on biofilm formation by *Vibrio fischeri*. *PLoS One*, 12(1), e0169521.
- Marsh, P. D., Do, T., Beighton, D., and Devine, D. A. (2016). Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontology 2000*, 70(1), 80-92.
- Marshall, V. M., Rawson, H. L. (1999). Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(2), 137-143.
- Martinelli, D., Bachofen, R., and Brandl, H. (2002). Effect of medium composition, flow rate, and signaling compounds on the formation of soluble extracellular materials by biofilms of *Chromobacterium violaceum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 278-283.
- Martinez, S., Garcia, J. G., Williams, R., Elmassry, M., West, A., Hamood, A., Hurtado, D., Gudenkauf, B., Ventolini, G., and Schlabritz-Loutsevitch, N. (2020). *Lactobacilli* spp.: Real-time evaluation of biofilm growth. *BMC Microbiology*, 20, 1-9.
- Masebe, R. D., and Thantsha, M. S. (2022). Anti-biofilm activity of cell free supernatants of selected lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* isolated from avocado and cucumber fruits, and from an avocado processing plant. *Foods*, 11(18), 2872.

- McLennan, M. K., Ringoir, D. D., Firdich, E., Svensson, S. L., Wells, D. H., Jarrell, H., Szymanski, C. M., and Gaynor, E. C. (2008). *Campylobacter jejuni* biofilms up-regulated in the absence of the stringent response utilize a calcofluor white-reactive polysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1097-1107.
- Mgomi, F. C., Yang, Y. R., Cheng, G., and Yang, Z. Q. (2023). Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. *Biofilm*, 5, 100118.
- Mgomi, F. C., Yuan, L., Wang, Y., Rao, S. Q., and Yang, Z. Q. (2022). Physiological properties, survivability and genomic characteristics of *Pediococcus pentosaceus* for application as a starter culture. *International Journal of Dairy Technology*, 75(3), 588-602.
- Mikkelsen, H., Duck, Z., Lilley, K. S., and Welch, M. (2007). Interrelationships between colonies, biofilms, and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2411-2416.
- Mishra, A., and Jha, B. (2013). Microbial Exopolysaccharides. In *The Prokaryotes*, 4th ed., vol. 11, E. Rosenberg, Ed. New York Dordrecht London, 179-192.
- Mohammed, Y. H. E., Manukumar, H. M., Rakesh, K. P., Karthik, C. S., Mallu, P., and Qin, H. L. (2018). Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development. *Microbial Pathogenesis*, 123, 339-347.
- Mokoena, M. P., Omatola, C. A., and Olaniran, A. O. (2021). Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. *Molecules*, 26(22), 7055.
- Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., and Arciola, C. R. (2011). Extracellular DNA in biofilms. *The International Journal of Artificial Organs*, 34(9), 824-831.
- Monteiro, G., Rossi, D., Valadares Jr, E., Peres, P., Braz, R., Notário, F., Gomes, M., Silva, R., Carrijo, K. and Fonseca, B. (2021). *Lactic bacterium* and *Bacillus* sp. biofilms can decrease the viability of *Salmonella gallinarum*, *Salmonella heidelberg*, *Campylobacter jejuni* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* on different substrates. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 23, 1408.
- Moradi, M., Molaei, R., and Guimarães, J. T. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 143, 109722.
- More, T. T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*, 144, 1-25.
- Moreno Osorio, J. H., Pollio, A., Frunzo, L., Lens, P. N. L., and Esposito, G. (2021). A review of microalgal biofilm technologies: Definition, applications, settings and analysis. *Frontiers in Chemical Engineering*, 3, 737710.

- Morozkina, S., Strekalovskaya, U., Vanina, A., Snetkov, P., Krasichkov, A., Polyakova, V., and Uspenskaya, M. (2022). The fabrication of alginate–carboxymethyl cellulose-based composites and drug release profiles. *Polymers*, 14(17), 3604.
- Mugwanda, K., Hamese, S., Van Zyl, W. F., Prinsloo, E., Du Plessis, M., Dicks, L. M., and Thimiri Govinda Raj, D. B. (2023). Recent advances in genetic tools for engineering probiotic lactic acid bacteria. *Bioscience Reports*, 43(1), BSR20211299.
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qui, J., Guan, X., and Huang, T. (2020). Beyond risk: Bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11, 928.
- Muhialdin, B. J., Saari, N. and Meor Hussin, A. S. (2020). Review on the biological detoxification of mycotoxins using lactic acid bacteria to enhance the sustainability of foods supply. *Molecules*, 25(11), 2655.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., Lewenza, S. (2008). Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 4(11), 1-12.
- Nachtigall, C., Surber, G., Herbi, F., Wefers, D., Jaros, D., and Rohm, H. (2020). Production and molecular structure of heteropolysaccharides from two lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 236, 116019.
- Naidoo, S., and Olaniran, A. O. (2014). Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(1), 249-270.
- Nami, Y., Panahi, B., Jalaly, H. M., Rostampour, M., and Hejazi, M. A. (2024). Probiotic characterization of lab isolated from sourdough and different traditional dairy products using biochemical, molecular and computational approaches. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6, 1-24. DOI: 10.1007/s12602-024-10234-2.
- Neves, A. R., Pool, W. A., Kok, J., Kuipers, O. P., and Santos, H. (2005). Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis*-the input from in vivo NMR. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 531-554.
- Nguyen, H. T., Razafindralambo, H., Blecker, C., N’Yapo, C., Thonart, P., and Delvigne, F. (2014). Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze–drying. *Biochemical Engineering Journal*, 88, 85-94.
- Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., and Nguyen, H. T. (2020). Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(4), 451.
- Nguyen, T. K. N., Van Duong, H., Nguyen, T. T., Dinh, M. T. N. and Nguyen, M. H. (2020). Characteristic of co-culture biofilm formed by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*, and antagonistic effects of this biofilm on pathogen growth. *Japan Journal of Food Engineering*, 21(2), 81-87.

- Niederle, M.V., Bosch, J., Ale, C.E., Nader-Macías, M.E., Aristimuño Ficooseco, C., Toledo, L.F., Valenzuela-Sánchez, A., Soto-Azat, C. and Pasteris, S.E. (2019). Skin-associated lactic acid bacteria from North American bullfrogs as potential control agents of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Plos One*, 14(9), e0223020.
- Nithya, C., and Pandian, S. K. (2010). The in vitro antibiofilm activity of selected marine bacterial culture supernatants against *Vibrio* spp. *Archives of Microbiology*, 192, 843-854.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions—A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62.
- Ohta, H., and Hattori, T. (1980). Bacteria sensitive to nutrient broth medium in terrestrial environments. *Soil Science and Plant Nutrition*, 26(1), 99-107.
- Okada, M., Sato, I., Cho, S. J., Iwata, H., Nishio, T., Dubnau, D., and Sakagami, Y. (2005). Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX. *Nature Chemical Biology*, 1(1), 23-24.
- Okshevsky, M., and Meyer, R. L. (2015). The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(3), 341-352.
- Okshevsky, M., Regina, V. R., and Meyer, R. L. (2015). Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 73-80.
- Pachekrepapol, U., Lucey, J. A., Gong, Y., Naran, R., and Azadi, P. (2017). Characterization of the chemical structures and physical properties of exopolysaccharides produced by various *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3424-3435.
- Padmanabhan, A., Tong, Y., Wu, Q., Zhang, J., and Shah, N. P. (2018). Transcriptomic insights into the growth phase-and sugar-associated changes in the exopolysaccharide production of a high EPS-producing *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1919.
- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., and Jermakow, K. J. A. M. (2020). Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 1871-1881.
- Panlilio, H., and Rice, C. V. (2021). The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(6), 2129-2141.
- Papenfort, K., and Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576-588.
- Parga, A., Manoil, D., Brundin, M., Otero, A., and Belibasakis, G. N. (2023). Gram-negative quorum sensing signalling enhances biofilm formation and virulence traits in gram-positive pathogen *Enterococcus faecalis*. *Journal of Oral Microbiology*, 15(1), 2208901.

- Parolin, C., Croatti, V., Laghi, L., Giordani, B., Tondi, M. R., De Gregorio, P. R., Foschi, C., and Vitali, B. (2021). *Lactobacillus* biofilms influence anti-Candida activity. *Frontiers in Microbiology*, 12, 750368.
- Peleg, M., and Corradini, M. G. (2011). Microbial growth curves: What the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(10), 917-945.
- Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H., and Williams, D. W. (2011). Introduction to biofilms. *Biofilms and Veterinary Medicine*, 41-68.
- Peterson, B. W., He, Y., Ren, Y., Zerdoum, A., Libera, M. R., Sharma, P. K., Van Winkelhoff, A. J., Neut, D., Stoodley, P., Van Der Mei, H. C., Busscher, H. J. (2015). Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 234-245.
- Pitts, B., Hamilton, M.A., Zelter, N. and Stewart, P.S. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, 54(2), 269-276.
- Pompilio, A., Kaya, E., Lupetti, V., Catelli, E., Bianchi, M., Maisetta, G. Di Bonaventura, G., and Batoni, G. (2024). Cell-free supernatants from *Lactobacillus* strains exert antibacterial, antibiofilm, and antivirulence activity against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Microbes and Infection*, 105301.
- Powell, L. C., Pritchard, M. F., Ferguson, E. L., Powell, K. A., Patel, S. U., Rye, P. D., Sakellakou, S. M., Buurma, N. J., Brilliant, C. D., Copping, J. M., Menzies, G. E., Lewis, P. D., Hill, K. E. and Thomas, D. W. (2018). Targeted disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate oligosaccharides. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 4(1), 13.
- Prazdnova, E. V., Gorovtsov, A. V., Vasilchenko, N. G., Kulikov, M. P., Statsenko, V. N., Bogdanova, A. A., Refeld, A. G., Brislavskiy, Y. A., Chistyakov, V. A., and Chikindas, M. L. (2022). Quorum-sensing inhibition by Gram-positive bacteria. *Microorganisms*, 10(2), 350.
- Prete, R., Alam, M. K., Perpetuini, G., Perla, C., Pittia, P., and Corsetti, A. (2021). Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: A sustainable tool for functional foods. *Foods*, 10(7), 1653.
- Quintana-Quirino, M., Morales-Osorio, C., Ramírez, G. V., Vázquez-Torres, H., and Shirai, K. (2019). Bacterial cellulose grows with a honeycomb geometry in a solid-state culture of *Gluconacetobacter xylinus* using polyurethane foam support. *Process Biochemistry*, 82, 1-9.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., and Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512.

- Rabiya, R., and Sen, R. (2022). Artificial intelligence driven advanced optimization strategy vis-à-vis response surface optimization of production medium: Bacterial exopolysaccharide production as a case-study. *Biochemical Engineering Journal*, 178, 108271.
- Rahnama Vosough, P., Habibi Najafi, M. B., Edalatian Dovom, M. R., Javadmanesh, A., and Mayo, B. (2021). Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of exopolysaccharide from *Enterococcus* strains isolated from traditional Iranian Kishk. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 5221-5230.
- Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Hayat, H. F., Hussain, N., Sarwar, S., Aslam, H., Nadeem, A. and Shi, J. (2019). Characterization, the antioxidant and antimicrobial activity of exopolysaccharide isolated from poultry origin *Lactobacilli*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 1132-1142.
- Rajoka, M. S. R., Wu, Y., Mehwish, H. M., Bansal, M., and Zhao, L. (2020). *Lactobacillus* exopolysaccharides: New perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. *Trends in Food Science & Technology*, 103, 36-48.
- Ramírez, M. D. F., Groot, M. N. N., Smid, E. J., Hols, P., Kleerebezem, M., and Abee, T. (2018). Role of cell surface composition and lysis in static biofilm formation by *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *International Journal of Food Microbiology*, 271, 15-23.
- Ramírez, M. D. F., Smid, E. J., Abee, T. and Groot, M. N. N. (2015). Characterisation of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 23-29.
- Ramirez-Mora, T., Retana-Lobo, C., and Valle-Bourrouet, G. (2018). Biochemical characterization of extracellular polymeric substances from endodontic biofilms. *PLoS One*, 13(11), e0204081.
- Rao, Y., Shang, W., Yang, Y., Zhou, R., and Rao, X. (2020). Fighting mixed-species microbial biofilms with cold atmospheric plasma. *Frontiers in Microbiology*, 11, 531825.
- Rappai, J., Beena, A., James, L. and Aparna, S. (2020). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from human milk. *The Pharma Innovation Journal*, 9(7), 383-388.
- Rashtchi, P., Tempelaars, M., van der Linden, E., Abee, T., and Habibi, M. (2022). *Lactobacillus plantarum* strains show diversity in biofilm formation under flow conditions. *Heliyon*, 8(12), e12602.
- Reichhardt, C., McCrate, O. A., Zhou, X., Lee, J., Thongsomboon, W., and Cegelski, L. (2016). Influence of the amyloid dye Congo red on curli, cellulose, and the extracellular matrix in *E. coli* during growth and matrix purification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 7709-7717.

- Ren, Y., Ji, Y., Teng, L., and Zhang, H. (2017). Using Raman spectroscopy and chemometrics to identify the growth phase of *Lactobacillus casei* Zhang during batch culture at the single-cell level. *Microbial Cell Factories*, 16, 1-10.
- Rendueles, O., Kaplan, J. B., and Ghigo, J. M. (2013). Antibiofilm polysaccharides. *Environmental Microbiology*, 15(2), 334-346.
- Renelli, M. (2003). *DNA-containing membrane vesicles of Pseudomonas aeruginosa PAO1 and their genetic transformation potential*. Doctoral Dissertation, University of Guelph.
- Resch, A., Rosenstein, R., Nerz, C., and Götz, F. (2005). Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2663-2676.
- Rezaei, Z., Khanzadi, S., and Salari, A. (2021). Biofilm formation and antagonistic activity of *Lactocaseibacillus rhamnosus* (PTCC1712) and *Lactiplantibacillus plantarum* (PTCC1745). *AMB Express*, 11, 1-7.
- Rezaei, Z., Salari, A., Khanzadi, S., Rhim, J. W., and Shamlou, E. (2023). Preparation of milk-based probiotic lactic acid bacteria biofilms: A new generation of probiotics. *Food Science & Nutrition*, 11(6), 2915-2924.
- Rollefson, J. B., Stephen, C. S., Tien, M., and Bond, D. R. (2011). Identification of an extracellular polysaccharide network essential for cytochrome anchoring and biofilm formation in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*, 193(5), 1023-1033.
- Romero-Luna, H. E., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., and Peredo-Lovillo, A. (2022). Bioactive peptides produced by engineered probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Food Chemistry: X*, 13, 100196.
- Roobab, U., Batool, Z., Manzoor, M. F., Shabbir, M. A., Khan, M. R., and Aadil, R. M. (2020). Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. *Current Opinion in Food Science*, 32, 17-28.
- Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Casaccia, M., Maggio, F., and Paparella, A. (2022). Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: An updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 2172-2191.
- Römling, U. (2023). Is biofilm formation intrinsic to the origin of life?. *Environmental Microbiology*, 25(1), 26-39.
- Ruas-Madiedo, P., and De Los Reyes-Gavilán, C. G. (2005). Invited review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 843-856.
- Ruijgrok, G., Wu, D. Y., Overkleeft, H. S., and Codée, J. D. (2024). Synthesis and application of bacterial exopolysaccharides. *Current Opinion in Chemical Biology*, 78, 102418.

- Rumbaugh, K. P., and Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571-586.
- Rutherford, S. T., and Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), a012427.
- Salas-Jara, M. J., Ilabaca, A., Vega, M., and García, A. (2016). Biofilm forming *Lactobacillus*: New challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, 4(3), 35.
- Sanalibaba, P., and Çakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology: Open Access*, 2(2), 1-5.
- Sánchez, J. I., Martínez, B., Guillén, R., Jiménez-Díaz, R., and Rodríguez, A. (2006). Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7495-7502.
- Sangwan, S., Pratibha, P., and Hemender, T. (2019). Anti-biofilm enzymes: A strategy to remove biofilms. *Agrobios Newsletter*, 17, 35-37.
- Sarikaya, H., Aslim, B., and Yuksekdog, Z. (2017). Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (l-EPSs) from *Lactobacilli* strains. *International Journal of Food Properties*, 20(2), 362-371.
- Sasikumar, K., Vaikkath, D. K., Devendra, L., and Nampoothiri, K. M. (2017). An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource Technology*, 241, 1152-1156.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., and Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., and De Vos, W. M. (2005). Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 204-211.
- Schlafer, S., Meyer, R. L., Dige, I., and Regina, V. R. (2017). Extracellular DNA contributes to dental biofilm stability. *Caries Research*, 51(4), 436-442.
- Schwibbert, K., Richter, A. M., Krüger, J., and Bonse, J. (2024). Laser-textured surfaces: A way to control biofilm formation?. *Laser & Photonics Reviews*, 18(1), 2300753.
- Seper, A., Fengler, V. H., Roier, S., Wolinski, H., Kohlwein, S. D., Bishop, A. L., Camilli, A., Reidl, J., and Schild, S. (2011). Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 82(4), 1015-1037.

- Shivaee, A., Rajabi, S., Farahani, H. E., and Fooladi, A. A. I. (2021). Effect of sub-lethal doses of nisin on *Staphylococcus aureus* toxin production and biofilm formation. *Toxicon*, 197, 1-5.
- Shukla, S. K., Rao, T. S. 2017. An improved crystal violet assay for biofilm quantification in 96-well microtitre plate. *Biorxiv*, 100214.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., and Azeredo, J. (2009). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: Quantification, structure and matrix composition. *Sabouraudia*, 47(7), 681-689.
- Silverstein, A., and Donatucci, C. F. (2003). Bacterial biofilms and implantable prosthetic devices. *International Journal of Impotence Research*, 15(5), 150-154.
- Smirnova, T. A., Didenko, L. V., Azizbekyan, R. R., and Romanova, Y. M. (2010). Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Microbiology*, 79, 413-423.
- Solano, C., Echeverez, M., and Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 96-104.
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., and Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: Critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43(3), 793-808.
- Soliamani, O., Salimi, F., and Rezaei, A. (2022). Characterization of exopolysaccharide produced by probiotic *Enterococcus durans* DU1 and evaluation of its anti-biofilm activity. *Archives of Microbiology*, 204(7), 419.
- Song, H., Lou, N., Liu, J., Xiang, H., and Shang, D. (2021). Label-free quantitative proteomic analysis of the inhibition effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on *Escherichia coli* biofilm formation in co-culture. *Proteome Science*, 19, 1-14.
- Song, Y., Sun, M., Feng, L., Liang, X., Song, X., Mu, G., Tuo, Y., Jiang, S. and Qian, F. (2020). Antibiofilm activity of *Lactobacillus plantarum* 12 exopolysaccharides against *Shigella flexneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(15), e00694-20.
- Söderling, E. M., Marttinen, A. M., and Haukioja, A. L. (2011). Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. *Current Microbiology*, 62, 618-622.
- Srinivash, M., Krishnamoorthi, R., Mahalingam, P. U., Malaikozhundan, B., and Keerthivasan, M. (2023). Probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from homemade fermented food products. *Journal of Agriculture and Food Research*, 11, 100517.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B. and Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.

- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I. and Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899.
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107-113.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 187-209.
- Sun, L., Zhang, Y., Guo, X., Zhang, L., Zhang, W., Man, C., and Jiang, Y. (2020). Characterization and transcriptomic basis of biofilm formation by *Lactobacillus plantarum* J26 isolated from traditional fermented dairy products. *LWT*, 125, 109333.
- Tan, L., Fu, J., Feng, F., Liu, X., Cui, Z., Li, B., Han, Y., Zheng, Y., Yeung, K. W. K., Li, Z., Zhu, S., Liang, Y., Feng, X., Wang, X., Wang, X., and Wu, S. (2020). Engineered probiotics biofilm enhances osseointegration via immunoregulation and anti-infection. *Science Advances*, 6(46), eaba5723.
- Tao, J., Huang, X., Ling, F., Yu, B., Zhou, X., Shen, Q., and Sagratini, G. (2022). Immobilization of lactic acid bacteria for production of extracellular polysaccharides. *Food Science and Technology*, 42(11), 1-8.
- Tarannum, N., Ali, F., Khan, M. S., Alhumaidan, O. S., Zawad, A. S., and Hossain, T. J. (2024). Bioactive exopolysaccharide from *Limosilactobacillus fermentum* LAB-1: Antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial and antibiofilm properties. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 31, 100409.
- Tatsaporn, T., and Kornkanok, K. (2020). Using potential lactic acid bacteria biofilms and their compounds to control biofilms of foodborne pathogens. *Biotechnology Reports*, 26, e00477.
- Tenke, P., Kovacs, B., Jäckel, M., and Nagy, E. (2006). The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urology*, 24(1), 13-20.
- Terraf, M. L., Juárez Tomás, M. S., Nader-Macías, M. E. F., and Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology*, 113(6), 1517-1529.
- Thomas, J. G., and Nakaishi, L. A. (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *The Journal of The American Dental Association*, 137, 10-15.
- Thomas, V. C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J., and Hancock, L. E. (2009). A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, 72(4), 1022-1036.
- Thomas, V. C., Thurlow, L. R., Boyle, D., and Hancock, L. E. (2008). Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 190(16), 5690-5698.

- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., and Aronsson, A. C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8, 49.
- Tiwari, O. N., Sasmal, S., Kataria, A. K., and Devi, I. (2020). Application of microbial extracellular carbohydrate polymeric substances in food and allied industries. 3 *Biotech*, 10, 1-17.
- Tomé, A. R., Carvalho, F. M., Teixeira-Santos, R., Burmølle, M., Mergulhão, F. J., and Gomes, L. C. (2023). Use of probiotics to control biofilm formation in food industries. *Antibiotics*, 12(4), 754.
- Torino, M. I., Font de Valdez, G., and Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 6, 145969.
- Tsuda, H. and Miyamoto, T. (2010). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Science and Technology Research*, 16(1), 87-92.
- Tukenmez, U., Aktas, B., Aslim, B., and Yavuz, S. (2019). The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells *in vitro*. *Scientific Reports*, 9(1), 1-14.
- Türetgen, İ. (2005). *Su sistemlerinde mikrobiyal biyofilm oluşumunun incelenmesi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 17.
- Ullah, M. W., Manan, S., Kiprono, S. J., Ul-Islam, M., and Yang, G. (2019). Synthesis, structure, and properties of bacterial cellulose. *Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Materials*, 4, 81-113.
- Valdés-Varela, L., Hernandez-Barranco, A. M., Ruas-Madiedo, P., and Gueimonde, M. (2016). Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* growth and toxicity when co-cultured in different prebiotic substrates. *Frontiers in Microbiology*, 7, 738.
- Van Ba, H., Seo, H. W., Seong, P. N., Kang, S. M., Cho, S. H., Kim, Y. S., Park, B. Y., Moon, S. S., Kang, S. J., Choi, Y. M., and Kim, J. H. (2019). The fates of microbial populations on pig carcasses during slaughtering process, on retail cuts after slaughter, and intervention efficiency of lactic acid spraying. *International Journal of Food Microbiology*, 294, 10-17.
- Van Hijum, S. A., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., and Van Geel-Schutten, I. G. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 157-176.
- Vélez, M. P., Petrova, M. I., Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Claes, I., Lambrichts, I., Soile, T., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. (2010). Characterization of MabA, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 386-398.

- Verderosa, A. D., Totsika, M., and Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial biofilm eradication agents: A current review. *Frontiers in Chemistry*, 7, 495483.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., and Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 377-410.
- Vilain, S., Pretorius, J. M., Theron, J., and Brözel, V. S. (2009). DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2861-2868.
- Vlassov, V. V., Laktionov, P. P., Rykova, E. Y. (2007). Extracellular nucleic acids, *Bioessays*, 29(7), 654-667.
- Vurmaz, M., Sahin, E. ve Dertli, E. (2019). Potential health promoting functions of exopolysaccharides (EPS) from lactic acid bacteria (LAB). *3rd International Conference on Advanced Engineering Technologies*. Bayburt: Bayburt University, 1379–1382.
- Walker, J. T., Surman, S., and Jass, J. (2000). *Industrial biofouling: Detection, prevention, and control* (pp. 1-12). New York: Wiley.
- Wang, J., Li, G., Yin, H., and An, T. (2020). Bacterial response mechanism during biofilm growth on different metal material substrates: EPS characteristics, oxidative stress and molecular regulatory network analysis. *Environmental Research*, 185, 109451.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., and Yang, Z. (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 119-126.
- Wang, L., Fan, D., Chen, W., and Terentjev, E. M. (2015). Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific Reports*, 5(1), 15159.
- Wang, M., Zhou, W., Yang, Y., Xing, J., Xu, X., and Lin, Y. (2021). Potential prebiotic properties of exopolysaccharides produced by a novel *Lactobacillus* strain, *Lactobacillus pentosus* YY-112. *Food & Function*, 12(19), 9456-9465.
- Wanna, W., Surachat, K., Kaitimonchai, P., and Phongdara, A. (2021). Evaluation of probiotic characteristics and whole genome analysis of *Pediococcus pentosaceus* MR001 for use as probiotic bacteria in shrimp aquaculture. *Scientific Reports*, 11(1), 18334.
- Wei, D. I., Zhang, Y. C., Hua-Xi, Y. I., Xue, H. A. N., Shu-Mei, W. A. N. G., and Zhang, L. W. (2018). Research methods for structural analysis of lactic acid bacteria induced exopolysaccharides. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 46(6), 875-882.
- Welman, A. D., and Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269-274.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., and Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487-1487.

- Williams, P., and Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: A tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 182-191.
- Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R., and Lewenza, S. (2016). Extracellular DNA acidifies biofilms and induces aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), 544-553.
- Winkelströter, L. K., Teixeira, F. B. dos R., Silva, E. P., Alves, V. F. and De Martinis, E. C. P. (2013). Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microbial Ecology*, 68(1), 35-46.
- Wood, P. J., Erfle, J. D., and Teather, R. M. (1988). Use of complex formation between congo red and polysaccharides in detection and assay of polysaccharide hydrolases. In *Methods in Enzymology*, 160, 59-74.
- Xiao, Y., Zou, H., Li, J., Song, T., Lv, W., Wang, W., Wang, Z., and Tao, S. (2022). Impact of quorum sensing signaling molecules in gram-negative bacteria on host cells: Current understanding and future perspectives. *Gut Microbes*, 14(1), 2039048.
- Xu, X., Peng, Q., Zhang, Y., Tian, D., Zhang, P., Huang, Y., Ma, L., Qiao, Y., and Shi, B. (2020). A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties in vitro. *Food & Nutrition Research*, 64, 1-13.
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., and Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8, 1-14.
- Yang, X., Ke, C., and Li, L. (2021). Physicochemical, rheological and digestive characteristics of soy protein isolate gel induced by lactic acid bacteria. *Journal of Food Engineering*, 292, 110243.
- Yao, C., Li, J., Jingjing, E., Wang, R., Zhang, Q. and Wang, J. (2022). The symbiosis among, and the storage stabilities of, starter lactic acid bacterial strains in biofilms. *LWT- Food Science and Technology*, 155, 112896.
- Yaron, S., Kolling, G. L., Simon, L., and Matthews, K. R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157: H7 to other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4414-4420.
- Yates, G. T., and Smotzer, T. (2007). On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. *Journal of Theoretical Biology*, 244(3), 511-517.
- Yi, L., Qi, T., Hong, Y., Deng, L., and Zeng, K. (2020). Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in Chinese homemade pickle and dry-cured meat, and bacteriocin identification by genome sequencing. *LWT-Food Science and Technology*, 125, 109177.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L., and He, J. (2019). Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3423.

- Yu, L., Xu, S., Deng, C., Li, H., Yang, Q., Xu, Z., and Chen, J. (2016). Preparation and partial structural characterization of the exopolysaccharide from *Bacillus mucilaginosus* SM-01. *Carbohydrate Polymers*, 146, 217-223.
- Yuan, L., Hansen, M. F., Røder, H. L., Wang, N., Burmølle, M. and He, G. (2020). Mixed-species biofilms in the food industry: current knowledge and novel control strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(13), 2277-2293.
- Yuksekdag, Z. N., and Aslim, B. (2008). Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51, 581-585.
- Yuksekdag, Z. N., Sahin, N., and Aslim, B. (2014). In vitro evaluation of the suitability potential probiotic of lactobacilli isolates from the gastrointestinal tract of chicken. *European Food Research and Technology*, 239, 313-320.
- Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., and Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1121-1135.
- Zapaśnik, A., Sokołowska, B., and Bryła, M. (2022). Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods*, 11(9), 1283.
- Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M., Øregaard, G., and Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: From genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), 168-200.
- Zhang, C., Yu, Z., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., and Chen, W. (2019). Colonization and probiotic function of *Bifidobacterium longum*. *Journal of Functional Foods*, 53, 157-165.
- Zhang, M., Che, Y., and Wu, C. (2022). A novel exopolysaccharide produced by *Zygosaccharomyces rouxii* with cryoprotective and freeze-drying protective activities. *Food Chemistry*, 392, 133304.
- Zhao, A., Sun, J., and Liu, Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1137947.
- Zhou, L., Zhang, Y., and Zhu, X. (2020). Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 11, 589640.
- Zhou, Y., Cui, Y., and Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers*, 207, 317-332.
- ZoBell, C. E., and Allen, E. C. (1935). The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of Bacteriology*, 29(3), 239-251.

- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W. and Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1452-1463.
- Zou, M., and Liu, D. (2020). Effects of carbon sources and temperature on the formation and structural characteristics of food-related *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Food Science and Human Wellness*, 9(4), 370-376.







Gazili olmak ayrıcalıktır