

BİYOFİLM KONTROLÜNDE BİYOSİTLER VE ETKİ TARZLARI

Nur Ceyhan Güvensen¹, Selma Ekmekcioğlu

Özet

Mikrobiyel hücrelerin dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu makroskobik olarak opak yapıda, koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz, giderilmesi güç olan yapıya biyofilm denir. Abiyotik biyofilmlerin kontrol yöntemlerinin başında dezenfeksiyon uygulamalarından olan biyositler gelir. Biyositler endüstriyel birçok alanda olmak üzere besin maddeleri, tekstil ürünleri, yapı malzemeleri, petrol ürünlerinde mikrobiyel gelişimi kontrol etmek için kullanılırlar. Yoğun biyosit kullanımı ile bakterilerin bunlara direnç geliştirebildikleri günümüzde bilinen bir gerçektir. Ancak birçok ortamın biyositlerle mikroorganizmalardan arındırılması ise yeni birçok enfeksiyonun ortaya çıkmasını önleyebilmektedir. Doğru biyositlerle ve doğru uygulamalarla ortam ve malzemelerin dezenfekte edilmesi bu tip birçok enfeksiyonun ortaya çıkmasını önleyebilecektir. Bu çalışmada, biyofilm kontrolünde kullanılan etkin biyosit çeşitleri ve bunların biyofilmleri giderim mekanizmaları sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, Biyofilm kontrolü, Biyositler, Quorum Sensing

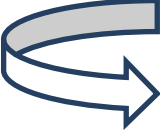

GİRİŞ

Günümüze kadar biyofilm birçok araştırmacı tarafından farklı şekillerde tanımlanmıştır. İlk 17. YY'da Leewenhoek'in dışından almış olduğu örnekte plaklar içinde yaşayan mikroorganizmalardan bahsetmesinden sonra, 1978 yılına kadar biyofilmin varlığından bahsedilmemiştir. Burada bakterilerin büyük bir kısmının "biyofilm" adı verilen besleyici bir oluşum içinde olduğu ve bakterinin yapışmış yüzeyi ile yüzen taraf arasında farklılık olduğu gösterilmiştir (1). Daha sonra yapılan mikroskobik gözlemlerde bakterilerin tabiattaki sıvısal ekosistemlerde farklı yüzeylere yapışarak çoğalması %99,9 biyofilm aracılığı ile olduğu gösterilmiştir. Artık günümüzde yeraltı suları ve okyanusların derinlikleri hariç biyofilmin tüm tabii ekosistemde oluşabildiği kabul edilmektedir (1).

Biyofilm birikimi birbirini izleyen fiziksel, kimyasal ve biyolojik proseslerin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Tablo 1).

¹ Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: nurceyhan@mu.edu.tr.

Tablo 1. Biyofilmin gelişim aşamaları (Kaynak 2'den derlenmiştir).

Zaman			
Saniyeler	İlk tutunma		Yeni biyofilm oluşumunun başlaması
Saniyeler/dakikalar	Hücre tabakası		
Saatler/günler	Aktif biyofilm	Hidrodinamikler ve/veya mekanik stres	
	 Olgun biyofilm	Biyomasın yapı, yüzeysel şekli ve uzaysal dağılımı	
Günler/haftalar	 Biyofilm büyümesi	Hareketlilik Kemotaksis	
	Aktif dönüşüm ve/veya biyoparçalanma	Yatay gen transferi Sıvıya veya sıvıdan çözülmüş madde transferi	
	Biyofilm kopmaları		Hücre kopması ve kaybı

Bakteriler değişik yüzeylere tutunabilirler; bu yüzeyler arasında canlı dokular, doğal deliklerden vücut içi uygulanan medikal cihazlar, endüstriyel ve içilebilir su sistemleri, doğal su sistemleri yer alır (3, 4). Mikroorganizmaların farklı popülasyonlarla fonksiyonel dayanışmaya girerek tutunmuş besinleri daha kolay elde etmesi ve ekstrasellüler polimerik bileşiklerin antimikrobiyel madde uygulamaları, susuz ve besinsiz kalma gibi kötü çevresel koşullara karşı koruyucu bir örtü ödevi görmesi yönleri ile biyofilm, mikroorganizmaların uzun dönem hayatta kalması için önemli bir avantajdır (5-10).

Biyofilm bakterileri, çevre koşullarına serbest bulunan planktonik bakterilerden daha dirençlidirler. Biyofilm yapısı inhibitör etkisi olan antimikrobiyeller, dezenfektanlar ve ısıya karşı koruyucu özellik gösterir. EPS (extracellular polymeric substances)'nin direnci artırdığı düşüncesi yaygındır (11,12).

Biyofilmin planktonik bakteriden üstünlükleri dört madde altında toplanmıştır. Bunlar sırasıyla (4):

1. EPS çevreden besin maddelerini (C - N - PO₄ gibi) konsantre ederek bakterilerin kullanımına sunar.

2. Biyofilm oluşumunda bulunan bakteriler antimikrobiyel maddeler, yüzey gerilimi değiştiren ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı dirençlilik geliştirirler. Bu direnç, gelişimin durdurulup canlılığın korunmasından, genetik düzenleme ile yukarı ya da aşağıya doğru düzenleme ile modifikasyona kadar değişen reaksiyonlar halinde gözlemlenir.

3. Tabakalı dizilim sonucu yüzeyde bulunan çeşitli bakteriler mekanik kalkan etkilerinin yanı sıra; katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılayarak antimikrobiyellere karşı iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar.

4. Biyofilm parçaları koparak yeni yüzeylere yayılır. Planktonik bir hücrenin tutunmasından daha kolay bir tutunma gerçekleştirirler.

Bakterilerin biyofilm oluşturan formları ile planktonik formu arasında ciddi bir gelişme gerilimi olmasına karşın bakterinin biyofilm oluşturmalarını gerektiren durumlar vardır. Bunlar:

1. Savunma: Strese cevap olarak gelişir. Biyofilmin kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi bir takım fiziksel güçlere karşı dayanıklılığı vardır. Biyofilme sahip organizmalar, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Bu nedenle biyofilm endüstriyel alanda bu özelliği kazandıran önemli bir faktör olarak bilinmektedir. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan exopolisakkaritler (EPS) savunmada önemli rol oynayan moleküldür. EPS bulunduğu bakteriyi güç alanlarından (elektrik çekimi) uzaklaştırarak inflamatuvar hücrelerin fagositozundan korurlar (13). Antibiyotik etkisinden de bakteriyi korurlar (14). Çevreden almış olduğu sinyaller sonucunda tehlikede olduğunu algılayan bakteri mevcut genler ile biyofilm oluşturarak kendini koruma altına almaktadır.

2. Adhezyon ve Kolonizasyon: Yaşam için gerekli ortamda kalabilmenin en bilinen yolu biyofilm oluşturmaktır. İnsan ve hayvanlar mikroorganizmaların süregelen bir şekilde vücutlarında bulunmaları sayesinde bilinen karmaşık immün sistemlerini geliştirirler. Vücudun en azından bir bölümünü bakterinin yaşama ve gelişmesi için besinden zengin ve su içeriği, O₂ olanağı ve ısı gibi ortamda devamlı bulunan birtakım (besin, su, O₂, ısı vs.) faktörlerle sabit bir yapı oluşturmaktadır. Tüm bunların sonucu vücudun immün sistemi ile bakteri arasında vücudu istila etmesine karşı amansız bir yarış süregitmektedir. Bazı durumlarda uzlaşma olarak belli bölgelerde büyük miktarlarda kommensal bakterilerin yaşamasına müsaade edilmektedir ve bu bakterilerin çoğu biyofilm oluşturmaktadırlar. Vücut, bilindiği gibi bakterilerin yaşaması için çekici bir ortam olup, bakterinin bu bölgede biyofilm oluşturarak yaşaması için primer bir motivasyon oluşturmaktadır. Bakterinin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmesini sağlamak için bir takım stratejileri vardır. Bakteri yüzey proteinleri, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstraselüller matriks proteinlerine yapışırlar. Bu adhesin ve matriks proteinleri konakçı ile bakterinin adheransında anahtar rol oynarlar ⁽¹⁵⁾. Adherans sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar. İlginçtir ki biyofilm bakterinin adheransını artırırken, biyofilm oluşumunun başlaması ile birlikte bakteri adhezyon ve motilite faktörlerinin ekspresyonunda da bir baskılama olmaktadır(16-19) (Tablo 2).

Tablo 2. Biyofilm üreten bazı bakterilerde belirli bir davranış için gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan çeşitli faktörler (20,21).

Gen	Protein/fonksiyon	Regülasyon	Tür
Adhezyon			
algC	Alginat sentez	↑	<i>P. aeruginosa</i>
wcaB	Kolanik asit sentezi	↑	<i>E. coli</i>
csgA	Curli	↑	<i>E. coli</i>
clfA	Kümelenme faktörü/fibrinojen bağlama	↓	<i>S. aureus</i>
scaA	CK-agregasyon	↓	<i>S. gordonii</i>
abpA	Amilaz bağlama	↓	<i>S. gordonii</i>
rggD	Glucosyltransferaz indükleyici	↑	<i>S. gordonii</i>
int/CoA	Intrajenerik ko-agregasyonla-ilişkili adhezin	↓	<i>S. gordonii</i>
flpA	Fibronektin-bağlama	↓	<i>S. gordonii</i>
has	Streptokokkal hemagglutinin	↓	<i>S. gordonii</i>
Quorum sensing			
pA4296	Regülatör	↓	<i>P. aeruginosa</i>
comD,E	Yeterlilik faktörleri	↑	<i>S. mutans</i>
Hücre duvarı			
mreC	Hücre morfolojisi	↑	<i>P. aeruginosa</i>
dltA	D-Alanin-D-Alanyl taşıyıcısı	↓	<i>S. gordonii</i>
ddl	D-Alanin: D-Alanin ligaz	↓	<i>S. gordonii</i>
Stres cevabı			
rpoH	Stres/sabit faz s faktörü	↑	<i>P. aeruginosa</i>
rpoS	Isı flok s faktörü	↓	<i>P. aeruginosa</i>
proU	Transport-osmotik adaptasyon DnaK: Protein katlama (Isı flok) Grpe: katlama (Isı flok) 60 kDa şaperon: Isı flok	↑ ↑ ↑ ↓	<i>E. coli</i> <i>S. mutans</i> <i>S. mutans</i> <i>S. mutans</i>
htgX	Putatif ısı flok proteini	↓	<i>S. gordonii</i>
Karbonhidrat metabolizması			
	Fruktoz bisfosfat aldolaz	↓	<i>S. mutans</i>
	Prüvat kinaz	↓	<i>S. mutans</i>
	6-Phospho-B-galaktosidaz	↓	<i>S. mutans</i>
pbg	Phospho-b-glukosidaz	↑	<i>S. gordonii</i>
P02925	D-ribose-bağlı periplazmik protein	↑	<i>E. coli</i>
Q6150	Malat dehidrogenaz	↑	<i>E. coli</i>
Bölünme			
	minicell associated protein Div IVA: Hücre bölünmesi	↑	<i>S. mutans</i>
	FTSZ: septum oluşumu	↑	<i>S. mutans</i>
	ATP-bağımlı DNA helikaz RECG: DNA replikasyonu	↓	<i>S. mutans</i>
	H-NS: DNA bağlanma	↑	<i>S. mutans</i>
Hareketlilik			
PA2128	Olası fimbrial protein	↓	<i>P. aeruginosa</i>
pilA	Pili protein	↓	<i>P. aeruginosa</i>
flgD	Flagellar basal-yapı modifikasyon proteini	↓	<i>P. aeruginosa</i>

PA1092	Flagellin tip B	↓	<i>P. aeruginosa</i>
fliD	Flagellar protein (örtü)	↓	<i>P. aeruginosa</i>
flgE	Flagellar protein (çengel)	↓	<i>P. aeruginosa</i>
fliC	Flagella sentezi	↓	<i>E. coli</i>
Faj	Pf1 bakteriofajının kılıf proteini	↑	<i>P. aeruginosa</i>
	Pf1 bakteriofajının Helix destabilize edici proteini	↑	<i>P. aeruginosa</i>
	Pf1 bakteriofajının olası kılıf proteini	↑	<i>P. aeruginosa</i>

3. Yaşanabilir çevre geliştirme: Özellikle ortamdaki glukozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının Pseudomonaslar, *V. cholerae*, *E. coli* ve Stafilkoklar'ın EPS ekspresyonu ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde arttırdığını gösterilmiştir. Karbon katabolitlerinin konakçıda yapışmış bakterinin gen regülasyonunu indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynaması (Tablo 3), bakterinin konakçıda uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmalar için biyofilm gerekliliği hipotezini ciddi bir şekilde desteklemektedir(22-24).

Tablo 3. Bazı bakterilerde biyofilm oluşumunda rol oynayan genler ve spesifik fonksiyonları .(18-20)

Gen	Protein/ fonksiyon	Tür
Adhezyon		
abpA	Amilaza bağlanma	<i>S. gordonii</i>
sspA/B	İnsan tükürük proteini ve kollejene bağlanma	<i>S. gordonii</i>
gbpA	Polisakkarit oluşturma	<i>S. mutans</i>
tarC	Glucosyltransferaz S in regülatörü ve glukan bağlayan protein	<i>S. mutans</i>
icaADBC	Intercellular adhesin sentezi	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
hla	Hemolitik toksin	<i>S. aureus</i>
clfA	Kümeleşme faktörü A (CFA), fibrinojen ba.layan protein	<i>S. aureus</i>
dltA	Teikoik asidin D-alanine esterifikasyonu	<i>S. aureus</i>
atlE	Otolizin/adhezin	<i>S. epidermidis</i>
aap	Akümüasyon ilişkili protein	<i>S. epidermidis</i>
bopABCD	Plastik yüzey operonları üzerindeki biofilm	<i>E. faecalis</i>
esp	Enterokokkal yüzey proteini	<i>E. faecalis</i>
agn43	Agregasyonda yer alan antijen proteini	<i>E. coli</i>
Quorum sensing		
comX	Yeterlilik	<i>S. gordonii</i>
comABCDE	Yeterlilik	<i>S. mutans</i>
luxS?	Quorum sensing	<i>S. mutans</i>
lasI	3OC12-HSL quorum-sensing sinyalinin sentezlenmesi	<i>P. aeruginosa</i>
Hücre Duvarı		
PBP2B	Peptidoglikan sentezi	<i>S. gordonii</i>

PBP5	Peptidoglikan sentezi	<i>S. gordonii</i>
glmM	Peptidoglikan sentezi	<i>S. gordonii</i>
bacA	Peptidoglikan sentezi	<i>S. gordonii</i>
brpA	Otolizin muhtemel düzenleyicisi	<i>S. mutans</i>
Metabolizma		
ccpA	Karbon katabolit kontrol proteini	<i>S. mutans</i>
crc	Global karbon metabolizma regülatörü	<i>P. aeruginosa</i>
Stress cevabı		
dgk	Stress cevap regülatör, antibiyotik regülatörü	<i>S. mutans</i>
σ^B ?	Sigma faktör-stress cevabını değiştirmek	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
purR	Purin sentezi ve metabolizmasının regülasyonu	<i>S. epidermidis</i>
rpoS?	Yavaş büyümenin regülasyonu	<i>E. coli</i>
mutT	DNA'nın yanlış eşleşmesinin onarımı	<i>S. gordonii</i>
Plasmid		
tra	F plazmidin konjugatif pilusu	<i>E. coli</i>

4. Kommünite oluşturmak: Bakterilerin ortama adaptasyonundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturdukları gibi ortamdan aldıkları uyaranlar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla da planktonik hale geçebilmektedirler. Böylece bu uyum ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri kominal yaşamlarının en önemli göstergesidir.

BİYOFİLM ZARARLARI VE KONTROLÜ

Biyofilmlerin başlıca zararlı etkileri biyofauling, korozyon, hidrasyon ve penetrasyon ile renk değişimidir. Suyula ilişkili sistemlerinde biyofilm oluşumları sudaki mikroorganizma sayısını belirgin derecede arttıran bir rezervuar gibi çalışmaya başlar. Bu mikrobiyel birikim bazen kötü koku oluşturabilir ve sistemden çıkan suda biyofilm materyalinin küçük partikülleri gözle görülebilir. Biyofilmden kopmalar, enfeksiyonların yayılması ve su sistemlerinin uzak bölgelerinin kontaminasyonunda klinik ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır(12, 26). Mikrobiyel enfeksiyonlar yanında biyofilmler birçok endüstriyel üretimde ürün kontaminasyonu ve bozulması, ekipman hasarı, üretimde düşüşler ve artan enerji giderlerinden dolayı milyarlarca-trilyonlarca lira kayıplara yol açarlar. Biyofilm kontaminasyonu ve kirliliği hemen hemen tüm su arıtımı ve dağıtımındaki su ilişkili endüstriyel proseslerde sıkça oluşmaktadır (27).

Biyofilmlerin tıbbi, endüstriyel, çevresel ve tarımsal alanda verdiği başlıca zararlar tablo 4 ve 5'te verilmiştir.

Belirtilen çoğu zarar verici biyofilmi temizlemek için belirgin sistemlere uygulanabilen bazı teknikler vardır (31, 32). Bunlar arasında;

- Mekanik temizleme,
- Antimikrobiyel ajanların kullanımı,
- Önemli besinlerin kaldırılması ile biyofilm gelişimini engellemek,
- Mikrobiyel yapışmaları engellemek ve
- Biyokütle çıkarımının desteklenmesi bulunmaktadır.

Tablo 4. Biyofilmlerle ilişkili tıbbi enfeksiyonlar (13, 28, 29).

Enfeksiyon veya hastalık	Etken Mikroorganizmalar
Dental plaklar (diş çürüğü, dişeti iltihapları)	Asidojenik gr (+) koklar (<i>Streptococcus sanguis vb.</i>)
Periodontitis	Gr (-) anaerobik ağız bakterileri (<i>Protovella intermedia, Actinobacillus</i>), <i>Candida albicans</i>
İnatçı enfeksiyonlar	
Otitis media	Non-tipik <i>Haemophilus influenzae</i>
Kaslar, iskelet enfeksiyonları	Gr (+) koklar (<i>Staphylococcus sp.</i>)
Safra yolu enfeksiyonları	Bağırsak bakterileri (<i>Escherichia coli vb.</i>)
Osteomyelitis	Çeşitli bakteriyel ve fungal türler-genelde karışık olarak
Enfeksiyöz böbrek taşları	Gr (-) basiller
Kronik tonsillit	Değişik türler
Kistik fibrozis pnömonisi	<i>P.aeruginosa</i> ve <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>P. pseudomallei</i>
Bakteriyal prostat	<i>E. coli</i> ve diğer gr (-) bakteriler
Nektorizan fasiit	Grup A streptokoklar
Gastrointestinal ve bilier traktus enfeksiyonu	<i>E. coli</i> gibi bağırsak bakterileri
İmplant kaynaklı enfeksiyonlar	
Yapay kalp kapakçığı (endokarditis, septisemi)	<i>S.epidermidis, S.sanguis, S.aureus</i> (koagülaz (-) <i>Staphylococcus sp.</i>)
Kontakt lensler (keratitis)	<i>P. aeruginosa, S. epidermidis</i> (gr(+) koklar)
Üriner kateter enfeksiyonları (bakteriüri)	<i>E.coli, P.aeruginosa, E.faecalis, Proteus mirabilis, Candida sp.</i>
İntravasküler kateterler (septisemi, endokarditis)	<i>S. epidermidis, S. aureus</i> , Gr(-) bakteriler
Merkezi venöz kateterler (septisemi)	<i>S.epidermidis</i> ve diğerleri (koagülaz (-) <i>Staphylococcus sp.</i>), <i>Enterococcus sp.</i> , <i>Klebsiella pneumoniae, P.aeruginosa, C.albicans</i>
Hickman kateterleri (kontaminasyon, borularda tıkanma)	<i>S. epidermidis, C. Albicans</i>
Kırık, çıkıklarda yerleştirilen platin vb. ortopedik aletler (septisemi)	<i>S. epidermidis, S. aureus, Peptokoklar, Streptokoklar</i> , Gr (-) bakteriler, <i>Propionibacterium acnes</i>
ICU pnömoni	Gr (-) basiller
IDUs	<i>Actinomyces israelii</i> ve diğerleri
Endotrakeal tüpler (pnömoni)	<i>P. aeruginosa, E. coli, S. epidermidis, S. aureus</i> , geniş bir bakteri ve fungus çeşitliliği
Yapay ses telleri	<i>Streptococcus sp., Staphylococcus sp., Candida sp.</i>
Peritoneal dializ (CAPD) peritonitisi	Çeşitli türler
Penis protezleri	<i>S.epidermidis, S aureus</i>

Tablo 5. Başlıca endüstriyel, çevresel ve tarımsal biyofilm zararları (4, 10, 30).

Sistem	Biyofilm Zararları
Endüstriyel ve çevresel	
Soğutma suyu kuleleri	Isı ve yoğunluk iletiminin azalması, verimde düşüş, biyofauling
Isı deęiřtirciler - Vantilatör sistemleri	Isı iletiminin azalması, sağlık sorunları
Kağıt ve kağıt hamuru tesisleri	Ürün kalitesinde ve verimde düşüş, biyofauling
Gıdaların işlenmesi	Kontaminasyonlar, sağlık sorunları, Ekipman hasarları, üretimde düşüş
Metal işçilięi	Metal işçiliği sıvısının degradasyonu
Madencilik	Madenlerin lięinginde biyofauling
Fotoğrafçılık	Hatalı basımlar, makina hasarları
Reverse osmosis	Membran geçirgenlięinin azalması, materyal degradasyonu
Yüzme havuzları	Sağlık sorunları
Lavabo, tuvalet vb. boruları, drenaj sistemleri	Akış hızında azalma, kontaminasyonlar
Klozetler	Kozmetik degradasyonu
Proses ekipmanları	Korozyon ve biyodeteriorasyon
Enerji santralleri kondansatörleri	Isı transfer dayanıklılığında artıştan dolayı enerji kayıpları
Petrol ve gaz drenajları, boru hatları	Su enjeksiyon kuyularının tıkanması, ekşime (H ₂ S üretimi), korozyon
İçme suyu boruları - Su dağıtım sistemleri	Sağlık sorunları, kontaminasyonlar, kötü koku, kötü lezzet, bulanıklılık, biyofauling, tıkanıklık
Gemi gövdeleri	Sıvı sürtünmesine duyarlılığın artışı nedeniyle güç kayıpları ve yüksek maliyet
Tarımsal	
Üzümler ve turunçgiller	Pierce's hastalığı
Patatesler	Halka-kök hastalığı
Sięirler	Mastitis

Mekanik temizleme ve antimikrobiyel ajanlar olarak biyositler en çok kullanılan yöntemlerdir. Mekanik temizleme pahalı olabilir, çünkü genelde alet kullanımı ve ciddi miktarda iş gücü gerektirir. Kirlenmiş bölgeye ulaşılamaması gibi bazı durumlarda da kullanılamaz. Biyosit ve dezenfektanların kullanımı, biyofilmdeki mikroorganizmaların antimikrobiyel ajanlara karşı direnç oluşturması durumunda etkisiz kalabilir (32, 33). Biyofilmin gerekli besinlerden mahrum bırakılması yoluyla temizlenmesi ve bu stratejinin etkinliğini belirleme üzerine çalışmalar devam etmektedir (33). Bu strateji ortamdaki besinlerin kontrol edilemediği durumlarda ve ortamlarda kullanılamamaktadır.

BİYOSİTLER VE ETKİ MEKANİZMALARI

Mikrobiyel aktiviteye karşı kullanılan biyositler, mikrobiyel popülasyonun hücre materyaline, enzim sistemine ya da proteinlerine zarar vererek onu öldürür (34).

Biyositlerin etki tarzları 4 gruba ayrılır (Tablo 6).

Tablo 6. Biyositlerin etki tarzları (34)

BIYOSİTLER			
Elektron sevenler		Membran aktive edenler	
Okside ediciler	Elektron sevenler	Parçalayıcılar	Proton alıcılar
Halojenler	Formaldehit	İndirgeyiciler	Parabenler
Peroksit bileşikleri	FA-alıcıları	Biguanidler	Zayıf asitler
	İzothiozonlar	Fenoller	Pyrithione
	Bronopol	Alkoller	
	Cu, Hg, Ag		

Bakterilerin biyofilm yapısında buldukları zaman geliştirdikleri metabolik değişikliklerle antimikrobiklere, antiseptik ve endüstriyel biyositlere, biyofilm bakterilerinin planktonik hallerine göre, 10-100 kat daha dirençli oldukları bildirilmiştir (3, 26) Planktonik hücrelerle kıyaslandığında, antibakteriyel maddelere, iodin, iodinpolivinil-pirollidon kompleksi, klorin, monokloramin, peroksijenler ve glutraldehit gibi biyositlere ve ısıya karşı daha dayanıklıdır (31, 32, 34, 36) Yetersiz dezenfeksiyonların ve temizlik ürünlerinin bilinçsiz kullanımının patojenik biyofilm organizmalarının neden olduğu hastalıkları artırıcı özellik göstereceği kaçınılmazdır. Limitlerin üstünde kullanılacak biyosit dozlarının ise sistemde korozyona neden olarak ekonomik kayıplara yol açacağı gibi suyun kullanıldığı ya da deşarj edildiği ortamda canlılar üzerinde olumsuz etkilere yol açacağı unutulmamalıdır. Bununla beraber, antimikrobiklerin yüksek doz uygulamaları gerek çevresel döngüleri olumsuz yönde etkilediğinden gerekse toksik etki gösterdiklerinden pek tercih edilmez (33).

BIYOFİLMLE MÜCADELEDE KULLANILAN BIYOSİTLER VE ÖZELLİKLERİ: Yükseltgeyen (Oksitleyici) Biyositler:

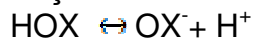
- Özel değildir.
- Ayrıca askıda katı maddeler ve organik maddelerle reaksiyona girerler.
- Halojenlenmiş yan ürünler oluşturabilirler.

Mikroorganizmaları, hayati elemanlarının oksidasyonu ile öldürür. En fazla kullanılanlar:

- Klor ve türevleri
- Brom ve türevleri
- Klor dioksit
- Ozon
- Perasetik asit

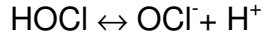
Klor Türevleri ve Brom Türevleri:

Başlama molekülünden bağımsız olarak aşağıdaki dengede oluşur.



Gerçek biyosit HOX molekülüdür. Ayrıca biyositin etki derecesi pH'ya bağlıdır. Yüksek pH değerlerinde brom bazlı biyositler klor bazlı biyositlerden daha etkilidir.

Klor ve türevleri:



pH ve alkalinite düşmesine neden olurlar.

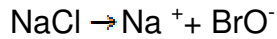
Hipoklorit



pH ve alkalinite artmasına neden olurlar.

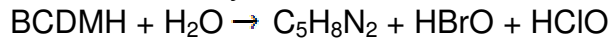
Brom türevleri:

Brom + Hipoklorit



Klor Brom Molar Oranı 1:1

Brom Kaynakları:



Yükseltgemeyen Biyositler:

- Hücre membranına,
- Hücre duvarına,
- Sitoplazmatik elemanlarına,
- Fotosenteze etki ederler.

Yükseltgemeyen Biyositlerin Özellikleri

- Özel etki gösterirler.
- Organizmalar biyosite alışabilirler.
- Pahalıdırlar.

İster endüstriyel ister klinik kullanım için olsun, uygun biyosit seçimi oldukça önemlidir. Bu amaçla, kontrol programının geliştirilmesi yani biyositin öldürme bilgileri, biyosit maliyeti ve sistem bilgisi çıkarılmalıdır.

Yükseltgeyen ve yükseltgemeyen biyositler biyofilm organizmalarını öldürebilir, ancak biyofilmlerin canlı olamayan kısımları birçok biyositten etkilenmeyebilir. Etkili bir biyosit uygulaması sonrasında bile bazı biyofilm parçaları yüzeylerde kalabilir. Bugün tıpta ve endüstriyel amaçla sıklıkla kullanılan biyositler, aktif bileşenleri ve etki tarzları tablo 7 ve 8'de verilmiştir.

Tablo 7. Bazı biyositaktif maddeleri, kullanım ve uygulama alanları ve etki tarzları.⁽¹²⁾

Biyosit	Kullanım ve Uygulama Alanları	Genel Etkileri
Yarılanmış amonyum bileşikler	Sağlık uygulamalarında, ev temizliğinde, yüzey temizliğinde, ilaç/ kozmetik alanında	Membran yapısını bozar, yüksek konsantrasyonlarda sitoplazmik membran proteinleri çöktürür.
Biguanidler	Sağlık uygulamalarında, ev	Klorheksidin membrana bağlı

	temizliğinde	ATPaz'ı indirger.
Fenoller/Kresoller	Sağlık uygulamalarında, ev temizliğinde, yüzey temizliğinde	Triclosan: düşük konsantrasyonlarda enoil açili indirger. Dinitrofenol membranı yıkar (ATP sentezi).
Alkoller	Sağlık uygulamalarında, ilaç/kozmetik alanında	DNA, RNA ve hücre duvarı sentezini baskılar. Düşük konsantrasyonlarda fenoksietanol <i>E. coli</i> ' de protein transferi sağlar.
Aldehitler	Sağlık uygulamalarında, ilaç/kozmetik alanında, kağıt endüstrisinde	Alkali ajan olarak kullanılır.
Etilen oksit	Sağlık uygulamalarında, medikal aletlerde (örneğin kateter sterilizasyonunda)	Alkali ajan olarak kullanılır.
Anyonik ajanlar	Ev temizliğinde, ilaç/kozmetik alanında	Parçalamada kullanılır.
Organik asitler	İlaç/kozmetik alanında, gıda korunumunda	Protonların hareketini sağlar, aminoasitleri baskılar.
Metal Tuzları	Sağlık uygulamalarında, ilaç hazırlamada	Tiol grupları arasında etkileşim sağlar (cıva, gümüş).
İzothiazolonlar	Kişisel temizlikte, ev temizliğinde ve endüstride	BIT (benzisothiazolonone) taşıma sistemine etki eder ve <i>S. aureus</i> ' ta glukozu okside eder, tiol içeren enzimleri, ATPaz' ı, gliseraldehit-3-fosfat' ı aktive eder.
Peroksitler	Sağlık alanında, kişisel temizlikte, ev temizliğinde ve endüstride	Oksitleyici ajan olarak kullanılır.
Klorlu bileşikler ve halojenler	Sağlık alanında, kişisel temizlikte, ev temizliğinde, endüstride ve atık sularda	Oksitleyici ajan olarak kullanılır.
Amfoterik ajanlar	Sağlık alanında, ev temizliğinde	Membranla ilişkisi bilinmemektedir.
Non-iyonik ajanlar	Sağlık alanında, ev temizliğinde	Membranla ilişkisi bilinmemektedir.
Limonen	Sağlık alanında, ev temizliğinde	Membranla ilişkisi bilinmemektedir.
Antimikrobiyal boyama	Sağlık alanında	DNA etkileşim ajanı olarak kullanılır.
Iodoforlar	Sağlık alanında	Tiol grupları ile kovalent bağlanır.
Pentamidin, Propamidin	Medikal aletlerde (örneğin kateterler)	DNA sentezini baskılar.

Tablo 8. US/FDA tarafından onaylanan biyositler (37).

Dezenfeksiyon Seviyesi	Biyositler
Düşük Seviye	Etil ve İzopropil alkol (% 70-90)
	İodofor çözeltisi (dilüsyon yapılabilir)
	Fenolik (dilüsyon yapılabilir)
	Yarılanmış amonyum deterjan çözeltisi (dilüsyon yapılabilir)
	Sodyum hipoklorit (ev temizliğinde % 5.25-6.15)
Orta Seviye	Etil ve İzopropil alkol (% 70-90)
	Fenolik (dilüsyon yapılabilir)
	Sodyum hipoklorit (ev temizliğinde % 5.25-6.15)
Yüksek Seviye	Gluteraldehit \geq % 2
	Gluteraldehit % 1.12 ve fenol/fenat (% 1.93)
	Hidrojen peroksit (% 7.5)
	Hidrojen peroksit (% 7.35) ve perasetik asit (% 0.23)
	Hidrojen peroksit (% 1) ve perasetik asit (% 0.08)
	Hipoklorit (Tuz içerikli chlorine ile kullanılmalı)
	Orto-fitalaldehit (0.55)
	Perasetik asit (% 0.2)

BİYOFİLM OLUŞUMUNDA VE KONTROLÜNDE QUORUM SENSİNG (QS)

Hücre dışı sinyaller ve QS (çevreyi algılama) düzenleme sistemlerinin biyofilmin oluşumu ve varlığı için önemli olduğu bildirilmiştir (38). Genel olarak bu mekanizmalar, hücre dışı işaretlemeler yolu ile çalışır. Bakteriler bu işaretleri, yerel yoğunluklarını değerlendirmek amacı ile kullanırlar. Bu işaretler yeterli yoğunluğa ulaştığında (örneğin yüksek yoğunluklara), düzenleyici bir geri bildirim (feed back) çemberi uyarılmakta, bunun sonucunda da hücre nüfusundaki fenotiplerin ifadesinde hızlı bir artış olmaktadır (39, 40). Çevreyi algılama, bir bakteriye kendi hücre popülasyon yoğunluğunu izlemesine olanak veren "otoinducer" veya "feromon" olarak adlandırılan sinyal moleküllerinin üretimine bağımlıdır. EPS lifli ve gözenekli bir yapıya sahiptir. Dolayısıyla düşük molekül ağırlıklı, yoğunluğa bağlı hücre-sinyal moleküllerinin hücreler arası geçişine izin verir. Değişik bakteri türlerinde, biyofilm oluşumu yanında biyoluminesens, antibiyotik biosentezi, konjugasyon ve hayvan, bitki ve balık patojenleri tarafından oluşturulan virulens faktörlerinin üretimi gibi çeşitli fizyolojik işlemler, QS ile regüle edilir (39, 42). Bugün biyofilmin oluşum evrelerinden her birinde QS mekanizmalarının rol oynadığı bilinmektedir. *S. aureus*, *H. pylori* ve *S. enterica*'nın bu mekanizmaları kullanarak tutundukları ve biyofilm oluşumunu başlattıkları kanıtlanmıştır (43). Otoinducerların ortamdaki konsantrasyonları yeterli seviyeye ulaştığında bakteri bu sinyalleri algılar ve bunları belirli hedef genlerin aktivasyonunda ya da baskılanmasında kullanır.

Biyofilm oluşumunda yüzeye tutunan hücrelerin genlerinde yukarı seviyeye (up-regulation) doğru ya da aşağı seviyeye (down-regulation) doğru düzenlemelerin olduğuna dair değişik çalışmalar bulunmaktadır. Davies ve ark.(1998), *P. aeruginosa*'ya ait biyofilm oluşumu ile ilgili genlerden *lasR-lasI* ve *rhIR-rhII* uyarım sistemlerini göstermişlerdir. Bu genlerden herhangi birinin uyarımı sonucu, yeterli sayıda biyofilm oluşturma yeteneğindeki bakterilerinin önce mikro koloniler oluşturduğu, daha sonra ince bir biyofilm tabakası meydana getirdikleri bildirilmiştir. Aynı çalışmada, uyarılmış biyofilmin tutunma yüzeyinden sürfektanlar ile kolayca yerinden söküldüğü bildirilmiş bunu takiben mikrokolonilerin olduğu ortama Homoserine Lactone eklendiğinde, normal yükseklikte biyofilm oluştuğu bildirilmiştir. QS sistemini kullanan bazı bakteriler ve bunların çevreyi algılama sisteminde rol alan biyofilm oluşumu ile ilişkili bazı regülatör sistemler tablo 9'da gösterilmiştir.

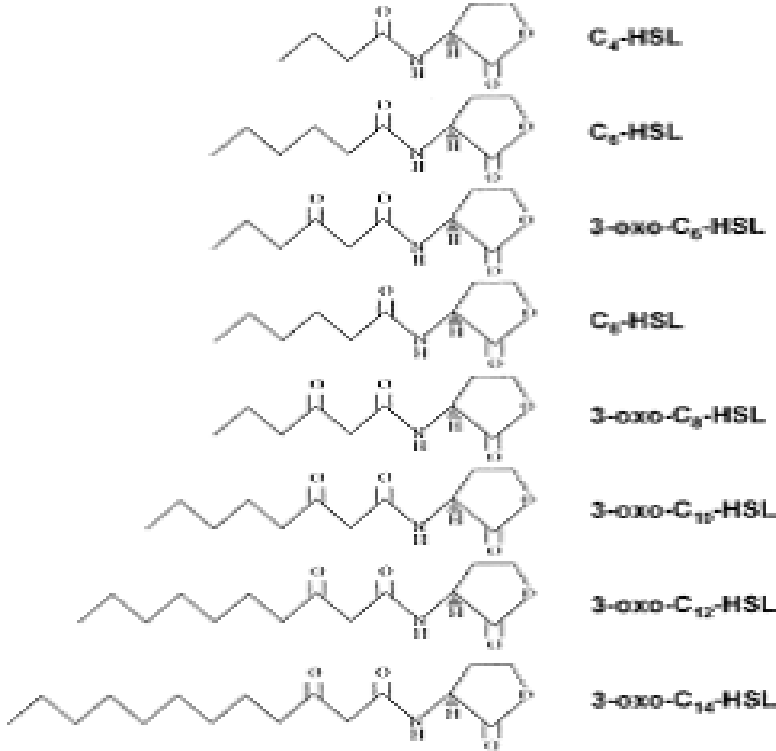
Tablo 9. Biyofilm oluşumu ile ilişkili bazı regülatör sistemler.(39, 43-46)

Regülatör gen(ler)	Bakteriyel türler	Biyofilm oluşumundaki fonksiyon
Gram (-) bakteriler		
barA/uvrY	<i>E. coli</i>	Biyofilm oluşumunun aktivasyonu
cpxRA	<i>E. coli</i>	Düzensiz yüzeylere hassasiyet ve optimal hücreler-arası iletişim ihtiyacı
Crp	<i>E. coli</i>	Biyofilm oluşumunun engellenmesi (katabolit represyon)
csrAB	<i>E. coli</i>	Biyofilm oluşumunun önlenmesi, kopmanın aktivasyonu
Hns	<i>E. coli</i>	Oksijensiz koşullarda adhezyonun indirgenmesi
ompR/envZ	<i>E. coli</i>	Tutunmanın ve selüloz gene aktivasyonunun arttırılması
rcsB-yojN-rscC	<i>E. coli</i>	Hücre yüzey kompozisyonunun yeniden modellenmesiyle biyofilm oluşumunun aktivasyonu
rpoS	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	Biyofilm kalınlığının azaltılması veya arttırılması Biyofilm kalınlığının azaltılması
Crc	<i>P. aeruginosa</i>	Normal biyofilm gelişimine ihtiyaç (tip IV hareketliliğinin aktivasyonu)
gacAS	<i>P. aeruginosa</i>	Mikrokolonilerin oluşumuna ihtiyaç
mvaT	<i>P. aeruginosa</i>	cup geninin indirgenmesiyle abiyotik yüzeylere adhezyonun azaltılması
rpoN	<i>P. aeruginosa</i> <i>Vibrio fisheri</i>	Adhezyonda ve biyofilm mimarisinde rol oynar Biyofilm mimarisinde rol oynar
bopABCD	<i>Enterococcus faecalis</i>	Plastik yüzeyler üzerindeki biyofilm oluşum operonu
lasI	<i>P. aeruginosa</i>	3OC12-HSL quorum-sensing sinyalinin sentezi, biyofilm oluşumu
lasI	<i>P. aeruginosa</i>	QS, swarming hareketin kontrolü
SwrI	<i>Serratia liquefaciens</i>	QS, swarming hareketinin regülasyonu

bsmA ve bsmB	<i>S. liquefaciens</i>	Biyofilmin gelişiminde iş görür
ahyR/I	<i>Aeromonas hydrophila</i>	QS, biyofilmin olgunlaşmasında rol oynar
ypsl/R	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	QS, agregasyonda fonksiyon gösterir
Ups	<i>Vibrio cholerae</i>	EPS biyosentezi
LuxS	<i>Salmonella enterica serovar typhimurium</i>	İnsanların safra taşları üzerinde biyofilm oluşumunda etkili
LuxS	<i>Helicobacter pylori</i>	Adezyonda etkili
cepl/R	<i>Burkholderia cepacia H111</i>	Olgun biyofilmin oluşumu için gerekli
RpfF	<i>Xanthomonas campestris</i>	DSF (Difüzlenebilir sinyal faktörü)'nün üretimi, DSF/rpf quorum-sensing sistemi, ekstraselüler mannosidaz sentezi ile yine kendi ürettiği ksantan polisakkaritinin ve biyofilmin dağılımı, parçalanması
Cer	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	QS, agregasyonun hücrel kontrolü
Gram (+) bakteriler		
AbrB	<i>Bacillus subtilis</i>	Biyofilm oluşumunun önlenmesi
CcpA	<i>B. subtilis</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Biyofilm oluşumunun engellenmesi (katabolit represyon)
SpoOA	<i>B. subtilis</i>	Olgun biyofilm oluşumunda gerekli (abrB'nin engellenmesi)
SpoOH	<i>B. subtilis</i>	Olgun biyofilm oluşumunda gerekli
ArlRS	<i>Staphylococcus aureus</i>	Polistren'e primer yapışmanın indirgenmesi
Rbf	<i>S. aureus</i>	Abiyotik yüzeyler üzerinde olgun biyofilm oluşumunda gerekli
SarA	<i>S. aureus</i>	Biyofilm oluşumunun aktivasyonu, PIA/PNAG aktivasyonu
Agr	<i>S. aureus</i>	QS, konak hücresi ile teması sağlayan yüzey adhesinlerin çalışmasında rol alır
SigmaB	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Biyofilm oluşumunun aktivasyonu
BfrAB	<i>Staphylococcus gordonii</i>	PVC ve tükürük kaplı biyofilm oluşumu aktivasyonu
Hk11/rr11	<i>S. mutans</i>	Biyofilm mimarisinde rol oynar
BrpA	<i>S. mutans</i>	Abiyotik yüzeyler üzerinde olgun biyofilm oluşumuna ihtiyaç
LuxS	<i>S. mutans</i>	QS, biyofilmin gelişimi
GbpA	<i>S. mutans</i>	Polisakkarit oluşumu

"Acyl-Homoserine Lactone (AHL)" sistemi bir grup Gram negatif bakterilerde (şekil 1), "otoindükleyici 2 sistemi (AI2)" Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde, "peptit bağlantılı sistem" ise, Gram pozitiflerde tanımlanmıştır. AHL-temelli QS sisteminin

hem biyofilm oluşumunu hem de bakterilerin iletişimini sağladığı ve topluluktaki hücrelerin QS ajanı olan AHL'nin yoğunluğu ile çoğunluk oranlarını çözdükleri bildirilmiştir. Aynı çalışmada, AHL'in diğer QS ajanlarından farklı olarak kolonizasyondan da sorumlu olduğu ortaya konmuştur.⁽³⁸⁾



Şekil 1. Bazı yaygın Acyl-Homoserine Lactone (AHL) lar ve türevleri. (20)

QS mekanizmasında kullanılan sinyal moleküllerinin çeşidi ve bu moleküllerin algılanma mekanizmaları dikkate alındığında farklı gruplara ayrılır (48) (Şekil 2).

Sinyal Molekülleri Bakterilerin Gram Özelliklerine Göre	*Acyl-Homoserine Lactone (AHL veya HSL)- Gram (-) *Oligopeptit-Gram(+) Furanosil borat diester türevleri-bazı Gram(-), Gram(+)(2 sinyal molekülü)
Mekanizmasına Göre	*LuxI/LuxR Sistemi-Gram(-) *Oligopeptit Sistemi- Gram(+) *Hibrit Sistemi

Şekil 2. QS mekanizmasının çeşitleri (20, 21 ve 42'den derlenmiştir).

Biyositlerin doğru seçilip uygulanması endüstriyel veya tıbbi sorunlarla mücadelede etkili sonuçların alınmasını sağlamaktadır. Bu sonuca ulaşabilmek için biyositin ortamda bulunan mikroorganizmalara etkili olduğunun güvenilir testlerle gösterilmesi, uygulama yöntemi ve uygulama konsantrasyonlarının doğru olarak belirlenebilmesi gerekmektedir (12). Biyositlerin etkisini değerlendiren testler yapılırken olaya birçok faktörün karışması nedeniyle dikkatli olunmalıdır. Test mikroorganizmasının doğru seçilmesi, hücre süspansiyonunun dikkatli yapılması, canlılık kontrolü yapılırken

biyositin etkisinin nötralizer maddelerle ortadan kaldırılması gerekmektedir. Biyositin bakteriyolojinin altın çağından önce erken tarihlerde bulunmuş olmalarına rağmen uluslararası kabul gören test şemaları oluşturulabilmesi son yıllara kadar sürmüştür. Günümüzde halen değişik ülkelerde değişik prensiplere dayanan farklı testler uygulanmaktadır (12,49). Biyosit testleri ile ilgili çalışmalar dezenfektan kinetiğine dayandırılmaktadır. Gözlemler, bakterinin biyosit tarafından öldürülmesinin, biyosit konsantrasyonu ve bakterinin biyositle temas süresine bağlı olduğunu göstermiştir. Son yıllarda konuyla ilgili pratik uygulamalar geliştirilmiştir. Kapasite testleri ve uygulamalı testler, gerçek yaşam ortamı taklit edilerek ve biyositin kullanım konsantrasyonlarında uygulama ortamında yapılan ve daha gerçekçi sonuç veren testlerdir. Bu testlerde, ürünün kullanım amacına göre değişik mikroorganizmalar ve temas süreleri kullanılmaktadır. Bazı Avrupa ülkelerinde sadece biyositin kendi etkisi değil, kullanım şekli veya biyosit işlemi de test edilmektedir (50-52).

Biyositin etkinliği birçok faktör tarafından etkilenebilmektedir. Bu nedenle biyosit etkinlik ölçüm testleri yapılırken bu faktörler dikkate alınmalıdır. Ortamın ısı ve pH'sı, inokulum büyüklüğü, yok edilmesi amaçlanan mikroorganizmanın cinsi ve fizyolojik durumu, mikroorganizmanın yüzey yapısı, kullanılan biyosit konsantrasyonu, ortamda biyosit etkisini interfere eden maddelerin bulunması, biyositin uygulanma şekli ve süresi biyosit başarısını etkileyen başlıca faktörlerdir (53). Biyosit işlemi ve biyosit etkinlik test sonuçlarını etkileyen faktörler mikroorganizmalara, biyosite ve çevresel faktörlere bağlı olabilmektedir. Mikroorganizma o biyosite doğal dirençli olabilir. Örneğin; bakteri sporları bütün biyositlere vejetatif bakterilere göre daha dirençlidir. Tüberküloz basili farklı duvar yapısı ve hidrofobik özelliğinden dolayı nispi bir doğal direnç sergilemektedir. *Pseudomonas*, dış membran yapısına bağlı olarak antibakteriyal maddeleri hücre içine daha az almaktadır. Ortamdaki mikroorganizma sayısı arttıkça biyositlerin etkisi azalabilmektedir. Biyofilm oluşturmuş bakteriler biyositlerin etkisine daha dirençli olmaktadır (54). Yine mikroorganizmalar mutasyonlar sonucu biyositlere kazanılmış direnç geliştirebilir. Biyositlere bağlı faktörler içinde biyosit konsantrasyonu, biyositle temas süresi ve biyosit eriyiğinin tazeliği sayılabilir. Ortamın ısı, pH' s, biyositin sulandırıldığı suyun sertlik derecesi, ortamdaki kir ve organik madde yükü dezenfeksiyonu etkileyen çevresel faktörlerdir. Örneğin; glutraldehit yüksek pH'larda daha etkili olurken, sodyum hipoklorit düşük pH'larda daha etkili olabilmektedir. Ortamdaki lipidler biyositin mikroorganizma üzerindeki etkilerini azaltmaktadır (55). Kir, toz, organik birikinti mikroorganizmalara besin maddeleri sağladığı gibi dezenfektan maddelerin buraya nüfuz etmesini de zorlaştırır. Bu nedenle dezenfeksiyon ancak bu kalıntılardan temizlenmiş ortamlarda beklenen etkiyi gösterebilmektedir.

Bugün çevresel yaklaşımlara artan ilgi nedeniyle ve sağlık açısından biyofilm kontrolü için çevre dostu alternatif yöntemler araştırılmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri, iletişim sinyallerinin ve QS sistemlerinin görüntülenmesi olup biyofilm oluşturan bakterilerin davranışları hakkında bize önemli ipuçları verir. Bu ipuçları biyofilmin neden olduğu zararlara karşı mücadelede önemli açılımlar sağlayabilir.

KAYNAKLAR:

- (1) Costerton, J.W., Geesey, G. G., and Cheng, K. J., 1978. Sci. Am. 238, 86-95.
- (2) Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006, Biofilms:Implications in Bioremediation, Trends in Microbiology, 14(9), 389-397.

- (3) Assanta, M.A., 2000. The War against Invasive Bacteria that Stick to Surfaces. <http://www.frd.gov.ca> (erişim tarihi:01.04.2003).
- (4) Donlan, R.M., 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces, *Emerg Infect Dis.* 8(9), 881-890.
- (5) Stoodley, P., Wilson, S., Cargo, R., Piscitelli, C., Rupp, J.C., 2000. Detachment and other Dynamic Processes in Bacterial Biofilms, *Surfaces in Biomaterials Foundation*, 189-192.
- (6) Momba, M.N.B., Binda, M.A., 2002. Combining Chlorination and Chloramination Processes for the Inhibition of Biofilm Formation in Drinking Surface Water System Models, *Journal of Applied Microbiology*, 92, 641-648.
- (7) Fang, H.P.H., Xu, L., Chan, K., 2002. Effects of Toxic Metals and Chemicals on Biofilm and Biocorrosion, *Water Research* 36, 4709-4716.
- (8) Davies, D., 2003. Understanding Biofilm Resistance to Antibacterial Agents, *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(2), 114-122.
- (9) Gilbert, P., McBain, A.J., Rickard, A.H., 2003. Formation of Microbial Biofilm in Hygienic Situations: A Problem of control, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 245-248.
- (10) Meyer, B., 2003. Approaches to Prevention, Removal and Killing of Biofilms, *International Biodeterioration& Biodegradation*, 51, 249-253.
- (11) Kreft, J.U., Wimpenny, J.W.T., 2001. Effect of EPS on Biofilm Structure and Function as Revealed by an Individual-based Model of Biofilm Growth, *Water.Sci.Technol.*, 43, 135-141.
- (12) Russell, A.D., 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations, *THE LANCET Infectious Diseases*, 3, 794-803.
- (13) Donlan, R. M.,and Costerton, J. W. Clin, 2002. *Microbiol Rev* 15, 167-93.
- (14) Lewis, K., 2001. Antimicrob Agents Chemother 45, 999-1007.
- (15) Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., Hook, M., 1994. *Annu Rev Microbiol* 48, 585-617.
- (16) Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P., 2001. *Nature* 413, 860-64.
- (17) Svensater, G., Welin, J., Wilkins, J. C., Beighton, D., Hamilton, I. R., 2001. *FEMS Microbiol Lett* 205, 139-46.
- (18) Wolz, C., Goerke, C., Landmann, R., Zimmerli, W., Fluckiger, U., 2002. *Infect Immun* 70, 2758-62.
- (19) Gilmore, K.S., Srinivas, P., Akins, D.R., Hatter, K.L., and Gilmore, M.S., 2003. *Infect Immun* 71, 4759-66.
- (20) Shirliff, M.E., Mader, J.T., Camper, A.K., 2002. Molecular Interactions in Biofilms, *Chemistry & Biology*, 9, 1-20.
- (21) Sakarya, S., 2005. Biyofilm Yapısı ve Enfeksiyon Hastalıklarının Virülans ve Tedavisindeki Rolü, *Klimik Dergisi*, 18: 3-8.
- (22) Ammendolia, M.G., Di Rosa, R., Montanaro, L., Arciola, C.R., Baldassarri, L. *J Clin*, 1999. *Microbiol* 37, 3235-8.
- (23) O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. *Annu Rev Microbiol* 54, 49-79.
- (24) Jefferson, K.K., Pier, D.B., Goldmann, D.A., and Pier, G.B.J., 2004. *Bacteriol* 186, 2449-56.
- (25) Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B., 1993. *Biofilms-Science and Technology*, Kluwer Academic Publishers, London, 720.

- (26) Chapman, J.S, 2003. Disinfectant Resistance Mechanisms, Cross-resistance, and Co- resistance. *Int Biodet Biodeg*, 51:271-276.
- (27) Türetgen, I., 2004. Comparison of Free Residual Chlorine and Monochloramine for Efficacy against Biofilms in Model and Full Scale Cooling Towers, *Biofouling*, 20, 81-85.
- (28) Davey, M.E. ve Ootole, G.A.,2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847-867.
- (29) Watnick, P., Kolter, R., 2000. Biofilm City of Microbes, *J.Bacteriol.*, 182, 2675-2679.
- (30) Tyson, G.W., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Banfield J.F., Richardson, P.M., 2004. Community Structure and Metabolism through Reconstruction of Microbial Genomes from the Environment, *Nature*, 428, 37-43.
- (31) Jass J, Walker J.T., 2000. Biofilms and biofouling. In: *Industrial Biofouling: Detection, Prevention and Control*. New York: Wiley, 410p.
- (32) Stewart, P.S., McFeters, G.A., Huang, C.T., 2000. *Biofilms II: Process analysis and applications*. New York: Wiley, 232.
- (33) Thormann, K.M., Saville, R.M., Shukla, S., Spormann, A.M., 2005. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *J Bacteriol*, 187: 1014-21.
- (34) Ataer, H.S.K., 2001. Çeşitli Dezenfektan Maddelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması, Doktora Tezi, I.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü.
- (35) Douglas, L.J., 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiol.* 11:30-36.
- (36) Cloete TE., 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int Biodeterioration Bio-degrad* 51.
- (37) Scenihr, 2009. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides, [see http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf] Section 3.3. Production, use and fate of biocides, 18p.
- (38) Kjelleberg,S., Molin,S., 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms. *Ecology Indust.Microbiol.* 5:254-258.
- (39) Lynch, M.J.,Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., 2002. The Regulation of Biofilm Development by Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*, *Environ. Microbiol.*, 4, 18-28.
- (40) Labbate, M., Qec, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2004. Quorum Sensing-controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1, *J. Bacteriol*, 186, 692.
- (41) Boşgelmez, G., 2003. Quorum Sensing in Gram-negative Bacteria. *Turk J. Biol.*, 27:85-93.
- (42) Karaboz, İ.&Sukatar, A., 2004. Bakterilerde Sosyal Davranışlar (Bakterilerde İletişim Mekanizmaları). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 02(05):23-32.
- (43) Parsek, M.R., Greenberg, E.P., 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms, *Trends Microbiol*, 13, 27–33.
- (44) Michaud, P., Da Costa, A., Coutois, B., Courtois, J., 2003. Polysaccharide Lyases: Recent Developments as Biotechnological Tools, *Critical Reviews in Biotechnology*, 23(4), 233-266.

- (45) Yarwood, J.M. ve Schlievert, P.M., 2003. Quorum Sensing in *Staphylococcus* Infections, J. Clin. Invest., 112, 1620-1625.
- (46) Cole, S.P., Harwood, J., Lee, R., She, R., Guiney, D. G. 2004. Characterization of Monospecies Biofilm Formation by *Helicobacter pylori*, J. Bacteriol., 186, 3124-3132.
- (47) Yao, Y. Martinez-Yamout, M.A. Dickerson, T.J. Brogan, A.P. Wright, P.E. Dyson, H.J.; "Structure of the Escherichia coli quorum sensing protein SdiA: activation of the folding switch by acyl homoserine lactones."; *J.Mol.Biol.*; (2006) **355**:262-273.
- (48) Xavier, K.B. ve Bassler, B.L., 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game, Current Opinion in Microbiology, 6, 191–197.
- (49) Gröschel D.H.M., 1991. Disinfectant testing in USA. J Hosp Infect, 18(Suppl A):274-9.
- (50) Maureen, B., Springhorpe, S., Sattar, S.A., 1994. Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: Studies with a mixture of five types of microorganisms. Am J Infect Control, 22:152-62.
- (51) Van Klinger B. Disinfectant testing on surfaces. J Hosp Infect, 30:397-408.
- (52) Miner, N., 1999. Principle to guide international standard tests for liquid chemical germicides: A proposal. J AOAC Int, 82:669-75.
- (53) Reybrouck, G., 1991. International standardisation of disinfectant testing: is it possible Hosp Infect J, 18(Suppl A):280-8.
- (54) Mariscal, A., Carnaro-Varo, M., Gutierrez-Bedmar, M., et al., 2007. A fluorescent method for assessing the antimicrobial efficiency disinfectant against E. coli ATCC 35218 biofilm. Appl Microbiol Biotechnol, 77:233-40.
- (55) Alıcı Ö., 2007. Dezenfeksiyonu etkileyen faktörler, 5. Ulusal Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi Kitabı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 35-40.