T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

BİTKİSEL KAYNAKLI DOĞAL ÜRÜNLERİN ANTİ-BİYOFOULİNG POTANSİYELLERİ YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ: DİŞ PLAĞI ÖRNEĞİ

Proje No: TYL-2015-5825

Tez Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK
Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Biyoteknoloji ABD
Araştırmacının Adı Soyadı
Tanju DEMİRHAN
Kurum Dışı Tez Öğrencisi

Doç. Dr. Dilşad ONBAŞLI
Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Biyoteknoloji ABD

Doç. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU
Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi/Biyoloji Eğitimi ABD

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TYL-2015 5825 nolu proje ile desteklenmiştir.

Haziran 2016
KAYSERİ

T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BİTKİSEL KAYNAKLI DOĞAL ÜRÜNLERİN ANTİ-BİYOFOULİNG POTANSİYELLERİ YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ: DİŞ PLAĞI ÖRNEĞİ

Hazırlayan

Tanju DEMİRHAN

Danışman

Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK
Doç. Dr.Hikmet KATIRCIOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2016

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Tanju DEMİRHAN

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"**Bitkisel Kaynaklı Doğal Ürünlerin Anti-Biyofouling Potansiyelleri Yönünde Değerlendirilmesi: Diş Plağı Örneği**" adlı Yüksek Lisans / Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan **Danışman**

Tanju DEMİRHAN **Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK**

Biyokimya ABD Başkanı

Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN

Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK danışmanlığında **Tanju DEMİRHAN** tarafından hazırlanan **"Bitkisel Kaynaklı Doğal Ürünlerin Anti-Biyofouling Potansiyelleri Yönünde Değerlendirilmesi: Diş Plağı Örneği"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Eczacılık Biyokimya** Anabilim Dalında **yüksek lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

31.05.2016

JÜRİ:

Danışman	: **Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK** (Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı)	**…….**
Üye	:**Doç. Dr.Hikmet KATIRCIOĞLU** (Gazi Ünv. Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı)	**…….**
Üye	: **Doç. Dr.Ahmet CUMAOĞLU** (Biyokimya Anabilim Dalı)	**…….**

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……tarih ve …..sayılı kararı ile onaylanmıştır.

…… /……../ ……

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalımamın gerçekleştirilmesinde bilgi, deneyim ve yardımlarıyla beni yönlendiren ve desteğini hiç esirgemeyen, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji öğretim üyesi değerli tez danışmanım Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK'e, ikinci danışmanım Doç. Dr. HİKMET KATIRCIOĞLU'na, tez çalışmanın ekstrakt üretimi ve cihazlarla kullanımlarda tüm yardımları için Kasım BÜYÜKBEZİRCİ'ye, tez çalışmanın kritik zamanlardaki yardımı ve desteği için Doç. Dr. Ahmet CUMAOĞLU'na, beni laboratuvarda yalnız bırakmayıp çalışmaları birlikte yürüttüğümüz arkadaşım Sercan FİDAN'a ve benim bu günlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir şekilde esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tanju DEMİRHAN

Kayseri Haziran 2016

BİTKİSEL KAYNAKLI DOĞAL ÜRÜNLERİN ANTİ-BİYOFOULİNG POTANSİYELLERİ YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ: DİŞ PLAĞI ÖRNEĞİ

Tanju DEMİRHAN

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ezcacılık Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2016

Danışman: Prof. Dr. Gökçen YUVALI Çelik, Doç. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU

ÖZET

Streptococcus mutans diş çürümesinden birinci derece sorumlu streptococcal suşlardan birisidir. Mikroorganizmaların kolonizasyonunda hücre adezyonu ilk basamaktır. İkinci basamak ise hücrelerin ürettikleri ekstraselüler polimerlerin oluşturduğu biyofilm yapısıdır. Bu süreç biyofouling (biyolojik kirlilik) olarak tanımlanır. Anti-biyofouling ise biyolojik kirlenmeyi kontrol etmek için kullanılan bir yöntemdir. Biyofilm oluşması veya metabolizmasına engel olabilecek mevcut anti plak ajanlar istenmeyen yan etkilere ve yüksek maliyetlere sahip olduğundan anti-biyofouling ajan özelliğinde yeni alternatif doğal materyallerin araştırmaları devam etmektedir.

Bu çalışmada Kayseri ilinden (Gesi Mahallesi) toplanan *Viburnum opulus* L. (Gilaburu) bitkisine ait yaprak ve kabuk örneklerinin etanol ekstraktlarının *S. mutans* planktonik hücreleri ve biyofilmi üzerindeki inhibisyon etkisinin *in vitro* araştırılması amaçlanmıştır. Kabuk ekstraktının bakteri üzerinde antimikrobiyal aktivitesinin daha güçlü olması nedeniyle çalışmalar kabuk ekstraktı ile devam ettirilmiştir. *S. mutans* biyofilmleri üzerinde ekstraktın inhibitör etkisini araştırmak için XTT hücre canlılığı testi, biyofilm yüzeyinin yapısını görüntülemek için SEM analizi yapılmıştır. Ayrıca bu bakterinin ekstrakt varlığında EPS ve dekstran üretimleri de tespit edilmiştir.

Kabuk ekstraktlarının 2,5 mg/mL konsantrasyonunda, hem 8 saat hem de 24 saatlik biyofilm gelişim fazlarında hücrelerin %50'sinden daha fazlasını inhibe ettiği tespit edilmiştir. Buna göre 5 mg/mL'lik kabuk ekstraktı varlığında hem biyofilm yüzeyindeki ekzopolimerik matriksin dağıldığı hem de EPS ve dekstran üretiminin kontrole kıyasla düştüğü belirlenmiştir.

Sonuç olarak *S. mutans* tarafından dişler üzerinde oluşan biyolojik kirliliğin *V. opulus* L. kabuk ekstraktı ile gideriminin mümkün ve diş çürüğü üzerine geliştirilebilecek yeni kemoterapötik stratejiler için alternatif bir yaklaşım olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Viburnum opulus*, *Streptococcus mutans*, Biyofilm, Anti-biyofouling, Diş plağı.

EVALUATION OF ANTI-BIOFOULING POTENTIAL OF PLANT-DERIVED NATURAL PRODUCTS: EXAMPLE OF DENTAL PLAQUE

Tanju DEMİRHAN

Erciyes University, Institute of Health Sciences,

Pharmacy Biochemistry Program,

Master Thesis, June 2016

Supervisor: Prof. Dr. Gökçen YUVALI Çelik, Assoc. Prof. Dr. Hikmet KATIRCIOĞLU

ABSTRACT

Streptococcus mutans is the primary streptococcal strain responsible for caries. The first step in the colonization of microorganisms is the cell adhesion. The second step is the construction of the biofilm structure formed by extracellular polymers that have been produced by the colonizing cells. This process is defined as biofouling. Anti-biofouling is a method for controlling biofouling. Due to side effects and high costs of anti-plaque agents preventing biofilm formation or interfering with the biofilm metabolism, the research for alternative natural materials featuring an anti-biofouling activity continues.

In this study the *in vitro* investigation of the inhibitory effect of the ethanol extracts, produced from the *Viburnum opulus* L. leave and bark samples that have been collected in the Kayseri province (Gesi village), on *S. mutans* planctonic cells and biofilm has been intended. Due to stronger antimicrobial aktivity of the bark extract on bacteria the study was continued only with the bark extract. To investigate the inhibitory effect of the extract on *S. mutans* biofilms the XTT cell viability test, to view the biofilm surface structure a SEM analysis was performed. Furthermore the EPS and dextran production of this bacteria, in presence of the extract was identified.

It has been found out that the bark extract with a concentration of 2,5 mg/mL was able to inhibite more than 50% of the cells in the 8 and 24 hours development phases. According to this, the exopolymeric matrix on the biofilm surface dispersed, EPS and dextran production got lowered in the presence of 5 mg/mL of bark extract compared to the control group.

As a result biofouling on teeth caused by *S. mutans* can be removed with an extract produced from *V. opulus* L. bark. It's considered that this extract can be used as an alternative approach for new chemotherapeutic strategies against tooth decay.

Key Words: *Viburnum opulus*, *Streptococcus mutans*, Biofilm, Anti-biofouling, Dental plaque.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK....i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK....ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI....iii
KABUL ONAY SAYFASI....iv
TEŞEKKÜR....v
ÖZET....vi
ABSTRACT....viii
İÇİNDEKİLER....x
KISALTMALAR....xii
TABLOLAR LİSTESİ....xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ....xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ....1
2. GENEL BİLGİLER....3
2.1. Biyofouling....3
2.2. Biyofilm Genel Özellikleri Ve Yapısı....4
2.3. Biyofilm Oluşum Mekanizması....6
2.3.1. Dönüşümlü Tutunma....7
2.3.2. Dönüşümsüz Tutunma....7
2.3.3. Koloni Gelişimi....7
2.3.4. Olgun Biyofilm Oluşumu....8
2.3.5. Biyofilm Hücrelerinin Koparak Ayrılması....8
2.4. Biyofilm Oluşumunun Kontrolü Ve Engellenmesi....8
2.5. Biyofilm Olarak Diş Plagı Ve Diş Plak Oluşumunda Yer Alan Mikroorganizmalar..9
2.6. Streptokoklar Hakkında Genel Bilgi....10
2.6.1. *Streptococcus mutans*'ın Özellikler....11
2.6.2. *S. mutans*'ın Patogenezi....12
2.6.3. *S. Mutans*'ın Epidemiyolojisi....12
2.7. Antbiyofilm ve Antibiyofouling....13
2.8. *Vibrunum* Cinsi hakkında Genel Bilgi....16
2.8.1. *Viburnum opulus* L. (Gilaburu)....18
3. GEREÇ VE YÖNTEM....20
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler....20
3.1.1. CihazlarTezin Konusu....20
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler....20
3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler....21

3.1.4. Kullanılan Bakteri Suşu....21
3.1.5. Araştırmada Kullanılan *Viburnum opulus* L. (Gilaburu) ve Temini 21
3.1.6. Bakterilerin Aktifleştirilmesi....21
3.2. Yöntem....21
3.2.1. Bitki Ekstrelerin Hazırlanması....21
3.2.2. *S. Mutans* Planktonik Hücrelerinin Bitki Ekstraktlarına Duyarlılığının Ölçülmesi....22
3.2.3. XTT Yöntemi ile Biyofilmlerin Bitki Ekstraktlarına Duyarlılığının Ölçülmesi....23
3.2.4. *S. Mutans*'ın EPS (Ekzopolisakkarit) Üretim Tayini....23
3.2.5. *S. Mutans*'ın Dekstran Üretim Tayini....25
3.2.6. Lamel Üzerinde *S. mutans* Biyofilminin Oluşumu ve Oluşturulan Biyofilmin Bitki Ekstraktına Duyarlılığının Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntülenmesi....26
3.2.7. İstatistiksel Analiz....26
4. BULGULAR....27
4.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması....27
4.2. *S. Mutans* Suşunun Bitki Ekstraktlarına Duyarlılığı....27
4.3. XTT Yöntemi ile *S. Mutans* Biyofilminin Bitki Ekstratlarına Duyarlılığının Ölçülmesi....30
4.4. *S. mutans*'ın EPS Üretim Sonuçları....32
4.5. *S. mutans*'ın Dekstran Üretim Sonuçları....32
4.6. Lamel Üzerinde *S. mutans* Biyofilminin Oluşumu ve Oluşturulan Biyofilmin Bitki Ekstraktına Duyarlılığının SEM ile Görüntülenmesi....32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ....35
6. KAYNAKLAR....39

KISALTMALAR

ATCC :American Type Culture Collection

EPS :Ekzopolisakkarit

SEM :Scanning Electron Microscopy

MIC :Minimum Inhibitory Concentration

MİK :Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

XTT :[2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide]

TCA :Trikloroasetik asit

DMSO :Dimetil Sülfoksit

NB :Nutrient Broth

pH :Power of Hydrogen

QS :Quorum Sensing

PBS :Phosphate Buffered Saline

FBS :Fetal Bovine Serum

GTF :Glukozil transferaz

rpm :rounds per minute (dakikadaki devir sayısı)

mg :miligram

µg :mikrogram

mL :mililitre

µL :mikrolitre

g :gram

L :litre

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. **:** Bitki kabuk ve yaprak ekstrelerinin % verimi

Tablo 4.2. **:** *S. mutans* suşunun 24 saat inkübasyon sonunda EPS ve dekstran üretimleri

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. **:** Denizsel Biyofouling

Şekil 2.2. **:** Endüstriyel Biyofouling

Şekil 2.3. **:** Biyofilmin 5 Oluşum Basamakları: 1. Dönüşümlü tutunma 2. Geri dönüşümsüz tutunma 3. Koloni gelişimi 4. Biyofilm olgunlaşması 5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması

Şekil 2.4. **:** *S.mutans*'ın Elektron Mikroskopundaki Görüntüsü

Şekil 2.5. **:** *Viburnum opulus americanum* yaprağındaki tüylü kısımları

Şekil 2.6. **:** *Vibrunum opulus americanum* çiçek demeti

Şekil 2.7. **:** *Viburnum opulus* L. meyvesi

Şekil 2.8. **:** *V.opulus* bitkisinin yeşil-kahverengi ve kızıl renkleri

Şekil 2.9. **:** *V.opulus* gövde ve sap yapısı

Şekil 3.1. **:** *S. mutans'ın* EPS üretimini tespit etmek için hazırlanan kalibrasyon doğrusu

Şekil 4.1. **:** Etanol-yaprak ekstresinin MIK testi

Şekil 4.2. **:** Etanol-kabuk ekstresinin MIK testi

Şekil 4.3. **:** *S. mutans* planktonik hücrelerinin bitki yaprak ekstresi varlığında büyüme eğrisi

Şekil 4.4. **:** *S. mutans* planktonik hücrelerinin bitki kabuk ekstresi varlığında büyüme eğrisi

Şekil 4.5. **:** Solda 8 saatlik, sağda ise 24 saatlik XTT çalışmasının XTT kit uygulanmamış hali

Şekil 4.6. **:** Solda 8 saatlik, sağda ise 24 saatlik XTT çalışmasının XTT kit uygulanmış hali

Şekil 4.7. **:** Kabuk ekstresinin 8 saatlik XTT analizinin blok-diyagramı

Şekil 4.8. **:** Kabuk ekstresinin 24 saatlik XTT analizinin blok-diyagramı

Şekil 4.9. **:** %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında 8 saat kültüre edilen *S. mutans* biyofilmi (kontrol)

Şekil 4.10. **:** 5mg/mL ekstre içeren %1 sükroz ilaveli Nutrient sıvı besi ortamında 8 saat kültüre edilen *S. mutans* biyofilmi

Şekil 4.11. **:** %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında 24 saat kültüre edilen *S. mutans* biyofilmi (kontrol)

Şekil 4.12. **:** 5mg/mL ekstre içeren %1 sükroz ilaveli Nutrient sıvı besi ortamında 24 saat kültüre edilen *S. mutans* biyofilmi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Biyofouling, istenmeyen birikme ve biyofilm büyümesi olarak adlandırılır. Bu olay çok geniş yelpazede (tıp, gıda endüstrisi, arıtım teknolojileri, denizcilik vb.) sorun yaratan ve istenmeyen bir durumdur. Bu kadar geniş alanda gözlenen bu biyolojik kirliliğin asıl sebebi de biyofilmlerdir. Biyofilmler, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir (1).

Biyofilmler dünyadaki yaşam formlarının en başarılısıdır ve yüksek konsantrasyondaki biyosidal ajanlara oldukça toleranslı canlı formlarıdır. Biyofilm hücreleri antimikrobiyal ajanlarla teması engelleyen ya da azaltan bariyere sahiptirler (2). Biyofilm oluşumu in vivo olarak canlı hücrelerde veya in vitro olarak cansız yüzeylerde meydana gelebilir. Nem miktarının fazlalılığı ve besin maddelerinin ortamda bulunması biyofilm oluşumunu arttırmaktadır. Biyofilmlerin oluşumuna ve gelişmesine bakteri suşu (3, 4), yüzey özellikleri, pH, besin miktarı, sıcaklık (5) gibi çeşitli çevresel faktörler etkili olmaktadır.

Diş plağı oluşumu diş sağlığı açısından da biyolojik kirlilik olarak ifade edilen istenmeyen bir durumdur. Diş plakları, tükürük ile diş arasında çevresel bir membran ödevi görerek ortamdaki biyolojik ve fizikokimyasal değişmelere bağlı olarak farklı özellikler göstermektedir. Bu şekilde de asit oluşturma potansiyelleri değişmektedir. Plakta yerleşebilen mikroorganizmalardan öncelikle kok tipi mikroorganizmalar, monosakkaritleri intraselüler olarak kullanarak asit oluşturmaları yanında, özellikle sükrozu kullanıp salgıladıkları ekstraselüler enzimler aracılığı ile dekstran ve levanları yaparak plağın karbonhidrat çatısına katkı sağlamaktadırlar. Ayrıca kullandıkları monosakkaritlerin fermentasyonu, laktik asidin lokal olarak birikimine neden olduğundan ortama asit özellik kazandırmaktadır. *S. mutans* türleri sükrozdan ekstraselluler polisakkarit (dekstran) senteziyle plak oluşumunu başlatarak diş

yüzeyinde kolonize olabilirler (8). Ayrıca bu mikroorganizmaların çürük ve periodontal hastalıkların gelişmesinde yer aldığı gösterilmiştir (9). Bu nedenle, bu oral patojene karşı antimikrobiyal ajanların kullanılması dental çürük ve periodontal hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir. Klinik olarak antibiyotiklerin bilinçsiz ve gereksiz kullanımları patojenik biyofilm organizmalarının neden olduğu infeksiyonların inatçılıklarını arttırıcı özellik göstermektedir. Oral patojenlerden korunmak için kullanılan klorheksidin, povidon-iodin, delmopinol hidroklorit, triklosan gibi antimikrobiyal ve antibakteriyel ajanlarlarda istenmeyen yan etkilerin bulunması ve yüksek maliyet gibi durumlar bakım ağız hijyeni için tedavide güvenli, etkili ve ekonomik alternatif ajanlara ihtiyacı kaçınılmaz hale getirmiştir. Bu nedenle tıbbi bitkilerin kullanımına yaygın bir ilgi duyulmaktadır. Bu bağlamda geleneksel bitkisel tıp da araştırma kapsamına girmiştir (10, 11,12).

Biyolojik kirlenme kimya, medikal ve farmasötik endüstrilerde istenmeyen ciddi problemlere yol açabilmektedir. Dental plaklar antimikrobiyal ajanlara oldukça dirençli bir biyofilm örneğidir. Biyofilm oluşması veya metabolizmasına engel olabilecek mevcut antiplak ajanlar istenmeyen yan etkilere ve yüksek maliyetlere sahip olduğundan antibiyofilm dolayısıyla antibiyofouling ajan özelliğinde yeni alternatif doğal materyallerin araştırmaları devam etmektedir. Bu bağlamda amacımız *S. mutans*'ın neden olduğu dental plaklarda farklı doğal ajanların antibiyofilm kapasitelerini tespit etmektir. Çalışmamızda; *V. opulus* L. bitkisinin yaprak ve kabuklarından hazırlanmış etanol ekstraktlarının *S. mutans* bakterisinin oluşturduğu biyofilm üzerindeki ve bununla bağlantılı olarak bu bakterinin EPS ve dekstran üretimi üzerindeki etkilerinin de araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyofouling

Mikroorganizmalar gelişimleri için uygun organik ve inorganik maddelerin biriktiği dış yüzeylerde, özellikle gözle görülemeyen çizikler ve aşınmış bölgeler içine yuvalanarak yerleşmekte, birbirlerine ve yüzeylere bağlanarak biyofilm oluşturabilmektedir. Biyofilme tutunmuş bakteriler bu yapının içinde antimikrobiyal ajanlara ve olumsuz çevre koşullarına dirençli hale gelebilmektedirler (13, 14, 15, 16). Biyofouling olarak da adlandırılan bu durum, değişik yüzeylerde mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilmlerin büyümesi vasıtasıyla biyolojik materyalin birikmesidir. Makrofouling ise makro düzeyindeki biyofoulingdir ve makroorganizmalar tarafından yapılır. Fouling terimi aslında biyofouling ve anorganik fouling'i kapsar. Yakın çevre, anorganik madde ve organizmaların miktarı kirliliğin ne türde olduğunu ve yoğunluğunu etkiler. Fouling türü medikal, denizsel ve endüstriyel uygulamalar olmak üzere önemli derecede değişir. Genelde medikal biyofouling sadece biyofilm içerirken, denizsel ve endüstriyel biyofouling biyofilm, makrofouling ve anorganik fouling türlerinin bir kombinasyonunu içerir (17).

Biyofilmler birçok sektörde insanlara sağlık ve maddi açıdan ciddi zarar verebilir. Biyofouling genellikle gemi ve su altı yapılarda üstünde su altı canlıların fark edilir ölçüde geliştiği denizcilik alanı ile bağdaştırılır (Şekil 2. 1). Bu geminin su-direncini, korozyon, yakıt tüketimi ve motor stresini artırır. Endüstriyel alandaki biyofouling ise enerji santrallerinde, su arıtma sistemlerinde, yemek ve içecek fabrikalarında meydana gelmektedir (Şekil 2.2). Problemler arasında boruların tıkanması, membran geçirgenlikteki azalma, kirlenmiş su ve ısıtma ve soğutma sistemlerdeki performans düşüşü sayılabilir. Medikal alandaki biyofouling ise protez implantlar, biyosensör, kateter, diş implantlar ve medikal ekipmanda meydana gelebilir (17).



Şekil 2.1. Denizsel Biyofouling (18)



Şekil 2.2. Endüstriyel Biyofouling (19)

2.2. Biyofilm Genel Özellikleri ve Yapısı

Antonie Philips van Leeuwenhoek basit bir mikroskop kullanarak diş yüzeyinde mikroorganizmaları görüntüleyen ilk kişidir ve böylece aynı zamanda biyofilmi bulan

ilk bilim adamı olarak kabul edilmektedir (5). Costerton ve arkadaşları 1977 yılında biyofilmi "bakterilerin, polisakkarit fiberlerin birbirine geçmesiyle veya şeker moleküllerinin dallanmasıyla bakteri yüzeyinden uzanarak tek bir hücrenin veya hücre kolonilerinin adezyonun iletimini sağlayan glikokaliks yapısının çevrelenmesiyle yapıştıkları görülmüştür" diyerek tanımlamışlardır (20). Elder ve arkadaşları ise mikroorganizmaların ekzopolimer matriks aracılığı ile oluşturdukları yapısal birlik olarak tanımlamışlardır (21). Biyofilmin en yeni tanımı; mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, mikro organizmaların herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan, mikroorganizmaların içinde gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks şeklindedir (22). Geliştiği bölgeye bağlı olarak biyofilm matriksi içinde mineral kristalleri, korozyon partikülleri veya kan bileşenleri gibi hücresel olmayan maddeler de bulunabilir (5).

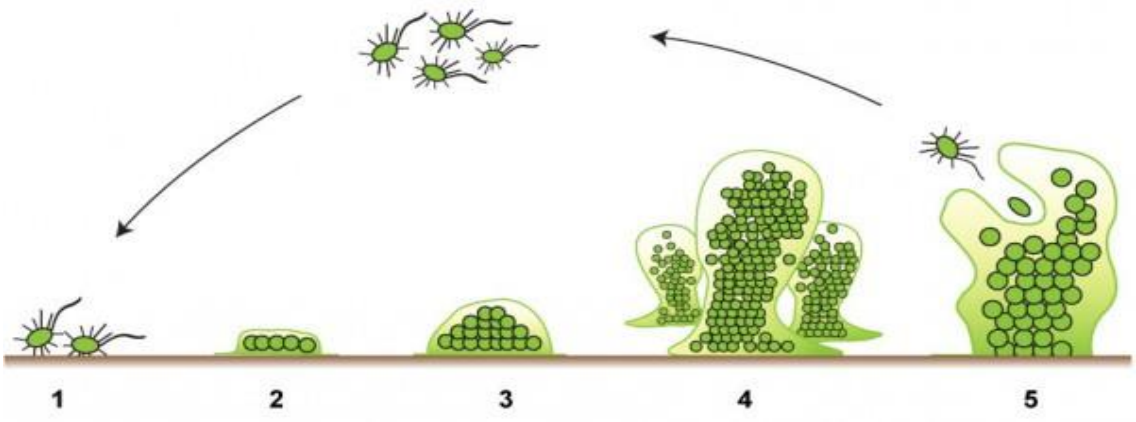
Biyofilmler canlı dokular üstünde, medikal cihazların iç kısımlarda, endüstriyel veya içme suyun boru sistemlerinde ve doğal su kaynakları gibi birçok değişik ortamda gelişebilir. Biyofilmlerin değişik yapıları SEM (Scanning Electron Microscopy) yardımı ile görüntülenebilir (5). Nem miktarının fazlalılığı ve besin maddelerinin ortamda bulunması biyofilm oluşumunu arttırmaktadır. Biyofilmlerin oluşumuna ve gelişmesine bakteri suşu (23, 24), yüzey özellikleri, pH, besin miktarı, sıcaklık (5) gibi çeşitli çevresel faktörler etkili olmaktadır. Biyofilm hücreleri antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik hücrelerden daha dirençli olup antimikrobiyal ajanlarla teması engelleyen ya da azaltan bariyere sahiptirler (25).

Uygun koşullar oluştuğunda bozulma etmeni olanlar ile patojen özellik gösteren tüm mikroorganizmalar tarafından biyofilm oluşturulabilir. Biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeylere bağlanma düzeyi, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, bakteri türü, bakteri hücre duvarının yapısı (Gram pozitif ya da Gram negatif oluşu), bakteri sayısı, bağlandığı yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin maddeleri içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok faktör ile değişebilmektedir (13, 26). Bazı bakteriler biyofilm oluşturmak için yüksek eğilime sahiptir. Bunlardan en yaygınları *Pseudomonas, Enterobacter, Flavobacterium, Alcaligenes, Staphylococcus* ve *Bacillus*'dur. Bu mikroorganizmalar besin maddelerinin çok olduğu birçok ekosistemde tüm yüzey tipleri üzerinde biyofilm oluşturabilir (27).

Biyofilm kütlesinin %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturur. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 ekzopolisakkarit (EPS), %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir. Ancak bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (28). Biyofilm yapısında bulunan maddeler birbirlerine ekstrasellüler matriks vasıtasıyla tutunmaktadırlar. EPS biyofilm oluşturarak mikroorganizmaların koloni oluşturmasına ve yüzeye bağlanmasına yardımcı olması yanı sıra mikroorganizmayı ozmotik strese, faj atıklarına, toksik bileşenlere ve antibiyotiklere karşı da koruyabilmektedir (27).

2.3. Biyofilm Oluşum Mekanizması

En basit biyofilmin yapısı karmaşık olup taze besiyeri sağlandıkça biyofilmin gelişimi çok farklı çevrelerde bile süreklilik göstermektedir. Fakat ortamdaki besin maddelerin azalmasıyla biyofilmin yüzey bağlantıları zayıflar ve içindeki hücreler planktonik modlarına geri dönerler. Biyofilmin oluşumu beş basamakta gerçekleşir (Şekil 2.3). Hücreler yüzeye dönüşümlü tutunup ortamda yaşam için gerekli olan besin maddelerin olup olmadığına araştırırlar. Daha sonra dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen bağları sayesinde bakteri hücre dışı yapıları ile kısa mesafeli etkileşerek yüzeye dönüşümsüz olarak tutunurlar. Bu şekilde yüzeye tutunmuş olan bakteri gelişir ve koloni oluşturur. Mikrokoloniler büyüyüp yüksek yapılara dönüşerek olgun biyofilm oluşur. Biyofilm oluşumunun son aşamasında tek bir bakteri hücresi veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından kopup ortama yayılır (27).



Şekil 2.3. Biyofilmin 5 Oluşum Basamakları: 1. Dönüşümlü tutunma 2. Geri dönüşümsüz tutunma 3. Koloni gelişimi 4. Biyofilm olgunlaşması 5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması (29)

2.3.1. Dönüşümlü Tutunma

Bakterinin yüzey ile ilk etkileşimde bakteri hücresi yüzey ile temas etmemekte ve sadece uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Bakterinin yüzeye tutunması bakteri hücre yüzeyinin, tekstür, yüzey yükü, hidrofobiklik, pH, sıcaklık ve besin maddelerin varlığı gibi fizikokimyasal faktörlere bağlıdır (5, 30, 31, 32, 33). Bu şekilde tutunmuş bakteriler çok az miktarda EPS'ye sahiptir ve bağımsız hareket edebilmektedir (34). Bu haldeki hücreler kolaylıkla durulama ile uzaklaştırılabilir (29)

2.3.2. Dönüşümsüz Tutunma

EPS varlığında dönüşümlü tutunmuş bakterilerin yapmış oldukları zayıf bağlar kalıcı bağlara dönüşüp dönüşümsüz tutunur (35). Bakteriler flagella (kamçı) ve pili (ince kıl) gibi organelleri ile EPS üretip önceden dönüşümlü tutunduğu yüzeye dönüşümsüz bağlanır (15). Hücreler dönüşümsüz tutunduktan sonra biyofilm hücrelerini yüzeyden uzaklaştırmak için güçlü mekanik kuvvet, deterjan, dezenfektan, enzim, sanitizerler veya yüksek ısıl işlemler gerekmektedir (36, 37, 38).

2.3.3. Koloni Gelişimi

Hücrelerin yüzeyde birikmesi, mikroorganizmaların gelişmesi ve EPS üretimi sonucunda mikrokoloni gelişimi gerçekleşir (39). EPS bakteriler arası ve bakteri yüzey

arası bağ oluşumuna katkıda bulunur ve bütün koloniyi kapladığından çevresel stresten korur (5). Bu işlemde bakterilerin bir araya gelmesi ve yüzeyde toplanması planktonik hücrelerin sinyal molekülleriyle etkileşmesi sonucu gerçekleşir. Bu aşamada bir bakteri yüzey üzerinde ilk koloniyi oluşturduktan sonra, diğer bakteriler aynı yüzeyde ikincil koloni oluşturmak üzere harekete geçer. Biyofilm gelişip büyüdükçe, içinde barındığı mikroorganizmalarda da çoğalma görülür (15).

Pseudomonas aeruginosa PA14 suşunun mikrokoloni oluşturabilmesi için pili 4 genine ihtiyaç duyduğu saptanmıştır (34). Yüzme hareketinin, itici güçlerin üstesinden gelebilme ve alt katmanlara ulaşabilmesini sağlayan pili 4 ile uzama ve geri çekilme hareketleriyle mikrokoloniler oluşturulduğu düşünülmektedir (40).

2.3.4. Olgun Biyofilm Oluşumu

Hücreler besin maddelerin etkisiyle kule şeklindeki yapılara dönüşürler (39, 41). Değişik yükseklikteki kuleler gibi duran mikrokoloniler arası besinlerin ulaştırılması ve metabolik atıkların uzaklaştırılması için dolaşım sistemi görevini üstlenen su kanalları bulunmaktadır (14, 15). Hücreler yaklaşık 10 gün ya da daha uzun bir süre içinde bu yapıya ulaşır (35).

2.3.5. Biyofilm Hücrelerinin Koparak Ayrılması

Bu son aşamada biyofilmdeki hücreler tekrar planktonik fazlarına geri dönerler (42). Akış kuvvetindeki artış, iç enzimatik bozulma, EPS ya da yüzey bağlayan proteinlerin açığa çıkması gibi hücre içi işlemler biyofilmdeki hücrelerin ayrılmasında önemli rol oynar (35, 43). Bunun yanında ortamdaki besin maddelerin tükenmesi de biyofilmdeki hücrelerin ayrılmasını önemli derecede tetiklemektedir (2). Biyofilm hücreleri dış kuvvetlerin etkisiyle ayrılabileceği gibi, biyofilm oluşumunun bir parçası olarak tek bir hücre veya birden fazla hücrelerin kopmasının bir sonucu da olabilir (15).

2.4. Biyofilm Oluşumunun Kontrolü ve Engellenmesi

Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesinde ilk aşama biyofilm oluşmadan gerekli tedbirlerin alınmasıdır. Planktonik hücrelerle kıyaslandığında, biyofilm oluşturan hücreler; antibakteriyel maddelere, iodin, iodinpolivinil-pirollidon kompleksi, klorin, monokloramin, peroksijenler ve gluteraldehit gibi biositlere ve ısıya karşı daha dayanıklıdır (44). Bu nedenle biyofilm üzerine yapılan araştırmaların bir diğer yönü de

mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ve her bir mikroorganizma için farklı kompozisyona sahip biyofilmin engellenmesi ve/veya ortadan kaldırılması üzerinedir (45). Biyofilm hücrelerinin antibakteriyel maddelere karşı dayanımının, planktonik hücrelerden en az 500 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir (46). Biyofilm içerisinde bulunan bakterilere ve kullanılan ilaç veya biyosite bağlı olarak biyofilm direncinin etkili olduğu birkaç mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalar, biyofilm içerisine antimikrobiyallerin penetrasyonunun fiziksel veya kimyasal bariyeri, besin sınırlamalarına bağlı olarak biyofilm büyümesinin yavaşlaması, genel stress cevabının aktive edilmesi ve biyofilme bağlı fenotipin ortaya çıkmasını içermektedir. Antimikrobiyal tamamen girememesi polimerik maddenin ajanların biyofilm içerisine biyofilm matriksini oluşturan antibiyotiklerin diffüzyonunu engellediği bilinmektedir. Biyofilm içerisindeki en azından bir kısım organizmaların besin sınırlamasından dolayı yavaş büyüme evresine geçtiği ve bu yüzden de antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği düşünülmektedir. Besin sınırlamasına bağlı olmayan genel strese karşılık olarak da büyümenin yavaşladığı gözlenmiştir. Biyofilm duyarlılığını azaltan diğer bir hususun da biyofilm içerisindeki bir kısım organizmaların koruyucu bir fenotip kazanması olarak açıklanmıştır (47, 48).

2.5. Biyofilm Olarak Diş Plağı ve Diş Plak Oluşumunda Yer Alan Mikroorganizmalar

Diş plağı; diş yüzeyinde biyofilm olarak bulunan, konağın polimerlerinin matriksinin içine yerleşmiş, mikrobiyal orijinli çeşitli mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanabilir. Diş plak birikimi ağız içerisinde güçlü uzaklaştırma etkilerinden koruma sağlayan durgun bölgelerde gerçekleşmektedir (49). Bu tanımı bakteri plağı olarak yapmak daha doğru olur çünkü tamamen bakteriler ve onların ürünlerinden oluşur. 1 mg bakteri plağında 200 milyondan fazla bakteri bulunur. Plak, sadece yiyecek artıklarının yapışmasından veya fırsatçı mikroorganizmaların gelişigüzel birikmesinden oluşmaz. Plağın diş üzerinde birikimi, oldukça organize ve düzenli olaylar zinciridir. Ağzımızda bulunan organizmaların çoğunluğu doğada başka bir yerde bulunmaz. Ağız ortamında mikroorganizmaların yaşamını sürdürmesi, onların yüzeye yapışma kapasitesine bağlıdır. Tutunamayan mikroorganizmalar, ağızdan tükürük akışıyla ve sık yutma refleksiyle hemen uzaklaştırılır. Sadece çok az sayıda özelleşmiş organizma (öncelikle streptokoklar) mukoza ve diş yüzeyi gibi ağız dokularına yapışabilir. Bu yapışan

bakterilerin diş yüzeyine yapışmasını sağlayan özel alıcıları vardır ve birbirlerine bağlanmalarını sağlayan yapışkan bir matriks üretirler. Böylece bakterilerin diş yüzeyine başarılı bir şekilde kolonize olmalarını sağlarlar. Yapışma sağlandığında bu öncü organizmalar çoğalır ve lateral olarak bir hasır oluşturacak şekilde diş yüzeyinin üzerini örterek yayılırlar. Bakterilerin daha da fazla büyümesi diş yüzeyinden dışarı doğru vertikal bir büyüme şeklindedir. Ortaya çıkan bu karışık streptokok hasar, diş yüzeyine doğrudan yapışamayan spiral ve filamentöz bakteriler gibi diğer organizmaların yapışmasına olanak sağlar. Olgun bir plak topluluğunun oluşması ard arda meydana gelen değişimleri içerir, ve oluşan her bir değişiklik bir sonraki aşama için lokal çevre hazırlayan bir önceki aşamaya bağlıdır (50).

Ağız mikroflorasında 700'den fazla bakteri türü diş, dil, ağız mukozası, damak ve periodontal cep gibi bölgelere kolonize olmuşlardır. Bu bakterilerin büyük bir kısmı ağız sağlığı için faydalıyken, bir kısmı da zararlıdır. Bilimsel çalışmalar özellikle ağız sağlığını tehdit eden patojenler üzerinde yoğunlaşmıştır (51). *Streptococcus mutans* bilinen en önemli karyojenik bakteridir. Hemen hemen her insanın ağız boşluğunda bulunmaktadır. *S.mutans*'ın diş yüzeyine tutunabilmesi ortamda sukroz ve diş çürüklerine neden olabilecek diğer şekerlerin fermentasyonu sonucu ortama salınan asitlerin varlığına bağlıdır (52).

Nes ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre streptokoklar ağız florası içinde aynı ortamda bulunan bakterilere kıyasla çok fazla bakteriyosin üretmektedirler. Streptokokların bu özellikleri ağız içerisinde baskın flora olmalarında oldukça etkilidir (53). Kısıtlı yaşam alanı ve besin varlığı nedeni ile biyofilm içerisindeki farklı bakteri türleri kendi aralarında rekabet etmektedirler. *S. mutans* ve *S. sanguinis* birbirlerinin gelişimlerini inhibe eden iki bakteridir. Buna göre; *S. mutans* sayısı yüksekse *S. sanguinis* sayısı azdır. Ortamda bulunan besin miktarı bu iki bakteri arasındaki rekabette önemli rol oynamaktadır. Besin miktarı yeterli ise iki bakteri de gelişebilmekte, biyofilm oluşumu için ilk hangisinin kolonize olduğu fark etmemektedir (54).

2.6. Streptokoklar Hakkında Genel Bilgi

Vücudun normal florasında bulunabilen streptokoklar fırsatçı patojenlerdendir (55). Deride geçici kolonizasyon gösterebilen ancak müköz membranların kalıcı florasında yer alan streptokokların birçok türü vardır ve ölümle sonuçlanabilen ciddi

infeksiyonlara neden olurlar (56). Genellikle hareketsiz olup endosporları yoktur ve gram pozitiftirler. Kanlı agarda tipik hemolitik reaksiyonları gerçekleştirirler. Aerob ve fakültatif anaerob mikroorganizmalardır (57, 58). Oral mikroorganizmalar doğumdan hemen sonra yeni doğan ağzında kolonize olmaya başlamaktadır. *S. salivarius* ,*S. mitis* ve *S. oralis* yeni doğan oral kavitesinde ilk tespit edilen ve en baskın olan mikroorganizmalardır (59).

Oral streptokoklar geleneksel olarak basit biyokimyasal ve fizyolojik testlerle ayırt edilirken günümüzde pek çok farklı tipi hücre protein profillerinin incelenmesi, DNA yapılarının araştırılması ve glikozidaz aktivitelerinin değerlendirilmesi ile birbirinden ayırt edilebilmektedir (60). Oral streptokoklar dört gruba ayrılırlar: *S.mutans, S. salivarius, S. anginosus, S. mitis* (56).

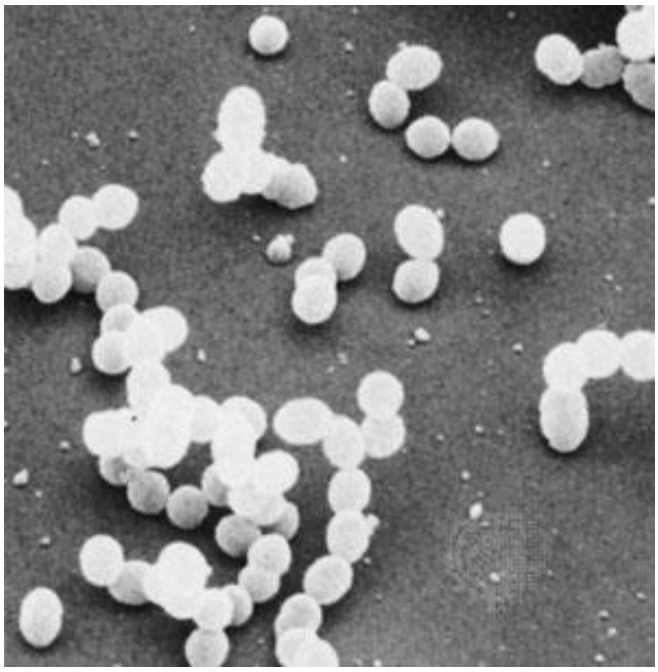
2.6.1. *Streptococcus mutans*'ın Özellikleri

Dental plakta mikroorganizmaların varlığı, 1683 yılında Leeuwenhoek tarafından mikroskop altında görüldüğünden beri bilinmektedir. 1924 yılında İngiliz doktor J.K. Clark bir çocuktaki çürük lezyonundan *Streptococcus* izole etmiştir. Bunu *S. mutans* olarak adlandırmıştır (61, 62).

Gram pozitif, fakültatif anaerob bir bakteri olan *S. mutans* oral kavitede yaşamakta ve diş çürüğünün primer patojeni olarak bilinmektedir (Şekil 2.4) (63). Buzlu cama benzeyen pürüzlü, kabarık ve düzensiz koloniler şeklinde ürer. Kanlı agarda beyaz, gri ya da sarı renkte 0,5–2,0 mm çapında koloniler oluştururlar (55). *S. mutans* α-hemoliz yapan streptokoklardandır. Yapısında, bazı istisnalar haricinde, C-polisakkarit bulunmadığından β-hemoliz yapan streptokoklardan daha basit bir yapıya sahiptir. *S.mutans* bir anaerob tür olduğundan diş ceplerin dip kısımlarında da üreyebilir. Bunun yanında asidik ortamda yaşabilme özelliğine sahiptir. Glukan kaynaklı adherens, laktik asit üretimi, asit toleransı, IgA-proteaz ve bakteriyosin üretimi bu patojenin spesifik özellikleridir (64).

Patojen bakterilerin konak hücrelere olan bağlanma yerlerini bloke edip bunların sayılarını azalttığından probiyotik etkisi vardır. *S.mutans*, şeker içeren besinlerin girişi ve bunun sonucunda düşen pH'ın etkisiyle diş minesi demineralize edebildiği, tükrükte bulunur. Bu nedeniyle *S.mutans* sayısı ile diş çürüğünün oluşma riski arasında bir bağ vardır (65, 66).

Bu bakteri örneğin dental müdahale sonucunda kan yoluna girip önceden hasar görmüş kalp kapakçıklarında endocarditis lenta'ya neden olabilir (65, 67).



Şekil 2.4. *S.mutans*'ın Elektron Mikroskopundaki Görüntüsü (71)

2.6.2. *S.mutans*'ın Patogenezi

Diş plağın oluşumu için dört faktör gerekir. Bunlar; 1) Taşıyıcı, 2) Substrat, 3) Zaman, 4) Bakteri.

Bakterilerin dekstran üretimi sonucu tutunabildiği temizlenmiş diş yüzeylerinde kısa süre içinde proteinler ve glikoproteinler birikebilir. Mekanik diş temizliği yapılmadığı takdirde 10-20 gün içinde kalın bir plak tabakası oluşur. Bu tabakanın içinde *S.mutans,* besinlerin içinde bulunan oligosakkaritlerden laktik asit üretir. Laktik asit Ca^{+} iyonlarının çözünmesine ve böylece diş minesinin demineralizasyonuna neden olmaktadır (64, 68).

Önceden hasar görmüş kalp kapakçılarda toksemi sonucunda endocarditis lenta oluşabilir. Ağızdaki küçük yaralardan ya da diş çekimi sırasında bakteriler kan dolaşımına girip, çoğu zaman yara izlerine sahip, fibrin ağı ile kaplı kalp kapakçıklara

yerleşir. Trombus oluşur ve kan akışı tarafından sürüklenip koroner arter embolisi ve beyin damar embolisine neden olmaktadır (69).

2.6.3 *S.mutans*'ın Epidemiyolojisi

Prehistorik çağlardan beri insanlık diş çürüğünden muzdariptir, dolaysıyla bu yeniçağın bir hastalığı değildir. Bu hastalık insandan insana bulaşır ve çoğu zaman anne enfeksiyon kaynağı olmaktadır. Böylece her insan doğumdan kısa süre sonra bu, ağız boşluğuna yerleşen, patojenin bir taşıyıcısı haline gelir (64, 70).

2.7. Antibiyofilm ve Antibiyofouling

Klinik ekipman ve implantlarda oluşan biyofilmler, infeksiyonların ana nedenlerinden biridir (72). İstenmeyen biyofilmleri temizlemek için belirgin sistemlere uygulanabilen bazı teknikler vardır (73, 74). Bunlar arasında (a) mekanik temizleme, (b) antimikrobiyal ajanların kullanımı, (c) önemli besinlerin kaldırılması ile biyofilm gelişimini engellemek, (d) mikrobiyal yapışmaları engellemek ve (e) biyokütle çıkarımının desteklenmesi bulunmaktadır. Mekanik temizleme ve antimikrobiyal ajanlar 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 (74, 75). Piyasada satılan birçok sayıda antiplak ajanların dental biofilm oluşumunu veya metabolizma önleyici etkisi araştırılmıştır. Ancak bu ajanların istenmeyen yan etkileri taşıdığından alternatif ajanların arayışı gereklidir (58). Kimyasal yollarla diş plağını kontrol altında tutmak üzere klorheksidin, fenol bileşikleri, kuarter amonyum bileşikleri, antibiyotikler, songuinarin, flouridler kullanılmaktadır. Bugün için klorheksidin en etkili antiplak ajanı olarak kabul edilmektedir. Ancak klorheksidinin dişleri, restorasyon materyallerini, mukozayı boyama; tad bozukluğu, mukozal deskuamasyon gibi yan etkileri bulunmaktadır (76). Ayrıca biyosit ve dezenfektanların kullanımı, biyofilmdeki mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara karşı direnç oluşturması durumunda etkisiz kalabilir (74, 75). Biyofilmin gerekli besinlerden mahrum bırakılması yoluyla temizlenmesi ve bu stratejinin etkinliğini belirleme üzerine çalışmalar devam etmektedir (75). Bu strateji ortamdaki besinlerin kontrol edilemediği durumlarda ve ortamlarda kullanılamamaktadır. Biyofilmin ayrılmasını destekleyen stratejiler, üzerinde en az durulanlardır (74). Biyofilm temizliğinde biyofilm matriksinin fiziksel bütünlüğünü

bozmak, biyofilm temizliğinin önemli olduğu tıbbi ve endüstriyel işlemler için çekici bir alternatiftir. Bu yaklaşım, ekolojik dengeyi bozma eğiliminde olan toksik antimikrobiyal ajanların kullanılmasının azalması ile bir avantaj sağlayacaktır (77). Biyofilmlerin önlenmesinde bugün konvensiyonel uygulamalara alternatif olarak daha yüksek EPS parçalama kapasitesine ve verimine sahip mikroorganizmaların keşfi üzerinde bazı çalışmalar vardır. Böylece, EPS'leri parçalayabilme yeteneğine sahip bakterilerin, istenmeyen biyofilmlere karşı potansiyel biyoparçalama ajanları olarak kullanılabilmeleri mümkün olacaktır. Bununla beraber, EPS'yi parçalayan bakteriyal polisakkarazlar ve proteazların daha detaylı taranmasıyla, zararlı biyofimler için dezenfektan ve temizleme ajanı olarak kullanılabilecekleri şüphesizdir (78). Hatta silikon kateterler üzerindeki birkaç *Candida* türü ve *Saccharomyces cerevisiae* biyofilmini inhibe edici ajanın yine *Candida* hücrelerinin oluşturduğu bir biyofilm olduğu bildirilmiştir (79). Leroy ve ark. (80) tarafından, biyofilm oluşturucu deniz mikro-organizma veya makro-organizmalarının dirençliliklerinden dolayı, öldürülmesinden ziyade enzimatik olarak biyofilm matriksin (EPS'nin) parçalanması ile adhezyonun inhibisyonu önerilmiştir. Hücre dışı polimerik matriksin yapışkanlığının enzimatik olarak giderilmesiyle biyofilm kontrol stratejilerinin mümkün olabileceği kinetik bir modelin önerildiği modelleme çalışmasıyla da ortaya konulmuştur (81).

Günümüzde yeni antimikrobiyal hedeflerin saptanmasına yönelik araştırmalar arasında, bir bakteri topluluğu içindeki hücrelerin birbirleri arasındaki iletişimin engellenmesi konusundaki çalışmalar, henüz pratiğe yansımamış olsa da, gelecek için umut vadetmektedir. Quorum Sensing (QS) adıyla bilinen ve bakteri hücresinin aynı topluluk içindeki türdeşlerinin yoğunluğunu algılaması ve bunun sonucunda topluluk içindeki tüm bireylerin koordine biçimde davranış değişikliği göstermesi olarak tanımlanabilecek bu özellik çok sayıda Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmada saptanmıştır. Bu mekanizmanın farklı biçimlerde inhibisyonunun antibakteriyal etki gösterebileceğine dair gözlem ve kanıtlar vardır (82).

Biyofilmin parçalanması için enzimler de kullanılabilmektedir. Fakat biyofilmdeki hücre dışı polisakkaritlerin çeşitliliği nedeniyle biyofilmlerin parçalanması amacıyla birden fazla enzim etkinliği gerekebilir. Yüzeydeki ve kapalı borularda biyofilm bakterilerinin kontrolü bilinen bir yöntemdir. Aslında, borularda ve proteinin kontakt lenslerden çıkarılması için proteazlar kullanılmaktadır. Ancak enzimlerin bakteriyel

biyofilmler üzerinde kullanılması yine de sınırlıdır, bu biraz da kullanımı sınırlılık göstermektedir (83).

Biyofilm matriksi çok sayıda heteropolisakkarit içerir. Bu nedenle EPS'lerin şeker içeriğinin tayini ve tüm şekerler için ayrı enzimatik aktivitenin eklenmesi önemlidir. Zararlı biyofilmlerle mücadelede EPS'nin parçalanması için spesifik polisakkarazların proteazlar, lipazlar ve glikoproteazlar ile uygulanmasının avantajı daha fazladır. Yine proteazların kullanımıyla yüzeylere sıvı akışı ile taşınan organik biyofouling de önlenebilecektir (84). Antibiyofouling biyolojik birikiminin uzaklaştırılması veya birikiminin önlenme sürecidir. Bu işlem biyofouling'i kontrol etmek için kullanılabilir. Antibiyofouling fiziksel veya kimyasal olarak yapılmaktadır. Fiziksel kontrol olarak düşük temas direnci ve düşük adezyon özelliğe sahip olan yüzeyler, ıslanabilen yüzeyler, köpek balığı ve yunusların derileri gibi mikro dokusuna sahip olan yüzeyler, bakım, kabuklanma kontrolü gibi kontrolleri sayılabilir. Kimyasal kontrolde ise değişik salgılar ile biyofilmler kontrol altında tutulur. Fouling bu belirtilen fiziksel ve kimyasal kontrollerle önlenir ve ortadan kaldırılabilir. Doğada bitki, böcek, mercan ve balıklar bu role üstlenirler. Spesifik antibiyofouling ajanlar lotus yaprağından tutup köpek balığı derisine kadar sıralanabilir (17). Biyofouling'i azaltan yöntemler arasında düşük temas dirence ve düşük adezyona sahip yüzeylerin kullanılması sıkça kullanılır. Sıvı akışında düşük temas direnci mikroorganizmaların kolaylıkla yıkarak uzaklaştırılmasını sağlar. Düşük adezyona sahip yüzeylerde ise mikroorganizmalar koloni oluşturmak üzere yüzeye tutunamazlar (85-87).

2.8. *Viburnum* Cinsi hakkında Genel Bilgi

Viburnum, daha önceden *Caprifoliaceae* familyasına ait bir üye iken moleküler filogenetiğe göre yapılan sınıflandırmaya göre *Adoxacea* familyasından olan ve yaklaşık 150-175 değişik çalı ve (birkaç türde) küçük ağaç türleri içeren bir cinstir (88, 89). Bu türler Kuzey yarıkürenin ikliminde bulunup Güney Amerika'nın tropikal dağlık bölgelerinde, Ukrayna, Rusya ve güneydoğu Asya'da, Afrika'da ise sadece Atlas Dağlarında bulunur (90, 91).

Yaprakları karşılıklı konumlanmış, basit ve tamamıyla ya dişli ya da lopludur. Soğuk iklim türleri yaprak dökerken ılık iklim türleri yaprak dökmez. Bazı türler filiz ve yaprak kısımlarda yıldız şeklindeki tüylerle yoğun bir şekilde kaplıdır (Şekil 2. 5).



Şekil 2.5. *Viburnum opulus americanum* yaprağındaki tüylü kısımları (92)

Çiçekleri 5-15 cm'lik demetler halindedir ve her çiçek beyazdan pembeye kadar değişen renklerde, 3-5 mm'lik çaplı ve beş taçyapraklı olup bazı türler yoğun kokuludur. Dişi organda 3 akraba meyve yapraklara sahiptir ve nektarı bu dişi organın tepesinde bulunur. Bunun yanında bazı türlerde demeti çevreleyen dölleyici hedef olarak görev alan büyük, gösterişli, kısır çiçek saçakları bulunur (Şekil 2. 6). Meyvesi ise yuvarlak,

oval veya bir nevi yassı sert çekirdekli, renkleri kırmızıdan mora, maviden siyaha kadar değişen tek tohumludur (Şekil 2. 7). Bunların bazıları insan tarafından yenilebilir fakat çoğu hafif zehirlidir (93-96).



Şekil 2.6. *Vibrunum opulus americanum* çiçek demeti (92)



Şekil 2.7. *Viburnum opulus* L. meyvesi (97)

2.8.1. *Viburnum opulus* L. (Gilaburu)

V. opulus L. bir yaprak döken çalı türüdür 1,5-6 metre yüksekliğe ulaşır. 4-6 mm uzunluğunda saplı kış tomurcuğu iki çift olgun, bitişik ve kel tomurcuk pula sahiptir.

Kalınlığı inceden kalına kadar değişen gövde kabuğu mantarımsı bir yapıya sahip olabilmektedir. İlk senesinde küt ve köşeli olan dalları yeşil-kahverengi, bazen kızıl (Şekil 2.8), hafif tüylü, farkedilebilir lentiselli kabuğa sahiptir (Şekil 2.9) (98).



Şekil 2.8. *V.opulus* bitkisinin yeşil-kahverengi ve kızıl renkleri (97, 99)



Şekil 2.9. *V.opulus* gövde ve sap yapısı (100)

Bitkinin beyaz renkli çiçekleri 4-11 cm çapa sahip korimbin ucunda gelişir. Her korimbte, 5 mm kadar küçük bir çapa sahip olan üretken çiçek ve bunları bir halka olarak çevreleyen 1. 5-2 cm çaplı, dikkat çekici taç yapraklı kısır çiçekler bulunur. Çiçekler yazın olgunlaşır ve böcekler tarafından tozlaşır. Meyvesi 7-10 mm çapında parlak kırmızı renkli, yuvarlak, sert tek çekirdeklidir. Tohumları kuşlar tarafından yayılmaktadır (101).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN GEREÇLER

3.1.1. Cihazlar

Sterilizasyon işlemlerinde Hirayama Hiclave HG-50 otoklavı, Ecocell pastör fırını, kültür çalışmalarında Safe Fast Classic Laminar Flow kabini ve New Brunswick Scientific Innova 42 inkubatörü kullanılmıştır. Çöktürme işlemlerinde Thermo Scientific SL 16R santrifüjü, karıştırma işlemlerinde BioSan Vortex V-1 plus, ısıtma ve çözme işlemlerinde Bandelin Sonorex RK 52 H ve hücre yoğunluğu ayarlanmasında BioSan Den-1 McFarland Densitometer kullanılmıştır. Ekstrenin hazırlanmasında Heidolph Instruments Gmbh & Co. KG – Laborota 4000 eco Rotary Evaporator ve Labconco Freezone liyofilizatör kullanılmıştır. UV ölçümlerinde Jenway 6800UV/Vis Spectrophotometer ve Biotek Synergy HT Eliza okuyucu kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bakteri üretiminde Nutrient sıvı (5g/L pepton, 3g/L meat extract, pH:7 ±0,2) (Merck M105443) ve Nutrient katı(NA) (5g/L pepton, 3g/L meat extract, 12g/L agar-agar, pH:7 ±0,2) (Merck M105450) besi ortamları ve Sukroz S0389 (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Bitkisel ekstrenin hazırlanmasında ekstraksiyon çözeltileri olarak etanol, toz ekstrenin çözücüsü olarak Dimetilsülfoksit (Carlo Erba 445103) tercih edildi. EPS ölçümlerde Triklorasetik asit (Merck M100807), %95'lik etanol, Fenol %100 (Sigma-Aldrich 16017) ve Sülfirik asit % 95-98 (Fluka 84721) kullanılmıştır. XTT yönteminde Cell Proliferation Kit XTT [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] (Appli Chem Panreac A80881000), SEM görüntülenmesine hazırlık çalışmasında ise Gibco 10270 FBS (Fetal Bovin Serum), PBS (Phosfate Buffered Saline) (Sigma-Aldrich P7059) ve Glutaraldehit (Sigma-Aldrich G5882) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Bütün çalışmalarda 0,5-10 µL (Eppendorf Research Plus 488450A), 10-100 µL (Eppendorf Research Plus 489855A), 100-1000 µL (Eppendorf Research Plus 494752A), ve 1-5 mL (Microlit Micropipette 15103516) otomatik mikropipetleri kullanılmıştır. Hazırlanan ekstrelerin filtrelenmesinde Sartorius Minisart Syringe Filter NML Hydrophilic 0,2 µm, MIC ve XTT çalışmalarında 96 well culture plate (Nest Biotech) ve SEM görüntülenme hazırlığında Thermo Scientific 177445 Lab-Tek Chamber Slide w/Cover Permanox Slide Sterile 16/PK 8 well kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan Bakteri Suşu

Çalışmada mikroorganizma olarak *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Microbiologics KWIK STIK 0266P) suşu kullanılmıştır.

3.1.5. Araştırmada Kullanılan *Viburnum opulus* L. (Gilaburu) ve Temini

Kullanılan *V. opulus* L. bitki örnekleri Kayseri ilinin Melikgazi ilçesine bağlı Gesi Mahallesi bağlık alanlarından toplanmıştır. Yaprak ve gövde kabuğu örnekleri 2015 yılı Eylül ayında toplanıp aynı gün ekstraksiyon işlemlerine başlanmıştır.

3.1.6. Bakterinin Aktifleştirilmesi

S. mutans bakterisi Nutrient sıvı besi ortamında uygun inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Bir gecelik inkübasyon süresinden sonra Nutrient sıvı besi ortamındaki aktif kültür MacFarland Densitometer kullanılarak 0,5 Mac Farland standardına ayarlanmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

V. opulus L. yaprağından total 45 g ve kabuğundan total 42,2 g örnekler toplanmıştır. Kabuk örnekleri uzunluğu ve genişliği yaklaşık 1cm olan parçalara küçültülmüştür. Yaprak ve kabuk örnekleri daha sonra havada madde kaybı olmadan kurutulmuştur ve yapraklar yaklaşık 5-7 mm'lik boyutlara kadar küçültülmüştür. Kabuk örneğinin 42,2 g'ı 500 mL distile %70'lik etanolde çalkalamak üzere kavanozlara aktarılmıştır. Aynı şekilde yaprak örneği 500 mL distile %70'lik etanole alınmıştır. 4 adet kavanoz 3 gece

37ºC'deki su banyosunda çalkalanmıştır. İlk gecenin sonunda kavanozlardaki alkol birer erlene süzülmüştür. Çalkalama işlemini devam ettirmek amacıyla kavanozlardaki örneklere 400 mL alkol ilave edilmiştir. İkinci gecenin sonunda yine alkol kavanozlardan süzülüp erlenlere alınmış ve bu sefer son çalkalama işlemi için örneklere 350 ml alkol ilave edilmiştir. Son bir gecelik çalkalamanın sonunda alkol yine süzülüp erlenlere aktarılmıştır. Bu 3 gecelik işlem sonunda yaklaşık 1,25 L kabuk etanol ekstrakt, 1,25 L yaprak etanol ekstraktı elde edilmiştir. Ekstreler daha sonra alkolü uçurmak amacıyla vakumda distile edilmiş ve oluşan yoğun ekstreler ardından dondurulup liyofilizatörde kurutulmuştur. Kuru örnekler havanda öğütülüp tartıldıktan sonra 50mL hacminde falkon tüpler içinde -20ºC'de depolanmıştır.

Ekstreler daha sonra deneylerde kullanmak üzere %100 DMSO ile 100 mg/L şeklinde 2mL'lik eppendorf tüplerinde hazırlanıp 14000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Süpernatant nutrient sıvı besi ortamı ile seyreltilip istenilen konsantrasyona getirildikten sonra 0,22 µm'lik şırınga filtrelerinden geçirilerek steril edilmiştir.

3.2.2. *S. mutans* Planktonik Hücrelerinin Bitki Ekstraktlarına Duyarlılığının Ölçülmesi

Bitki ekstraktlarının Nutrient sıvı besi ortamında hazırlanan stok çözeltilerinden (20mg/mL) iki-katlı dilüsyon serileri (0,625-10 mg/mL) oluşturulmuş ve eppendorflara konulmuştur. Aktif bakteri kültürünün yoğunluğu 0,5 Mac Farland standardına göre ayarlanmıştır. 96 kuyucuklu mikroplakaların her bir çukuruna hazırlanan konsantrasyonlardan 100 µL ve *S. mutans* bakteri kültüründen 100 µL eklenmiş ve 37ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar birbirinden bağımsız üç denemeden elde edilmiştir. Negatif kontrol olarak kuyucuğa sadece 200µL besi ortamı, pozitif kontrol olarak ise kuyucuğa 100 µL bakteri kültürü ve 100 µL besi ortamı konulmuştur (102). Biyofilm ve planktonik hücreler için Minimum İnhibitör Konsantrasyonu $(MİK)_{50}$, ≥ %50 bakteriyel inhibisyona neden olan minimum antibakteriyel konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

3.2.3. XTT Yöntemi ile Biyofilmlerin Bitki Ekstraktlarına Duyarlılığının Ölçülmesi

Çalışmada 24 saat %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında aktifleştirilmiş *S.mutans* kullanılmıştır. *S. mutans* biyofilm denemeleri 96 kuyucuklu mikroplakalarda gerçekleştirilmiştir. Öncelikle eppendorf tüplere 1 mL bakteri kültürü (0,5 Mac Farland) ilave edilerek 37ºC'de farklı sürelerde (8 ve 24 saat) inkübe edilmiştir. Belirlenen inkübasyon sürelerinden sonra örnekler 20 dk, 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant dökülüp eppendorflardaki peletlere 1'er mL PBS eklendikten sonra bu karışım tekrar santrifüj edilmiştir. İkinci santrifüjden sonra süpernatant dökülüp oluşmuş peletlere 1 mL daha PBS ilave edildikten sonra tüpler son bir kez santrifüj edilmiştir. Son santrifüjden sonra süpernatant atılmıştır ve bu sefer peletlere 1 mL %1'lik sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamı eklenmiştir ve ardından vortexlenip her bir kuyucuğa 100'er µL konulmuştur. Daha sonra kuyucuklara bitki ekstraktlarının stok çözelti hazırlanan iki-katlı dilüsyon serilerinden (0,3125-5 mg/mL) 100 µL ilave edilerek 37ºC 24 saat inkübe edilmiştir (103). Tüm testler 3 paralel 2 tekrarlı yapılmıştır. Pozitif ve negatif kontroller 3.2.2' de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Bu süreden sonra XTT kit prosedürü doğrultusunda kör serisi ve kontrol kuyucuklar da dahil olmak üzere her kuyucuğa 100'er µL XTT kit çözeltisinden eklenip tekrar 30 dakika inkübatöre yerleştirilmiştir. Daha sonra hücre canlılığına göre renk değişimi gösteren ve göstermeyen bütün kuyucukların 450nm'de UV spektrometrede ölçümler yapılıp sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.4. *S. mutans*'ın EPS (Ekzopolisakkarit) Üretim Tayini

Çalışmada kullanılan *S.mutans*'ın oluşturduğu EPS miktarı hem %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında (kontrol) hem de 5 mg/mL bitki kabuk ekstraktı içeren %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında tespit edilmiştir (104).

S. mutans bakteri suşu Nutrient sıvı besi ortamında 37ºC 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda gelişen kültürün hücre yoğunluğu 0,5 Mac Farland bulanıklığına ayarlandıktan sonra yukarıda bahsedilen iki farklı sıvı besi ortamına %1 oranında aşılanarak 37ºC 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 1 ml'lik hücre kültürleri steril 1,5 mL'lik eppendorf tüplerine alınmış ve 10-15 dakika 100 ºC'de kaynatılmıştır. Daha sonra tüpler oda sıcaklığına gelinceye kadar soğutulup üzerine %85'lik TCA'dan 1,7µL ilave edilmiştir ve tüplerin hepsi 20 dakika 14000rpm'de

santrifüj edilmiştir. Süpernatanlart temiz eppendorflara alınıp üzerine %95'lik etanol ilave edilerek 1 gece 4ºC'de bekletildikten sonra 20 dakika 14000rpm'de santrifüj edilmiştir. Peletler 1 mL distile suda çözülerek total EPS fenol-sülfirik asit metoduna (105) göre standart olarak glikoz (106) kullanılarak tespit edilmiştir.

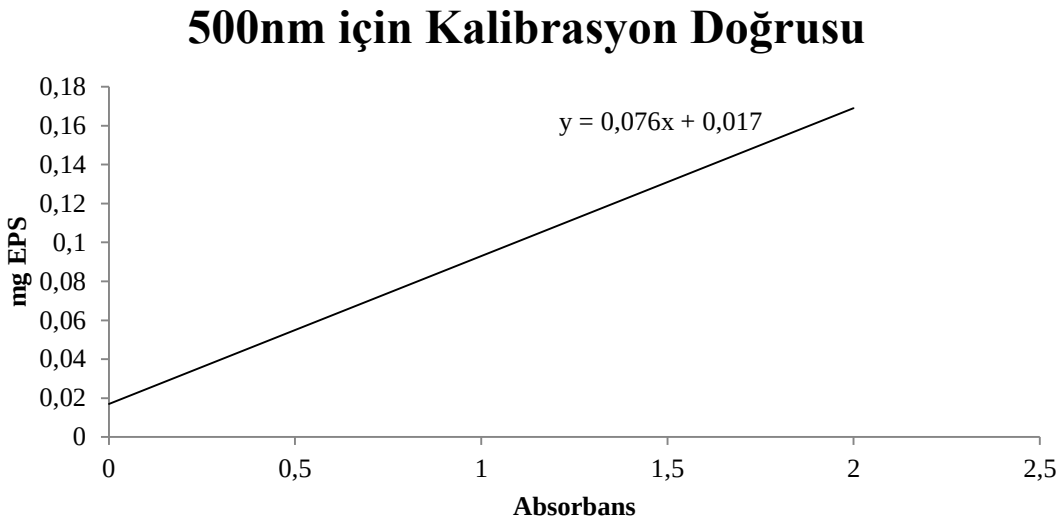
Fenol-Sülfirik Asit Metodu:

Bölüm 3.2.4.'de belirtildiği gibi hazırlanan örnekler 9 mL'lik deney tüplerine aktarıldıktan sonra bunlara %5'lik 1 mL fenol eklenmiştir. Ardından her örneğe 5 mL derişik sülfirik asit ilave ettikten sonra tüpler vortexlenip 10 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler 25-30ºC'deki su banyosunda 10-15 dakika soğutulduktan sonra belirtilen dalga boyunda okumaya hazır hale gelmiştir.

Standardın Hazırlanışı:

5-100 µg/mL aralığında hazırlanan glikoz konsantrasyonları kullanılarak EPS standardı hazırlanmıştır. Bakterinin EPS üretimi standart eğri ile karşılaştırılarak mg/mL olarak saptanmıştır (Şekil 3.1.).

$y = 0{,}076x + 0{,}017$ $R^2 = 0{,}997$



Şekil 3.1. *S. mutans'ın* EPS üretimini tespit etmek için hazırlanan kalibrasyon doğrusu

3.2.5. *S. mutans*'ın Dekstran Üretim Tayini

Çalışmada kullanılan *S.mutans*'ın oluşturduğu dekstran miktarı hem %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında (kontrol) hem de 5 mg/mL bitki kabuk ekstraktı içeren %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında tespit edilmiştir (107).

1mL Nutrient sıvı besi ortamında aktifleştirilen bakterilerin hücre yoğunlukları 0,5 Mac Farland bulanıklığına ayarlanarak 9 mL %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamına aktarılıp 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 10 ml'lik bu kültür dekstran üretimi için kullanılacaktır. 10 mL'lik kültürde, 90 mL'lik %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamına ilave edilmiştir ve 37ºC 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra örnek iyice karıştırılarak aynı miktarda (100mL) etanol eklenip santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine yine aynı miktarda etanol ilave edilip iyi karıştırmayla çözündürülmüştür. Süpernatant oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletilmiştir ve peletten ayrılıp atılmıştır. Sonra etanol ilave edilmiştir. Çöken dekstran madde kaybı olmadan süzülmüştür ve kurutulduktan sonra tartılmıştır.

3.2.6. Lamel Üzerinde *S. mutans* Biyofilminin Oluşumu ve Oluşturulan Biyofilmin Bitki Ekstraktına Duyarlılığının Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntülenmesi

Plakalar içindeki lamellere yüzeylerini kaplayacak şekilde fetal bovine serum (FBS) eklenip 4ºC'de gece boyunca bekletilmiştir. Lamel üzerindeki FBS'yi uzaklaştırmak için 3 kez steril PBS (0,01 M) ile yıkanmıştır. Biyofilm oluşumunu sağlamak için bir gece öncesinden %1'lik sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında aktifleştirilmiş ve hücre yoğunlukları 0,5 Mac Farland bulanıklığına ayarlanmış hücre kültüründen 100 µL lamellere ilave edilip 37ºC 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda plaka içi boşaltılır ve üzerine pozitif kontrol için 200µL steril Nutrient sıvı besi ortamı, geliştirilen biyofilmin test edilecek bitki ekstraktına duyarlılığını tespit etmek için ise biyofilm tabakasının üzerine 200 µL ekstrakt (5 mg/mL) ilave edilmiştir. Bu plakalar daha sonra çalışılan süreler için (8 ve 24 saat) 37ºC inkübasyona bırakılmıştır (102).

Belirtilen inkübasyon sürelerinden sonra sıvı kısım atılıp biyofilmler PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine %2,5'luk glutaraldehit ilave edilip 4ºC'de bekletilmiştir. Bu işlemlerden sonra örnekler SEM için rutin olan metotla hazırlanmıştır (102).

3.2.7. İstatistiksel Analiz

İstatiksel analiz Sigma Plot 12.0 Student t-Testi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve değerlendirilmiştir. Test grupları arasında istatistiki olarak anlamlı düzey $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

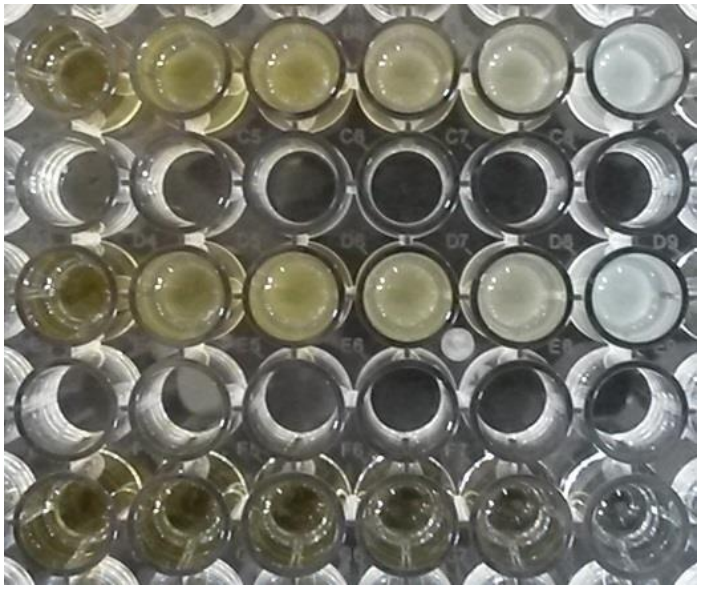
V. opulus'un kabuk ve yapraklarının etanol ile hazırlanmış ekstraktlarının % verimleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Bitki kabuk ve yaprak ekstrelerinin % verimi

Örnek	Örnek Miktarı	Kullanılan Çözücü Miktarı	Kuru Ekstre	%Verim
Kabuk EtOH	42,2g	1250mL	6,54g	%15,5
Yaprak EtOH	45,0g	1250mL	12,37g	%27,5

4.2. *S. mutans* Suşunun Bitki Ekstraktlarına Duyarlılığı

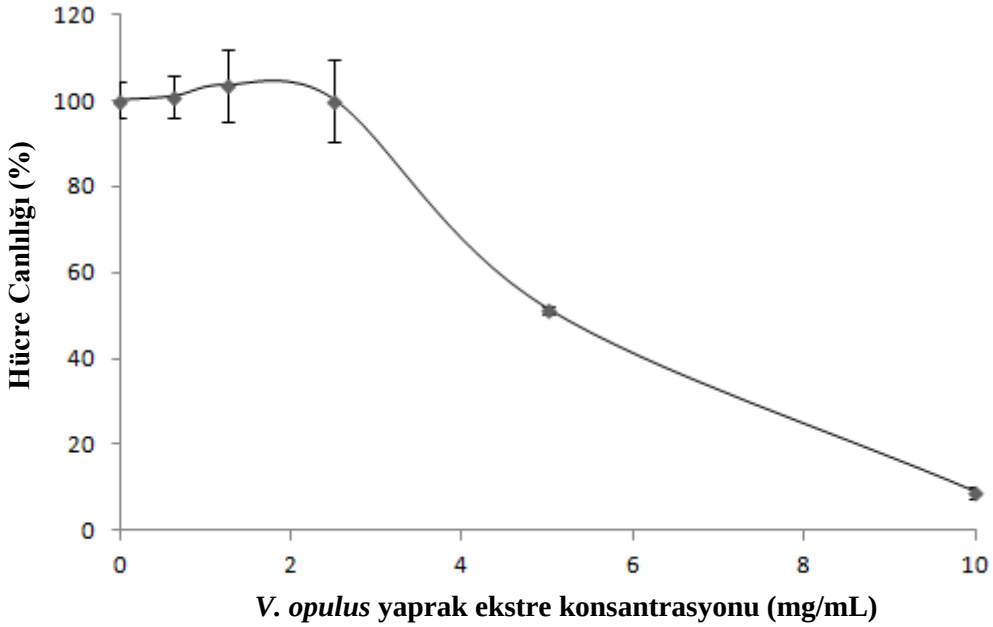
Yaprak ve kabuk örneklerine ait etanol ekstrelerinin MIK testleri yapılmıştır. *S. mutans* planktonik hücre gelişimleri üzerinde farklı konsantrayonlardaki bitki kabuk ve yaprak etanol ekstrelerinin etkisi Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Kabuk ekstresi >2,5mg/mL konsantrasyonlarında 24 saatte bakteri hücre gelişimini inhibe ederken yaprak ekstresi 5 mg/mLve üstü konsantrasyonda gelişim üzerinde inhibitörik etki göstermiştir (Şekil 4.3, 4.4). Hücre canlılığında meydana gelen azalma pozitif kontrolle mukayese edilmiştir. Yaprak ekstraktında 5 mg/mL ve 10 mg/mL konsantrasyonlarında, kabuk ekstraktında ise 1,25-10 mg/mL aralığında çalışılan konsantrasyonlarda anlamlı fark ($p<0,05$) tespit edilmiştir. *S. mutans* üzerinde kabuk ekstresinin yaprak ekstresine göre daha düşük konsantrasyonlarda inhibitörik etkiye sahip olmasından dolayı devamındaki çalışmalar için kabuk ekstresi seçilmiş ve kullanılmıştır.



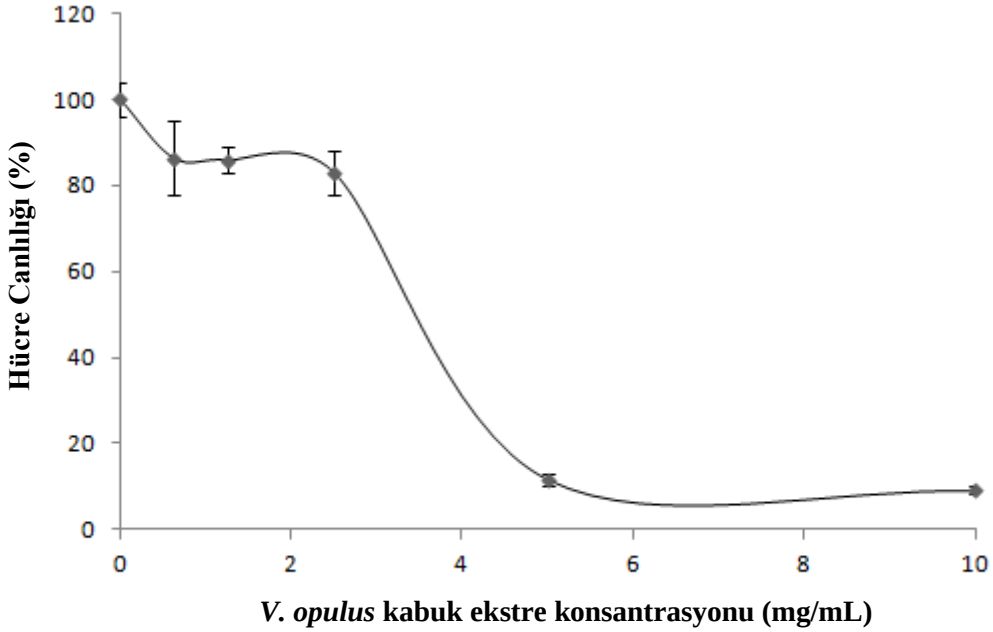
Şekil 4.1. Etanol-yaprak ekstresinin MIK testi



Şekil 4.2. Etanol-kabuk ekstresinin MIK testi



Şekil 4.3. *S. mutans* planktonik hücrelerinin bitki yaprak ekstresi varlığında büyüme eğrisi



Şekil 4.4. *S. mutans* planktonik hücrelerinin bitki kabuk ekstresi varlığında büyüme eğrisi

4.3. XTT Yöntemi ile *S. mutans* Biyofilminin Ekstrakta Duyarlılığının Ölçülmesi

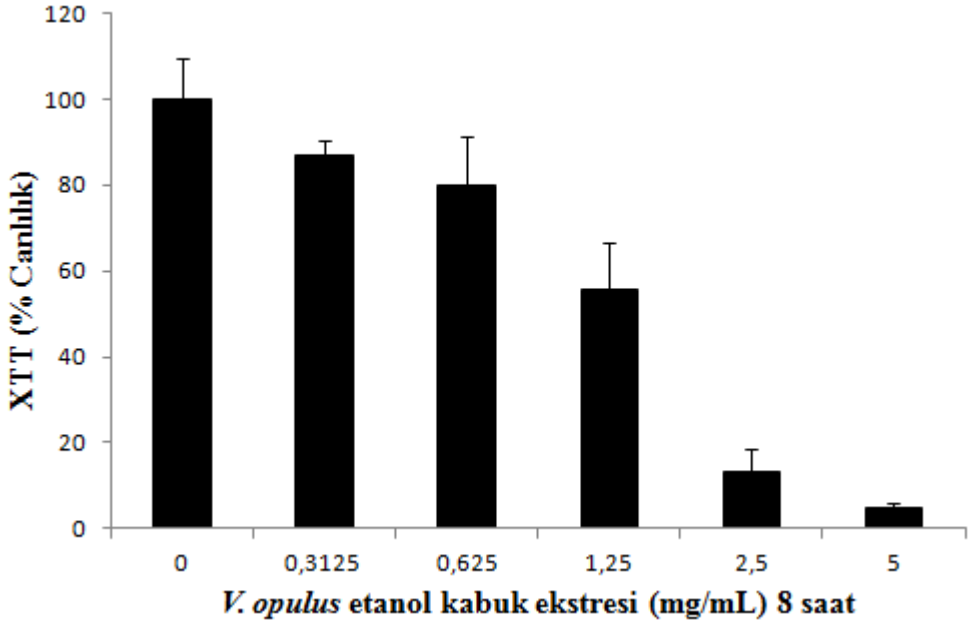
XTT redüksiyon yöntemi bitki kabuk ekstraktının *S. mutans* tarafından üretilen biyofilm üzerindeki etkisini ölçmek için kullanılmıştır (Şekil 4. 5 ve 4. 6). Farklı fazlardaki (8 ve 24 saat) bakteri biyofilminin kabuk ekstresine duyarlılığı sırasıyla Şekil 4. 7 ve 4. 8'de verilmiştir. 8 saatlik fazdaki biyofilmde 1,25-5 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda, 24 saatlik fazdaki biyofilmde ise çalışılan tüm konsantrasyonlarda anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Ekstrenin her iki inkübasyon süresi sonucunda oluşturulan biyofilm tabakası üzerinde birbirine yakın düzeyde inhibisyonun gösterdiği ancak erken fazda (8 saat) bu etkinin olgun faza (24 saat) göre yüksek konsantrasyonlarda ($\geq$ 2,5 mg/mL) daha güçlü olduğu tespit edilmiştir.



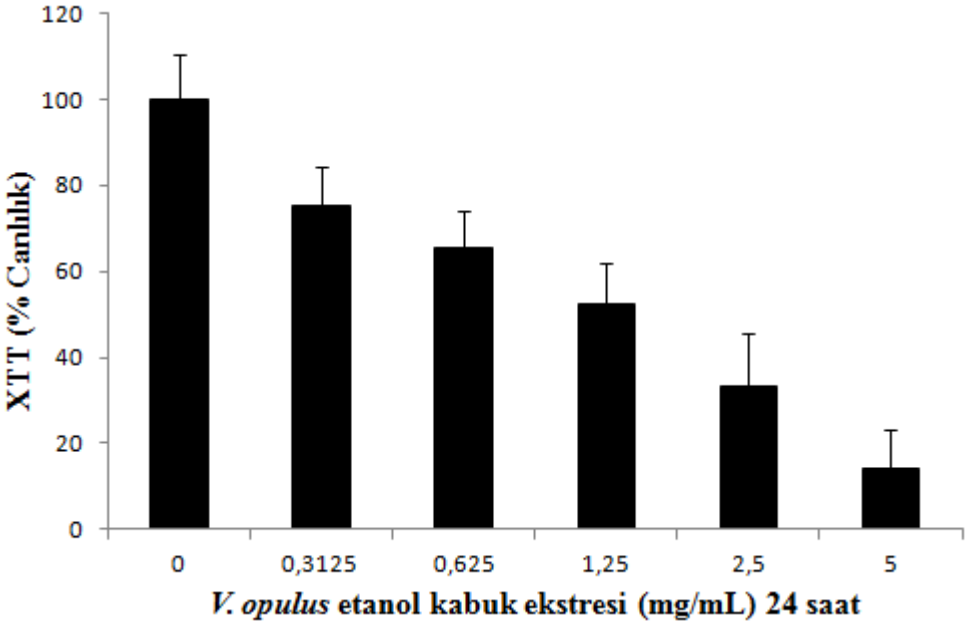
Şekil 4.5. Solda 8 saatlik, sağda ise 24 saatlik XTT çalışmasının XTT kit uygulanmamış hali



Şekil 4.6. Solda 8 saatlik, sağda ise 24 saatlik XTT çalışmasının XTT kit uygulanmış hali



Şekil 4.7. Kabuk ekstresinin 8 saatlik XTT analizinin blok-diyagramı



Şekil 4.8. Kabuk ekstresinin 24 saatlik XTT analizinin blok-diyagramı

4.4. *S. mutans*'ın EPS Üretim Sonuçları

Çalışmada kullanılan *S. mutans*'ın ürettiği EPS miktarı %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında (kontrol) ve 5 mg/mL bitki kabuk ekstraktı içeren %1 sükroz ilaveli Nutrient sıvı besi ortamında tespit edilmiştir. *S mutan*s'ın EPS üretim miktarlarının sırasıyla 0,072 ve 0,046 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm duyarlılığının tespitinde kullanılmış olan ekstrenin (5 mg/mL) ilave edilmesi ile bakterinin EPS üretiminde kayda değer bir azalma olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2).

4.5. *S. mutans*'ın Dekstran Üretim Sonuçları

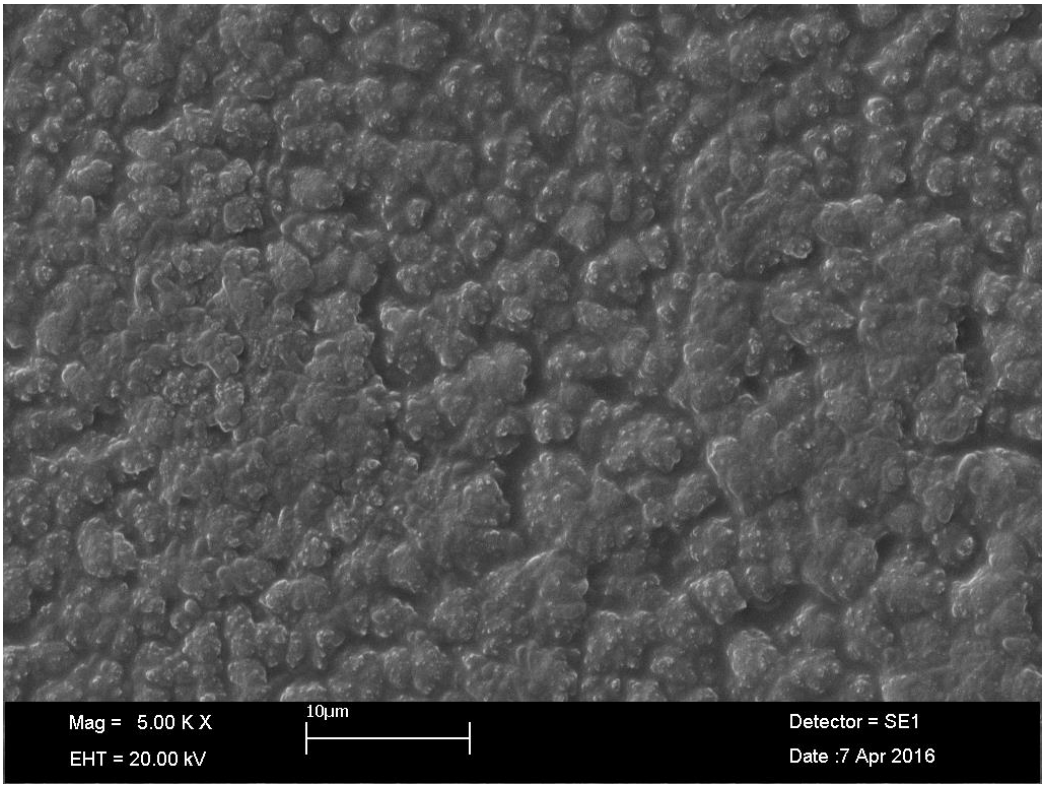
Çalışmada kullanılan *S.mutans*'ın dekstran üretim miktarı %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında (kontrol) ve 5 mg/mL bitki kabuk ekstraktı içeren %1 sükroz ilaveli Nutrient sıvı besi ortamında tespit edilmiştir. *S mutan*s'ın dekstran üretim miktarlarının sırasıyla 0,659 ve 0,559 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstresi ilaveli besi ortamında geliştirilen bakterinin dekstran üretiminin, yaklaşık %15'lik bir azalış gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. *S. mutans* suşunun 24 saat inkübasyon sonunda EPS ve dekstran üretimleri

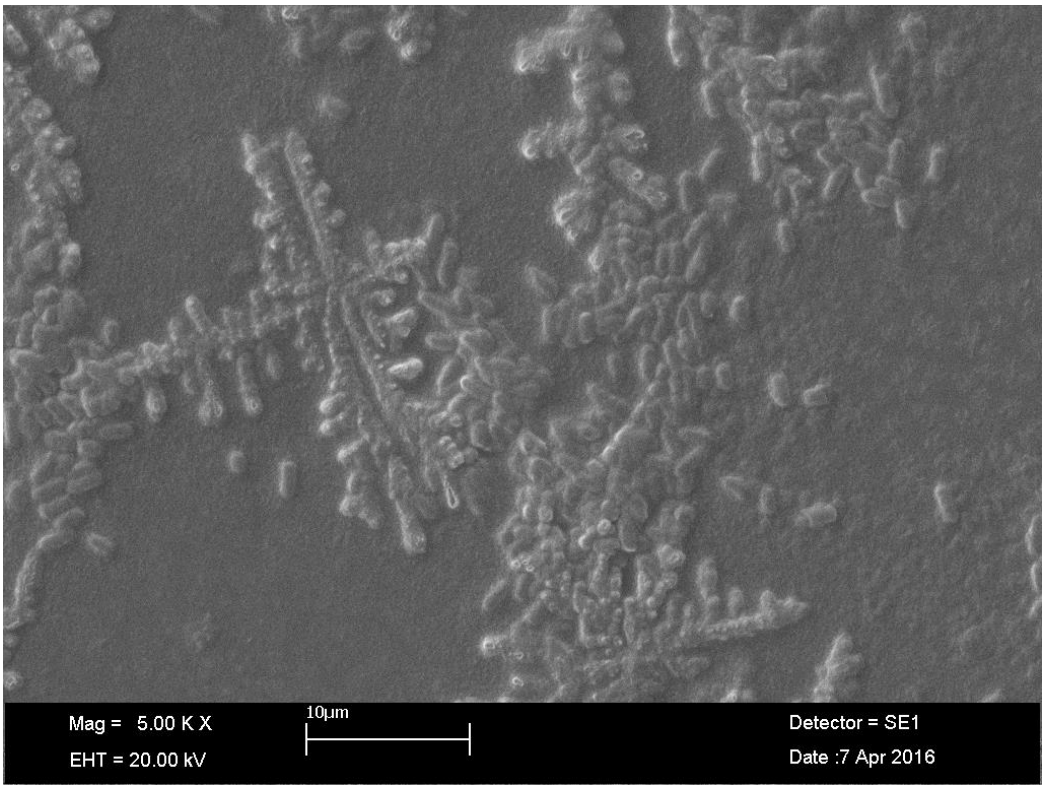
Besi ortamı	EPS üretimi (mg/mL)	Dekstran üretimi (mg/mL)
% 1 Sükrozlu Nutrient Sıvı (Kontrol)	0,072±0,008	0,659±0,003
5 mg/mL ekstrakt içeren %1 sükrozlu Nutrient Sıvı	0,046±0,002	0,559±0,005

4.6. Lamel Üzerinde *S. mutans* Biyofilminin Oluşumu ve Oluşturulan Biyofilmin Bitki Ekstraktına Duyarlılığının SEM ile Görüntülenmesi

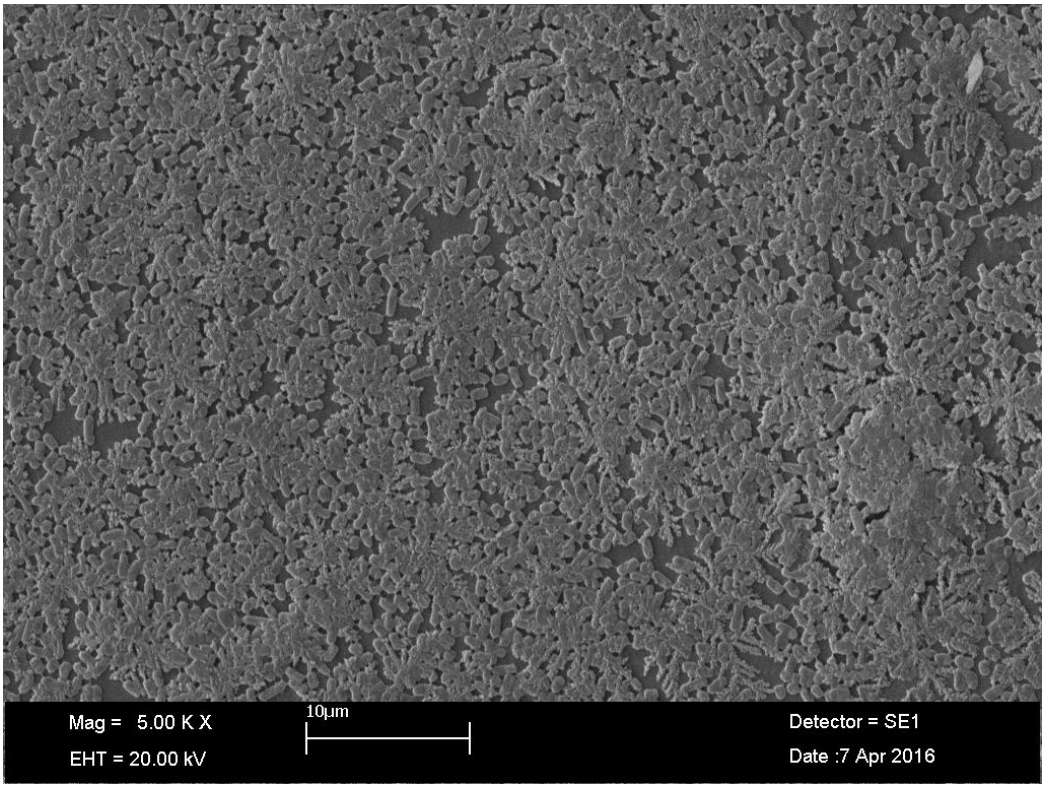
SEM çalışması ile kontrol ve bitki ekstresi (5mg/mL) ile muamele edilmiş *S. mutans* biyofilmleri (8 ve 24 saat) arasındaki yapısal farklılık görüntülenmiştir (Şekil 4. 9, 4. 10, 4. 11, 4. 12). *S. mutans* bakterisinin kontrol biyofilmleri yoğun bir ağ tabakası ve ekzopolimerik matriks sergilerken 8 ve 24 saatlik ekstre ilaveli biyofilmlerde ağ yapısı ve ekzopolimerik matriksin gözle görülür bir biçimde dağıldığı dikkat çekmiştir.



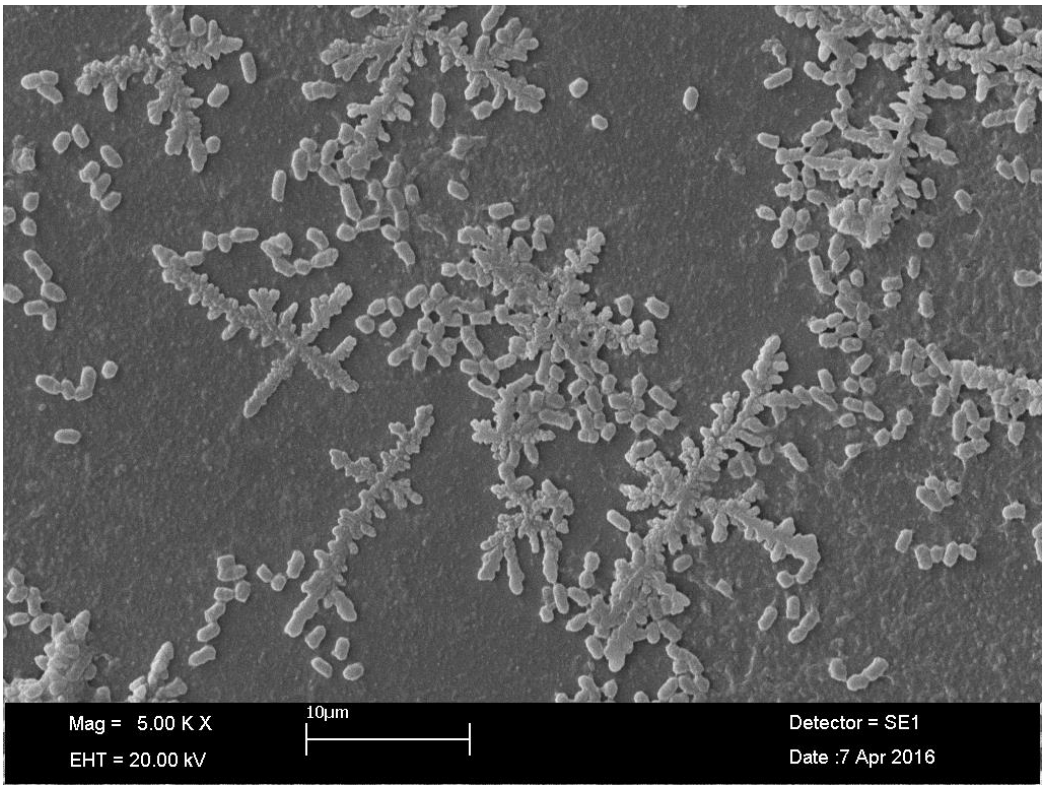
Şekil 4.9. %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında 8 saat kültüre edilen *S. mutans* biyofilmi (kontrol)



Şekil 4.10. 5mg/mL kabuk ekstresi içeren %1 sükroz ilaveli Nutrient sıvı besi ortamında 8 saat kültüre edilen *S. mutans* biyofilmi



Şekil 4.11. %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında 24 saat kültüre edilen *S. mutans* biyofilmi (kontrol)



Şekil 4.12. 5mg/mL kabuk ekstresi içeren %1 sükroz ilaveli Nutrient sıvı besi ortamında 24 saat kültüre edilen *S. mutans* biyofilmi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

S. mutans, diş yüzeyinde biyofilmlerde bulunan ve diş çürümesine neden olan ağız enfeksiyonlarında etkin olan önemli bir patojen bakteridir. *S. mutans*, mikroorganizmaların kolonize olmaları, tutunmaları ve plak matriksi oluşturmalarında önemli bir rolü olan ekzopolisakkaritleri sentezlemede sükrozdan etkili bir şekilde yararlanır. Diş yüzeylerine tutunma ve biyofilm oluşturma, karbonhidrat kullanma ve asit üretme ve diğer çevresel streslerle birlikte düşük bir pH'da canlılığını koruyabilmesi, *S. mutans*'ın diş çürüğü probleminde etkin bir mikroorganizma olmasının nedenleridir. Glukozil transferaz (GTF) diyetteki sükrozu glukoz ve fruktoza yıkar ve glukanlardaki serbest glukoza dahil olur. Daha sonra diş yüzeyine *S. mutans*'ın tutunmasını teşvik eder. Fruktozun fermentasyonu sonucu ortaya çıkan laktik asit ise demineralizasyon ve diş kaybına sebebiyet verir. Bu bakımdan mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yetenekleri dolayısı ile dişte bakteriyel biyofilmin varlığı endodontik enfeksiyonların gelişmesinde önemli bir rol oynar (108-111).

Diş plağı oluşumundan korunma yöntemleri, ağızdaki bakteri sayısını düşüren klorheksidin gibi başlıca antimikrobiyal maddelerin kullanımına dayanmaktadır (112). Bu ürünleri *in vitro* (113) ve *in vivo* (114) çalışmalarda iyi sonuçlar vermelerine rağmen bunların biyofilmleri yok etme yetenekleri tartışılabilir (115). Günümüzde enfeksiyon tedavisinde kullanılan çok sayıda antibiyotik mevcuttur. Ancak bu antibiyotiklerin de neden olabilecekleri yan etkilerden dolayı, biyofilm kontrol etme stratejisi olarak geniş spektrumlu mikrobiosid kullanımına dayanarak bakteriyel virulensliği bozma açısından ilgi çekici olan geleneksel antimikrobiyal terapi yaklaşımı hedeflenmektedir. Bu bakımdan alternatif ürün çalışmaları devam etmekte ve geleneksel ilaçlarda kullanılan bitkilerden izole edilmiş doğal fitokimyasallar iyi birer alternatif olarak düşünülmektedir (116). Oolong çayı (117), propolis (118, 119), kakao ekstraktı (120) yeşil çay (121) Çin siyah çayı (122) ve bileşenlerinin örneğin, propolisteki apigenin ve

tt-farnesol (123) ve yeşil çaydaki polifenoller (124) gibi, *in vitro* çalışmalarda GTF'yi inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu doğal ekstraktlar GTF enzimini inhibe etmekle kalmaz aynı zamanda *S. mutans*'ın yüzeye tutunmasını da azaltabilmektedirler (117, 119, 122, 123).

Viburnum cinsi (Caprifoliaceae) Güney Amerika'dan Güneydoğu Asya'ya kadar yayılım göstermekte olup 230'daha fazla sayıda tür ihtiva etmektedir. Bu cinse ait türlerin antioksidant, antibakteriyel, kanamayı durdurucu ve sedatif ilaç gibi kaydadeğer tıbbi özellikleri bilinmektedir (125).

Viburnum cinsinin triterpenoid, diterpenoid, sesquiterpen, iridoid ve polifenolleri içerdiği bilinmektedir (126).

V. opulus L. türüne ait ekstraktların *S. mutans* biyofilmine karşı alternatif ve etkili bir ajan olup olamayacağı düşüncesi doğrultusunda kurgulanan çalışmada Orta Anadolu bölgesinde özellikle Kayseri'de yaygın olan *V. opulus* L. türüne ait yaprak ve kabuk etanol ekstraktları hazırlanmıştır. Elde edilen ekstraktların MİK çalışması ile *S. mutans* bakterisi üzerindeki rolü analiz edilmiştir. Sonuçlarda ekstrelerin bakterinin planktonik hücrelerine karşı bakteriyostatik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3, 4.4) MİK çalışmasında elde edilen sonuçlarda kabuk ekstrelerinin daha düşük konsantrasyonlarda inhibitörik etkiyi göstermiş olmasından dolayı bir sonraki analizler sadece kabuk ekstraktları seçilerek devam ettirilmiştir.

Tekrarlı XTT redüksiyon analizlerinde 2,5 mg/mL'lık kabuk ekstrakt konsantrasyonunda hem 8 saat hem de 24 saatlik fazlarındaki biyofilmlerde hücrelerin %50'sinden daha fazlasını inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ekstrenin 2,5 mg/mL ve üstü konsantrasyonu, her iki fazda da etkili olmakla birlikte biyofilmin erken fazında (8 saat) 24 saatlik faza göre daha iyi etkinlik göstermiştir (Şekil 4.7, 4.8).

V. lantanal'ın kabukları geleneksel tıpta rubefiyan ve ağrı kesici olarak kullanılmaktadır (127). Khan ve arkadaşları *V. foetens* yapraklarının ekstraktlarından saflaştırılan n-oktakozanoik asidin *S. mutans*'a karşı potansiyel bir antibiyofilm ve antiadezyon ajan olduğunu tespit etmişlerdir (128). Bir başka araştırmada *V. opulus* L. türüne ait kabuk ekstraktının viburnin, tannin, valerik asit esteri ve flavonoidleri içerdiği bildirilmiştir (129). Ayrıca *V. opulus* L. kabuklarının mide ve rahim kanamalarına, hemoroide yönelik tedavilerde tıbbı amaçlı kullanımları rapor edilmiştir (130). Bubulica ve

arkadaşları ise *V. opulus* L. ekstraktının *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* patojenlerine karşı antibakteriyel ve antibiyofilm özelliklerini çalışarak medikal biyofilmlere yönelik alternatif ajan olabileceğini ileri sürmüşlerdir (131).

Dekstran 1→6 bağlı α-d-glukopiranoz birimlerinden oluşan bir EPS'dir (132). Dekstranlar, bilimsel olarak araştırılan ve endüstriyel düzeyde üretilen ilk mikrobiyal ekzopolisakkarit olma özelliği göstermektedirler (133). Streptokoklar da dahil olmak üzere çok sayıda mikroorganizma sukrozdan dekstran sentezlemektedir (107).

Çalışmada kullanılan *S.mutans*'ın ürettiği EPS miktarı %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında (kontrol) ve 5 mg/mL bitki kabuk ekstraktı içeren %1 sükroz ilaveli Nutrient sıvı besi ortamında tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Ekstrenin belirtilen konsantrasyondaki varlığının, kontrole göre EPS üretiminde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan *S.mutans*'ın dekstran üretim miktarı %1 sükrozlu Nutrient sıvı besi ortamında (kontrol) ve 5 mg/mL bitki kabuk ekstraktı içeren %1 sükroz ilaveli Nutrient sıvı besi ortamında tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Bitki ekstresi ilaveli besi ortamında geliştirilen bakterinin dekstran üretiminin de EPS üretiminde olduğu gibi azalma gösterdiği belirlenmiştir. Kabuk ekstresinin ortama ilave edilmesiyle bakterinin kontrole göre hem EPS hem de dekstran üretim miktarında düşüş tespit edilmesi GTF enzimin ekstrakt varlığı ile inhibe edilmiş olabileceğini göstermektedir. Bu sonuç, kabuk ekstresine karşı biyofilm duyarlılığı ile paralellik göstermektedir.

SEM çalışması ile, kontrol ve bitki ekstresi (5mg/mL) ilaveli *S. mutans* biyofilmleri (8 ve 24 saat) arasındaki yapısal farklılık görüntülenmiştir. Ekstre ilaveli her iki biyofilm fazında ekzopolimerik matriksin kayda değer bir şekilde dağılmış olduğu tespit edilmiştir. Çalışma, bitki ekstraktı ile muamele edilmiş biyofilmlerin muamele edilmeyen biyofilmlerle (kontrol) mukayese edildiğinde biyofilmin her iki oluşum fazınında da daha yavaş bir gelişim gösterdiğini ortaya çıkarmaktadır (Şekil 4.9, 4.10, 4.11, 4.12).

V. opulus L. ekstraktlarının *S. mutans*'a yönelik yapılan ilk antibiyofilm çalışmasıdır. Yapılan literatür çalışmalarında bu konuya yönelik bir veriye rastlanılmamıştır. Ancak *Viburnum* cinsine ait farklı türlerin antibiyofilm çalışma bulguları sonuçlarımızı desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu datalar *V. opulus* L. etanol kabuk ekstraktının diş plaklarının oluşumunda en önemli etkenlerden biri olan *S. mutans* biyofilm hastalıkları üzerinde geliştirilebilecek bir antimikrobiyal ajan olduğunu göstermektedir. Ancak çalışılan bitki ekstraktının *S. mutans*'a karşı potansiyel bir antibiyofilm ve antibiyofouling ajan olabilirliği daha ileri *in vivo* çalışmalara ihtiyaç göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Leone S, Molinaro A, Alfieri F, et al. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. Carbohydr Res 2006; 341: 2456-2461.

2. O'Toole GA, Kaplan HB. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol 2000; 49-79.

3. Chae MS, Schraft H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. International Journal of Food Microbiology 2000; 62: 103-111.

4. Borucki, MK, Peppin JD, White D. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 7336-7342.

5. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002; 8 (9), 881-890.

6. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology 2003; 149:279-294.

7. Aydın M. Mikrobiyal biyofilmler ve aerosoller. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın (Edt), Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Güneş Yayınevi, Ankara 2004:p175-180

8. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. J Dent Res 1994; 73: 672-681.

9. Hardie JM. Oral microbiology: current concept in the microbiology of dental caries and periodontal disease. Br Dent J 1992; 172: 271-278.

10. Peralta SL, Carvalho PHA, van de Sande FH, et al. Self-etching dental adhesive containing a natural essential oil: anti-biofouling performance and mechanical properties. Biofouling 2013; 29: 345-355.

11. Ulusoy AT. Pedodontide Güncel Koruyucu Yaklaşimlar. Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg 2010: 28-37.

12. Apatzidou DA. Modern approaches to non-surgical biofilm management. Front Oral Biol 2012; 15: 99-116.

13. Arnold JW, Silvers S. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. Poul Sci 2000; 79: 1215-1221.

14. Kumar, CG, Anand, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology 1998; 42: 9-27.

15. Poulsen, LV. Microbial biofilm in food processing: review, Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 1999; 32: 321- 326.

16. Türetgen, İ. Comparison of free residual chlorine and monochloramine for efficacy against biofilms in model and full scale cooling towers" Biofouling 2004; 20:81-85.

17. Bixler G D, Bhushan B. Biofouling: lessons from nature. Philosophical Transactions of the Royal Society A 2012; 370; 2381-2417.

18. WEB_1. Website of the Australian Government Department of Agriculture and Water Resources. http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionImages/animal-plant/pests-diseases/marine-pests/biofouling-consult/yacht.jpg (25.02.2015)

19. WEB_2. Energy and the Environment-A Coastal Perspective's website. http://coastalenergyandenvironment.web.unc.edu/files/2011/05/BIOFOULING-300x173.png (26.05.2011)

20. Costerton W, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. Sci Am 1978; 238: 86–95.

21. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK. Biofilmrelated infections in ophthalmology. Eye 1995; 9: 102-9.

22. Donlan MR, Costerton W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-93.

23. Chae MS, Schraft H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different Listeria monocytogenes strains. International Journal of Food Microbiology 2000; 62(1e2), 103-111.

24. Borucki MK, Peppin JD, White D. Variation in biofilm formation among strains of Listeria monocytogenes. Applied and Environmental Microbiology 2003; 69(12), 7336-7342.

25. O'Toole GA, Kaplan HB. Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology 2000; 49-79.

26. Lindsay D, Brözel VS, Mostert JF, Von Holy A. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate J Appl Microbiol 2002; 92: 352 – 361.

27. Akan E, Kınık Ö. Biyofilm Oluşum Mekanizması ve Biyofilmlerin Gıda Güvenliğine Etkisi, Gıda ve Yem Bilimi – Teknolojisi Dergisi / Journal of Food and Feed Science – Technology 2014; 14:42-51.

28. Allison DG.The biyofilm matrix. Biofouling 2003; 19 (2): 139-150.

29. WEB_3. DiaTek's website. http://www.diatek.com.tr/uploads/biofilm%20model.jpg (2015)

30. Ferreira C, Pereira AM, Melo LF. Advances in industrial biofilm control with micronanotechnology. Applied Microbiology 2010: 845-854.

31. Abdallah FB, Chaieb K, Zmantar T, Kallel H, Bakhrouf A. Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Brazilian Journal of Microbiology 2009: 394-398.

32. Nilsson RE, Ross T, Bowman JP. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. International Journal of Food Microbiology 2011; 150(1): 14-24.

33. Gerstel U, Römling U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in Salmonella typhimurium. Environmental Microbiology 2001; 3(10): 638-648.

34. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Molecular Microbiology 1998; 30(2): 295-304.

35. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Review of Microbiology 2002; 56: 187-209.

36. Qian Z, Sagers RD, Piti WG. The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of *P. aeruginosa* biofilms. Annals of Biomedical Engineering 1997; 25(1): 69-76.

37. Sinde E, Carballo J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. Food Microbiology 2000; 17: 439-447.

38. Augustin M, Ali-Vehmas T, Atroshi F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences: a Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques 2004; 7(1): 55-64.

39. Maukonen J, Mättö J, Wirtanen G, Raaska L, Mattila-Sandholm T, Saarela M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2003; 30(6): 327-356.

40. Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2003; 2(1): 22-32.

41. Skerker JM, Berg HC. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001; 98(12): 6901-6904.

42. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Molecular Microbiology 2003; 48(6): 1511-1524.

43. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. Bacteriology 2002; 184(4): 1140-1154.

44. Kaplan JB, Ragunath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004; 48(7): 2633-2636.

45. Cloete TE. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. Int Biodeterioration Biodegrad 2003; 51: 277 – 282.

46. Meyer B. Approaches to preventetion, removel and killing of biofilms. Int. Biodeterioration Biodegrad 2003; 51: 249 – 253.

47. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol. 1995; 49: 711-745.

48. Stewart PS, McFeters GA, Huang CT. Biofilms II: Process analysis and applications. New York: Wiley, 2000: 232.

49. Thormann KM, Saville RM, Shukla S, Spormann, AM. Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. J Bacteriol 2005; 187: 1014-21.

50. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res 2004; 38: 204-11.

51. Yalçın Çakır F, Gürgan S, Attar N. 2010. Çürük Mikrobiyolojisi, Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi. 34: (3-4), 78-91.

52. Marsh PD, "Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style", Journal of Clinical Periodontology 2005; 32:7-15.

53. Oh S, Lee J, Kim G, Shim G, Back J, "Anticariogenic activity of a bacitracin produced by lactooccus bacteria", Food Sci Biotech 2003; 12: 9-12.

54. Nes IF, Diep DB, Holo H, "Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*", J Bacteriol 2007; 189: 1189-98.

55. Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F, "Competition and Coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. J Bacteriol 2005; 187(21): 7193–7203.

56. Hardie JM, Whıley RA. The Genus *Streptococcus* —Oral. Prokaryotes, 2006; 4 :76–107.

57. Aktaş A, B Giray, D Menemenlioğlu, M Hayran. %0.2 Klorheksidin diglukonat gargara kullanımının oral flora üzerine kısa dönem etkileri . Hacettepe diş hekimliği fakültesi dergisi. 2008; 32(4): 81-93.

58. Samaranayake LP. Essential Microbiology for Dentistry. Second Edition, Elsevier, China, 2002.

59. Ceyhan N. Klinikte Biyofilmlerin önlenmesi için antibiyofilm stratejileri. Turkish J. İnfection, 2008; 22(4): 227-240.

60. Law V, Seow WK, Townsend G. Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children Australian Dental Journal 2007; 52(2):93-100.

61. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. Community Dent, Oral Epidemiol, 2005; 33:248-255.

62. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol. Rev, 1986; 50(4):353-380.

63. Balakrishnan M, Simmonds R.S, Tagg J.R.Dental caries is a preventable infectious disease Australian Dental Journal. 2000;45:(4):235-245.

64. Merritt J, Qi F. The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. molecular oral microbiology, 2012;27: 57–69.

65. HELLWIG, E., KLIMEK, J., ATTIN, T. Einführung in die Zahnerhaltung (4.Aufl.) Urban & Fischer, München 2006

66. Bock JAB, *Streptococcus*: Eine szientometrische Analyse, Doktora Tezi, Institut für Arbeitsmedizin der Medizinischen Fakultät Charité, Berlin 2009:118

67. BERKOWITZ RJ. Mutans streptococci: acquisition and transmission. Pediatr Dent 2006; 28: 106-109; 192-108.

68. HAMADA S, SLADE HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980; 44: 331-384.

69. HANADA N. Current understanding of the cause of dental caries. Jpn J Infect Dis 2000; 53: 1-5.

70. HARDIE JM, MARSH PD. Streptococci and the human oral flora. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 1978; 7: 157-206.

71. PIEPER K. Epidemiologische Begleituntersuchungen zur Gruppenprophylaxe 2000. Deutsche Abeitsgemeinschaft für Zahnpflege e.V.(DAJ), Bonn 2001

72. WEB_4. Encyclopedia Britannica's website. http://global.britannica.com/science/Streptococcus-mutans

73. Huebner J, Goldmann DA. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. Annu Rev Med 1999; 50: 223-6.

74. Jass J, Walker JT. Biofilms and biofouling. In: Industrial Biofouling: Detection, Prevention and Control. New York: Wiley, 2000: 410.

75. Stewart PS, McFeters GA, Huang CT. Biofilms II: Process analysis and applications. New York: Wiley, 2000: 232.

76. Thormann KM, Saville RM, Shukla S, Spormann, AM. Induction of rapid detachment in Shewanella oneidensis MR-1 biofilms. J Bacteriol 2005;187: 1014-21.

77. Chen X, Stewart PS. Biofilm removal caused by chemical treatments. Water Res 2000; 34: 4229-33.

78. Ceyhan N, Ozdemir G. Extracellular polysaccharides produced by cooling water tower biofilm bacteria and their possible degradation. Biofouling 2008; 24: 129-35.

79. Cateau E, Berjeaud JM, Rodier MH, Imbert C. Fungal biofilm inhibition by a component naturally produced by Candida albicans yeasts growing as a biofilm. Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 166-70.

80. Leroy C, Delbarrea C, Ghillebaertb F, Comperec C, Combes D. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. Biofouling 2008; 24: 11-22.

81. Xavier JB, Picioreanu C, Rani SA. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix–a modelling study. Microbiology 2005; 151: 3817-32.

82. Akova M. Bakteriler arası iletişimin engellenmesi: umut vaadeden yeni bir aktibakteriyal tedavi yaklaşımı. ANKEM Derg 2005; 19: 126-8.

83. Johansen C, Falholt P, Gram, L. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilm. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 24-8.

84. Augustin M, Ali-Vehmas, Atroshi F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. J Pharmaceut Sci 2004; 7: 55-65.

85. Lee KK, Bhushan B, Hansford D. Nanotribological characterization of fluoropolymer thin films for biomedical micro/nanoelectromechanical system applications. J. Vac. Sci. Technol. A 2005; 23: 804–810.

86. Bhushan B, Cichomski M, Hoque E, DeRose JA, Hoffmann P, Mathieu HJ. Nanotribological characterization of perfluoroalkylphosphonate self-assembled monolayers deposited on aluminum-coated silicon substrates. Microsyst. Technol. 2006; 12: 588–596.

87. Bhushan B, Hansford D, Lee KK. Surface modification of silicon and polydimethylsiloxane surfaces with vapor-phase-deposited ultrathin fluorosilane films for biomedical nanodevices. J. Vac. Sci. Technol. A 2006; 24: 1197–1202.

88. Winkworth RC, Donoghue MJ. "*Viburnum* phylogeny based on combined molecular data: implications for taxonomy and biogeography". American Journal of Botany 2005; 92(4): 653–66.

89."Genus: *Viburnum* L.". Germplasm Resources Information Network. United States Department of Agriculture (2010)

90. Верба и калина - символы Украины. Verba and kalina are Ukraine's national symbols. - kievcolours.com. - "Калина… символизировала праздник Коляды, Рождества мира. Надругательство над ней покрывало человека позором, также как и убийство аиста." – Kalina symbolized the Kolyada

91. The herbs. Myths and Legends. - myphs.jimdo.com. – «Без верби и калини нема України» // «Without verba [pussy-willow] & kalina [viburnum], there is no Ukraine.»

92. WEB_5. Transformational Gardening's website. http://www.transformationalgardening.com/forage/plants/viburnum-opulus-americanum-images.html (2011)

93. GRIN Species Records of *Viburnum*". Germplasm Resources Information Network. United States Department of Agriculture (2010)

94. Huxley, A., ed. New RHS Dictionary of Gardening. Macmillan 1992 ISBN 0-333-47494-5.

95. WEB_6. Plants For A Future's website. http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Viburnum+lentago

96. WEB_7. Plants For A Future's website. http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Viburnum+opulus

97. WEB_8 Go Botany's website https://gobotany.newenglandwild.org/species/viburnum/opulus/

98. WEB_9. Floraweb's website. http://www.floraweb.de/pflanzenarten/artenhome.xsql?suchnr=6296&

99. WEB_10. Global Biodiversity Information Facility's website. http://www.gbif.org/species/2888605

100. WEB_11. Virginia Tech's website. http://dendro.cnre.vt.edu/dendrology/syllabus/factsheet.cfm?ID=267 (2015)

101. RHS A-Z encyclopedia of garden plants. United Kingdom: Dorling Kindersley. 2008. p. 1136. ISBN 1405332964.

102. Pu Y, Liu A, Zheng Y, ye, B, In vitro damage of *Candida albicans* biofilms by chitosan. Experimental and Therapeutic Medicine 2014; 8: 929-934.

103. Meshulam T, Levitz SM, Christin L, Diamond RD. A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye, (2,3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sul- phenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) J Infect Dis. 1995; 172:1153–1156.

104. Frengova G, Simova E, Beshkova D, Simov ZI, Production and monomer composition of exopolysaccharides by yoğurt starter cultures. Canadian J. Microbiol. 2000; 46: 1-5..

105. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 1956; 28: 350-356.

106. Torino MI, Taranto MP, Sesma F, de Valdez GF. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. Journal of Applied Microbiology 2001; 91: 846-852.

107. Quader SAU, Iqbal L, Aman A, Shireen E, Azhar A. Production of dextran by newly isolated strains of *L. mesenteroides* PCSIR-4 and PCSIR-9. Turk J. Biochem 2005; 31: 21-26.

108. Goulhen F, Grenier D, Mayrand D. Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14:399e412.

109. Schilling KM, Bowen WH Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for Streptococcus mutans. Infect Immun 1992; 60:284–295.

110. Ooshima T, Matsumura M, Hoshino T, Kawabata S, Sobue S, Fujiwara T. Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. J. Dent. Res. 2001; 80: 1672– 1677.

111. Kaufman HW, Kleinberg I, X-ray diffraction examination of calcium phosphate in dental plaque. Calcif. Tissue Res. 1973; 11: 97– 104.

112. Sammons R. Control of dental plaque. In: Jass, J., Surman, S., Walker, J. (Eds.), Medical Biofilms: Detection, Prevention and Control. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 2003: 221– 254.

113. Pratten J, Wills K, Barnett P, Wilson M. In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *Streptococcus sanguis* biofilms. J. Appl. Microbiol. 1998; 84: 1149–1155.

114. Renton-Harper P, Addy M, Moran J, Doherty FM, Newcombe RG. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. J. Periodontal 1996; 67: 486–489.

115. Twetman S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. Caries Res. 2004; 38:223–229.

116. Sagdic O, Aksoy A, Ozkan G Evaluation of the antibacterial and antioxidant potentials of cranberry (gilaburu, *Viburnum opulus* L.) fruit extract. Acta Aliment 2006; 35: 487–492.

117. Nakahara K, Kawabata S, Ono H, Ogura K, Tanaka T, Ooshima T, Hamada S. Inhibitory effect of oolongtea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 1993; 59: 968– 973.

118. Koo H, Vacca Smith AM, Bowen WH, Rosalen PL, Cury JA, Park YK. Effects of Apis mellifera propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. Caries Res. 2000; 34: 418– 426.

119. Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, Rosalen PL. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. Biol. Pharm. Bull. 2003; 26: 527–531.

120. Ito K, Nakamura Y, Tokunaga T, Iijima D, Fukushima K. Anti-cariogenic properties of a water-soluble extract from cacao. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003; 67: 2567– 2573.

121. Hattori M, Kusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. Chem. Pharm. Bull. 1990; 38: 717– 720.

122. Limsong J, Benjavongkulchai E, Kuvatanasuchati J. Inhibitory effects of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. J. Ethnopharmacol. 2004; 92: 281–289.

123. Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Marquis RE, Bowen WH. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. Oral Microbiol. Immunol. 2003; 17: 337– 343.

124. Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res. 1991; 25: 438– 443.

125. Baytop T. Therapy with medicinal plants in Turkey. Nobel Medical Publishers, Istanbul. (1996)

126. Tao ZM, Li YY, Ji P, Wang YB, Qin GB. Chemical constituents from aerial part of *Curcuma wenyujin*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2007; 32: 2604–2646.

127. Iwai K, Kim MY, Onodera A, Matsue H. Physiological effects and active ingredients of *Viburnum dilatatum* Thunb fruits on oxidative stress. Biofactors 2004; 21: 273–275.

128. Khan R, Khanam Z, Khan AU. Isolation and characterization of n-octacosanoic acid from *Viburnum foetens*: a novel antibiofilm agent against *Streptococcus mutans*. Med Chem Res 2012; 21:1411–1417.

129. Ovodova RG, Golovchenko VV, Popov SV, Shashkov AS, Ovodov YS. The isolation, preliminary structural studies, and physiological activity of water-soluble polysaccharides from the squeezed berries of snowball tree *Viburnum opulus*, Bioorganicheskaya Khimiya, 2000; 26: 61–67.

130. Schopmeyer CS. Seeds of Woody Plants in the United States. US Department of Agriculture, Washington DC, USA, 1974.

131. Bubulica MV, Anghel I, Grumezescu AM, Saviuc C, Anghel GA, Chifiriuc MC, Gheorghe I, Lazar V, Popescu A. In Vitro Evaluation of Bactericidal and Antibiofilm

Activity of *Lonicera tatarica* and *Viburnum opulus* Plant Extracts on *Staphylococcus* Strains. Farmacia, 2012; 60:1, 80-91.

132. Monchois V, Willemot RM, Monsan P. Glucansucrases: mechanism of action andstructure–function relationships. FEMSMicrobiol Rev 1999; 23: 131–151.

133. Zorba M, Altuğ T. Gamlar, Gıda Katkı Maddeleri. Ege Ü. Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 2001: 96-99**.**

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı	: Tanju DEMİRHAN
Uyruğu	: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri	: 1 Mayıs 1990 / Frankfurt a. M.- Almanya
Medeni Durumu	: Bekâr
E-mail	:tanjudemirhan@hotmail.com
Yazışma Adresi	:Köşk Mah. Dede Efendi Sok. 20 Daire:13 38039 Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Ezcacılık Biyokimya ABD	
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya	2012
Lise	Sema Yazar Anadolu Lisesi	2008

YABANCI DİLLER

İngilizce, Almanca