

Farklı Çevre Koşullarında Klinik *Salmonella* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Araştırılması[§]

Zaliha BALTACIOĞLU*, Fethiye Ferda YILMAZ*, Mine HOŞGÖR LİMONCU*, Şöhret AYDEMİR**, Alper TÜNGER**

* Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, *Salmonella* spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının, biyofilm oluşturma kapasitelerinin araştırılması ve ayrıca biyofilm oluşumuna çeşitli ortam koşullarının ve siprofloksasin (CIP) varlığının etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bakterioloji Laboratuvarı'nda 2012 yılında izole edilen 44 *Salmonella* spp. izolatı çalışmaya alındı. İzolatların CIP duyarlılıkları CLSI kriterlerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile ve biyofilm oluşturma kapasiteleri kristal viyole kullanılarak spektrofotometrik mikropalak yöntemi ile araştırıldı. Daha sonra, farklı sıcaklık, NaCl konsantrasyonu, pH değeri uygulanan koşullar altında ve farklı konsantrasyonlarda CIP (1/2MİK, MİK, 2MİK) varlığında biyofilm oluşturma kapasiteleri araştırıldı. Orta ve güçlü düzeyde biyofilm oluşturan *Salmonella* izolatları için her bir parametrenin biyofilm oluşumuna etkisi diğer iki parametre sabit tutularak (sıcaklık: 4°C, 20 °C, 37°C, pH: 4, 6, 7.3, NaCl: %0.5, %4, %6) test edildi.

Bulgular: Standart koşullarda (37°C, pH:7.3, NaCl: %0.5), orta düzeyde biyofilm (%59) ve güçlü biyofilm (%5) oluşturan 28 izolatın pH:6'da pH:4'e, %6 NaCl'de %4 NaCl'ye ve 20°C de 4°C'ye göre daha iyi biyofilm oluşturduğu gözlemlendi. Bir *Salmonella* izolatında CIP direnci saptanırken, bir izolat da orta duyarlı olarak bulundu. CIP, orta düzeyde biyofilm oluşturan bir izolatla hem biyofilm üretimini azalttı hem de önceden oluşmuş biyofilm tabakası üzerinde inhibe edici etki gösterdi.

Sonuç: Bu çalışma, incelenen *Salmonella* izolatlarının belirli çevre koşullarında daha fazla biyofilm oluşturarak yaşam şanslarını arttırabildiklerini ve CIP'nin biyofilm üretimi üzerindeki etkili olduğunu ortaya koymuştur.

ABSTRACT

Investigation of Biofilm Forming Capacity of Clinical *Salmonella* Isolates under Different Environmental Conditions

Objective: This study aimed to investigate the antibiotic susceptibility and biofilm forming capacity of isolates of *Salmonella* spp., and the effect of different environmental conditions and the presence of ciprofloxacin (CIP) on biofilm forming ability.

Materials and Methods: Forty-four *Salmonella* spp. strains isolated in 2012 in Ege University, Faculty of Medicine, Bacteriology Laboratory of Department of Medical Microbiology, were included in this research. CIP susceptibilities were determined by microdilution method according to the CLSI recommendations and biofilm forming capacities were examined using crystal violet by spectrophotometric microplate method. Afterwards, the effects of different ambient temperatures, NaCl concentrations, pH values and presence of CIP (1/2MIC, MIC, 2MIC) on their biofilm forming capacities were assessed. The impact of each parameter on biofilm formation in *Salmonella* strains with moderate and strong biofilm forming capacities at standard conditions (pH 7.3- NaCl 0.5%-37°C) were tested singly while the other two parameters were kept at fixed levels (temperature: 4°C, 20°C, 37°C; pH: 4, 6, 7.3; NaCl: 0.5%, 4%, 6%).

Results: Under standart conditions, a total of 28 isolates of *Salmonella* spp. with moderate (59%) and strong biofilm (5%) forming capacities showed higher biofilm forming ability at pH 6, NaCl concentration of 6%, and ambient temperature of 20°C when compared with pH 4, NaCl concentration of 4%, and ambient temperature of 4°C. CIP resistance was found in one *Salmonella* spp. isolate, and one isolate demonstrated intermediate resistance to CIP. CIP inhibited both biofilm formation and showed inhibitory effect on pre-formed biofilm layer in a moderate biofilm producer.

Conclusion: This study revealed that *Salmonella* isolates increased their chances of staying alive in certain conditions by increasing their biofilm forming ability and CIP was found to be effective on biofilm formation.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, *Salmonella*, siprofloksasin

Keywords: Biofilm, *Salmonella*, ciprofloxacin

Alındığı tarih: 28.06.2016

Kabul tarihi: 21.09.2016

Yazışma adresi: Mine Hoşgör-Limoncu, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova / İzmir

Tel: (0232) 388 39 83 **Faks:** (0232) 388 52 58

e-posta: minehosgorlimoncu@yahoo.com.tr, mine.hosgor.limoncu@ege.edu.tr

[§] Çalışma, I. KLİMUD Günleri, GAP İllerinde Yaygın Görülen Enfeksiyonlar (13-14 Haziran 2013, Şanlıurfa) ve Microbiologia Balkanica 2013, 8th Balkan Congress of Microbiology, (2-5 October 2013, Veliko Tarnovo, Bulgaria) Kongreleri'nde sunulmuştur.

GİRİŞ

Salmonella enfeksiyonları dünya çapında yaygın olarak görülmektedir. *Salmonella*'lar insanlar, vahşi kuşlar, evcil hayvanlar ve kemiricilerin de aralarında bulunduğu birçok hayvan türünün bağırsaklarında bulunabilen bakteridir. İnsanların tükettiği, aralarında sebze ve meyvelerin de bulunduğu birçok gıdadan izole edilebilirler⁽¹⁻³⁾. Bu bakteriler, asidik stres, düşük su aktivitesi ve yüksek sıcaklık gibi koşullara adapte olarak çeşitli yüzeylerde aylarca canlı kalabilmektedirler⁽⁴⁾.

Mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak dezenfektanlara, antibiyotiklere ve kuruluğa karşı dayanıklı hâle gelmekte ve birçok dış etkenden korunabilmektedirler. Biyofilm içerisinde bulunan hücreler, kendi ürettikleri ve dış çevreye karşı kimyasal ve mekanik koruma sağlayan bir matriks içerisine gömülü olarak bulunmakta ve üzerlerinde çok çeşitli bileşiklerin birikmesine neden oldukları için hem endüstriyel alanda hem de tıp alanında büyük sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır⁽⁵⁻⁷⁾. Endüstriyel sanitasyon uygulamalarına rağmen, *Salmonella*'lar, biyofilm oluşturma yetenekleri sayesinde, polimer, çelik ve cam gibi yüzeylerin yanı sıra organik yüzeylerde de canlılıklarını sürdürebilmektedirler^(8,9).

Bu çalışmada, *Salmonella* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının, biyofilm oluşturma kapasitelerinin araştırılması ve ayrıca biyofilm oluşumuna çeşitli ortam koşullarının ve siprofloksasin (CIP) varlığının etkisinin incelenmesi amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2012 yılında izole edilen 44 *Salmonella* spp. izolatı çalışmaya alındı. İzolatların kotrimoksazol (CTX) (Oxoid Ltd., Birleşik Krallık), siprofloksasin CIP (Oxoid

Ltd., Birleşik Krallık), kloramfenikol (CAM) (Oxoid Ltd., Birleşik Krallık), ampisilin (AMP) (Oxoid Ltd., Birleşik Krallık), duyarlılıkları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi, CIP (Koçak Farma, İstanbul) duyarlılığı mikrodilüsyon yöntemi ile CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre belirlendi⁽¹⁰⁾. Tüm izolatların standart yaşam koşullarındaki (37°C, pH:7.3, NaCl: %0.5) biyofilm oluşturma kapasiteleri, spektrofotometrik mikropalak yöntemi ile araştırıldı⁽⁵⁾. Ayrıca bu koşullarda orta düzey ve güçlü biyofilm oluşturduğu belirlenen *Salmonella* izolatlarında, farklı sıcaklık, NaCl konsantrasyonu ile pH değerlerinin biyofilm oluşumuna etkisi, belirtilen parametrelerden biri değiştirilirken diğerlerinin sabit tutulduğu büyüme koşulları hazırlanarak (pH 4, NaCl %0.5, 37°C; pH 6, NaCl %0.5, 37°C; pH 7.3, NaCl %4, 37°C; pH 7.3, NaCl %6, 37°C; pH 7.3, NaCl %0.5, 4°C; pH 7.3, NaCl %0.5, 20°C) inkübe edildikten sonra aynı yöntem ile test edildi.

CIP'nin (1/2MİK, MİK, 2MİK) biyofilm oluşumuna ve oluşmuş biyofilm üzerine etkisi biri orta duyarlı ve biri dirençli iki izolatta spektrofotometrik mikropalak yöntemi ile test edildi⁽⁵⁾. İzolatların oluşturduğu biyofilm miktarlarındaki değişim, standart koşullarda CIP varlığındaki inkübasyondan sonra ve inkübasyon sonrasında CIP ilavesinin ardından ölçüldü.

Değerlendirmede spektrofotometrik mikropalak ölçüm yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, %0.25 oranında glukoz eklenerek hazırlanmış steril "Tryptic Soy Broth" (TSB) (Merck) besiyerinden 180 µl alınarak 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalaklar içerisine dağıtıldı ve üzerine 0.5 Mc Farland'a ayarlanmış 20 µl bakteri süspansiyonu steril koşullarda ilave edildi. Kuyucuklar 35°C'de 18-20 saat inkübasyon sonunda boşaltılıp steril fosfat tamponu ile yıkandı ve mikropalak ters çevrilip kendi hâline bırakılarak kuruması sağlandı. Daha sonra biyofilmin fiksasyonunu sağlamak amacıyla bu kuyucuklara

metanol ilave edildi ve 20 dakika sonra boşaltılıp ters çevrilerek oda sıcaklığında kurutuldu. Son olarak kuyucuklara %0.1'lik kristal viyole çözeltisi ilave edilip 15 dakika bekletilerek, oluşan biyofilmin boyanması sağlandı. Süre sonunda kuyucuklar boşaltılıp, musluk suyu ile yıkanarak boyanın fazlası uzaklaştırıldı ve kurumaya bırakıldı. Biyofilm tarafından tutulan boyanın görüntülenmesi amacıyla kuyucuklara %95'lik etanol ilave edildi ve 30 dakika sonra spektrofotometrede 570 nm'de okunan optik dansite değerlerine göre biyofilm oluşumu negatif, zayıf, orta ve güçlü olarak yorumlandı. Pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kullanıldı.

BULGULAR

Kırk dört *Salmonella* spp. izolatında CTX direnci saptanmazken, CIP ve CAM direnci %2.3, AMP direnci %13.63 olarak bulundu. Mikrodilüsyon yöntemi ile bir izolat dirençli (MİK: 1.5 µg/ml), bir izolat orta duyarlı (0.15 µg/ml), 42 köken ise CIP'ye duyarlı bulundu. CIP MİK aralığı 0.04-1.5 µg/ml olarak tespit edildi.

Standart üreme koşullarında (37°C, pH=7.3, NaCl= %0.5) orta düzeyde biyofilm (%59) ve güçlü biyofilm (%5) oluşturan toplam 28 izolat tespit edildi. Bu izolatlarla yapılan denemelerde pH=6'da pH=4'e, %6 NaCl'de %4 NaCl'ye ve 20°C'de 4°C'ye göre biyofilm oluşumunun artışı gözlemlendi (Tablo 1, 2).

Tablo 1. Standart üreme koşullarında orta ve güçlü biyofilm oluşturan yirmi sekiz *Salmonella* spp. izolatının test edilen ortam parametrelerine göre değişen biyofilm oluşturma oranları⁽⁶⁾.

		Farklı Ortam Koşullarında Değişen Biyofilm Oluşturma Özelliğine Göre İzolat Sayısı-N (%)					
		pH		NaCl (%)		Sıcaklık (°C)	
BOD	SKB	4	6	4	6	4	6
Güçlü	2 (7.1)	3 (10.7)	15 (53.6)	1 (3.6)	26 (92.9)	-	4 (14.3)
Orta	26 (92.9)	12 (42.9)	13 (46.4)	18 (64.3)	2 (7.1)	-	23 (82.1)
Zayıf	-	13 (46.4)	-	9 (32.1)	-	1 (3.6)	1 (3.6)
Negatif	-	-	-	-	-	27 (96.4)	-

BOD: Biyofilm oluşturma düzeyi, SKB: Standart koşullarda biyofilm (37°C, pH=7.3, NaCl= %0.5)

Mikrodilüsyon yöntemine göre, CIP dirençli (MİK 1.5 µg/ml) 2 numaralı izolat ve orta duyarlı (MİK 0.15 µg/ml) 19 numaralı izolatın orta düzey biyofilm oluşturan grupta olduğu görüldü. Denemeler sonucunda orta duyarlı olan 19 numaralı izolatla 1/2MİK, MİK, 2MİK (0.075; 0.15; 0.3 µg/ml) oranında uygulanan CIP'nin hem biyofilm üretimini hem de önceden oluşmuş biyofilm tabakasını orta düzeyden zayıf biyofilm düzeyine düşürdüğü, CIP'ye dirençli 2 numaralı izolatla ise uygulanan 1/2MİK, MİK, 2MİK (0.75; 0.15; 3 µg/ml) CIP'nin böyle bir değişiklik oluşturmadığı belirlendi (Tablo 3, 4).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Salmonella* izolatlarında CIP ve CAM direnci %2.3, AMP direnci %13.63 oranında bulunurken, CTX direnci saptanmadı. Genel olarak literatür verilerine baktığımızda, *Salmonella*'larda antibiyotik direnci dünyada önemli bir sorundur. Özellikle gelişmekte olan ülkelerin çoğunda hayvan yetiştiriciliğinde ve insanlarda antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı sonucu çoklu dirençli *Salmonella* izolatlarında artış olmuştur. *Salmonella*'larda genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, diğer Gram-negatif bakterilerdeki kadar yaygın değildir ancak plazmid, integron ve transpozonlarla taşıdıkları için aminoglikozid, tetrasiklin, sülfonamidlere çapraz direnç söz konusudur. 2010 yılında da Tayvan'dan karbapenem dirençli *Salmonella Typhimurium* kökeni bildirilmiştir. Çalışmamızda,

Tablo 2. Standart üreme koşullarında orta ve güçlü biyofilm oluşturan yirmi sekiz *Salmonella* spp. izolatının biyofilm oluşturma kapasitelerinin test edilen ortam parametrelerine göre değişimi.

İzolot No	SKB	pH		NaCl (%)		Sıcaklık (°C)	
		4	6	4	6	20	4
1	O	O	G	O	G	G	Y
2*	O	Z	G	O	G	G	Y
6	O	Z	O	O	O	G	Y
7	O	Z	G	O	O	G	Y
8	G	O	G	Z	G	O	Y
13	O	Z	O	O	O	G	Y
14	O	Z	G	Z	O	G	Y
15	O	O	O	O	G	G	Y
16	O	O	G	Z	G	O	Y
17	O	Z	G	O	O	G	Y
18	O	Z	G	Z	O	G	Y
19#	O	Z	G	O	O	G	Y
20	O	O	G	O	O	G	Y
22	O	O	O	Z	O	G	Y
23	O	G	O	O	O	G	Y
26	O	O	G	O	O	G	Y
27	O	O	G	Z	O	G	Y
28	G	G	O	O	G	Y	G
29	O	O	O	O	G	Y	O
30	O	G	O	O	O	Y	G
36	O	O	Z	O	G	Y	O
38	O	O	Z	O	G	Y	O
39	O	O	O	G	G	Y	O
40	O	G	O	O	G	Y	G
41	O	O	Z	O	G	Z	O
42	O	O	O	O	G	Y	O
43	O	O	G	O	G	Y	O
44	O	O	O	Z	G	Y	O

SKB: Standart koşullarda biyofilm (37 °C, pH 7.3, NaCl %0.5), G: Güçlü biyofilm, O: Orta biyofilm, Z: Zayıf biyofilm, Y: Biyofilm oluşturma yeteneği yok, *CIP dirençli, # CIP orta duyarlı

Tablo 3. *Salmonella* spp. izolatlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri ile CIP duyarlılığı arasındaki ilişki.

	MİK Aralığı (µg/ml)	Direnç Profili N(%)			MİK ₅₀ (µg/ml)	MİK ₉₀ (µg/ml)
		S	I	R		
Biyofilm (+) (n=28)	≤0.04 - 1.5	26 (93)	1 (3.5)	1 (3.5)	≤0.04	≤0.15
Biyofilm (-) (n=16)	≤0.04 - ≤0.04	16 (100)	-	-	≤0.04	≤0.04
TOPLAM (n=44)	≤0.04 - 1.5	42 (95.4)	1 (2.3)	1 (2.3)	≤0.04	≤0.04

S: Duyarlı. I: Orta duyarlı. R: Dirençli. (Duyarlılık sınırları S:≤0.06; I:0.12-0.5; R:≥1)

Tablo 4. Orta duyarlı ve dirençli iki izolatta CIP'nin biyofilm oluşturma kapasitesine etkisi.

İzolot No	MİK (µg/mL)	Standart koşullarda biyofilm	½ MİK	MİK	2 MİK
2	1.5	O	O	O	O
19	0.15	O	Z	Z	Z

O: Orta biyofilm, Z: Zayıf biyofilm

kullanılan izolatlarda daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında antibiyotik direncinin çok yüksek düzeyde olmadığı görülmektedir⁽¹¹⁻¹³⁾.

NaCl, hücreler için önemli besinsel gereksinim olup, NaCl'nin bulunmadığı ortamlarda bakteriyel büyümenin gerçekleşmediği bilinmektedir. Bu faktör bakteriyel büyümenin yanında biyofilm oluşumu üzerinde de olumlu etki yaratmaktadır. Hücre içi pH, hücrenin fizyolojisini ve bakteri üremesini etkileyen önemli bir faktördür. Mikroorganizmalar çevresel pH değişimleriyle yaygın olarak karşılaşır ve sonuç olarak alkali ya da asidin neden olacağı zararları en aza indirmek amacıyla çeşitli adaptif stratejiler geliştirirler. Pek çok bakteri, bazı genlerini düzenleyerek asit stresine yanıt verirler. *Salmonella*'lar da işleme ve saklama sırasında değişen çevresel koşullara (ısı, pH ve NaCl) adapte olarak yaşamda kalabilirler⁽¹⁴⁾.

Çalışmamız kapsamında, *Salmonella* bakterisinin biyofilm oluşturan izolatları farklı çevresel parametrelere (sıcaklık: 4°C, 20°C, 37°C; pH: 4, 6, 7.3; NaCl: %0.5, %4, %6) maruz bırakılmıştır. Bu amaçla uygulanan ilk parametre farklı sıcaklık değerleridir. 20°C'ye maruz bırakılan *Salmonella* örneklerinin normal koşullara göre daha güçlü biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Ortama eklenen NaCl, biyofilm oluşumunda belirgin bir artışa neden olmuştur. En iyi biyofilm oluşumu %6 NaCl derişiminde meydana gelmiştir. Bu çalışma kapsamında uygulanan parametrelerden biri de farklı değerdeki pH uygulamaları olmuştur. Çalışmada, bakterilerin pH 6'da pH 4'e göre daha güçlü biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, gıdaların korunması için geleneksel bir uygulama olan pH ve NaCl seviyelerinin düzenlenmesi ile *Salmonella* izolatlarında biyofilm oluşumunun önlenebileceği gösterilmiş ve araştırmacılar bu uygulamanın gıda güvenliğine katkı sağlayabileceğini belirtmiş-

lerdir⁽⁹⁾. Altmış *Salmonella enterica* ile farklı çevre koşullarında biyofilm üretiminin test edildiği bir çalışmada pH 5.5 (%58.3), %0.5 NaCl (%48.3) ve 25°C'de (%53.3) yüksek oranda biyofilm oluştuğu gözlenmiştir⁽³⁾. Ortam sıcaklığının 30°C ve pH'nın 6'ya yakın ve pepton oranının düşük tutulduğu bir çalışmada, biyofilm üretiminin daha yüksek olduğu belirtilmiştir⁽¹⁾. Bu çalışma ve diğer çalışma sonuçları dikkate alındığında, *Salmonella* bakterilerinin standart yaşam koşullarından uzaklaşıkça yaşamda kalabilmek için biyofilm oluşturma eğiliminin arttığı görülmektedir. Biyofilm oluşumunda birçok genin ve tam olarak anlaşılabilen düzenleyici mekanizmalarının rol aldığı düşünülürse mikroorganizmaların biyofilm oluşturma özelliği izolatlar arası farklılık gösterebilmektedir. Bunun yanı sıra yapılan deneysel çalışmalarda da, gerçek yaşam ortamı tam olarak oluşturulamadığı için sonuçlar yanıltıcı olabilmektedir^(1,9,14).

Salmonella spp. izolatlarında CIP direncinin değerlendirildiği bu çalışmada, CIP dirençli ve orta duyarlı iki izolatın orta düzeyde biyofilm oluşturan grup içerisinde yer aldığı görülmüştür. CIP, orta düzeyde biyofilm oluşturan izolatların birinde hem biyofilm üretimini azaltmış hem de önceden oluşmuş biyofilm tabakası üzerinde inhibe edici etki göstermiştir. Ortamda biyofilm oluşumu öncesi ve sonrası CIP ilavesi sonucunda elde edilen veriler birbirinden farklı bulunmamıştır. CIP MİK değerinin alt ve üst konsantrasyonlarının aynı kökende biyofilm oluşturma düzeyini değiştirmediği saptanmıştır.

Antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının mikrobiyal kalıcılık ve direnç gelişimi üzerine etkileri çok fazla çalışılmamıştır. İlk kez Majtan ve ark.⁽¹⁵⁾ klinik *S. Typhimurium* kökenlerinin biyofilm üretimi ile antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarındaki etkileşimini araştırmışlardır ve başka antibiyotiklerin de kullanıldığı bu çalışmada, CIP'nin ekzopolisakkarit üretimini

etkilemediği belirtilmiştir. Çalışmamızda, izolatların çoğunun CIP MİK değerleri çok düşük düzeyde ($\leq 0.04 \mu\text{g/ml}$) olduğundan bu antibiyotiğin sub-MİK konsantrasyonlarının biyofilme etkisi tüm izolatlarda çalışılmamıştır. Bir çalışmada, planktonik hücrelerle kıyaslandığında, biyofilm üreten *S. Typhimurium* kökenlerinin CIP'ye daha az duyarlı olduğu belirtilmiştir⁽¹⁶⁾. Olgun biyofilm içinde üreyen bakteriler genelde antibiyotiklere dirençlidirler. Bu durumla ilgili iki hipotez öne sürülmektedir. İlki antibiyotiğin biyofilm içine geçişindeki yetersizlik, ikincisi ise biyofilm içindeki bakterilerin düşük hızda çoğalması ya da çoğalmıyor olması nedeniyle bakterilerin antibiyotiğe daha az duyarlı hâle gelmeleridir. Anderl ve ark.⁽¹⁷⁾, CIP'nin biyofilm içindeki bakterilere yukarıdaki hipotezi destekler şekilde etkisiz olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmanın sonuçları, incelenen *Salmonella* izolatlarının belirli çevre koşullarında daha fazla biyofilm oluşturarak yaşam şanslarını arttırabildiklerini ve CIP'nin bazı izolatlarda biyofilm üretimi üzerine etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Buna göre, bakterilerin çeşitli yüzeylere tutunması ve kolonizasyonunu engellemek için çevre koşullarının uygun şekilde düzenlenmesi ve gerektiğinde bir antibiyotik ilavesinin önemli yararlar sağlayacağı düşünülmüştür.

Teşekkür

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (13ECZ004). Araştırmacılar biyofilm ölçümündeki katkılarından dolayı Dr. Fadime Aydın Köse'ye ve Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'na teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

1. **Speranza B, Corbo MR, Sinigaglia M.** Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. *J Food Sci* 2011; 76 (Suppl 1):S12-6.
2. **Álvarez-Ordóez A, Prieto M, Bernardo A, Hill C, López M.** The acid tolerance response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Res Int* 2012; 45:482-92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.002>
3. **Lianou A, Koutsoumanis KP.** Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int J Food Microbiol* 2012; 160:171-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.002>
4. **Gülmez D.** Morfoloji, Kültür ve Biyokimyasal Özellikler. In: Erdem B, eds. *Salmonella*. İstanbul: Logos Yayıncılık, 2013:52-64.
5. **Stepanović S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M.** Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol* 2004; 38:428-32. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x>
6. **Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, de Keersmaecker SCJ.** *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res Int* 2012; 45:502-31. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038>
7. **Fàbrega A, Soto SM, Ballesté-Delpierre C, Fernández-Orth D, Jiménez de Anta MT, Vila J.** Impact of quinolone-resistance acquisition on biofilm production and fitness in *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:1815-24. <https://doi.org/10.1093/jac/dku078>
8. **Castelijn GAA, Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T.** Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella Typhimurium* strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling* 2012; 28:51-63. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.648927>
9. **Karaca B, Akcelik N, Akcelik M.** Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains isolated from Turkey. *Biologia* 2013; 68:1-10. <https://doi.org/10.2478/s11756-012-0138-2>
10. **CLSI.** Clinical and Laboratory Institute. Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-third Informational Supplement, Document M100-S23, Clinical and Laboratory Standarts Institute, 2013.
11. **Percin D.** Antimikrobiyal Direnci. In: Erdem B, eds. *Salmonella*. İstanbul: Logos Yayıncılık, 2013:200-9.
12. **Van TT, Nguyen HN, Smooker PM, Coloe PJ.** The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *Int J Food Microbiol* 2012; 154:98-106. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.032>
13. **Zaidi MB, Estrada-García T, Campos FD, et al.** Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in *Salmonella* and *Shigella* infections from children in Yucatan, Mexico. *Front Microbiol* 2013; 4:288. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00288>
14. **Spector MP, Kenyon WJ.** Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res Int* 2012; 45:455-81. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>

- 15. Majtan J, Majtanova L, Xu M, Majtan V.** In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolated in Slovakia. *J Applied Microbiol* 2008; 104:1294-1301.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03653.x>
- 16. Tabak M, Scher K, Chikindas ML, Yaron S.** The synergistic activity of triclosan and ciprofloxacin on biofilms of *Salmonella Typhimurium*. *FEMS Microbiol*

Lett 2009; 301:69-76.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01804.x>

- 17. Anderl JN, Zahller J, Roe F, Stewart PS.** Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1251-6.
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1251-1256.2003>