

# DNaz I ve Proteinaz K Enzimlerinin *Listeria monocytogenes* Bakterisine Ait Serotiplerin Çoklu Kültürlerinde Biyofilm İnhibisyonuna Etkilerinin İncelenmesi

## Investigation of the Activities of DNase I and Proteinase K Enzymes on Biofilm Inhibition in Multiple Cultures of *Listeria monocytogenes*

Hamide Sena Or<sup>\*✉</sup>, Reha Onur Azizoğlu<sup>\*✉</sup>

\* Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

**Atf/Cite as:** Or HS, Azizoğlu RO. DNaz I ve proteinaz K enzimlerinin *Listeria monocytogenes* bakterisine ait serotiplerin çoklu kültürlerinde biyofilm inhibisyonuna etkilerinin incelenmesi. Turk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg. 2024;54(4):242-250.

### Öz

**Amaç:** *Listeria monocytogenes* bakterisinin neden olduğu listeriosis sıklıkla görülmemesine rağmen etkilediği popülasyon grubunda ölümcül enfeksiyonlara neden olabilen bir enfeksiyondur. *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşturma özelliği, bu bakterinin çevresel stres koşullarına ve antimikrobiyel ajanlara karşı direnç göstermesinde önemli rol oynamaktadır. Çalışmanın amacı, biyofilmlerin spesifik enzim grupları ile inhibisyonunun etkinliğinin araştırılmasıdır.

**Yöntem:** *Listeria monocytogenes*'in farklı suşları ve biyofilm oluşturma yeteneklerine göre seçilmiş üç suşun ikili kombinasyonları ile oluşturulmuş çoklu kültürlerinin oluşturduğu biyofilm yapılar incelenmiş ve DNaz I ve Proteinaz K enzimlerinin *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşturma kapasitesini engelleme yetenekleri belirlenmiştir. Seçilen suşların ikili kombinasyonlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri OD (595 nm) değeri ile belirlenmiş ve suşlar arası olası sinerjistik etki araştırılmıştır. Son aşamada çoklu kültürlerle DNaz I ile Proteinaz K enzimleri, biyofilm inhibisyonundaki etkinliği test etmek amacıyla uygulanmıştır.

**Bulgular:** Çalışma sonucunda, NCTC 5345- 4b ve 1/2b-4b kültür karışımları için 50 µg/ml Proteinaz K enziminin en etkili biyofilm inhibisyonunu sağladığı belirlenmiştir. NCTC 5345-1/2b çoklu kültüründe inhibisyon için benzer olarak 50 µg/ml Proteinaz K oldukça etkili iken 48 saatlik inkübasyon sonrasında yapılan testlerde 200 µg/ml konsantrasyonda Proteinaz K enziminin de etkisinin yadsınamaz olduğu gözlemlenmiştir.

**Sonuç:** Yapılan çalışmada, tüm enzim uygulamalarından elde edilen verilerin karşılaştırılmasıyla en etkili inhibisyon sağlayan enzimin 50 µg/ml konsantrasyonda Proteinaz K olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu neticenin, oluşmuş biyofilmlerde inhibisyona dair süregelen çalışmalara benzer olarak literatüre katkı sağlaması ve kontaminasyon risklerini azaltıcı yeni yöntemler geliştirilmesinde rol oynaması hedeflenmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Biyofilm İnhibisyonu, Enzim, *Listeria monocytogenes*

### ABSTRACT

**Objective:** Although listeriosis caused by *Listeria monocytogenes* is not frequently encountered, it leads to fatal infections in affected population. The ability of *L. monocytogenes* to form biofilms plays a significant role in its resistance to environmental stress conditions and antimicrobials. The aim of this study is to investigate the effectiveness of inhibiting biofilm formation with specific groups of enzymes.

**Methods:** Biofilm structures formed by mixed-cultures created with combinations of three selected strains of *L. monocytogenes*, based on their abilities to form biofilms, were examined. The abilities of DNase I and Proteinase K enzymes to inhibit the capacity of *L. monocytogenes* to form biofilms were determined. The biofilm formation capacities of selected strain combinations were determined by OD (595 nm) value, and possible synergistic effects between strains were investigated. In the final stage, DNase I and Proteinase K enzymes were applied to multi-cultures to test their effectiveness in inhibiting biofilms.

**Results:** It was determined that 50 µg/ml ProteinaseK enzyme provided the most effective inhibition for NCTC 5345-4b and 1/2b-4b culture mixes. Similarly, 50 µg/ml ProteinaseK was very effective for inhibition in NCTC 5345-1/2b mix-culture.

**Conclusion:** In this study, it was concluded that Proteinase K enzyme at a concentration of 50 µg/ml was the most effective inhibitor compared to all enzyme applications. This outcome, similar to ongoing studies on inhibition in formed biofilms, will contribute to the literature and play a role in the development of new methods to reduce contamination risks.

**Keywords:** Biofilm inhibition, Enzyme, *Listeria monocytogenes*

**Alındığı tarih / Received:**

07.05.2024 / 07.May.2024

**Kabul tarihi / Accepted:**

02.08.2024 / 02.August.2024

**Yayın tarihi / Publication date:**

10.12.2024 / 10.December.2024

**ORCID Kayıtları**

H. S. Or 0009-0008-4954-7564

R. O. Azizoğlu 0000-0001-7857-1821

✉ ronur3@gmail.com

## GİRİŞ

Biyofilmler, bünyesinde eksopolisakkarit (EPS), protein, lipid, su ve çeşitli nükleik asitleri barındıran, yoğun ve jelse yapılarıdır<sup>(1)</sup>. Yapının kimliklendirilmesinde rol alan ve koruyucu etkinin ana unsuru olan EPS yapısı olgun bir biyofilmde %75–90 arasındadır<sup>(2)</sup>. Biyofilm yapıları mikroorganizmalara dış etkenlere karşı koruma sağlar ve bu nedenle dezenfeksiyon ve antimikrobiyal prosedürlerinin etkinliğini azaltır. Bu nedenle biyofilm oluşumu sağlık ve gıda endüstrisi olmak üzere farklı sektörlerde problem teşkil etmektedir<sup>(3)</sup>. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) verilerine göre, insan sağlığını tehdit eden bakteriyel enfeksiyonların %60'undan fazlasına biyofilmler tarafından oluşturulan enfeksiyonlar sebep olmaktadır<sup>(4)</sup>. Biyofilmler, cerrahi implant enfeksiyonları, diş eti hastalıkları, kateter kaynaklı idrar yolları ve akciğer enfeksiyonlarına neden olmaktadır<sup>(5)</sup>.

Gram-pozitif bir bakteri olan *Listeria monocytogenes*, son on yılda çeşitli gıda kaynaklı hastalık salgınlarında etken organizma olarak ortaya çıkmıştır. Bu bakteriden kaynaklanan Listeriyoz, öncelikle hamile kadınları, ileri yaşlardaki hastaları veya bağışıklık sistemi zayıflamış bireyleri etkileyen enfektif bir hastalıktır. *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi en yaygın enfeksiyon kaynağıdır<sup>(6)</sup>. Bu nedenle bu patojen için biyofilm inhibisyonu ile kontaminasyon riskinin ortadan kaldırılması önemlidir. Biyofilmlerin komplike yapısı ve organizasyon yeteneklerinin gelişmiş olması nedeniyle planktonik durumlarına göre yüzeylerden giderilmesi oldukça zordur<sup>(7)</sup>. Yapılan bir çalışmada, biyofilmdeki bakteri sayısını azaltmak için 1000 ppm'den fazla aktif klorin konsantrasyonu gerekli olduğu belirtilmiş iken; planktonik hücreler için 10 ppm konsantrasyonun yeterli olduğu sonucuna varılmıştır<sup>(8)</sup>.

Mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilm yapıları bakterilerin türü ve gelişim ortamı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır<sup>(9)</sup>. Biyofilmin yapısı, saf kültürler için türe; çoklu kültürler için ise substrata özgüdür<sup>(1)</sup>. Oluşumun ilk aşaması olan ve uygun bir yüzey etkileşimi ile gerçekleşen tutunma sonrasında

kolonizasyon, mikrokoloni oluşumu, organizmaların olgunlaşması ve biyofilmden planktonik hücrelerin ayrıldığı kopma aşaması gelir<sup>(10)</sup>. Oluşumdaki temel mekanizma çoğunluk algılama yani quorum sensing (QS) mekanizmasıdır. Bu mekanizma, temel olarak bir iletişim aracıdır. Her bir mikroorganizma çok küçük QS molekülleri salgılar ve bu moleküller diğer bakterilerin hücrelerine sızarak onları kendi varlıklarından haberdar eder; böylece bakteriler birbirlerinin aktivitelerini koordine edebilirler<sup>(11)</sup>.

Biyofilmlerin inhibisyonu, süregelen çalışmaların konusu olmuş, özellikle oluşumlarının önlenmesine dair kesin bir çözüm geliştirilememiştir. Oluşumun önlenmesinde çoğunluk algılama mekanizmasının quorum quenching (QQ) mekanizması gibi sistemlerle engellenmesi bir alternatiftir. QQ enzimleri, QS sinyallerinin taşıyıcısı olan moleküllerin hidrolizi veya parçalanması yoluyla bakteriler arası haberleşmeyi engelleyerek kolonizasyonu önler ve biyofilm oluşumunu engelleyebilir<sup>(12,13)</sup>.

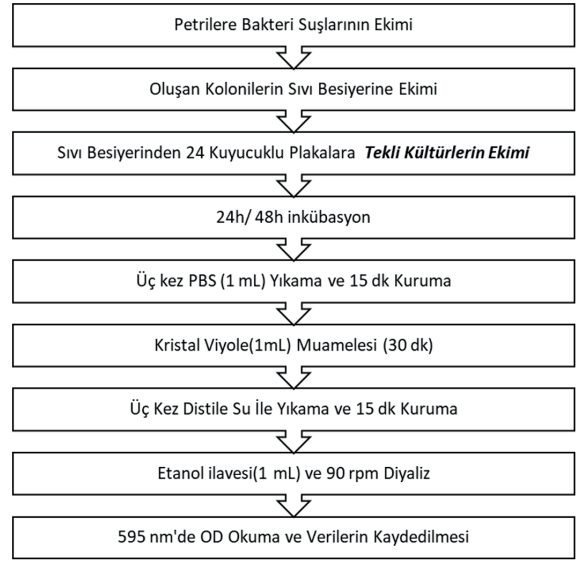
Olgun biyofilmlerin inhibisyonunda ise pratikte uygulaması olan çeşitli yöntemler kullanılabilmektedir. Li ve ark.'nın<sup>(14)</sup> yaptığı çalışmada *Vibrio parahaemolyticus* üzerinde biyofilm inhibisyonuna yönelik DNaz I ve Proteinaz K enzimlerinin etkinliğini incelemiş ve bu iki enzimin kombine uygulaması ile önemli ölçüde biyofilm inhibisyonunun sağlandığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise lizozim ve nisin *Staphylococcus aureus* üzerine inhibe edici etkisi araştırılmış ve nisin inhibisyonunda daha etkili olduğu görülmüştür<sup>(15)</sup>. Benzer olarak, marul üzerindeki *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinin inhibisyonu amacıyla timokinon ve nisin sinerjistik etkisinin araştırıldığı çalışmada, bileşenlerin inhibisyonunda sinerjistik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir<sup>(16)</sup>.

Bu çalışmada gıda kaynaklı ölümcül bir patojen olarak halk sağlığını tehdit eden *L. monocytogenes* bakterisinin farklı serotiplerine ait suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri belirlenmiş ve en yüksek biyofilm oluşturma kapasitesine sahip suşların biyofilm oluşturmalarını engellemek amacıyla DNaz I ve Proteinaz K enzimleri test edilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Listeria monocytogenes** suşlarının biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi: Bu çalışmanın ilk aşamasında Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi bakteri koleksiyonunda bulunan *L. monocytogenes* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri belirlenmiştir. Bu merkezden elde edilen *L. monocytogenes* suşları: ATCC 15115, NCTC 5345, serotip 1/2b, serotip 1/2c, serotip 4b, serotip 4c, serotip 5, serotip 6b suşlarını kapsamaktadır. Bakteriler -80°C dondurucuda Brain Heart Infusion (BHI, BD, Sparks, MD, ABD) besiyeri ile karışım halinde olan %30 gliserol içerisinde saklanmıştır. Çalışma aşamalarında serotiplerin gelişmesi için gerekli besinleri içerisinde barındıran BHI besiyeri, oluşumları görünür kılmak için kullanılan kristal viyole çözeltisi ve plakalardaki biyofilm oluşturmamış hücrelerin uzaklaştırılmasında ise PBS çözeltisi kullanılmıştır. Her deney öncesi bakteriler BHI agar üzerine ekilmiştir ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra tek bir koloni BHI sıvı besiyere inoküle edilerek 37°C'de inkübe edilmiştir. Bu prosedür her biyofilm deneyi öncesi bakterilerin deney koşullarına adaptasyonu için tekrar edilmiştir. Katı besiyerine ekim sonrasında 24 saatlik inkübe edilen bakteriden alınan koloni, sıvı BHI besiyerine ekildikten sonra da 24 saatlik inkübasyona bırakılmış ve biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirleneceği 24 kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirilmiştir.

Bu plaklarda 24 ve 48 saat sürelerince biyofilm oluşturmak üzere 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan alınan plakalarda biyofilm oluşturmayan hücrelerin kuyucuktan uzaklaştırılması için üç kez PBS yıkaması gerçekleştirilmiş ve ardından plaka, 15 dakika kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra plakalarda oluşan biyofilmlere görünürlük kazandırması amacı ile kristal viyole boyası muamele edilmiş ve 30 dakika boyunca boya, hücrelere nüfuz etmiştir. Distile su ile yıkama ve kurutma işlemlerinin sonrasında %96'lık saf etanol ilavesi ile diyalizde 30 dakika süresince kristal viyolenin hücre içine nüfuz etmesi sağlanmıştır<sup>(14)</sup>. İşlemler sonrasında, plaka okuyucuda (SpectraMax ID3, Molecular Devices, San Jose, CA, ABD) OD 595 nm değerinde okutulmuş ve veriler kaydedilmiştir.



**Şekil 1. Biyofilm oluşturma kapasitelerinin tespiti işlem basamakları**

Şekil 1'de biyofilm oluşumlarının tespiti için takip edilen işlem basamakları verilmiştir. Her bir deney üç kez birbirinden bağımsız olarak tekrarlanmıştır.

### Seçilen *Listeria monocytogenes* suşlarının çoklu kültür ortamında biyofilm oluşturma kapasiteleri:

Çalışmanın ikinci aşamasında, ilk aşamada seçilen NCTS 5345, 1/2b ve 4b serotipleri ve bu serotiplerin çoklu kültürlerinde biyofilm oluşumları izlenmiştir. Çoklu kültürler, bir kuyucuğa eşit hacimlerde iki farklı serotipin ekimi ile oluşturulmuştur. İlk aşamadaki analiz adımlarına benzer şekilde katı besiyerinden sıvı besiyerine ve daha sonra plakalara serotiplerin ekimi yapılmıştır. İki farklı inkübasyon süresi için test edilmek üzere hazırlanmış her bir 24 kuyucuklu plakada NCTS 5345, 1/2b, 4b serotiplerine ek olarak NCTC 5345-1/2b, NCTC 5345- 4b ve 1/2b-4b kültür karışımları her bir plaka sütununa bir kültür veya çoklu kültür olacak şekilde ekilmiştir.

İnkübasyon süreleri dolan plakalar önce PBS ile yıkanmış ve 15 dakika süresince kurumaya bırakılmış; daha sonra %0.1'lik kristal viyole boyası her bir kuyucuğa 1 mL hacimde eklenmiş ve 30 dakika süresince beklenmiştir. Daha sonra ilk aşamadaki adımlar ile paralel olarak distile su ile yıkama ve etanol ilavesi ile diyaliz gerçekleştirilerek plaka okuyucuda 595 nm dalga boyunda OD değerleri ölçülmüştür.

**Seçilen *Listeria monocytogenes* suşlarının çoklu kültür ortamında biyofilm inhibisyonu:** Son aşamada, seçilen çoklu kültür kombinasyonları ikinci aşamadan farklı olarak her bir plakanın tamamına ekilerek 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerince plaka üzerinde biyofilm oluşturmaları sağlanmıştır. Daha sonra, inkübasyon süresini dolduran plakalar PBS ile yıkanmış; her bir enzim 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyon değerlerinde plakalarda üçer kuyucuk kaplayacak şekilde ve her bir kuyucuğa 0.5 mL hacimde eklenerek 30 dk muamele edilmiştir. Sonrasında %0.1'lik kristal viyole uygulaması ile diğer işlem basamaklarındaki adımlar izlenerek inhibisyon sonrasındaki biyofilm miktarlarını tespit etmek için 570 nm'de OD değerleri kaydedilmiştir.

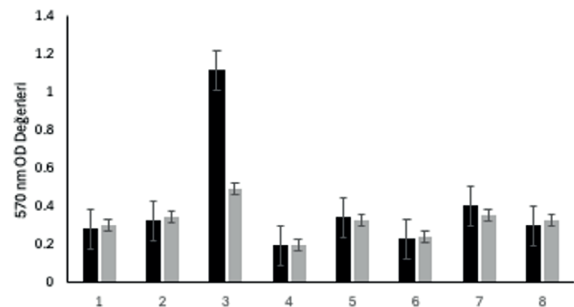
**Enzimlerin Hazırlanması:** DNaz I ve Proteinaz K enzimleri 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında ve 10 ml hacimde hazırlanmıştır. DNaz I hazırlamak için ilk olarak 17.5 ml steril distile suya 3.5 mg toz enzim eklenmiştir ve 200 µg/ml konsantrasyon enzim stoğu hazırlanmıştır. Daha sonra kademeli olarak dilüsyon yapılarak enzimler hazırlanmıştır. Proteinaz K hazırlamak için de aynı adımlar takip edilmiş, farklı olarak sıvı formu Proteinaz K'dan 189 µl 20ml steril distile suya eklenmiştir ve bu aşamadan sonra işlemler aynı şekilde tekrarlanmıştır. Her bir enzim konsantrasyonu bir plakada üç kuyucuğa uygulanmak üzere her bir kültür karışımı için üç plakaya uygulanmış ve enzimler, kuyucuklardaki serotiplere 30 dakika süre ile muamele edilmiştir.

**İstatistiksel analiz:** İstatistik analizleri SPSS® Statistics (Ver 23, IBM, ABD) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Student's iki yönlü çiftli t-testi kullanarak p değerleri belirlenmiştir. Hata çubukları, testin maksimum ve minimum değerleri olarak gösterilmiştir ve 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

*Listeria monocytogenes* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri: Bu aşamada, BHI besiyerinde geliştirilen genotipik olarak birbirinden farklı sekiz *L. monocytogenes* suşunun 37°C'de 24 ve 48 saat inkübasyonları sürecinde biyofilm oluşturma kapasiteleri belirlenmiştir. Genel olarak test edilen suşların test edilen çevresel koşullar altında biyofilm oluşturma kapasiteleri birbirine benzerlik göstermektedir (Tablo 1, Şekil 2). Farklı olarak, test edilen *L. monocytogenes* NCTC 5345 suşunun diğer suşlardan belirgin olarak fazla biyofilm oluşturma özelliğine sahip olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu suş, 24 saatlik inkübasyon sonrasında en yakın biyofilm oluşturma kapasitesine sahip *L. monocytogenes* 5 suşundan yaklaşık üç kat daha fazla oranda biyofilm oluşturmuştur. Biyofilm oluşturma kapasiteleri açısından *L. monocytogenes* NCTC 5345 suşunu *L. monocytogenes* 4b ve *L. monocytogenes* 1/2b suşları takip etmektedir. Bu nedenle çalışmanın diğer aşamalarında bu üç suş daha detaylı olarak incelenmiştir.

Seçilen *L. monocytogenes* suşlarının çoklu kültür ortamında biyofilm oluşturma kapasiteleri:



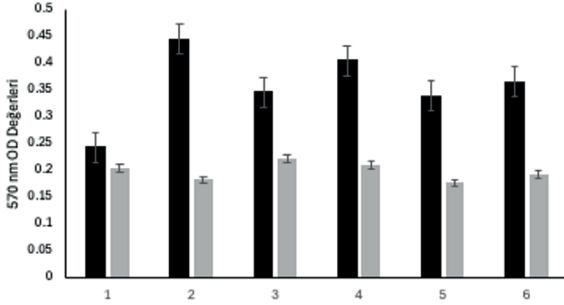
Şekil 2. Çalışmada test edilen suşların 24 (siyah) ve 48 (gri) saatlik 37°C'lik inkübasyon sonrası biyofilm oluşturma kapasiteleri (1: ATCC 15115, 2: 1/2b, 3: NCTC 5345, 4: 1/2c, 5: 4b, 6: 4c, 7: 5, 8: 6b).

Tablo 1. *Listeria monocytogenes* suşlarında biyofilm oluşumlarına dair ortalama OD değerleri

İnkübasyon	ATCC 15115	1/2b	NCTC 5345	1/2c	4b	4c	5	6b
24 saat	0.28	0.33	1.12	0.20	0.34	0.23	0.40	0.30
48 saat	0.31	0.35	0.50	0.20	0.33	0.25	0.35	0.33

**Tablo 2. *Listeria monocytogenes* suşlarında ve çoklu kültürlerde ortalama OD değerleri**

İnkübasyon	NCTC 5345	1/2b	4b	NCTC 5345- 1/2b	NCTC 5345- 4b	1/2b-4b
24 saat	0.24	0.44	0.35	0.41	0.34	0.37
48 saat	0.20	0.18	0.22	0.21	0.18	0.19

**Şekil 3. Çalışmada test edilen suşların 24 (siyah) ve 48 (gri) saatlik 37°C'lik inkübasyon sonrası biyofilm oluşturma kapasiteleri (1: NCTC 5345, 2: 1/2b, 3: 4b, 4: NCTC 5345 ve 1/2b, 5: NCTC 5345 ve 4b, 6: 1/2b ve 4b).**

Çalışmanın bu kısmında, ilk aşamada seçilmiş olan *L. monocytogenes* bakterisine ait 1/2b, 4b ve NCTC 5345 suşlarının ikili kombinasyonları olan NCTC 5345-1/2b, NCTC 5345-4b ve 1/2b-4b kombinasyonları ile çoklu kültürler oluşturulmuştur. Oluşturulan çoklu kültürlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri incelenirken aynı plakada paralel olarak suşların tekli oluşumları da incelenmiştir (Tablo 2; Şekil 3). Suşların tekli ve ikili kültürlerindeki biyofilm oluşumlarına bakıldığında NCTC 5345 serotipinin 24 saatlik inkübasyon süresinde 1/2b ve 4b serotipleri ile kombinasyonunda biyofilm kütlelerinin arttığı yani bu suşlar ile biyofilm oluşumunda sinerjistik etki gösterdiği görülmüştür. Farklı olarak, 1/2b suşunun aynı inkübasyon süresinde ikili kültürlerinde tespit

edilen biyofilm kütlelerinin tekli kültürdeki miktarına göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).

Biyofilm yapılarının 24 saat inkübasyon ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde daha uzun süren inkübasyonda oluşumların daha yüksek OD değerlerinde seyredeceği öngörülmesi 24 saatlik inkübasyon süresinde oluşumlar daha fazla olarak tespit edilmiştir (Tablo 2; Şekil 3). Yapılan araştırmalar sonrası analizde herhangi bir hata olmadığı ve beklenmeyen durumun kaynağının biyofilmin fizyolojisi veya biyofilmleri görünür kılan ve OD değerinin okutulması için uygulanan kristal viyole boyasının biyofilmler tarafından hücre içine alınma durumlarının farklı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Seçilen *Listeria monocytogenes* suşlarının çoklu kültür ortamında biyofilm inhibisyonu: Araştırmanın son ve kritik basamağı olan üçüncü aşamada, oluşturulmuş çoklu kültürlerde farklı konsantrasyonlarda olmak üzere DNaz I ve Proteinaz K enzimleri uygulanmış ve oluşmuş biyofilmlerin inhibisyonunda en etkili enzim ve konsantrasyonu tespit edilmiştir. Bu aşama, üç deneme şeklinde gerçekleştirilip verilerin ortalama değerleri üzerinden değerlendirme yapılmıştır (Tablo 3). Enzimlerin inhibe edici etkisi biyofilmlerin yüzdesel inhibisyon oranları ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4). Biyofilm inhibisyon oranlarının 48 saat

**Tablo 3. Suşlara enzim uygulandıktan sonraki ortalama OD değerleri**

Suşlar	İnkübasyon Süresi (saat)	Kontrol	50 µg/ml		100 µg/ml		200 µg/ml	
			DNaz	Proteinaz	DNaz	Proteinaz	DNaz	Proteinaz
NCTC-1/2b	24	0.20	0.16	0.14	0.15	0.21	0.17	0.15
	48	0.21	0.15	0.14	0.14	0.19	0.15	0.13
NCTC-4b	24	0.21	0.16	0.14	0.16	0.19	0.18	0.17
	48	0.21	0.15	0.13	0.15	0.19	0.15	0.13
1/2b- 4b	24	0.20	0.16	0.15	0.16	0.22	0.17	0.16
	48	0.21	0.17	0.16	0.17	0.21	0.17	0.15

Tablo 4. Enzimlerce sağlanan biyofilm inhibisyonu (%)

Suşlar	İnkübasyon süresi (saat)	Biyofilm inhibisyonu (%)					
		Dnaz I (µg/ml)			Proteinaz K (µg/ml)		
		50	100	200	50	100	200
NCTC-1/2b	24	19.30	22.03	16.08	28.93	-4.99	22.88
	48	28.23	30.99	28.28	32.74	7.41	35.06
NCTC-4b	24	20.00	21.54	10.58	31.64	5.97	16.98
	48	27.40	28.93	27.50	37.78	10.38	37.06
1/2b- 4b	24	17.29	18.30	13.12	23.69	-13.93	18.35
	48	20.67	20.77	20.25	25.71	1.71	26.90

inkübasyon sonrasındaki her bir suş ve enzim için 24 saat verilerine göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. NCTC 5345-1/2b çoklu kültürü için maksimum inhibisyon 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri için sırasıyla 50 µg/ ml Proteinaz K (% 28.9) ve 200 µg/ ml Proteinaz K (% 35) ile sağlanmıştır. NCTC 5345- 4b çoklu kültürüne bakıldığında her iki inkübasyon değeri için de optimum inhibisyonun 50 µg/ml Proteinaz K (%31.6 ve % 37.8) tarafından sağlandığı görülmüş; 1/2b-4b ikili kültürü için ise 24 ve 48 saat inkübasyon için sırasıyla 50 µg/ml Proteinaz K (%25.7) ve 200 µg/ml Proteinaz K (% 26.9) enziminin en iyi inhibisyon oranlarını verdiği tespit edilmiştir. Üçüncü aşama sonrasında çalışma tamamlanmış olup, elde edilen veriler her bir çoklu suş kombinasyonu için tüm denemeler baz alınarak incelenmiş ve grafik halinde sunulmuştur. Oluşmuş olan biyofilmlerin inhibisyonunda net bir şekilde Proteinaz K'nın etkileri belirlenmiş, araştırma sonucuna dair değerlendirmeler ise kapsamlı olarak tartışma kısmında ele alınmıştır.

## TARTIŞMA

Üç aşamada gerçekleştirilen çalışmada amaç, *L. monocytogenes* bakterisine ait suşlarda ve bu suşların çoklu kültürlerinde biyofilm oluşumlarının tespiti; sonrasında ilk aşamada sekiz serotipten biyofilm oluşturma kapasiteleri yüksek olan NCTC 5345, 1/2b ve 4b suşlarının seçilmesi ve bu serotiplerle oluşturulan biyofilmlere DNaz I ve Proteinaz K enzimlerinin üç farklı konsantrasyonlarda uygulanması ile biyofilm inhibisyonu sağlanmasıdır. Böylece ilk olarak bakteri suşlarının biyofilm

oluşturma yetkinlikleri tespit edilerek yüksek optik yoğunluk değerlerine sahip serotiplerin ikinci aşamada denemeye alınması sağlanmıştır. Daha sonra, seçilen suşların ve bu suşların ikili kombinasyonları ile oluşturulan çoklu kültürlerinde biyofilm oluşum düzeyleri belirlenerek serotipler arasında biyofilm oluşumunu destekleyici bir sinerjistik etkinin varlığı araştırılmıştır. Son kısım ise çoklu kültürler üç farklı konsantrasyonda DNaz I ve Proteinaz K enzimleri uygulanarak biyofilm inhibisyonunda hangi çoklu kültürde inhibisyonun yüksek olduğu ve bu inhibisyonu sağlayan enzim ve enzim konsantrasyonunun optimum parametreleri belirlenmiştir.

Bakterilere ait serotiplerde biyofilm oluşumları, her bir serotip için farklı bir fizyoloji ve bileşen kompozisyonu söz konusu olduğundan farklı düzeylerde seyredir. Yapılan bir çalışmada *L. monocytogenes* bakterisine ait 1/2a, 1/2b ve 4b serotiplerini içeren toplamda 98 adet suşun biyofilm oluşturma kapasiteleri incelenmiş; çalışma sonucunda, farklı *L. monocytogenes* suşlarının, serotipleriyle tam olarak ilişkili olmayan farklı yoğunluklarda biyofilm oluşturduğu ve hücre sayısı, hidrofobiklik ve belirli yağ asitlerinin miktarının biyofilm oluşumunu etkilediği bildirilmiştir<sup>(17)</sup>. Yapılan başka bir çalışmada da *L. monocytogenes* bakterisine ait farklı kaynaklardan izole edilen 80 adet 3a, 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4c ve, 4b serotipleri biyofilm oluşumu, filojenik bölünme ve çevrede kalıcılık arasında bir ilişki olup olmadığını belirlemek için biyofilm oluşumu açısından değerlendirilmiş ve OD değerleri ile tanımlanan biyofilm biyokütellerinin her serotip için farklı düzeylerde seyrettiği belirtilmiştir<sup>(18)</sup>. Yapılan



çalışmanın ilk aşamasında da *L. monocytogenes* bakterisine ait sekiz farklı serotipte biyofilm oluşumları, optimum biyofilm oluşumu gösterenlerin ayrımı yapılmak üzere karşılaştırılmıştır. Daha sonra, biyofilm oluşumları gözlenen serotiplerden biyofilm oluşumları yüksek değerlerde seyreden NCTC 5345, 1/2b ve 4b serotipleri seçilmiştir. Suşların genel olarak 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde gösterdiği gelişim benzer olsa da NCTC 5345 suşu için 24 saatlik inkübasyondaki gelişim 48 saat inkübasyona göre oldukça fazla olarak gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin, biyofilmleri görünür hale getirmek üzere eklenen kristal viyole boyasının kültür tarafından absorbe edilmesinin kısıtlı olmasından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. Başka bir fikir olarak da yapılan çeşitli çalışmalarda *L. monocytogenes* bakterisinin biyofilm oluşturma süresinin farklı inkübasyon sürelerinde değişkenlik gösterebileceği kanısına varılmıştır. Bu yorumu destekler nitelikteki bir çalışmada, *L. monocytogenes* bakterisinin paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşturma kapasitesi incelenmiş ve 24, 48, 72 saat inkübasyon süreleri için optimum biyofilm oluşumunun 48 saat olduğunu bildirilmiştir<sup>(19)</sup>.

İkinci aşamada, 24 kuyucuklu plakalara üç farklı suş ve bu suşların ikili kombinasyonlarının ekimi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada bakteriye ait kültürlerinin biyofilm oluşturma kapasitelerine paralel olarak bakterilerin, birbirlerinin biyofilm oluşturma durumunu nasıl etkiledikleri de gözlemlenmiştir. Farklı bakteriler ve bu bakterilerin serotiplerinden oluşturulan çoklu kültürlerde biyofilm oluşumu kültür karışımını oluşturan bakteri veya serotiplerin birbiri ile etkileşiminden etkilenir. Chen ve ark.'nın<sup>(16)</sup> yaptığı çalışmada, *Vibrio parahaemolyticus* bakterisine ait VP802 ve VP24 ile *L. monocytogenes* bakterisine ait LM115 ve LM5 serotiplerinin çoklu kültürlerinde biyofilm oluşumları incelenmiş; çalışmanın sonucunda, VP802 -LM115 ve VP24-LM5 suşlarını içeren çoklu kültürlerin daha düşük konsantrasyonda EPS yapısı içermesi sebebiyle biyofilm oluşumunun tekli kültürdeki oluşumuna oranla daha düşük olduğu bildirilmiştir. Çoklu kültürleri oluşturan bakteri serotipleri de biyolojik yapılarına göre birbirinin biyofilm oluşturma yeteneğini destekler veya baskılar nitelikte olabilir. Yapılan başka bir çalışmada, *L. monocytogenes* bakterisinin

1/2a ve 4b suşlarının tekli ve çoklu kültürlerinde biyofilm oluşturma kapasiteleri incelenmiş ve 1/2a suşlarının biyofilm oluşturmada genellikle daha verimli olduğunu ve 4b ile oluşturulan çoklu kültür biyofilmlerinde bu suşun daha baskın olduğu bildirilmiştir<sup>(20)</sup>. Bakteri suşlarının sinerjistik etkisinin araştırıldığı benzer bir çalışmada da *Microbacterium phyllosphaerae*, *Shewanella japonica*, *Dokdonia donghaensis*, ve *Acinetobacter lwoffii* bakterileri ve çoklu kültürlerinde biyofilm oluşumları gözlemlenmiş ve çalışma sonucunda 96 kuyucuklu plakalarda oluşan biyofilmlerde bakterilerin birbiri ile sinerjistik olarak etkileşime girdiği belirtilmiştir. Çalışma sonucunda dört suşun oluşturduğu biyofilmlerde, tek suşlardan oluşan biyofilmlere kıyasla biyofilm biyokütlesinin yaklaşık iki kat arttığı bildirilmiştir<sup>(21)</sup>. Serotipler arası etkileşimi incelemek için çalışmanın ikinci aşamasında serotiplerin olası sinerjistik etkileri de araştırılmıştır. İnkübasyonlar için yapılan denemelerin ortalamalarına bakıldığında 24 saatlik inkübasyon süresi için NCTC 5345 serotipi, 1/2b ve 4b suşları ile kombine edilerek biyofilm oluşumları gözlemlendiğinde suşun bireysel haline göre biyofilm oluşturma kapasitesinin arttığı sonucuna varılmıştır. Farklı olarak 1/2b serotipi için, NCTC 5345 ve 4b suşları ile biyofilm oluşturma kapasitesinin bireysel haline göre azaldığı söylenebilir. Bir diğer suş olan 4b serotipinde ise NCTC 5345 ve 1/2b suşları ile oluşturduğu biyofilm yapısının bireysel haline benzer olduğu görülmüştür. Diğer 48 saatlik inkübasyon sürelerinde yapılan denemelerde ise genel olarak bireysel oluşumlarla kombine oluşumların benzer miktarlarda seyrettiği görülmüştür.

Üçüncü aşamada, biyofilm oluşturma kapasiteleri tespit edilen çoklu kültürlere farklı konsantrasyonlarda Proteinaz K ve DNaz I enzimleri uygulanmış ve bu enzimlerin inhibe edici etkisi araştırılmıştır. Üç farklı konsantrasyonda hazırlanan DNaz I ve Proteinaz K enzimleri her bir kültür karışımına uygulanmış ve daha sonra önceki kısımlardaki işlemler ile OD değerleri okutularak oluşumlarındaki azalma tespit edilmiştir. Araştırmanın sonucunda, çoklu kültürlerde gözlemlenen biyofilm oluşumlarının karmaşık fizyolojileri olduğu ve biyofilm oluşturmuş çoklu kültürlere uygulanan enzimlerden DNaz I enziminin beklenen etkiyi sağlamadığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, *Staphylococcus aureus* bakterisine

ait RN6390 serotipinin biyofilm inhibisyonu için rekombinant lizostafin ve DNaz I enzimleri ve bu enzimlerin kombine uygulaması gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, tek başına lizostafinin iyi bir inhibe edici unsur olduğu belirtilmiş olsa da lizostafin ve DNaz I enziminin birlikte uygulandığı biyofilmdeki inhibisyonun daha fazla olduğu ve bunun olası nedeninin DNaz I'in hücre dışı DNA'yı uzaklaştırması ve olgun biyofilmleri dağıtması ile Lizostafinin penetrasyonunu kolaylaştırması olduğu bildirilmiştir<sup>(22)</sup>. Bahsedilen araştırmaya bakıldığında, DNaz I enziminin diğer inhibe edici unsurları destekleyici özelliği olsa da *L. monocytogenes* suşları ile oluşturulan biyofilmlerin inhibisyonunda tek başına uygulandığında yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır. Nguyen ve Burrows'un<sup>(23)</sup> çalışmasında ise, *L. monocytogenes'* e ait 568 suşunda DNaz I, Proteinaz K ve ampisilin kullanarak biyofilm inhibisyonları gerçekleştirilmiş ve Proteinaz K enziminin inhibisyonunda daha etkili olduğu bildirilmiştir. Benzer bir araştırmada, selüloz, DNaz I ve Proteinaz K'nın paslanmaz çelik yüzeydeki *Salmonella enterica* Enteritidis biyofilmleri üzerindeki enzimatik etkisi incelenmiştir. Çalışmada, işletme dezenfeksiyonunda klor uygulaması öncesi Proteinaz K enziminin uygulanmasının biyofilm inhibisyon verimini artırdığı bildirilmiştir<sup>(24)</sup>. Literatürdeki inhibisyon çalışmalarına bakıldığında, Proteinaz K enziminin farklı bakteri suşlarında biyofilm inhibisyonundaki etkisinin yadsınamaz olduğu ve bu durumun çalışmamızın bulgularını da destekler nitelikte olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada, tüm enzim uygulamalarından elde edilen verilerin karşılaştırılmasıyla en etkili inhibisyon sağlayan enzimin, literatürdeki çalışmalara benzer olarak, 50 µg/ml konsantrasyonda Proteinaz K olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bu neticenin, oluşmuş biyofilmlerde inhibisyona dair süregelen çalışmalara benzer olarak literatüre katkı sağlaması ve kontaminasyon risklerini azaltıcı yeni yöntemler geliştirilmesinde rol oynaması hedeflenmektedir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansman:** Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 2209-A - Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Funding:** This study was supported by The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TÜBİTAK) under the program 2209-A.

## KAYNAKLAR

1. İlhan G, Ekinci FY. Biyofilmler: Yüzeylelerdeki mikrobiyal yaşam. Gıda. 2009;34(3):165-73.
2. Padera RF. Infection in ventricular assist devices: The role of biofilm. Cardiovascular Pathology. 2006;15(5):264-70. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2006.04.008>
3. Ali A, Zahra A, Kamthan M, et al. Microbial biofilms: Applications, clinical consequences, and alternative therapies. Microorganisms. 2023;11(8):1034. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081934>
4. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(4):999-1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>
5. Motta JP, Wallace JL, Buret AG, Deraison C, Vergnolle N. Gastrointestinal biofilms in health and disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021;18(5):314-4. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00397-y>
6. Valenti M, Ranganathan N, Moore LS, Hughes S. *Listeria monocytogenes* infections: Presentation, diagnosis and treatment. Br J Hosp Med (Lond). 2021;82(10):1-6. <https://doi.org/10.12968/hmed.2021.0107>
7. Kam Hepdeniz Ö, Seçkin Ö. Dinamik mikrobiyal bir yaşam: Oral biyofilm. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2017;8(3):47-55. <https://doi.org/10.22312/sdusbed.294953>
8. Meyer B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. Int Biodeterior Biodegrad. 2003;51(4):249-53. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00047-7)
9. Allison DG. The biofilm matrix. Biofouling. 2003;19(2):139-50. <https://doi.org/10.1080/0892701031000072190>
10. Arar D. Bakteriyal biyofilm oluşumu [yüksek lisans tezi]. Denizli: Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2015.
11. Cámara M. Quorum sensing: A cell-cell signalling mechanism used to coordinate behavioral changes in bacterial populations. In: Hoogeboom HJ, Păun G, Rozenberg G, Salomaa A, editors. Membrane Computing. WMC 2006. Lecture Notes in Computer Science. 2006;4361:42-8. [https://doi.org/10.1007/11963516\\_3](https://doi.org/10.1007/11963516_3)



12. Vashistha A, Sharma N, Nanaji Y, et al. Quorum sensing inhibitors as therapeutics: Bacterial biofilm inhibition. *Bioorg Chem.* 2023;136:106551. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106551>
13. Odularu AT, Afolayan AJ, Sadimenko AP, Ajibade PA, Mbese JZ. Multidrug-resistant biofilm, quorum sensing, quorum quenching, and antibacterial activities of indole derivatives as potential eradication approaches. *BioMed Res Int.* 2022;2022:9048245. <https://doi.org/10.1155/2022/9048245>
14. Li W, Wang JJ, Qian H, et al. Insights into the role of extracellular DNA and extracellular proteins in biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol.* 2020;11:813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00813>
15. Sudağından M, Aydın A. Lizozim ve nisinin gıda kaynaklı *Staphylococcus aureus* suşlarında gelişim ve biyofilm oluşumu üzerine etkileri. *İstanbul Univ Vet Fak Derg.* 2013;39(2):254-63. <https://doi.org/10.16988/iuvfd.27546>
16. Chen H, Ji PC, Qi YH, et al. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by thymoquinone in combination with nisin. *Front Microbiol.* 2023;13:1029412. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1029412>
17. Doijad SP, Barbuddhe SB, Garg S, et al. Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. *PloS One.* 2015;10(9):e0137046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137046>
18. Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(12):7336-42. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7336-7342.2003>
19. Ripolles-Avila C, Hascoët AS, Guerrero-Navarro AE, Rodríguez-Jerez JJ. Establishment of incubation conditions to optimize the in vitro formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. *Food Control.* 2018;92:240-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.054>
20. Pan Y, Breidt Jr F, Kathariou S. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(18):5846-52. <https://doi.org/10.1128/AEM.00816-09>
21. Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sørensen SJ, Kjelleberg S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(6):3916-23. <https://doi.org/10.1128/AEM.03022-05>
22. Lin Q, Sheng M, Tian Y, et al. Antibiofilm activity and synergistic effects of DNase I and Lysostaphin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Qual Saf.* 2024;8:fyae024. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyae024>
23. Nguyen UT, Burrows LL. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *Int J Food Microbiol.* 2014;187:26-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.025>
24. Kim MJ, Kim JS. Enhanced inactivation of *Salmonella enterica* Enteritidis biofilms on the stainless steel surface by proteinase K in the combination with chlorine. *Food Control.* 2022;132:108519. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108519>