



MİKROORGANİZMALAR VE BİYOFİLM

Prof. Dr. Ayşe WILLKE TOPCU

2. UDAIS

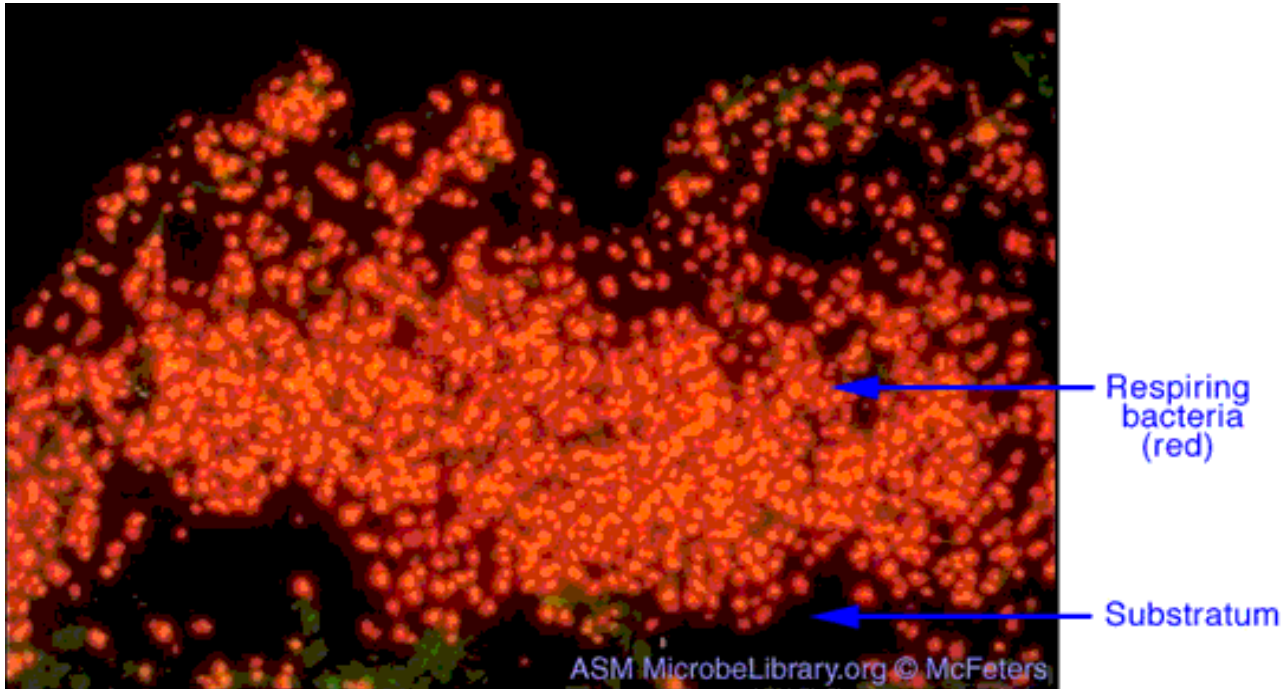
26 Mayıs 2012, İstanbul

Biyofilm tanımı

- Cansız ya da canlı yüzeylere
- Geri dönüşümsüz olarak tutunup çoğalan mikroorganizmaların
- Ekstrasellüler polimerik yapıdaki matriks içinde
- Birbirleriyle haberleşme, gen transkripsiyonu gibi özellikleri ile
- Planktonik mikroorganizmalara göre daha farklı bir fenotip kazanarak oluşturduğu mikroorganizma topluluğu

Biyofilmin basitçe tanımı

- Yüzeyle tutunarak ekstra sellüler matriks içinde birlikte yaşayan mikroorganizma topluluğu



Antonie von Leeuwenhoek 17.yüzyıl



Kendi diş (plağı)
kazıntılarını
kendi yaptığı
mikroskopta
inceleyerek bakterileri
gösteren bilim adamı

Biyofilm özellikleri

- Hidrotermal kayalarda, fosillerde 3.2 milyar yıldır varlığı gösterilmiştir
- Mikroorganizmalar sanıldığığının aksine %65-80 oranında biyofilmler oluşturarak yaşarlar, enfeksiyon oluştururlar
- Mikroorganizmaların varlığını sürdürmesinin evrensel stratejisi biyofilm oluşumudur
- Oysa mikrobiyolojik çalışmaların çoğu planktonik (serbest) yaşayanlarla yapılmıştır

Biyofilm özellikleri

- Medikal önemi yanında endüstriyel sorunlara da yol açar
 - Her türlü borunun tıkanması
 - Yüzeylerin korozyonu
 - Gıda tezgahlarının kontaminasyonu
- Bakteriler dışında funguslar, protozoonlar, viruslar, algler de biyofilm oluşturur
- Genellikle birden fazla tür hatta cins birliktedir
- Sanayide bazan toksik maddelerin temizlenmesinde kullanılır

Biyofilmin önemi

Soğutma suyu



Gıda üretimi

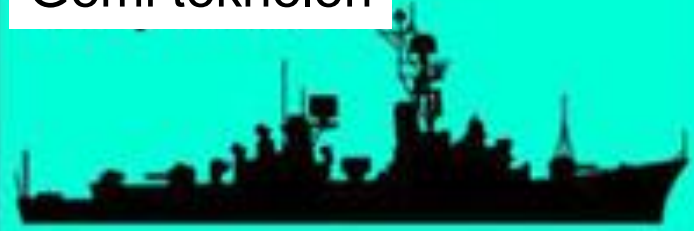


Dişler



Petrol çıkarma

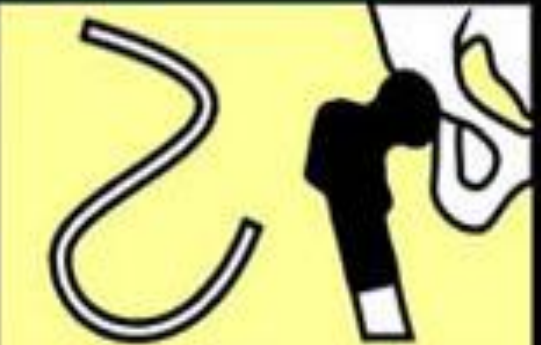
Gemi tekneleri



Kağıt imalatı



İçme suyu



Medical Implants

Biyofilmle ilişkili hastalıklar

- Dental plaklar
- Kateter (trakeal, damar, üriner, şant) enfeksiyonları
- Eklem ve kalp protez enfeksiyonları
- Endokardit
- Kistik fibrozis
- Kontak lens enfeksiyonları
- Böbrek taşları

Biyofilmle ilişkili hastalıklar

- Osteomyelit
- Prostatit
- Kronik sinüzit
- Kronik otitis media
- Vajinal tamponlara bağlı TSS
- Prostatit
- Kronik enfeksiyonlar, **diyabetik ayak enf.**

Biyofilmle ilişkili hastalıklar

- Nekrotizan fasiit
- Safra yolu enfeksiyonları
- Kolera gibi gastrointestinal enfeksiyonlar
- CAPD peritoniti
- Greft enfeksiyonu
- Penil protez enfeksiyonu
- Safra yolu stent obstrüksiyonu
- Sütür enfeksiyonu

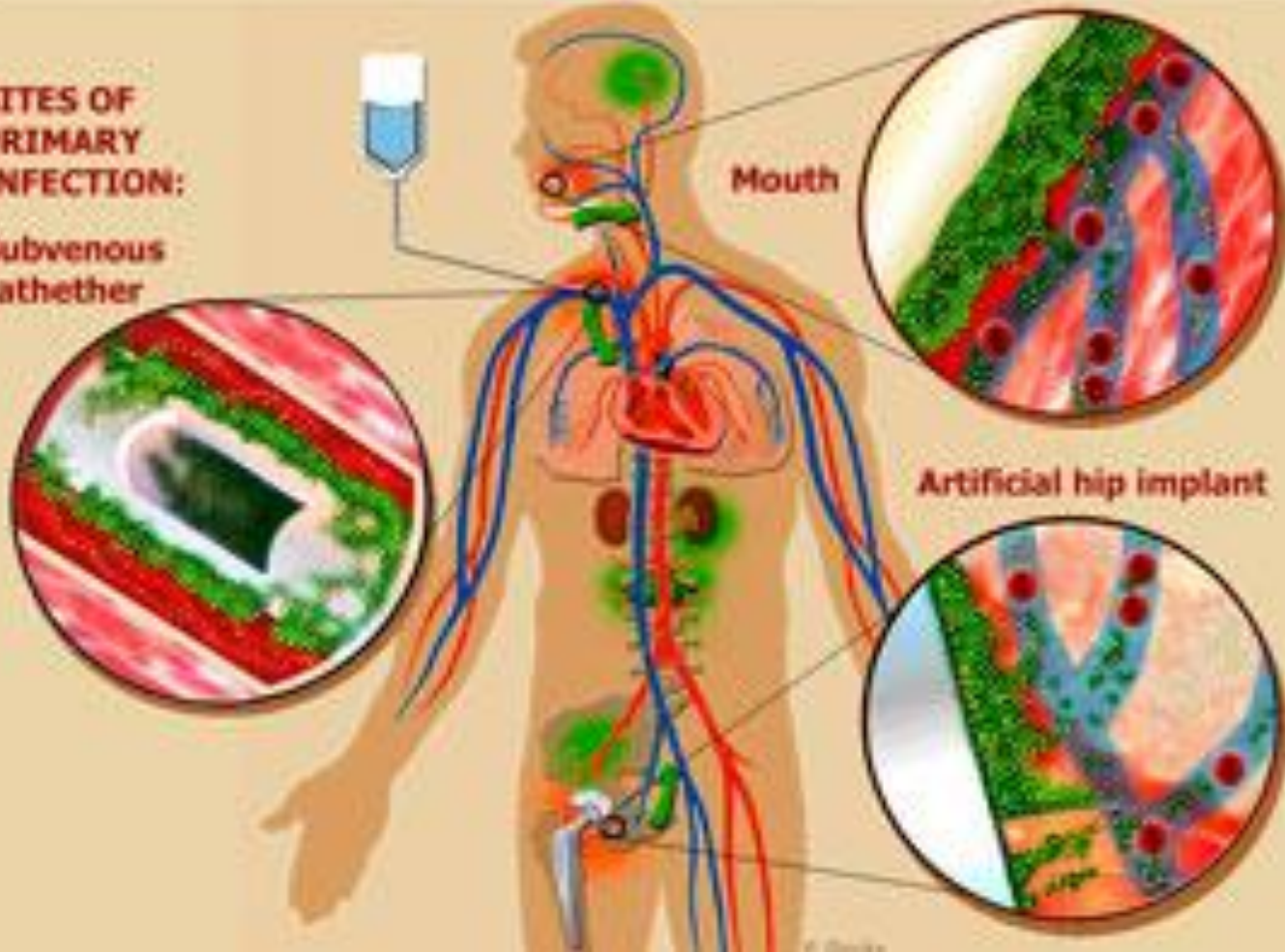
Sites of **Primary** and **Secondary** Biofilm Infection

**SITES OF
PRIMARY
INFECTION:**

Subvenous
cathether

Mouth

Artificial hip implant

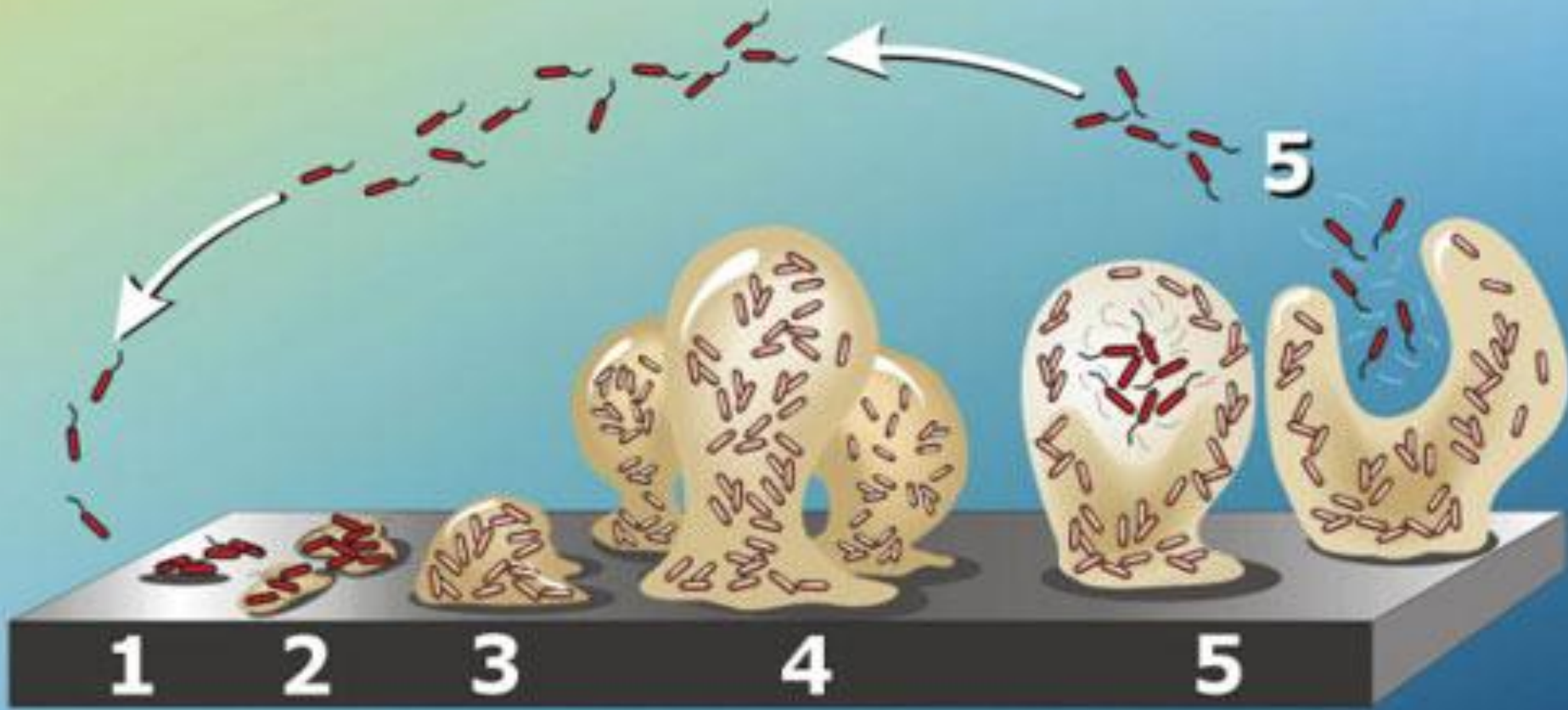


Biyofilm

Mikroorganizmaların doğada varlığını sürdürmek için de kullandıkları bir yaşam tarzıdır;

- *Leptospira*
- *Legionella*
- *Vibrio spp*

Biyofilm oluřma basamakları: Birbirini izleyen 5 evre



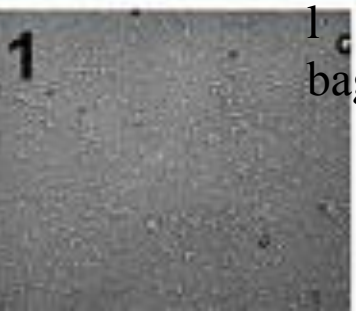
Tutunma

İrreversib
1
bağlanma

Tabaka oluřumu

Tabakaların kalınlaşması

Planktonik formda
kopmalar



Biyofilm oluşumunun başlaması

- Mikroorganizmalar stres anında biyofilm oluştururlar;
- Yüzeyin durumu
 - Yüzeyin düzgün veya pürüzlü olması
 - Teflon, plastik veya cam, metal
- Çevre sinyalleri
 - Yüzeyde organik ve inorganik besinlerin varlığı (müsin, aktin, DNA vb)
 - Ortamın oksijeni, pH, ısı, osmolite, demir iyonları vb gibi

Biyofilm oluşumunun 1. basamağı

- Saniyeler sürer
- Yüzeye irreversibl bağlanma vardır, bazı hücreler ayrılabilir
- Logaritmik çoğalma fazındadır m.o.lar

Biyofilm oluşumunun 2. basamağı

- Birinci basamaktan dakikalar sonra başlar
- Bağlanma irreversibldir, adezinler rol oynar
- Bakteriler yüzey adezinleri ile diğer hücrelere de bağlanır
- Bu evrede çoğalma devam eder, QS gen aktivasyonu
- Hücreler arası iletişimi sağlayan kimyasal sinyaller göndermeye başlar (QUORUM SENSING)
- Sinyal yoğunluğu belli bir düzeye ulaşınca ekzosellüler polimerik madde (EPS: slime) salınımını sağlayan genetik mekanizmalar aktive olur

Biyofilm oluşumunun

2. basamağı(devam)

- Mikroorganizma agregatları oluşur, çevresi matriks ile sarılıdır
- Matriks yapısının %50-90'nını EPS, kalanı proteinler, eDNA vb moleküllerden oluşur
- EPS yapışkan oldukça hidrate bir maddedir,
- EPS planktonik bakterileri, gıdaları, mineral, kristal, korozyon maddelerini yakalar
- Giderek bu yapı tabakalar halinde kalınlaşır

Biyofilm oluşumunun 3. basamağı

- Biyofilm kalınlığı 10 μ m yi aştığında başlar
- I. Matürasyon basamağı da denir
- Tipik olarak biyofilm mikrokolonileri
 - % 10-25'i bakteri hücrelerinden
 - % 75-90'ı EPS matriksten oluşur

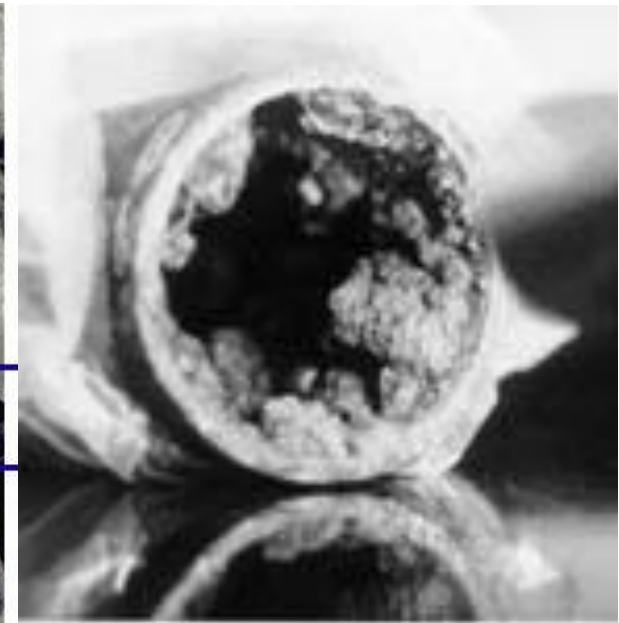
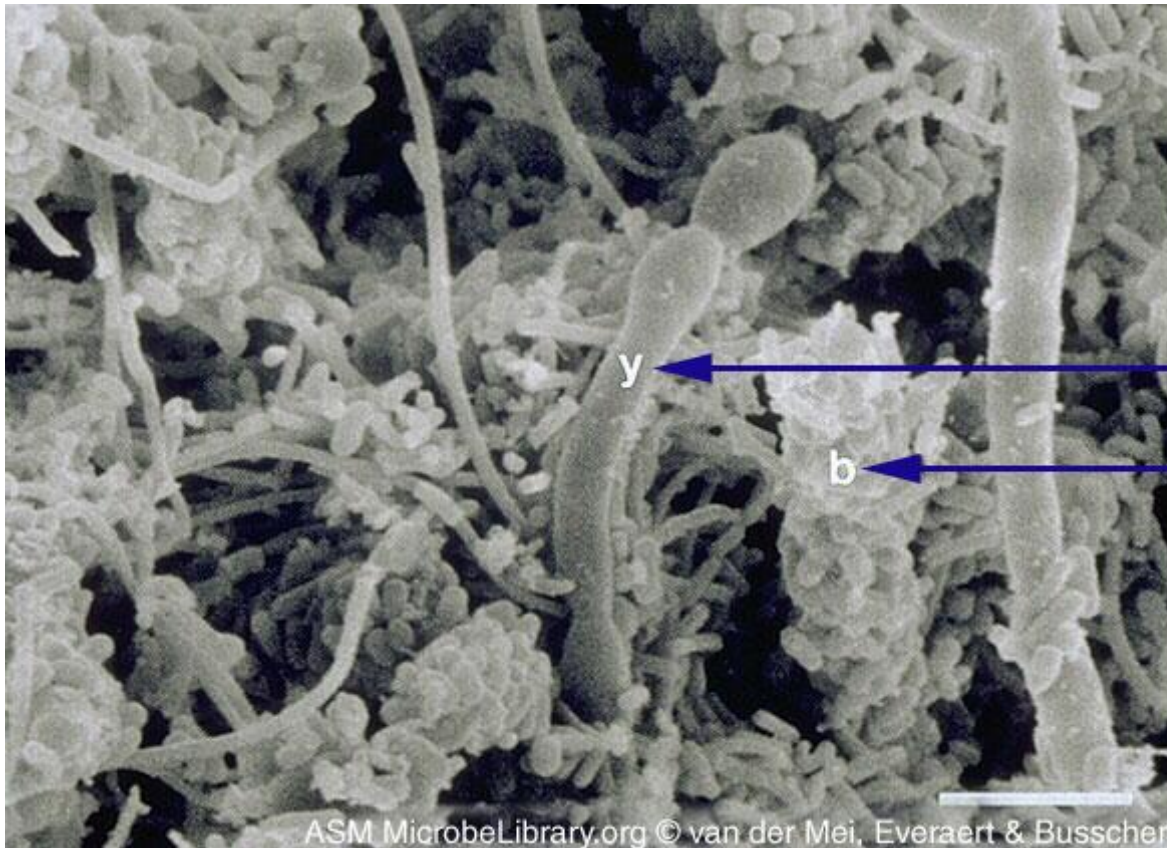
Biyofilm oluşumunun 4.ve 5. basamağı

- Biyofilm kalınlığı $100\mu\text{m}$ 'yi aştığında 4. basamak ve 2. olgunlaşma dönemi denir
- Biyofilmin 5.basamağında hücre ayrılmaları görülür
 - 4.aşamadan birkaç gün sonradır
 - Bakterilerin bazıları planktonik forma dönüşür
 - Biyofilmi terkeder, yeni yüzeylere doğru yola çıkar
 - Biyofilm bir mikroorganizma yuvasıdır



Biyofilm hareketleri: Koparak ayrılma dışında, kayarak, Yuvarlanarak, saçılarak, akarak da yayılır

Biyofilm morfolojisi

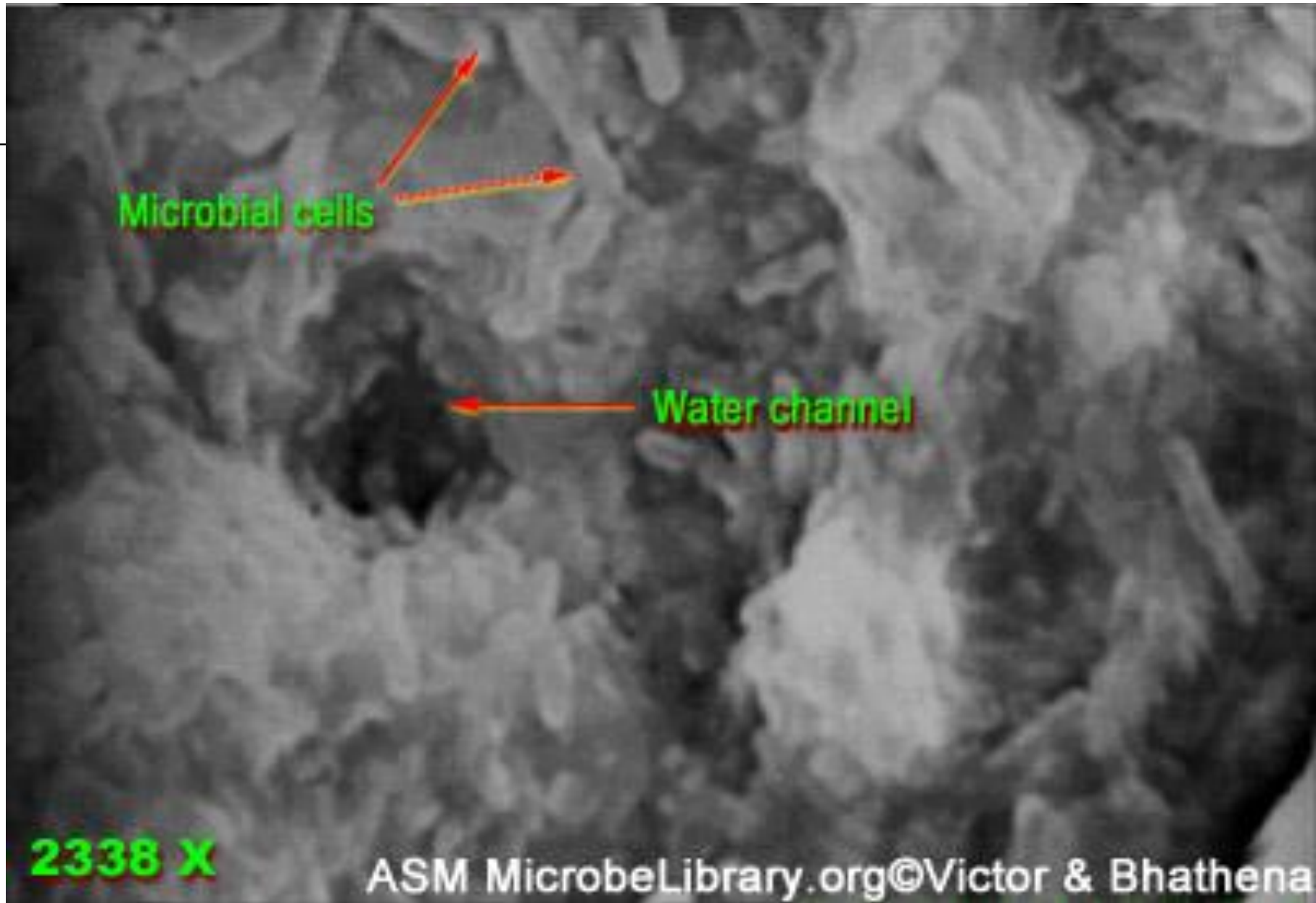


Biyofilm özellikleri

- Biyofilm içindeki bakteri topluluğu
 - Planktonik bakterilerden farklı bir fenotip çizer
 - Sesil ya da dormant bakteri de denir
 - Birbirleriyle iş birliği içinde
 - İş bölümü yaparak
 - Gıda paylaşımı ile
 - Koordine bir şekilde
 - Kendine ait metabolizması ile
 - Adeta çok hücreli bir canlıyı taklit eder

Biyofilm mimarisi

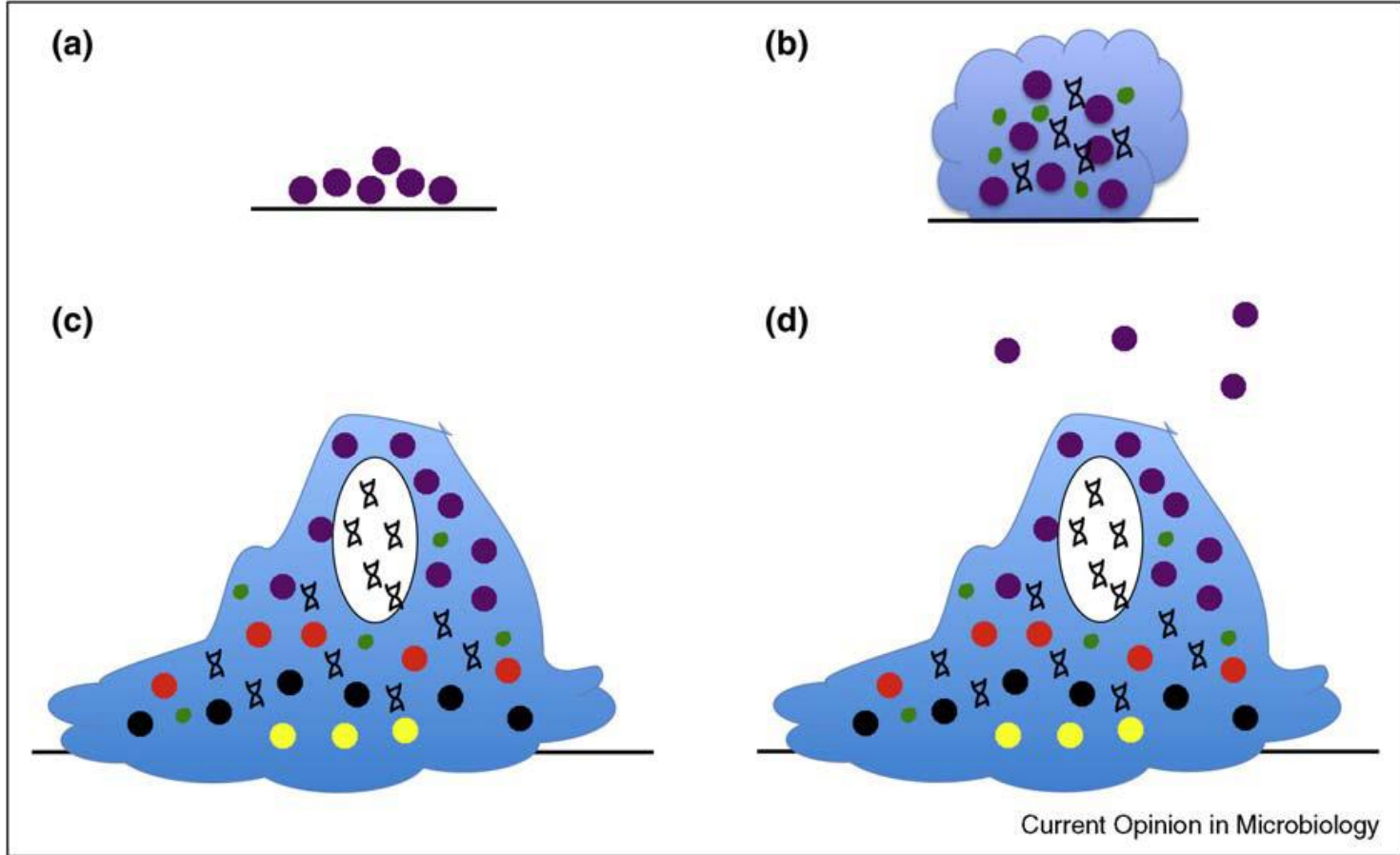
- **Oldukça karmaşıktır**
- **Matriks içindeki bakteri toplulukları yapısal ve metabolik olarak oldukça heterojendir**
- **Bu çok hücreli topluluğun değişik katmanlarında aynı anda hem aerop hem anaerop süreç çalışır**
- **Olgun bir biyofilmde besinlerin ve suyun dolaştığı su kanalları vardır**
- **Besinlerin dağıtımında ve atık gideriminde görev gören ilkel bir dolaşım sistemidir**



Microbial cells

Water channel

2338 X



**Sarı: Ölü bakteriler, Siyah: Dormant bakteriler, Mor: aerop,
Kırmızı: anaerop/mikroaerobik**

Biyofilm bakterileri

- Açlık sınırında yaşar
- Yavaş çoğalır, antibiyotik etkisinden korunur
- Gıdaları su kanallarından molekül difüzyonu ve sıvı akımı ile temin eder
 - Sıvı akım gücü bakteri üreme kontrolünde rol oynar
 - Çevreye yakın olanlar daha hızlı ürer
- Çevrelerindeki matriks bunları dış etkilerden korur
 - Antibiyotik
 - Antikor
 - Toksik maddeler

Quorum sensing

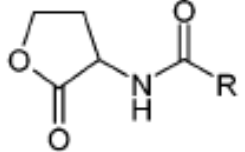
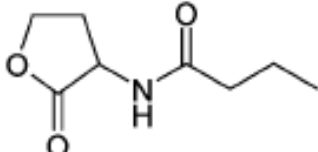
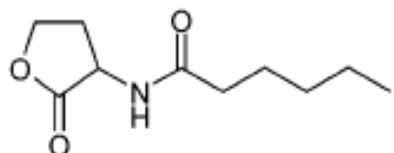
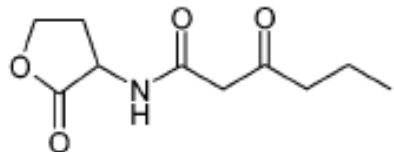
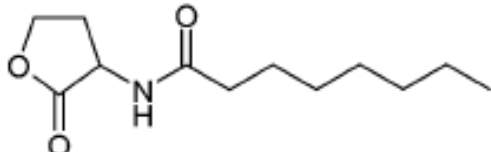
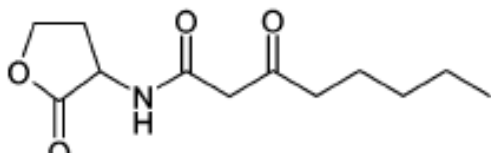
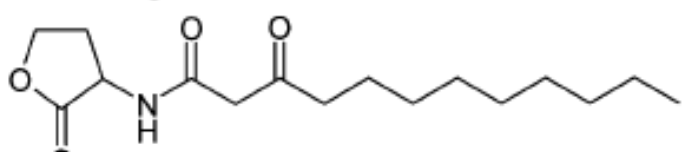
- Hücreler arası sinyal sistemi
- Hücre dışı kimyasal moleküllerle, feromonlarla hücreler arası iletişim ağı
- Yüzeye tutunan bakteriler çevrede kaç bakteri olduğunu anlayabilir bu sistemle
- Çevresinde yoğun bakteri olan bir bakteri o topluluğa katılma eğilimi gösterir
- Biyofilm oluşumunda temel bir rolü var



Bakteriler birbirleriyle haberleşme amacıyla 3 tip sinyal molekülü kullanıyor

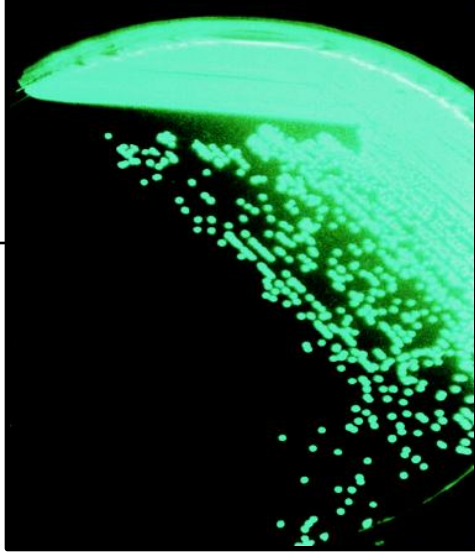
- 1. Acyl-homoserine lactones (AHLs) → Gram negatif**
- 2. Autoinducer peptides (AIPs) → Gram pozitif**
- 3. Autoinducer-2 (AI-2) → Gram negatif ve gram pozitif**

Gram (-) bakterilerin sinyal molekülleri

	Structure	Microorganism
N-acyl-homoserine lactone (AHL)		
N-butyl-homoserine lactone (C4-HSL)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (RhII)
N-hexanoyl-homoserine lactone (C6-HSL)		<i>Chromobacterium violaceum</i> (CvII)
N-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL)		<i>Vibrio fischeri</i> (LuxI)
N-octanoyl-homoserine lactone (C8-HSL)		<i>Burkholderia cepacia</i> (CePI)
N-3-oxo-octanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C8-HSL)		<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (TraI)
N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (LasI)

Quorum sensing

- Bakterilerin sosyal bir yaşamları olduğu ilk defa 1970'lerin başında bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* üzerinde yapılan çalışmalar sırasında ortaya çıktı



•Bu bakteride biyolüminesens (biyoışıma)'in kollektif bir çalışma ile oluşturulduğu keşfedildi



•*Vibrio fischeri* kökenleri yalnız olduklarında ışık üretemeyip ancak çoğalıp belli bir sayıya ulaştıklarında, hepsi birden aynı anda ışık üretmeye başlıyorlar

Quorum sensing

- Birçok gram negatif
- Gram pozitif bakteriler
- İnsan, hayvan ve bitki patojeni tarafından yaygın olarak kullanıldığı anlaşıldı

Quorum sensing

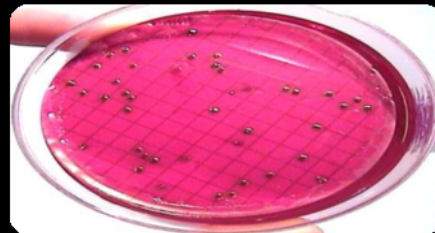
Hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal molekül ağı:

- Koloni oluşumunu kontrol eder**
- Üreme hızını düzenler**
- Türler arası iletişimi sağlar**
- Toksin üretiminde rol alır**
- İnvazif özellikleri belirler**

SOCIO-MICROBIOLOGY

BIOFILMS AND QUORUM SENSING IN INFECTIOUS DISEASES

Dr.T.V.Rao MD



Biyofilm enfeksiyonlarının tanısı

- Tanı sorunludur, enfeksiyon kliniği varsa ve;
 - Kültür negatifse
 - Mikroskopi pozitif kültür negatifse
 - Koloni sayısı az ise
 - Antibiyotik direnci varsa
 - Sürüntü örneği ve kültür negatifse biyofilm enfeksiyonu akla gelmelidir

Çıkarılan kateterde biyofilm saptama yöntemleri

- Kateter ucu Gram boyama (Cooper)
- Kateter ucu akridin orange boyama
- Scanning E/M
- Maki yöntemi

Biyofilm gösterme yöntemleri

- TCP metodu (doku kültürü plak yöntemi)
- Tüp yöntemi
- Kongo kırmızısı agar yöntemi
- Bioluminesans inceleme
- Reflecting spectroscopy
- Piezoelektrik sensor

Antibiyotik tedavisinin güçlükleri

- İlacın biyofilm penetrasyonundaki güçlük
- Biyofilm bakterileri yavaş üredikleri için aby etkisine daha az duyarlıdır
- Yüzeyde olan bakteriler aby.ten etkilenir
- Derindekiler bir enfeksiyon odağı olarak kalır

Biyofilm eradikasyon yöntemleri

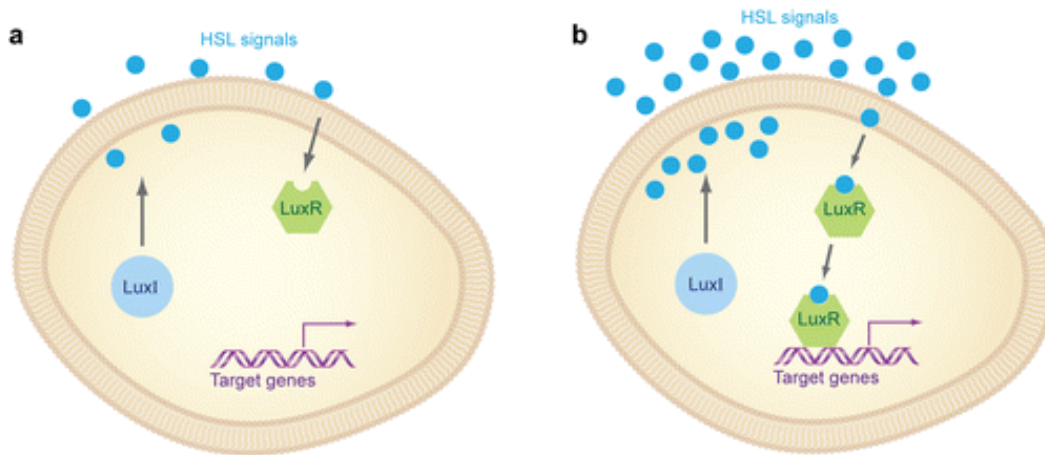
- Mekanik (sonikasyon vb) harabiyet/uzaklaştırma
- İmmün modülasyon (düşük doz azitromisin, doksisisiklin)
- Lokal antimikrobikler (gümüş veya tobramisin)
- Biyofilm penetrasyonu iyi olan ilaçlar (Örn: Rifampisin, ekinokandinler)

Quorum sensing inhibisyonu için kullanılan stratejiler

Sinyal molekülünün
(AHL autoinducer)
üretiminin
önlenmesi

Sinyal molekülünün
yıkılması (AHL sinyal
molekülünün hidrolizi)

Sinyalinin alınmasının
önlenmesi (LuxR-Tipi
reseptör proteine
bağlanacak
analogların
geliştirilmesi)



QS inhibitörleri

- 1- Doğal İnhibitörler
- 2- Sentetik Analoglar
- 3- Bazı İlaçlar

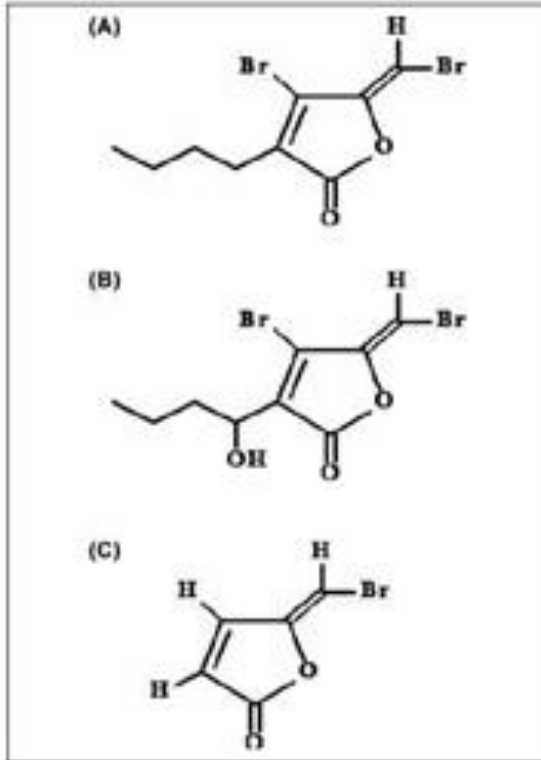


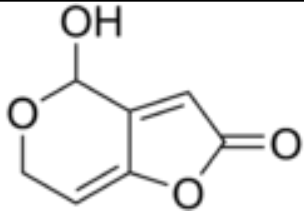
□ Animasyon



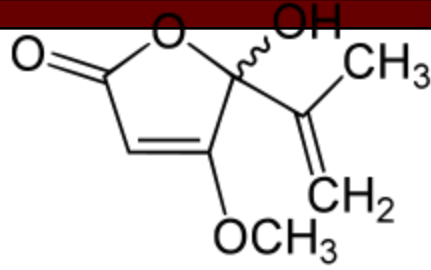
1- Doğal İnhibitörler

Gram-negatif bakterilerde çevreyi algılama sistemini bloke ettiği tespit edilen ilk bileşik, kırmızı bir deniz algi olan *Delisea pulchra*'dan izole edilen halojenlenmiş furanonlardır.

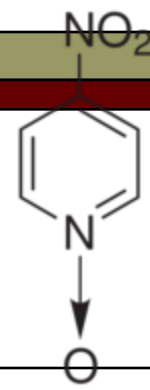




Patulin



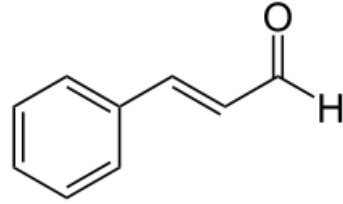
Penicillic asit



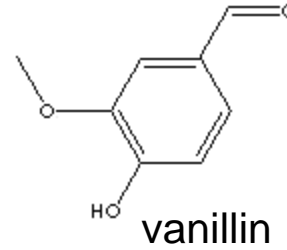
4-nitro-pyridine-*N*-oxide (4-NPO)



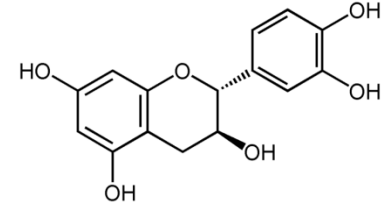
sarımsak özütü



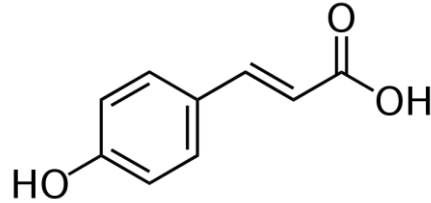
cinnamaldehyde



vanillin




catechin



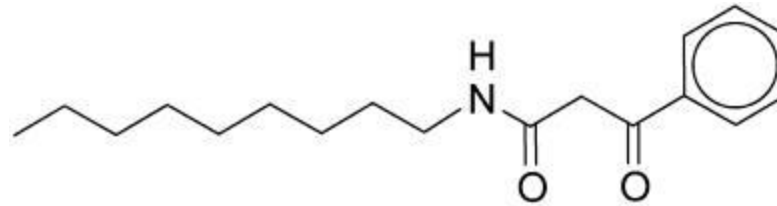
p-coumaric acid

- gibi birkaç doğal bileşiğin daha Gram-negatif bakterilerin çevreyi algılama sistemini etkilediğini rapor edilmiştir.

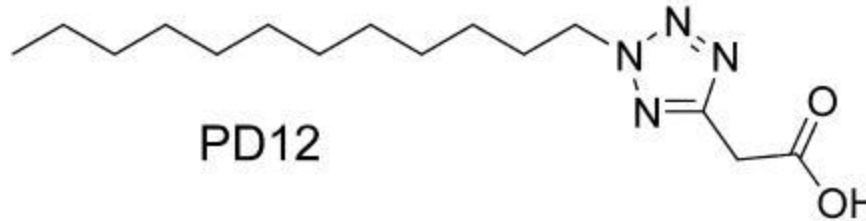
- 
-
- Ancak bu bileşiklerin çoğunun ya toksik olmaları ya da tolere edilebilir dozlarda etki gösterememeleri nedeniyle insan kullanımına çok uygun olmadıkları görülmüştür.

2- Sentetik Analoglar ve Sentetik Bileşikler

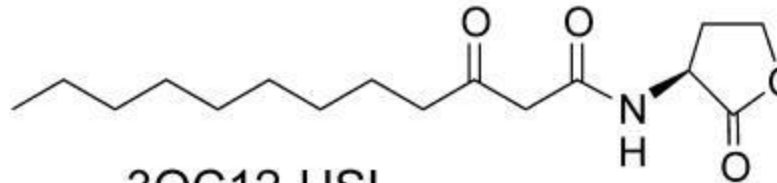
Hücreler arası iletişimi sağlayan sinyalin alınmasını önlemek amacıyla reseptöre (LuxR-tipi) karşı yarışan sentetik moleküller



V-06-018



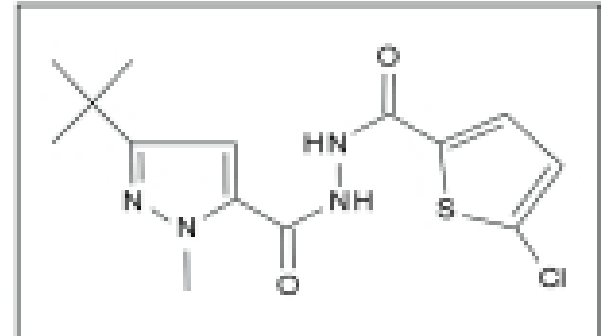
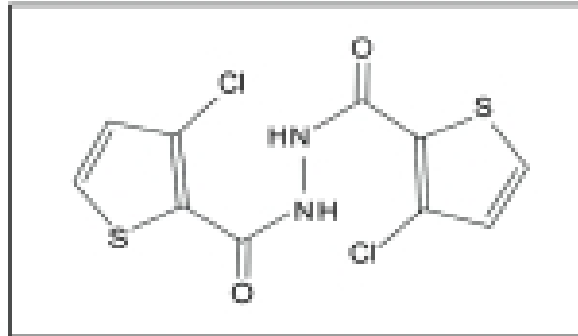
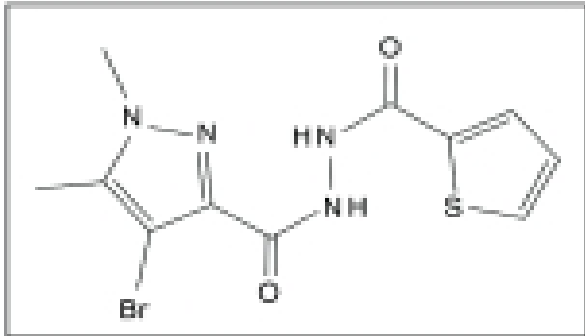
PD12



3OC12-HSL


P. aeruginosa sinyal molekülü

Bilgisayar destekli molekül dizaynı ile QSI molekül taraması çalışmaları ile yapısal olarak AHL' lara benzerlik göstermeyen bazı moleküllerin de bazı bakteri türlerinde QS sistemini inhibe ettiği görülmüştür.



3- Bazı Bilinen İlaçlar


- İlaç pazarındaki bazı ilaçların kullanımlarına neden olan biyolojik etkilerine ~~ilave olarak quorum sensing aktivitesine de sahip oldukları~~ gösterilmiştir
- Bazı makrolid ve non-makrolid antibiyotiklerin sub-MIC değerlerinde, Gram (-) bakterilerin quorum sensing sistemi üzerine etkileri bildirilmiştir
- Salicylic acid, nifuroxazide ve chlorzoxazone'un *P. aeruginosa* quorum sensing sistemini inhibe ettiği görülmüştür.

- 
-
- Tobramycinin , *P. aeruginosa* da elastaz üretimini azalttığı gözlenmiştir.
 - Bilinen ilaç moleküllerinin bakteriyel QS üzerindeki etkileri onların farklı medikal uygulamalarda kullanılma potansiyelleri olduğunu göstermektedir



Eğer insan kullanımına uygun QS inhibitörler geliştirilebilirse,
bu moleküllerin antibiyotiklerden farkı ne olacak?

- Üremeyi direk olarak etkilemeyeceklerinden, dirençli bakterilerin gelişimine neden olmayacakları,
- konakta mevcut faydalı bakteri komünitelerini yok etmeyecekleri umulmaktadır.

- 
-
- QS inhibitörlerinin mevcut antibiyotiklerle birlikte kullanılarak onların etkisini artıracakları ve raf ömrünü uzatacağı umulmaktadır.

