

## Bakteriyel Biyofilmler ve Konakçı Savunma Sistemi ile Etkileşimleri

Nefise Akçelik, Mustafa Akçelik\*

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

(Alınış / Received: 22.06.2016, Kabul / Accepted: 16.03.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 21.04.2017)

### Anahtar Kelimeler

Biyofilm,  
Bakteriler,  
Patojen,  
Konakçı Savunma Sistemi

**Öz:** Biyofilmler, mikroorganizmaların, genellikle çevresel stres koşullarına karşı oluşturduğu çok hücreli benzeri yaşam formlarıdır. Bu çevresel stres faktörleri; başta konakçı hücre immün yanıtları, konakçı sistemlerde yerleşik mikrobiyota, ortamdaki antimikrobiyal bileşikler ve ortamdaki sıcaklık, pH, tuz, organik ve inorganik besin değişimleri olmak üzere birçok biyotik ve abiyotik faktör ya da onların kombinasyonu olabilmektedir. Patojen bakteriler hem biyotik ve hem de abiyotik yüzeylerde, yüksek düzeyde biyofilm yapıları oluşturma yeteneği içerdiğinden, önemli ölçüde kalıcılık ve inatçı enfeksiyon karakteristiği göstermektedir. Günümüzde biyofilmler özellikle bakteriyel üremenin predominant formu olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle, bu yapıların; kimyasal fiziksel biyolojik özelliklerinin yanında, biyofilmlerin biyotik ve abiyotik sistemlerle etkileşimlerinin detaylı bir şekilde tanımlanması, modern mikrobiyolojinin temel çalışma konuları arasına girmiştir.

## Bacterial Biofilms and Their Interactions With The Host Defence System

### Keywords

Biofilm,  
Bacteria,  
Pathogen,  
Host Defence System

**Abstract:** Biofilms are multicellular-like living forms of microorganisms that they form under environmental stress conditions. This environmental stress factors could be include many biotic and abiotic factors or their combinations, in particular; host immune responses, residential microbiota in the host systems, the antimicrobial compounds and pH, salt, temperature, and, organic and inorganic nutrient changes in the environment. Pathogen bacteria show high level durability and persistent infectious characteristics with the higher ability to forming biofilm structures on both biotic and abiotic surfaces. Nowadays biofilm forms are defining as the predominant form of bacterial growth. Therefore, detailed definition of the biofilm interactions with the biotic and abiotic surfaces in addition to characterisation of their chemical, physical and biological properties has become one of the main subjects of modern microbiology.

### 1. Giriş

Doğada mikroorganizmalar, bağımsız formlardan (planktonik) çok biyofilm formları (sesil) olarak bulunmaktadır. Biyofilm formları, biyofilmi oluşturan tek ya da birden fazla türün ürettiği hücre dışı polimerik madde (EPS, **E**xtracellular **P**olimeric **S**ubstances, biyofilm matriksi) içerisinde organize olmuş, çok hücreli form benzeri davranış gösteren mikroorganizma topluluklarıdır [1,2]. Biyofilmlerin büyük bir çoğunluğunda mikroorganizmalar, toplam kuru ağırlığın yaklaşık % 10'unu, EPS ise % 90'ını oluşturmaktadır. EPS yapısında, esas olarak; ekzopolisakkaritler, hücre dışı yapısal ve fonksiyonel proteinler, hücre dışı DNA (eDNA), yüzey aktif maddeler ve lipitler gibi farklı biyopolimerler su fazında kümelenmiş halde bulunmaktadır. EPS öncelikle, biyofilmi oluşturan mikroorganizmaları immobilize ederek yakın ilişkide tutmak suretiyle hücre iletişiminin ve sinerjetik bir mikrokonsorsiyumun oluşumuna aracılık eder [3]. Diğer yandan yapısındaki polisakkaritler, proteinler, eDNA ve amfifilik moleküller sayesinde tutunmayı; polisakkaritler, proteinler ve eDNA sayesinde bakteriyel hücre agregasyonunu ya da nötral ve yüklü polisakkaritler, amiloitler, lektinler ve eDNA sayesinde biyofilmlerin birleşmesini sağlar. Ayrıca, EPS yapısındaki maddelerin biyofilm yapısındaki rollerini şu şekilde özetlemek mümkündür:

- 1) Hidrofilik polisakkaritler ve bazı olası proteinler: su birikimine
- 2)
- 3) Polisakkaritler ve proteinler: antimikrobiyal ajanlara, fagositoza, spesifik ya da spesifik olmayan konakçı immün savunma sistemine dirençliliğe
- 4) Yüklü, hidrofobik polisakkaritler ve proteinler organik bileşiklerin alınımına
- 5) Yüklü polisakkaritler ve proteinler: inorganik iyonların alınımına
- 6) eDNA: genetik aktarımın stimülasyonu suretiyle genetik çeşitlenmeye
- 7) Hümitik bileşikler ve proteinler: elektron verici ve alıcıları olarak enerjetik reaksiyonlara
- 8) Nükleik asitler, enzimler, lipopolisakkaritler ve fosfolipitler içeren membran vezikelleri: ve su kanalları ilkel bir boşaltım sisteminin oluşumuna yardımcı olmaktadır.

Bunlara ilave olarak EPS, hücre dışı enzimlerin bu yapıda kümelenmesini sağlamak suretiyle çok yönlü bir sindirim sistemi oluşumunu gerçekleştirir. Bu yolla EPS, bir yandan sulu faza alınan besin maddelerinin çözülmesini ve biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar için besin ve enerji kaynağı olarak kullanılmasını olanaklı hale getirirken, diğer yandan biyofilm içerisinde parçalanmış hücrelerin tüm elemanlarını tutarak geri dönüşüme sokar [4,5,6,7].

Biyofilmler; su sitemleri, gıda üretim yüzeyleri, konakçı organizma mukozal yüzeyleri, kayalar, buzullar, gıda ve gıda paketlenme yüzeyleri, deri geçişli tıbbi cihazlar, diş yüzeyleri gibi, doğadaki nerede ise tüm biyotik ve abiyotik yüzeylerde oluşabilmektedir. Yüksek kalıcılık ve yeniden kontaminasyon kaynağını teşkil ettiklerinden, hem tıbbi ve hem de endüstriyel açıdan ciddi sorunlara yol açmaktadırlar. Ayrıca mikrobiyal enerji, biyogübre üretimi ve çevresel arıtmada biyofilm formlarından yaygın bir şekilde yararlanılmaktadır. Günümüzde yapay kalp kapakçıkları, kataterler ve uterus içi tıbbi cihazlar başta olmak üzere deri geçişli tıbbi malzemeler yanında konakçı epitel hücreleri ve mukozal yüzeylerinde oluşan bakteriyel biyofilmlerin; kistikfibrozis, endokardit, periodondit, ostemiyelit, kronik yara enfeksiyonları ve rinosinüzit gibi birçok hastalığa yol açtığı belirlenmiştir [8]. Özellikle konakçı organizmalardaki savunma mekanizmaları ve enfekte edilen konakçı sitemlerdeki besinsel yetersizlik, yarışma ve oportünistik mikroorganizmaları patojenik faktörleri kazanmaya zorlayan evrimsel güçlere ilave olarak birçok fiziksel, kimyasal ve biyolojik stres koşulu mikroorganizmaların biyofilm yapıları halinde organize olmasını tetikleyen ana nedenlerdir. Günümüzde insanlarda yumuşak ve sert doku enfeksiyonlarının % 80'inin biyofilm yapılarından kaynaklandığı bilinmektedir [1,8]. Mukozal biyofilmler, konakçı sistemlerde kommensal ya da patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturulabilmektedir. Örneğin; kolonda kommensal mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmler, konakçı fonksiyonları üzerine etki etmeksizin ve bu nedenle herhangi bir konakçı immün yanıtı oluşturmaksızın, sadece biyofilmi oluşturan mikroorganizmaları bu koşullarda avantajlı hale getirir. Diğer organ ve dokulardaki biyofilmler ise yüksek düzeyde kalıcılığa sahip enfeksiyon ve enflamasyon etkenleridir. Planktonik formlarda olduğu gibi, biyofilm enfeksiyonları da konakçı doğal immün sistemi tarafından tanınmakta ve immün yanıtlar oluşturulmaktadır [9,10].

Günümüzde mikrobiyal üremenin predominant formu olarak tanımlanan biyofilmlerin planktonik formlardan çok farklı yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip olduğunun hiç bir kuşkuyla yer bırakmayacak şekilde tespiti, biyofilm enfeksiyonlarının ve konakçı-biyofilm etkileşimlerinin doğasının detaylı bir şekilde tanımlanma zorunluluğunu beraberinde getirmiştir. Zira yakın geçmişe kadar, mikrobiyal enfeksiyonların mekanizmasının ve konakçı patojen etkileşimlerinin tanımlanması yanında, enfeksiyonların kontrolü ve tedavisinde, patojenlerin planktonik formları esas alınarak yürütülen bilimsel çalışmalar temel hareket noktasını teşkil etmekteydi. Bu derlemede; biyofilm oluşumu ve patojenik bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin konakçı savunma sistemi ile etkileşimleri, güncel literatür bilgisi ışığında açıklanarak, konunun detaylı bir şekilde anlaşılabilirliğinin sağlanması ve bu doğrultuda yürütülecek çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

## 2. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm oluşumu tek hücreli organizmalara geçici olarak çok hücreli benzeri yaşam formu kazandıran bir süreçtir. Bu grup davranışı sayesinde mikroorganizmalar olumsuz çevre koşullarına karşı dirençli hale gelmektedir. Planktonik yaşam formundan biyofilm formuna geçiş; karmaşık metabolik regülasyon süreçlerinin gen ifadesini değiştirmesi suretiyle mikroorganizmaların üç boyutlu ve geçici reorganizasyonu olarak tanımlanmaktadır [11]. Bu hücresel yeniden programlanma; besin maddelerinin kullanımını, hücre yüzey moleküllerinin ve virülans faktörlerin ifadesini değiştirmek suretiyle mikroorganizmaları olumsuz çevre koşullarına karşı hazır duruma getirmektedir [12,13].

Hücresel agregasyon ile başlayarak biyofilm olgunlaşması ile sonuçlanan süreçte çok sayıda spesifik ve korunmuş faktör devreye girmekte ve bu süreç geri dönüşebilen ve geri dönüşümü olmayan aşamaları

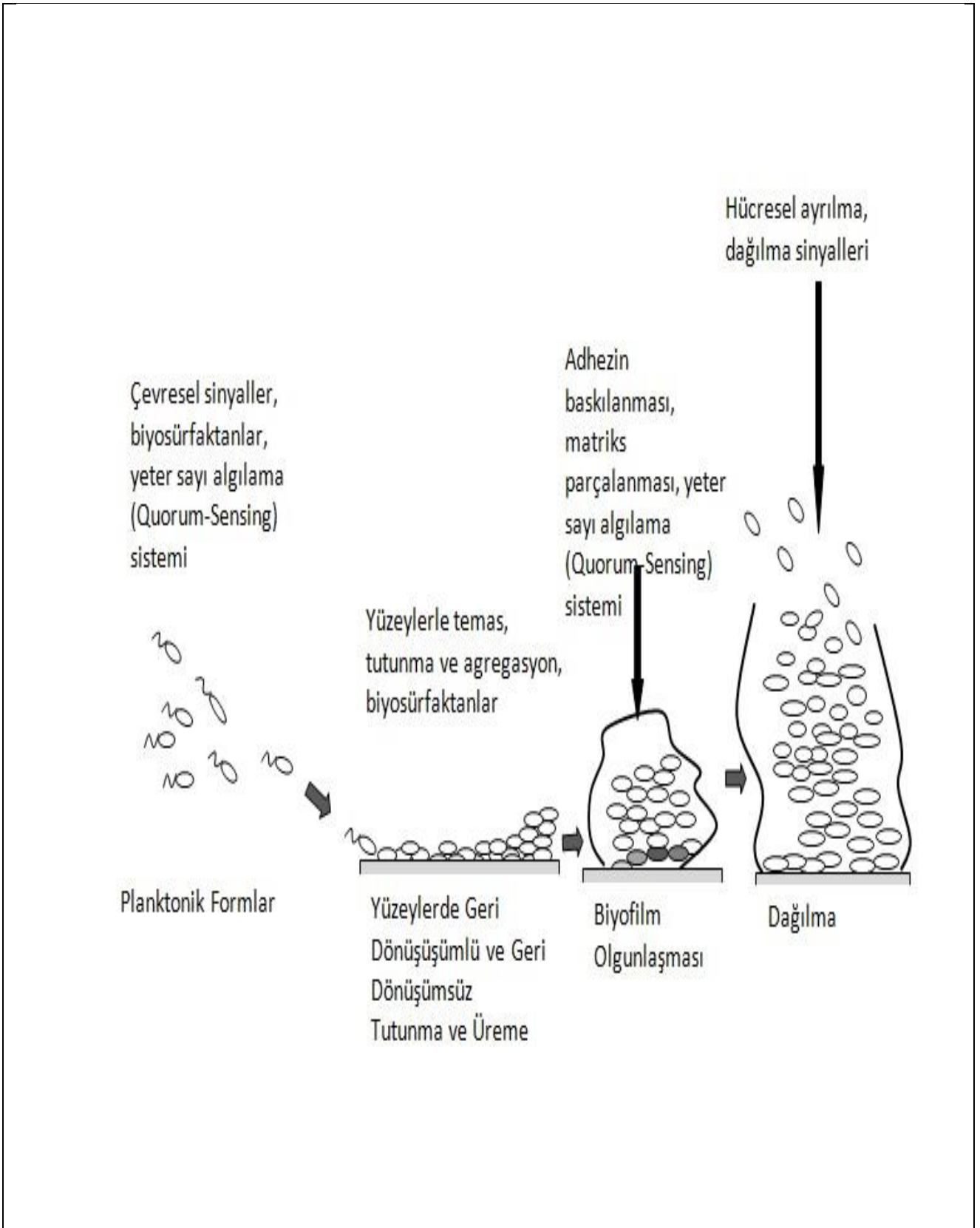
içermektedir. Biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan tutunma çoğunlukla rastgele bir aşamadır. Bu süreçte Brown hareketi, yerçekimsel ve hidrostatik güçler önemli ölçüde etkin rol oynamaktadır. Diğer yandan herhangi bir nişte bakteriler; sıcaklık, iyonik akış, pH ve besin maddesi düzeylerine bağlı olarak, çekici ve itici güçleri algılayabilmektedir. Ortam özellikleri, hücre yüzey kompozisyonuna bağlı olarak temas yüzeyine doğru ya da aksi yönde gerçekleşecek olan vektörel hareketi belirlemektedir [14]. Hareketli bakteriler bu aşamada yarışmacı bir avantaja sahiptir. Zira flagella hareketi sayesinde, hidrodinamik ve itici güçlerin olumsuz etkisinin üstesinden gelebilmektedirler. Flagella hareketi *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* ve *Escherichia coli* gibi bakterilerin biyofilm oluşturmada önemli bir rol oynamaktadır [15]. Bazı bakteri türlerinde kemotaksi de yüzeylere tutunmanın yönlendirilmesinde görev almaktadır. Örneğin; *P. aeruginosa*'nın *cher1* metil transferaz mutantlarında yüzeyde tutunmanın ve biyofilm olgunlaşmasının bozulduğu tespit edilmiştir. Bazı *E. coli* suşlarında kemotaksinin tutunmada önemli olmadığı öne sürülmesine rağmen, üropatojenik *E. coli* (UPEC) suşlarında bir kemotaksi proteini olan protein II (metil akseptör protein) bakımından mutant suşlarda (*tar*) biyofilm oluşumunun gerçekleşmediği saptanmıştır. Bu ilk tutunma aşaması ortamdaki besinsel değişim, hidrodinamik ve itici güçler gibi etkilerle geri dönüşebilir olan dinamik bir süreçtir [16].

Yüzey ile temas gerçekleştiğinde; hücre dışına salgılanan polisakaritler, nükleik asitler, proteinler, amiloitler, hücre dışı adhezif uzantılar ve adheziner gibi ilave elemanlar aracılığı ile tutunmanın "geri dönüşsüz" yapışma aşaması gerçekleştirilmektedir [17]. UPEC ve diğer *E. coli* patotipleri bu süreçte, çok üniteli adhezif organeller olan tip 1 pili'yi kullanmaktadır. Şaperon-kılavuz (chaperone-usher, CU) izyolu ile (CUP) sentezi tamamlanan bu organeller, mikroorganizmalara niş spesifik tutunma özgülüğünü kazandırmaktadır. Şaperon-kılavuz izyolunun (CUP) temel elemanları; pilus alt engelleyen ve proteinlerin doğru katlanmasını sağlayan bir şaperon (PapD), dış membranda por oluşumunu gerçekleştirerek, şaperonu ve pilin proteini alt ünitelerini bu organelin sentez bölgelerine taşıyan bir kılavuz protein (usher) ve pilin proteini alt ünitelerinden oluşmaktadır [18]. Tip 1 fimbriyanın FimH adhezini, mannozlanmış bölgeleri tanımakta olup, insan mesane epitel hücrelerine tutunma ve işgal için insan üroplakinini kullanmakta ve bu yolla UPEC patojenezinde kritik bir rol oynamaktadır [19]. Bunlara ilave olarak Tip 1 pililerin kıvrımlı ve antijen 43 fibrilleri, bakterilerin abiyotik yüzeylere tutunmasında da etkinlik göstermektedir. Kıvrımlı fimbriyanın, ayrıca; laminin, fibronektin ve plazminojen gibi ökaryotik hücre dışı matriks proteinlerine tutunmayı sağladığı da belirlenmiştir [20]. Önemli bir biyofilm üreticisi ve patojen olan *P. aeruginosa*'da yüzeye geri dönüşsüz tutunmada rol oynayan değişik tutunma organelleri tanımlanmıştır. Bunların en önemlileri tip IV ve UPEC benzeri CupA fimbriyalardır [12]. *Pseudomonas* ve UPEC'den farklı olarak, Gram-pozitif enterokoklar hareketsiz olup tutunma elemanı olarak pilus içermezler. Enterokoklarda ökaryotik hücre dışı matriks elemanlarına tutunmada rol oynayan SagaA, Acm (*Enterococcus faecium*) ve Ace (*E. faecalis*) gibi kollajen tutunma proteinleri tanımlanmıştır. Yine bu cins üyelerinde tespit edilen Esp proteininin, *E. faecalis* suşlarının abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda rol oynadığı saptanmıştır. Diğer yandan son çalışmalarda *E. faecalis*'de tespit edilen enterokokkal biyofilm pilisinin (Ebp), biyofilm oluşumu yanında endokardit ve üriner sistem enfeksiyonlarında önem taşıdığı belirlenmiştir [21,22,23,24].

Mikroorganizma ile yüzey teması, gen ifadesini değiştiren yanıtları teşvik ederek, sesil (bağlı, biyofilm) formların oluşumu ve olgunlaşması için gerekli gen ifadesini tetiklemektedir. Bu genetik regülasyonda ilk aşama, hücre dışı polimerik matriks materyalinin (EPS) oluşumunu ve dolayısı ile biyofilmin olgunlaşmasını sağlayan genlerin ifadesidir. EPS'nin ilk aşamada üretilen en önemli elemanları; ilk kez kommensal *E. coli* pelikül biyofilmlerinde, UPEC ve gastrointestinal *E. coli* biyofilmlerinde belirlenen selüloz, pelikül biyofilm oluşumunda kritik bir rol oynayan kıvrımlı ve amiloit fibriller yanında, poliglukozamin (PGA) ve kolonik asittir [25]. EPS, *P. aeruginosa* suşlarında yoğun bir şekilde çalışılmış ve bu suşların çevresel koşullara bağlı olarak iki temel EPS elemanı (Pel ve Psl) sentezledikleri belirlenmiştir. Psl, *Pseudomonas* suşlarının solunum yolu epitel hücrelerine ve musine tutunmasını sağlar. Diğer yandan kistik fibrozis hastalığında ve solunum yollarında kalıcılıkta *pel* geninin ifade artışının önemli olduğu da tespit edilmiştir. Ayrıca 3,5-çevrimsel diguanilik asidin (c-di-GMP) yüksek düzeylerine yanıt olarak, biyofilm yapısında büyük bir salgı adhezini olan CdrA'nın ifade edildiği bilinmektedir. CdrA biyofilm yapılarını stabilize etmektedir. [26]. *P. aeruginosa* EPS yapısında bulunan bir diğer yapısal bileşen olan aljinatın ise, antibiyotiklere ve kronik enfeksiyonlarda konakçı immün savunma mekanizmalarına karşı dirençlilik rolü oynadığı saptanmıştır. Pel ve Psl'de olduğu gibi aljinat üretimi de, artan c-di-GMP düzeyi ile tetiklenmektedir. Zira yüzey bağlı bir protein olan diguanilat siklazın (MucR) aljinat sentezinin pozitif regülatörü olduğutespit edilmiştir. *Pseudomonas* biyofilmlerinin ilişkilenmesi ve stabilizasyonunda hücre dışıDNA'nın da önemli bir rol oynadığı deneysel olarak örneklenmiştir. Bu durum özellikle mantar benzeri biyofilmlerde yoğun bir şekilde çalışılmıştır [27]. eDNA'nın biyofilm yapısında oynadığı rol; *E. faecalis* GeLE (çinko metalloproteaz) ve SprE (serin proteaz) enzimlerinin hücresele otolizi indükleyerek biyofilm yapısına eDNA'nın salınımını sağladığının belirlenmesi suretiyle tespit edilmiştir. Ayrıca Atn otolizininin üretimini engellenmesi halinde bu bakterilerde biyofilm oluşumunun, eDNA salınımının azalması yolu ile, % 30 oranında düştüğü saptanmıştır [21]. Çevresel stres faktörlerine bağlı olarak, biyofilm içerisindeki hücreler, çok hücreli yaşam formlarındaki gibi, farklılaşma gösterirler. Bu farklılaşmayı biyofilm içerisinde farklı bölgelerde oluşan besin maddeleri, oksijen,

antimikrobiyal maddeler ve elektron akseptörleri gibi çevresel koşulların yarattığı gradiyent tetiklemektedir. Bu sayede biyofilm içerisinde farklı fizyolojik koşullara sahip olan mikrokolonilerde farklı gen ifadesi meydana gelmekte ve fonksiyonel farklılaşma gerçekleşmektedir. Söz konusu farklılaşma üzerine etkili diğer bir önemli sistem ise bakteriyel popülasyonun ürettiği otoindüksiyon özelliğindeki hücre dışı sinyallerdir. Bu sinyaller sinyal transdüksiyonunu tetiklemekte (Quorum-sensing -yeter sayı algılama- sistemi) ve biyofilm içerisinde çok hücreli yanıtlar oluşturulmaktadır [28,29]. Biyofilm olgunlaşmasından sonraki aşama, biyofilm yapısından kaçış ya da dağılma olarak nitelendirilen son aşamadır. Dağılma ortam etkileri ile pasif bir şekilde meydana gelebilen ancak esasen biyofilmi oluşturan hücrelerin yönettiği aktif bir süreçtir. Bu aktif süreçte bakteriler, çevresel değişimleri algılayarak, biyofilm formu ile planktonik form arasında bir tercih yapmakta ve avantajlı formu seçmektedir. Biyofilm dağılımı ortamın besinsel değişimine, oksijen miktarına, toksik ürünlerin birikimine ve diğer stres faktörlerine bağlı olarak teşvik edilmektedir [30,31]. UPEC suşlarında hücre dışı demir, *P. aeruginosa* suşlarında ise karbon ve azot kaynaklarının ortamdaki artışı, biyofilm dağılımını tetikleyen ana faktörlerdir. Bakterilerde birçok sensör sistemler, çevredeki küçük moleküllerin düzeyini ölçmekte ve bu sinyaller aracılığı ile biyofilm dağılması için zorunlu gen ifadesini pozitif yönde etkilemektedir [32]. Diğer sinyaller de rol almakla birlikte, evrensel c-di-GMP'nin biyofilm formundan planktonik forma geçişte anahtar rol oynadığı belirlenmiştir. *P. aeruginosa* ve *E. coli* suşlarında c-di-GMP seviyesi arttıkça tercih edilen yaşam formunun, biyofilm formu olduğu saptanmıştır. Aksi durumda ise biyofilm formunun dağılması indüklenmektedir. c-di-GMP bağlanma proteini olan BdcA, biyofilm komünitelerinde c-di-GMP seviyesini düşürmek suretiyle biyofilmin dağılmasını tetiklemektedir. Bu durum *Pseudomonas* spp. ve *Rhizobium melliotti*'de örneklenmiştir [33-35].

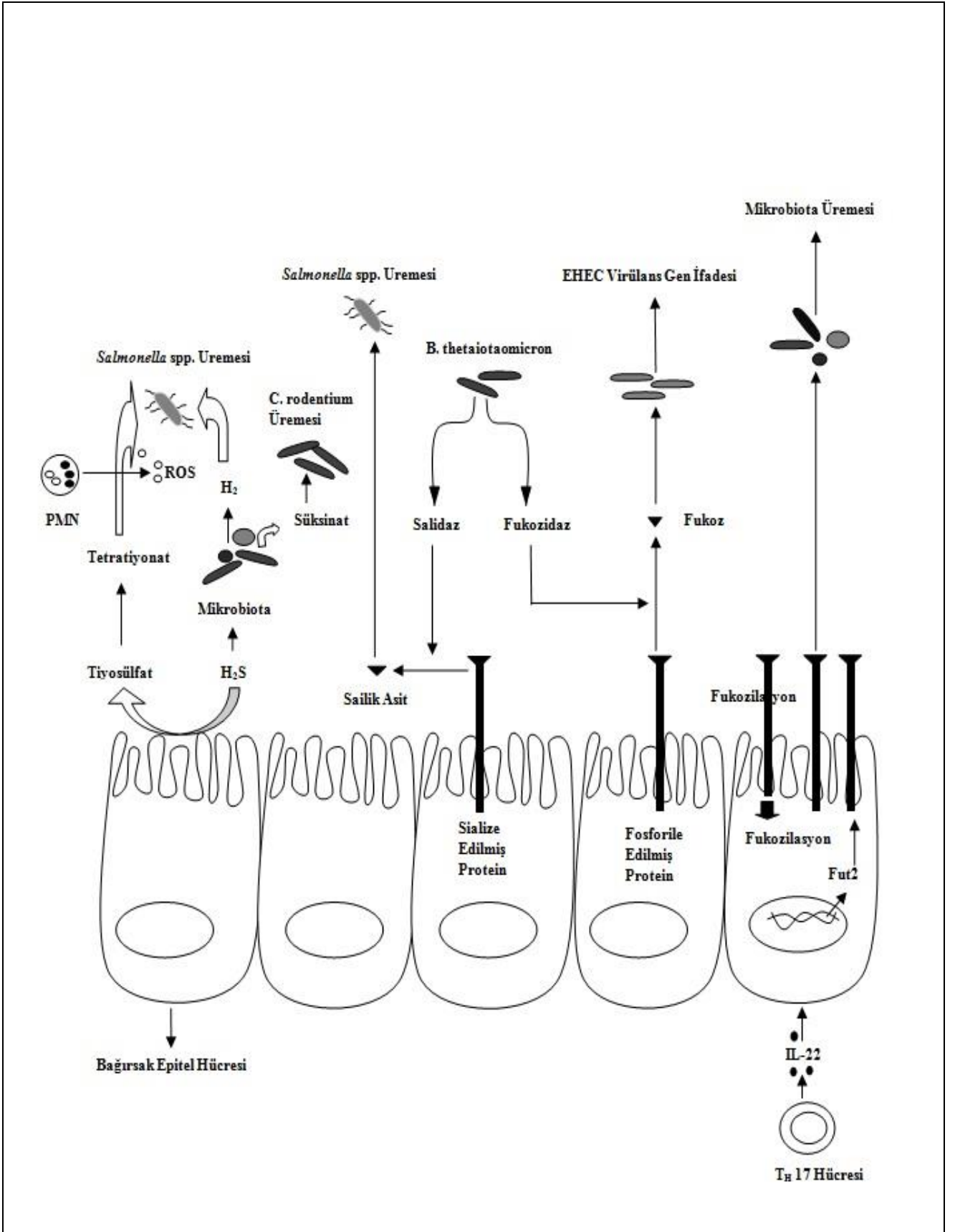
*P. aeruginosa*'da aljinat liyaz gibi EPS parçalayan enzimler de bakterilerin matriksten ayrılmasını sağlamaktadır. *E. coli* 'de CsrA proteininin PGA sentezini bozduğu ve biyofilmin dağılmasını teşvik ettiği saptanmıştır [36]. Buna ilave olarak *P. aeruginosa* biyofilmlerinde flagellalı formların mikrokoloniler oluşturarak biyofilm yapısından ayrıldığı belirlenmesi, flagella üretiminin hareketli bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin dağılmasında önem taşıdığına işaret etmektedir [8,37]. Biyofilm yapısındaki hücresel eksilme, hücre ölümü ile de gerçekleşmektedir. *Bacillus subtilis* model organizma olarak kullanılmak suretiyle, üremenin durma fazında üretilen ve peptidoglikan yan zincirlerinde yer alan D-alanin, D-lösin, D-metionin, D-tirozin ve D-triptofan gibi D-amino asitlerin biyofilmin dağılımını teşvik ettiği saptanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda, bu amino asitlerin dışarıdan ilavesinin *B. subtilis* biyofilmlerinde de aynı etkiyi yarattığı belirlenmiştir. Devam eden çalışmalarda D-amino asit/norspermidin karışımlarının bu bakterilerin biyofilmlerinin dağılımında yüksek bir etkinliğe sahip olduğu tanımlanmış ve bu karışımların antibiyofilm ajanları olarak kullanılabilme potansiyeli olduğuna dikkat çekilmiştir [38-40] (Şekil 1).



**Şekil 1.** Biyofilm oluşum aşamaları üzerinde etkili faktörler [41]

### 3. Konakçı Savunma Sistemleri ve Patojenlerle Etkileşimleri

Mikroorganizmaların konakçı sistem ile ilk karşılaşma yeri olan iç ve dış epitel yüzeyleri, dış ortama karşı fiziksel bariyer oluşturarak enfeksiyonlara karşı savunmanın ilk basamağını teşkil eder. İkinci aşama; musin ve antimikrobiyal proteinlerden meydana gelen karmaşık bir ağ oluşturarak, birçok epitel yüzeyini kaplayan ve bu yolla mikroorganizmaların epitel hücrelere ulaşmasını engelleyen mukoz yapıdır. Konakçı savunma sisteminde üçüncü aşama, immün sistem hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Bu üç aşamalı savunma sistemi birlikte mukozal bariyeri oluşturarak, örneğin; insan bağırsak sisteminde bulunan trilyonlarca kommensal mikroorganizmanın sistemik bölgelere ulaşmasını engeller. Daha önemlisi immün sistem, patobiyont'lar olarak tanımlanan oportünistik ya da primer patojen mikroorganizmalara karşı da engel oluşturmaktadır. Bununla beraber birçok patojen, konakçı savunma sistemlerinden kaçma yönünde evrimleşmiştir [10]. Konakçı sistemlerde biyofilmlerin oluşumunun belirleyici ilk aşaması, söz konusu biyofilmleri oluşturacak enfeksiyon ajanlarının (patojenlerin) dahil olduğu konakçı sistemlerdeki mikrobiota ile etkileşimleridir. Patojenlerle enfeksiyon, klasik olarak mikroorganizmalar ile immün sistem arasındaki savaş olarak kabul edilmektedir. İmmün sistem patojenlerin konakçı sistemlerde kolonize olmasının ve hastalığa yol açmasının engellenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Gerçekte patojenler, epitel hücreleri veya immün sistem hücrelerinden önce, sistemde var olan mikroflora ile karşılaşılırlar. Bu kommensal mikroorganizmalar, gastrointestinal sistem örneğinde olduğu gibi, sistemdeki farklı nişleri işgal etmiş durumdadırlar ve eksojen mikroorganizmaların bu bölgeleri işgal etmelerine direnç gösterirler. Bu olaya "kolonizasyon direnci" adı verilmektedir. Ancak bazı kommensal mikroorganizmaların patojenlerin kolonizasyonuna önemli katkılarda bulunduğu da belirlenmiştir. Söz konusu biyofilmleri oluşturacak enfeksiyon ajanlarının (patojenlerin) dahil olduğu konakçı sistemlerdeki mikrobiota ile etkileşimleri sonucunda ortaya çıkmaktadır. Patojenlerle enfeksiyon, klasik olarak mikroorganizmalar ile immün sistem arasındaki savaş olarak kabul edilmektedir. İmmün sistem patojenlerin konakçı sistemlerde kolonize olmasının ve hastalığa yol açmasının engellenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Son altı yılda yürütülen çalışmalarda, mikrobiyota'nın patojenlere elektron akseptörlerini, inorganik besinleri ve şekerleri sağlayarak regülatör görevi gördüğünü ve bu yolla virülanslığı teşvik ettiğini kanıtlamıştır. Örneğin; *Salmonella* spp. anaerobik solunum yapar ve elektron akseptörü tetrasyonattır. Tetrasyonat gastrointestinal sistem mikrobiyotasının ürettiği hidrojen sülfid ve nötröfillerde üretilen reaktif oksijen türlerinin bir seri oksidasyon reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır. *Salmonella* spp.'nin buna ilave olarak, mikrobiyota'nın şeker fermentasyonunun son ürünü olan moleküler hidrojeni (H<sub>2</sub>), organik enerji kaynaklarının azaldığı ya da tükendiği durumlarda, enerji kaynağı olarak kullanabildiği de belirlenmiştir [40,42,43,44,45]. *Salmonella* spp. sialik asidi enerjice zengin karbon kaynağı olarak kullanmak suretiyle gastrointestinal sistemde çoğalabilme avantajını kazanmaktadır. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) ise başka bir mekanizma kullanarak *B. thetaiotaomicron* aktivitesinden yararlanmaktadır. EHEC suşları, *B. thetaiotaomicron* tarafından üretilen fukozidaz enzimi aktivitesi sonucu, konakçı glikanlarından sağlanan fukozlara duyarlıdır. Bu yolla oluşan fukozlar EHEC suşlarında, konakçı sistemde kolonizasyonu sağlayan virülans genlerin ifadesini indükleyerek, bu patojenlere kolaylık sağlar [44]. Benzer şekilde *Clostridium difficile* ve *Citrobacter rodentium* mikrobiota'nın ürettiği süksinatı metabolize ederek bağırsak sisteminde çoğalabilmektedir. Bu bileşik ayrıca *C. difficile*'nin virülans genlerinin pozitif regülasyonunda rol almaktadır [45]. Mikrobiyota'nın yararlı bileşikler oluşturmak suretiyle dolaylı bir şekilde patojenleri desteklemesi, konakçı sistemin patojen yanıtları oluşturması sürecinde de gerçekleşmektedir. Örneğin; patojenlerdeki Toll-benzeri resertör (TLR) ligantları, ince bağırsak epitel hücrelerinde interlökin-22 (IL-22) bağımlı fukozilasyonu teşvik etmektedir. Bu hücreler ince bağırsak lümenine geçtiğinde fukoz serbest kalarak mikrobiota tarafından metabolize edilir. Fukoz salınımı yukarıda ifade edildiği şekilde bazı patojenler için elverişli koşullar yaratırken, örneğin; *C. rodentium*'da virülans genlerin ifadesini baskılamaktadır, konakçı organizmanın söz konusu patojene karşı toleransını da artırabilir [46] (Şekil 2).



**Şekil 2.** Gastrointestinal sistemde patojen-mikrobiota etkileşimleri. (PMN: Polimorfonuklear nötrofiller; ROS: Reaktif oksijen türleri; EHEC; Enterohemorajik *E. coli*) [10]

Homeostaz'ın korunması ve kommensal bakterilerin patojenlerden ayrılması için, kommensal bakteriler ile konakçı hücreler arasındaki etkileşimler sıkı bir şekilde regüle edilmektedir. Kommensal bakterilerin TLR esaslı tanınması, konakçı ile mikrobiota arasındaki simbiyozun temelini teşkil etmektedir. Kommensal bir bakteri olan *Bacteroides fragilis*'in hücre yüzeyinde yer alan ve kapsüler bir polisakkarit olan polisakkarit A'nın (PSA) TLR2 tarafından tanınması bu etkileşimin tipik bir örneğidir. PSA tarafından tetiklenen TLR2,regülatör T hücrelerinin indüksiyonunu sağlar ve bu hücreler de anti enflamatuvar sitokin IL-10 üretirler. Ayrıca, *B. thetaiotaomicron* gibi kommensal bakteriler çekirdek faktörünün (NF- $\kappa$ B) aktivitesini ayarlayarak gastrointestinal sistemde proenflamatuvar sitokin ifadesini baskılamaktadır. Diğer yandan mikrobiota'nın doğal immün sistemi uyararak, immünoglobulin A (Ig A) üretimini teşvik ederek ya da T hücrelerinin farklılaşmasını indükleyerek patojen kolonizasyonu ve üremesini baskıladığı bilinmektedir. Tüm bunların yanında kommensal bakterilerin, immün sistem hücrelerini uyararak antimikrobiyal lektinlerin ve defensinlerin üretimini de teşvik ettiği saptanmıştır. Bu durum da patojenlere karşı erken aşamada oluşturulan savunmada önemli bir avantaj sağlamaktadır [10] (Şekil 2). Bakteriyel lokalize enfeksiyonlara karşı konakçı immün sisteminde ilk aşama savunma polimorfonükleer nötrofiller (PMN) ve diğer fagositik hücreler tarafından sağlanmaktadır. Sitokinler gibi çok sayıda çekici faktöre sahip nötrofiller, kan dolaşımı yolu ile enfeksiyon bölgesine ulaşmaktadır. Bakteriler tarafından üretilen bazı moleküller de nötrofiller için kimyasal çekiciler (kemoatraktant) olabilmektedir. Bunun en tipik örneklerini; f-Met-Leu-Phe tripeptidi ve önemli bir biyofilm bakterisi olan *P. aeruginosa* tarafından üretilen ve yeter sayı algılama sistemi (quorum-sensing) elemanı olan N-(3-oksidodekanoil) homoserin lakton teşkil etmektedir [46,47,48]. PMN'ler enfeksiyon bölgesine ulaştığında, bakterileri fagosite etmekte ve fagosite edilen bakteriler, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi (Şekil 2) yanında hücre içinde ve dışında etki gösteren başka sitotoksik ve bakterisidal bileşikler aracılığı ile öldürülmektedir. Örneğin; laktoferrin antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri ile bu bileşikler arasında özel bir yer tutmaktadır. Ayrıca lokal savunma sisteminin diğer silahları olan defensinler,katolisidinler ve trombosidinler de kısmen nötrofillerin içerisinde yer alabilmektedir. Bunların arasında katelisidin LL-37'nin önemli sayılabilecek bir antibiyofilm aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir [10,48] (Şekil 2).

#### 4. Polimorfonükleer Nötrofillerin (PMN) Planktonik Formlar ve Biyofilm Formları İle Etkileşimleri

PMN'ler spesifik olmayan, doğal efektör hücreler olarak kabul edilmektedir. Zira bu hücrelerde antijen spesifik tanıma mekanizması benzeri bir tanıma mekanizması bulunmamakta ve bu nedenle de söz konusu hücreler hafıza yanıtları üretmemektedirler. PMN'ler bunun yerine, birçok bakteri türünde ortak olan ve evrimsel süreçte korunmuş yüzey moleküllerine duyarlıdır. Bu evrimsel süreçte korunmuş yapıları birçok reseptör tanıdığından dolayı, söz konusu yapılar patojen ilişkili moleküler elemanlar (PAMP) ya da mikroorganizma ilişkili moleküler elemanlar (MAMP) olarak adlandırılmıştır. Bu konakçı reseptörleri arasında en önemlileri tüm immün yanıt oluşturma yeteneğindeki hücrelerde bulunan Toll-benzeri reseptörlerdir (TLR). İnsanda bu reseptör ailesi 9 adet olup, hedef yapılarının; lipopolisakkaritler, lipotaykon asidi, peptidoglikan ve flagellin gibi temel elemanlardan meydana geldiği belirlenmiştir. Lipopolisakkaritler ve parçalanmış bakteri kalıntılarını tanıyan ve bu nedenle atık reseptörleri olarak adlandırılan CD14 reseptörleri, immün sistem hücrelerinde bulunan diğer önemli reseptörlerdir. TLR-9 biyofilm yapısının önemli bir elemanı olan hücre dışı DNA'yı (eDNA) özgül bir şekilde tanınmasına rağmen, PMN'lerin ayrıca TLR-9'dan bağımsız bir şekilde de eDNA'yı tanıyabildiği belirlenmiştir [8,49,50].

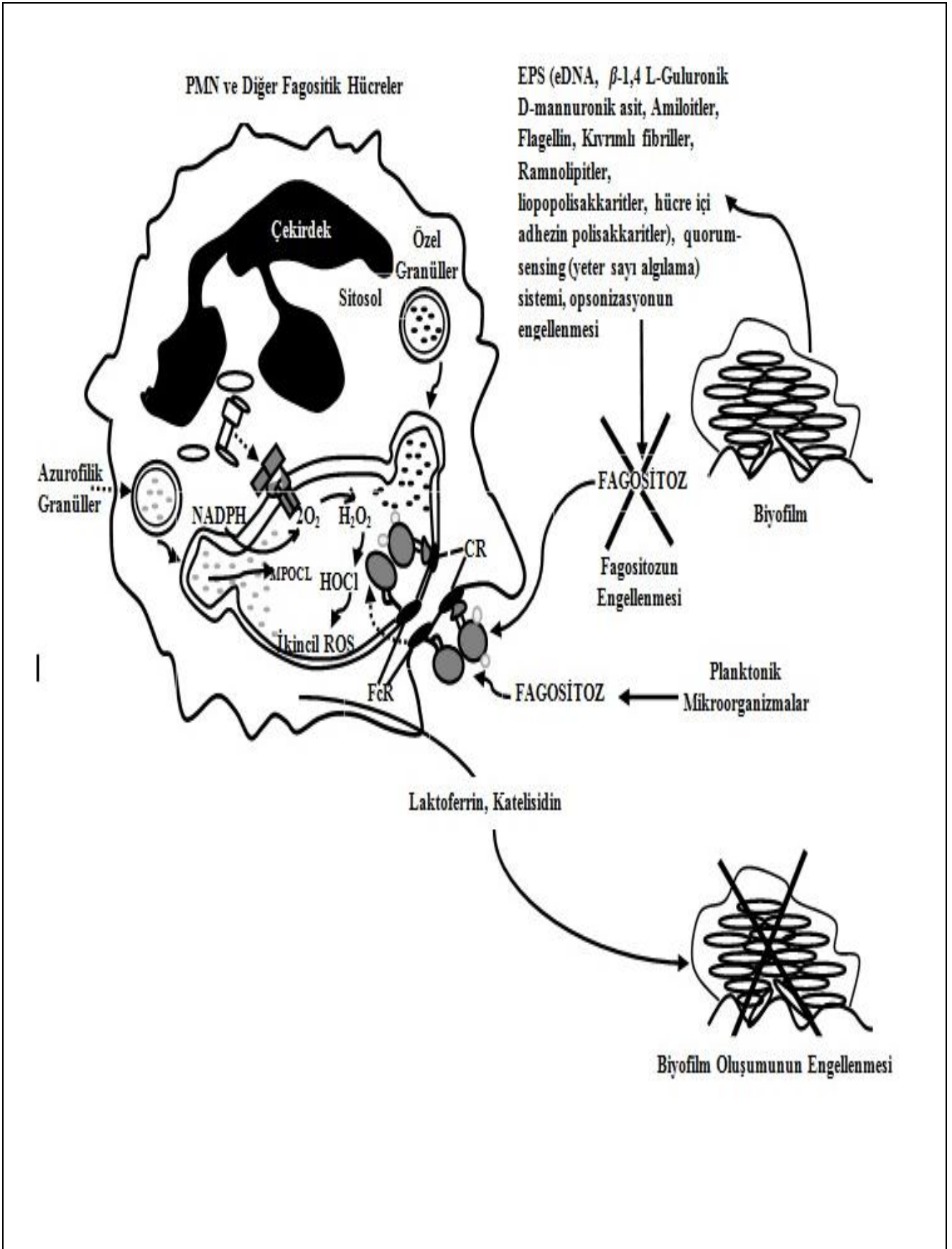
Özetle PMN'ler ve diğer fagositik hücreler çok sayıda reseptör ifade ederek ya da diğer reseptörlerden yararlanarak uygun konakçı yanıtının oluşmasına katkıda bulunurlar. Bakterilerin konakçı sistemden temizlenmesi, etkin fagositoz ve öldürme, opsonizasyona bağlıdır. Bakterilerin fagositoza duyarlı hale getirilmesi anlamına gelen opsonizasyonda C3b/C3bi komplementinin, immünoglobulin G reseptörlerinin (CD16, CD32 ve CD64) ve komplement reseptörlerinin (CR1 ve CR3) rol oynadığı saptanmıştır [51]. Özellikle *P. aeruginosa* biyofilmleri ile yürütülen çalışmalar sonucu, EPS elemanlarının fagositozu inhibe ettiği belirlenmiştir. *P. aeruginosa* biyofilmlerinin EPS matriksinin bileşenlerinden biri olan aljinatın ( $\beta$ -1,4 L-Guluronik D-mannuronik asit) PMN'lerin yönlendirilmiş hareketini ve fagositik etkinliğini inhibe ettiği in-vitro deneyler sonucunda saptanmıştır. Bu durum kistik fibrozis hastalarında yürütülen çalışmalarla doğrulanmıştır [50,51,52]. Başlangıçta akciğerlerde mukoit olmayan suşların kolonizasyonu oluşmakta, hastalık geliştiğinde, aljinat üretilerek biyofilm yapısının oluşumuna yol açan mukoit suşlar meydana gelmekte ve hastalığın seyri ağırlaşmaktadır. *P. aeruginosa*'da biyofilm oluşumuna bağlı olarak ramnolipitlerin üretildiği bilinmektedir. Bu sentez, yeter sayı algılama (quorum-sensing) sistemi molekülleri tarafından kontrol edilmektedir [52].

Ramnolipitler özellikle su kanalları başta olmak üzere biyofilm yapılarının stabilizasyonunda önem taşımaktadır. Ramnolipitler düşük konsantrasyonda iken makrofaj ve nötrofilleri aktive ederken, konsantrasyonları yükseldiğinde, bu hücrelerin litik ve nekrotik ölümüne yol açmaktadır. Lize olan nötrofillerden salınan proteolitik enzimler de konakçıda doku hasarına yol açmaktadır. Nötrofil saldırısına karşı *P. aeruginosa*'da ramnolipit üretiminin teşvik edildiğinin belirlenmesi, biyofilm yapılarının immün yanıtlara



paralel olarak da üretildiğinin en güçlü kanıtıdır. Henüz immün yanıtlara bağlı biyofilm teşviki çok iyi anlaşılmamış olmasına rağmen, enfilre nötröfillerden sızan sitokinlerin (tümör nekrozis faktör  $\alpha$ , interlökin 1 ve 6) bakteriler tarafından tanınmasının ve bu yolla bakteri üremesini indüklemesinin de olası olduğu öne sürülmektedir [9,53,54,55]. Genel kuralın aksine, *Staphylococcus* (*S. epidermidis* ve *S. aureus*) biyofilmlerinde nötrofil ve makrofaj fagositozundan, kalıtsal korunma söz konusu değildir. *S. Aureus* biyofilmlerinin fagositozu için antibadi- komplement opsonizasyonuna gerek yoktur. Ancak fagositler IgG tarafından sağlanan sinyallere ihtiyaç duymaktadırlar. Bununla birlikte *S. epidermidis* biyofilmleri için komplement bağlanması engellenmesi, biyofilm yapılarını fagositozdan korumaktadır. Bazı *Staphylococcus* biyofilimlerinde bu özellikleri taşıyan salgı molekülleri tanımlanmıştır. Özellikle katater enfeksiyonlarına yol açan *Staphylococcus* biyofilm yapılarında tanımlanan hücre içi bir polisakkarit adhezinin (PIA) biyofilm oluşumunu teşvik ettiği ve konakçı immün sistem yanıtlarından koruduğu saptanmıştır. Fagositlerin içerisine alınan biyofilm yapılarının parçalanmasında (biyofilm matriks yapısının bozulması) en önemli sitotoksik bileşiklerin reaktif oksijen türleri (ROS) olduğu belirlenmiştir [23,56,57].

Konakçı savunma sistemleri ile biyofilm yapılarının interaksiyonlarında bir diğer önemli nokta, biyofilmi oluşturan bakterilerdeki quorum-sensing (yeter sayı algılama) regülasyon sistemleridir. Bu regülatör sistemler biyofilm oluşumunu ve virülans faktörlerin sentezlenmesini teşvik etmeleri yanında, konakçı savunma sistemlerinden korunmada da rol oynamaktadır. Özellikle fenolde çözülebilen bir modülün olan peptid sinyal molekülünün (agr-quorum-sensing sistemi) üretilmediği *S. epidermidis* ve *S. aureus* mutantlarında fagositlerin kemotaksisinin yönlendirilemediği ve söz konusu mutantların oluşturduğu biyofilmlerin hücre içi sitotoksik etkilere karşı çok daha duyarlı bir hale geldiği saptanmıştır (Şekil3) [9,17,58].



**Şekil 3.** Polimorfonükleer nötrofiller (PMN) ve diğer fagositik hücreler ile biyofilm yapılarının etkileşimi (CR: komplement reseptörü, FcR: antibadi reseptörü, EPS: hücre dışı polimerik madde)

## 5. Biyofilmlere Karşı Başarısız İmmün Yanıtın Konakçıda Yarattığı Sorunlar

Özellikle kistik fibrozis ve impant ilişkili ostemiyelit'te tanımlandığı üzere, nötrofillerin ve diğer immünokompetan hücrelerin infiltrasyonu biyofilm enfeksiyonunun temel göstergesidir. Diğer göstergeler ise enfeksiyonun inatçı oluşu ve implant ilişkili ostemiyolit'de tanımlanan kemik parçalanması gibi yıkıcı enflamatuvar süreçlerdir. Ayrıca bakterileri öldürme akiviteri başarısız olan lökositlerin infiltrasyonu, parçalanma ile sonuçlanmakta ve açığa çıkan bakterisidal ve sitotoksik bileşikler konakçıda doku hasarına, dolayısı ile daha fazla lökosit çeken proenflamatuvar çevrenin oluşmasına ve sonuçta da enflamasyonun gelişmesine yol açmaktadır. Bu durum "amacına ulaşmayan fagositoz" ya da "başarısız deneme" olarak adlandırılmaktadır. Enflamasyon nekrotik ve lize lökositlerin enflamasyon bölgesinden temizlenememesi nedeniyle de tetiklenmektedir. Diğer yandan, bakterisidal etkilerinden kaynaklanan nötrofil klerensi için zaman ve uzamda limitli bir enflamasyon sürecinin oluşması ön koşuldur. Aksi taktirde nötrofil klerensi gerçekleşmemekte ve enflamasyon tetiklenmektedir. Nötrofil klerensi ancak fagositoz sonrasında apoptotik hale geçen hücrelerin, içerikleri ortama saçılmadan, makrofajlar tarafından tanınması ve alımı ile gerçekleşir. Ancak biyofilm enfeksiyonlarında nötrofiller enflamatuvar yanıtı daha da şiddetlendirerek, biyofilm oluşumunu teşvik etmektedirler [8,55,59,60].Konakçı yanıtını etkinliği sıkı bir şekilde zamanlamaya bağlıdır. Eğer doğru zamanda ve yeterli yanıt oluşturulur ise etkin bir antibiyofilm başarısı elde etmek mümkün olmaktadır. Biyofilm enfeksiyonlarında, iyon şelatlama sağlanabilir.Örneğin; laktoferrin nötrofillerde oluşturulur ve orada depolanır. Ancak birçok hücre dışı salgıda da laktoferrin bulunduğu belirlenmiştir. Laktoferrinin biyofilm oluşumunu engelleme etkisi hücre dışı laktoferrin konsantrasyonunun doğru zamanda artışına bağlıdır. Bir proteaz olan katepsin B ile laktoferrinin kesiminin, söz konusu proteinin antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesini kaybetmesine yol açtığı belirlenmiştir. Katepsin B salınımı ise elastaz aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Laktoferrinin antibiyofilm aktivitesi; elastazın yoğun olarak bulunduğu hatalı immün yanıt koşullarında, yani lize ya da nekrotik nötrofillerin yoğun olarak bulunduğu durumlarda, ortadan kalkmaktadır [24,61]. İnsan katyonik antimikrobiyal proteini olan katelisinidin (*LL-37*) esas olarak epitel hücreleri ve nörofiller tarafından üretilmekte ve vücut sıvılarında da bulunmaktadır. Anjiyogenez, kemotaksi ve kemokin sentezinde rol oynadığı belirlenen bu protein bir enfeksiyon yanıtı olarak üretilmektedir. Söz konusu proteinin antibiyofilm aktivitesinin; quorum-sensing sisteminin baskılanması, bakteriyel hareketliliğin teşvik edilmesi ve bakterilerin yüzey temasının engellenmesi suretiyle ortaya çıktığı belirlenmiştir. Başarısız immün yanıt koşullarında meydana gelen nötrofil parçalanması, nekrozu ve doku hasarı, katelisinidin üretimini de önemli ölçüde düşürdüğünden, biyofilm oluşumu için avantajlı koşullar meydana gelmektedir [8,62,63].

## 6. Sonuç

Biyofilm oluşumunun konakçı savunma sistemleri ve kullanılan kemoterapötikler yanında, gıda başta olmak üzere farklı endüstriyel üretim süreçlerinde kullanılan abiyotik yüzeylerden dezenfektanlar aracılığı ile etkin bir şekilde gideriminin mümkün olmaması, söz konusu yapıların oluşumunun biyokimyasal, genetik ve fizyolojik esasının tam anlamı ile aydınlatılamamasından kaynaklanmaktadır. Biyofilm yapısında yer alan mikroorganizmaları, yüzey agregasyonunda, yüzeyler ve besin maddeleri için var olan mikrobiota ile yarışmasında, konakçı savunma sistemlerine karşı etkin yanıtlar oluşturmasında ve yayılmasında hangi genetik regülasyon mekanizmalarının ve bunların teşvik ettiği moleküllerin rol oynadığının belirlenmesi, etkin biyofilm önleme ve eradikasyon stratejilerinin geliştirilmesini beraberinde getirecektir. Bu ancak patojenlerin planktonik formları ile biyofilm formlarının karşılaştırmalı sistem biyolojisi çalışmaları kullanılarak detaylı bir şekilde incelenmesi sonucunda mümkün olacaktır.

**Kaynakça**

- [1] Dongari-Bagtzoglou, A. 2008. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 6, 201-208.
- [2] Donlan R. M. 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiology*, 17, 66-72.
- [3] Flemming, H. C., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- [4] Roberts, A. P., Wilson, P., Mullany, P. 1999. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiology Letters*, 177, 63-66.
- [5] Reisner, A., Höller, B. M., Molin, S., Zechner, E. L., 2006. Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion. *Journal of Bacteriology*, 180, 3582-3588.
- [6] Wen, Z. T., Yates, D., Song-Joon, A., Burne, R. A., 2010. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered When Grown in Dual-Species Model, *BMC Microbiology*, 10, 111-118.
- [7] Mitri, S., Xavier, J. B., Foster, K. R. 2011. Social evolution in multispecies biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 10839-10846.
- [8] Gupta, P., Sankar, S., Das, P., Battacharjee, S., Tribedi, B. 2015. Biofilm, pathogenesis and prevention: a journey to break the wall. *Archives of Microbiology*, 10, 1148-1160.
- [9] Hansch, G.M. 2012. Host defence against bacterial biofilms: "mission Impossible"? *ISRN Immunology*, 2012:1-17.
- [10] Perez-Lopez, A., Behnsen, J., Nuccio, J-P., Raffatellu, M. 2016. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. *Nature Reviews Immunology*, 16, 135-148.
- [11] Monds, R. D., O'Toole, G. A. 2009. The developmental model of microbial biofilms: paradigm up for review. *Trends Microbiology*, 17, 73-87.
- [12] Klebensberger, J., Birkenmaier, A., Geffers, R., Kjelleberg, S., Philipp, B. 2009. SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 11, 3073-3086.
- [13] Woodcock, S., Bessemer, K., Battin, T. J., Curtis, T. P., Sloan, T.P. 2013. Modelling the effects of dispersal mechanisms and hydrodynamic regimes upon the structure of microbial communities within fluvial biofilms. *Environmental Microbiology*, 15, 1216-1225.
- [14] Donlan, R. M. 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881-890.
- [15] Toutain, C. M., Caizza, C. M., Zegans, M. E., O'Toole, G. A. 2007. Roles for flagellar stators in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, 158, 471-477.
- [16] Hadjifrangiskou, M., Go, A. P., Pinker, J., Kostakioti, M., Zhang, E. W., Greene, S. E., Hultgren, S. J. 2012. Transposon mutagenesis identifies uropathogenic *Escherichia coli* biofilm factors. *Journal of Bacteriology*, 194, 6195-6205.
- [17] Schluter, P., Nadell, C. D., Bassler, B. C., Foster, K. R. 2015. Adhesion as a weapon in microbial competition. *The ISME Journal*, 9, 139-149.
- [18] Spurbeck, R. R., Stapleton, E. A., Johnston, J. R., Walk, S. T., Hooton, T. M., Mobley, H. C. 2011. Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *E. coli* strains: contribution of Ygi and Yad fimbriae. *Infection and Immunity*, 79, 4753-4763.
- [19] Chen, S. L., Hung, C. S., Pinker, J. S., Walker, J. N., Cusumano, C. K., Boucheart, J., Gordon, J. I., Hultgren, S. J., 2009. Positive selection identifies: an In vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 22439-22444.
- [20] Uhlich, G. A., Cooke, P. H., Solomon, E. B. 2006. Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2564-2572.
- [21] Guiton, P. S., Hung, C. S., Kline, K. A., Roth, R., Kau, A. L., Hayes, E., Heuser, J., Dodson, K. W., Cuperon, M. G., Hultgren, S. J. 2009. Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. *Infection and Immunity*, 77, 3626-3638.

- [22] Kline, K. A., Dodson, K. W., Caparon, M. G., Hultgren, S. J. 2010. A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiology*, 18, 224–232.
- [23] Widder, S., Bessemer, K., Singer, G. A., Ceola, S., Bertuzzo, E., Qince, C., Sloon, W. T., Rinaldo, A., Battin, T. J. 2014. Fluvial network organization imprints on microbial co-occurrence networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 12799–12804.
- [24] Dang, H., Lovell, C. R. 2016. Microbial colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, 91-138.
- [25] Agladze, K., Wang, X., Romero, T. 2005. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *Journal of Bacteriology*, 187, 8237–8246.
- [26] Borlee, B. R., Goldman, A. D., Murakami, K., Samudrata, R., Wozniak, D. J., Parsek, M. R. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 75, 827–842.
- [27] Yang, L., Borken, K. B., Skindersoe, M. E., bChristensen, A. B., Tolker-Nielsen, T. 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 153, 1318–1328.
- [28] Lopez, D., Wlamakis, H., Kolter, R. 2010. Biofilms. *CSH Perspectives in Microbiology*, 12, 354-365.
- [29] Boano, F., Harvey, J. W., Marion, A., Packman, A. I., Revelli, R., Ridolfi, R., Wörmen, A. 2014. Hyporheic flow and transport processes: mechanisms, models, and biogeochemical implications. *Reviews of Geophysics*, 52, 603–679.
- [30] Hong, S. H., Lee, J., Wood, T. K. 2010. Engineering global regulator Hha of *Escherichia coli* to control biofilm dispersal. *Microbial Biotechnology*, 3, 717–72.
- [31] Rowe, M. C., Withers, H. L., Swift, S. 2010. Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. *FEMS Microbiology Letters*, 307, 102–109.
- [32] Kaplan, J. B. 2010. Biofilm dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, 89, 205–218.
- [33] Ma, Q., Zhang, Q., Wood, T. K. 2011a. *Escherichia coli* BdcA controls biofilm dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* and *Rhizobium meliloti*. *BMC Research Notes*, 4, 447-451.
- [34] Ma, Q., Yang, Z., Pu, M., Peti, W., Wood, T. K., 2011b. A novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. *Environmental Microbiology*, 13, 631–642.
- [35] Zhang, W., Sikleika, T., Packman, A. L., 2013. Effects of fluid flow conditions on interactions between species in biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 84, 344–354.
- [36] Wang, X., Dubey, A. K., Suzuki, K., Buken, C. S., Babitzke, P., Romeo, T. 2005. CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a Biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 56, 1648–1663.
- [37] Harmsen, M., Yang, M., Pamp, S. J., Tolker-Nielsen, T. 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59, 253–268.
- [38] Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., Losick, K., 2010. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, 30, 627-629.
- [39] Kostakioti, M., Hadjifangiskou, N. M., Pinkener, J. S., Hultgren S. J. 2009. QseC-mediated dephosphorylation of QseB is required for expression of genes associated with virulence in uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 73, 1020–1031.
- [40] Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., Packman, A. I. 2016. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 251-253.
- [41] Rendueles, O., Kaplan, J. B., Ghigo, J. M. 2012. Antibiofilm polysaccharides. *Environmental Microbiology*, 15, 334–346.
- [42] Maier, L., Vyas, R., Cordova, G. D., Lindsay, H., Schimis, T. S. B., Brugiroux, S., Periaswamy, B. M., Bauer, R., Sturm, A., Schreiber, F., von Mering, C., Robinson, M. D., Stecker, B. 2013. Microbiota-derived hydrogen fuels *Salmonella Typhimurium* invasion of the gut ecosystem. *Cell Host Microbe*, 14, 641–65.
- [43] Winter, S. E., Thienmitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsolis, R. M., Rth, J. R., Baumler, A. J. 2010. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, 467, 426–429.

- [44] Marciobal, A., Barboza, M., Sonnenburg, E. D., Pudlo, N., Martens, E. C., Desai, P., Lebrilla, C. B., Weimer, B. C., German, J. B., Sonnenburg, J. L. 2011. Bacteroides in the Infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe*, 10, 507–514.
- [45] Curtis, M. M., Hu, Z., Klimko, C., Narayanan, S., Deberardinis, S., Sperendiro, V. 2014. The Gut commensal Bacteroides thetaiotaomicron exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. *Cell Host Microbe*, 16, 759–769.
- [46] Pickard, J. M., Maurice, C. F., Kinnebrew, M. A., Abt, M. C., Schenten, D., Golovkina, T. V., Bogatyrev, S. R., Ismagilov, R. F., Pamer, E. G., Turnbaugh, P. J., Chernovsky, A. V. 2014. Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host-commensal symbiosis in sickness. *Nature*, 514, 638–64.
- [47] Allesen-Holm M. A., Borke, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Rjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. 2006. Characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59, 1114–1128.
- [48] Costerton, J. W., Montanaro, L., Arciola, C. R., 2007. Bacterial communications in implant infections: a target for an intelligence war. *The International Journal of Artificial Organs*, 30, 757–763.
- [49] El Kebir, D. L., Josef, L., Filep, J. G. 2008. Neutrophil recognition of bacterial DNA and toll-like receptor 9-dependent and -Independent Regulation of Neutrophil Function. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, 56, 41–53.
- [50] Ishii, K. J., Koyama, S., Nakagava, A., Coban, C., Akira, S. 2008. Host Innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host and Microbe*, 3, 352–363.
- [51] Hodgins, D. C., Scheven, E., Thoen, O. 2010. Subversion of the immune response by bacterial pathogens. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 2, 15–32.
- [52] Leid, J. G., Wilson, C. S., Shirliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R., Jeffers, A. K. 2005. The exopolysaccharide alginate protects Pseudomonas aeruginosa biofilm bacteria from IFN- $\gamma$ -mediated macrophage killing. *Journal of Immunology*, 175, 7512–7518.
- [53] Luo, G., Nissel, D. W., Shaban, R. A., Grim, E. A., Klimpel, G. R. 1993. Tumor necrosis factor alpha binding to bacteria: evidence for a high-affinity receptor and alteration of bacterial virulence properties. *Infection and Immunity*, 61, 830–835.
- [54] Umberto, G., Meduri, G., Stephen, M. A. 1999. Cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  enhance in vitro growth of bacteria. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160, 961–967.
- [55] Hofer, U. 2016. Biofilms; turning tides for quorum-sensing. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 64–65.
- [56] Vuong, M., Dürr, M., Aaron, W. E. 2004. Regulated Expression of *agr* associated molecular Pattern Molecules. *Cellular Microbiology*, 6, 753–759.
- [57] Thurlow, L. R., Hanke, M., Fritz, T. 2011. Staphylococcus aureus biofilms prevent phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 186, 6585–6596.
- [58] Mullarky, I. K., Frieze, N., Park, Y. H., Sordillo, L. M. 2001. Staphylococcus aureus *agr* genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. *Infection and Immunity*, 69, 45–51.
- [59] Parks, Q. M., Young, R. L., Poch, K. R., Malciom, K. C., Nick, J. A. 2009. Neutrophil enhancement of Pseudomonas aeruginosa biofilm Development. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 492–502.
- [60] Arciola, C. R. 2010. Host defense against implant infection: the ambivalent role of phagocytosis, *The International Journal of Artificial Organs*, 33, 565–567.
- [61] Ammons, D. R., Puttanguta, R., Granadas, J. C., De la Giza, G., Evamb, G. S., Ranpersad, J. 2010. An exploratory study of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and SCCmec elements obtained from a community setting along the Texas border with Mexico. *Current Microbiology*, 60, 321–326.
- [62] Hell, E., Giske, C. G., Nelson, A., Römling, U., Marchini, G. 2010. Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 211–215, 2010.
- [63] Tsai, P. W. 2011. Human antimicrobial peptide LL-37 inhibits adhesion of Candida albicans by interacting with yeast cell-wall carbohydrates. *PLoS ONE*, 6, 749–755.