

## Bakteriyal Biyofilmlerin Biyolojik Önemi ve Etkili Kontrol Stratejileri

### The Biological Significance of Bacterial Biofilms and Effective Control Strategies

Demet HANÇER AYDEMİR\*

Süleyman Demirel Üniversitesi,  
Isparta Sağlık Hizmetleri Meslek  
Yüksekokulu, Doğu Kampüsü,  
Isparta, Türkiye  
E-mail: demetaydemir@sdu.edu.tr

#### Öz

Bakteriler, canlı yüzeylere olduğu kadar protezler ve kalıcı tıbbi cihazlar gibi cansız yüzeylere de yapışabilir ve hücre dışı polisakaritler, proteinler ve diğer bileşenlerden oluşan bir biyofilm oluşturabilirler. Biyofilm içinde büyüyen bakteriyel patojenler, pek çok antibiyotik etkisine ve doğuştan gelen bağışıklık sistemine dirençlidirler. Biyofilm oluşumu, konak canlıda antimikrobiyal maddelere olan direnci arttırdığı gibi iltihabi reaksiyonları tetikleyerek kronik inflamasyona bağlı kalıcı infeksiyonlara da neden olabilir. Tüm mikrobik infeksiyonların %60'ından fazlasının biyofilmlerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Özellikle klinisyenler bakteriyel biyofilm oluşumunun ve bunlarla ilişkili hastalıkların öneminden daha fazla haberdar edilebilirse, bu konuda daha fazla araştırma yapıp yeni tedavi yaklaşımları geliştirilebilecektir. Bununla birlikte, biyofilmlerin zararlı etkilerini gidermek için etkili stratejiler geliştirme girişimleri yapılmaktadır ve mikrobiyal biyofilmlerin yok edilmesi için uygun bir terapi tasarlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu derleme ile bakteriyel biyofilmlerin biyolojik önemi ve bakteriyel infeksiyonların kontrolü ve tedavisi için umut vaat eden etkili kontrol stratejilerinin özetlenmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Bakteriyal biyofilm, biyofilm direnci, quorum sensing, antibiyofilm stratejiler.

#### Abstract

Bacteria can adhere to inanimate surfaces, such as prostheses, permanent medical devices, as far as living surfaces, and can form a biofilm composed of extracellular polysaccharides, proteins, and other components. Bacteria growing in the biofilm are resistant to many antibiotic effects and the innate immune system. Biofilm formation may increase resistance to antimicrobials in the host, as well as induce inflammatory reactions, leading to persistent infections due to chronic inflammation. More than 60% of all microbial infections are estimated to be due to biofilms. Especially, if clinicians are made more aware of the importance of the bacterial biofilm formation and associated diseases, more research and new treatment approaches can be developed. However, attempts have been made to develop effective strategies to counteract the harmful effects of biofilms, and further research is needed to design appropriate therapies for the destruction of microbial biofilms. In this review, it is aimed to summarize the biological significance of bacterial biofilms and the promising effective control strategies for the control and treatment of bacterial infections.

\*Corresponding author  
Handling Editor: M. Kaygusuz

**Key words:** Bacterial biofilm, biofilm resistance, quorum sensing, antibiofilm strategies

### 1. Giriş

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye tutunmuş, kendi ürettikleri hücre dışı polimerik yapıdaki bir matrikse (ekzopolisakarit=EPS) gömülü mikrobiyal hücrelerle karakterize edilmiş bir topluluktur. Bakteriyel biyofilm kavramı ilk olarak 17. yüzyılda Antonie van Leeuwenhoek tarafından ifade edilmiştir. Araştırmacı, kendi dışından kazıdığı plakları, kendi geliştirdiği ilkel mikroskobunda incelemiş ve bu gözlemlerindeki yapıları küçük hayvancıklar anlamına gelen "animalcules" adını vermiştir (Donlan ve Costerton 2002). Herhangi bir yüzeye bağlı

mikrobiyal yığılmaları tanımlamak için "Biyofilm" terimi ise ilk olarak Bill Costerton tarafından 1978 yılında kullanılmıştır (Costerton 1978). Biyofilmler, plastik, metal, cam, toprak partikülleri, ahşap, tıbbi implantlar, doku ve gıda ürünleri gibi her türlü yüzeyler üzerinde oluşabilmektedir (Kokare vd. 2009).

Bakteriyel biyofilmler, her ne kadar atık su arıtım uygulamalarında ve biyoteknolojide pozitif etkiye sahip olsa da (Wolfaardt vd. 1994; Rittmann vd. 2004) klinikte oldukça zararlıdır. Epidemiyolojik çalışmalar biyofilm

oluşumunun insanlarda görülen infeksiyonların %60'ından fazlasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Biyofilm oluşumu, insanlarda oluşan infeksiyonun devamlılığı ve tedavide karşılaşılan zorluklar açısından önemlidir. Planktonik yaşam tarzı ile karşılaştırıldığında biyofilm yapısındaki bakteriler fizyolojik ve fenotipik olarak farklıdır. Biyofilm içerisinde büyüyen bakteriler, olumsuz çevre şartlarına, konağın bağışıklık sistemine (opsonizasyon ve fagositoza) ve antibiyotiklere karşı oldukça dayanıklıdır (Brown vd. 1988; Costerton vd. 1995; Beveridge vd. 1997; Jesaitis vd. 2003; Leid vd. 2005). Biyofilmler, üst solunum yolu infeksiyonları (*Pseudomonas aeruginosa*) (Govan ve Deretic 1996), üriner sistem infeksiyonları (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) (Kahlmeter 2003), periodontit (*Porphyromonas gingivalis*) (Kuramitsu 2001), katater ve diğer cihazlarla ilişkili infeksiyonlar (*E. coli*, *Enterococcus faecalis*) (Sandoe vd. 2002; Ferrières vd. 2007; Jacobsen vd. 2008; Fey ve Olson 2010; Reyes ve Zervos 2013) gibi birçok inatçı ve kronik infeksiyona neden olmaktadır. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda, fırsatçı biyofilm oluşturan patojenlerin neden olduğu infeksiyonlar ciddi semptomlara ve birçok durumda ölüme yol açarak yıkıcı olabilmektedir (Kostakioti vd. 2013). Bu infeksiyonların etkili bir şekilde önlenmesi için biyofilm oluşumunu engelleyen yeni ve etkin metodların kullanılması gerekmektedir. Bu derleme ile biyofilm oluşumunun önemi ve yeni antibiyofilm stratejilerin geliştirilmesinde son gelişmelerin özetlenmesi amaçlanmıştır.

### 1.1. Biyofilm Yapısı ve Oluşumu

Mikroorganizmalar uygun koşullar oluştuğunda canlı hücreler veya cansız yapılar üzerine yapışarak kendi ürettikleri EPS içinde bölünüp çoğalarak biyofilm oluşturabilirler. Biyofilm tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabileceği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Biyofilm oluşumu, bakteri türü ve bakteri sayısı dışında ortam sıcaklığı ve pH'ı, bağlandığı yüzeyin özelliği, hücre hareketliliği, ortamdaki besin miktarı ve içeriği ile de yakından ilişkilidir. Biyofilm içerisinde mikroorganizmalar kendi aralarında çok iyi organize olmuşlardır. Biyofilmin yapısallığı için gereken biyofilm matriksidir. Ekstraselüler matriks, polisakaritler, proteinler ve ekstraselüler DNA (eDNA)'lardan oluşmaktadır. Matriks sulu bir tabiata sahip olup temel besinlerin ve minerallerin yakalanarak konsantrasyon hale getirilmesine olanak sağlayan bir sistem oluşturur. Matriks, biyofilmler içerisinde yer alan bakterileri çevresel tehditlere, biositlere, antikorlara, surfaktanlara ve beyaz kan hücrelerine karşı korur (Whitchurch vd. 2002; Starkey vd. 2004).

Biyofilm oluşumu çok aşamalı, aynı zamanda dinamik bir yapılanma olup, farklı genetik ve çevresel faktörler tarafından düzenlenmektedir. Yapılan genetik çalışmalar, hücre hareketliliği, hücre membran proteinleri, ekstraselüler polisakaritler ve sinyal moleküllerinin biyofilm oluşumunda önemli rol oynadıklarını göstermektedir. Bakteriyel hareketlilik hücre yüzeyinden köken alan flagella ve fimbria adı verilen iki çeşit protein ile gerçekleşmektedir. İnce, uzun ve sarmal yapıda olan flagellum bakterilere sıvı ortamda yer değiştirme olanağı

sağlar. Fimbrialar ise kısa ve düz yapıda olup bakterilerin çeşitli yüzeylere tutunması ve seçirme (twitching) hareketinden sorumludurlar. *E. coli* (Pratt ve Kolter 1998) ve *P. aeruginosa* (O'toole ve Kolter 1998) üzerinde yapılan çalışmalar her iki hareketin biyofilm oluşumu için gerekli olduğunu göstermiştir. *P. aeruginosa*, kolonizasyonun adezyon fazında epitel hücre yüzeylerinde bulunan asialo GM1 yapılarına bağlanmak için flagella ve Tip IV pilus gibi tutunma organelleri kullanarak biyofilm oluşturan fırsatçı bir patojendir (Gupta vd. 1994). Flagella tarafından gerçekleştirilen bakteriyel hareketlilik, bakteri ile yüzey arasındaki etkileşimin kurulması için de gerekli iken fimbrialar mikrokolonilerin oluşumu için gereklidir.

Adezin adı verilen özel hücre membran proteinleri, bakterilerin çeşitli yüzeylere yapışmasını sağlamaktadır. Adezin aktivitesi inhibe edildiğinde biyofilm oluşumunun mümkün olmadığı *E. coli* (Pratt ve Kolter 1998) ve *Vibrio cholerae* (Watnick ve Kolter 1999) üzerinde yapılan çalışmalarla da kanıtlanmıştır. Bakteriler yüzeye ve birbirlerine geri dönüşümlü olarak bağlanabilmek için EPS üretirler (Kumar ve Anand 1998). Eksopolisakarit tabaka, bakterileri çevreler ve bakterilerin yüzeylere sıkıca tutunmalarını sağlayarak bakterilere stabilite kazandırır. Ekzopolisakarit tabaka, biyofilm oluşumu için oldukça önemlidir. *P. aeruginosa* üzerinde yapılan moleküler genetik çalışmalar, ekzopolisakarit tabakanın sentezi için gerekli genlerin aktivasyonunun bakteri ile yüzey arasında kararlı bir bağlantı kurulduktan sonra gerçekleştiğini göstermiştir (Davies ve Geesey 1995). *Staphylococcus epidermidis* üzerinde yapılan çalışmalar ekzopolisakarit tabakanın sentezinden sorumlu genler inaktive edildiğinde bakterinin biyofilm oluşturma yeteneğini kaybettiğini göstermiştir (Heilmann vd. 1996).

Bakterilerin uygun bir yüzeye tutunmalarının ardından biyofilm oluşumunun başlaması 'Quorum Sensing (QS, Çevreyi Algılama Sistemi)' denilen bir haberleşme sisteminden gelen çeşitli kimyasal sinyallere bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki kimyasal sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçerek, çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça otoindükleyci olarak işlev gören bazı sinyal moleküllerinin lokal ekstraselüler konsantrasyonları da artmakta ve bu durum çevrede bulunan bakteriler için o bölgede bir hücresel kümelenmenin başladığı anlamına gelmektedir. Yüzeyle etkileşimden sonra bakteriler bir araya gelip tek tabakalı hücre hatları ve ardından mikrokoloniler oluştururlar. Mikrokoloniler ise daha sonra olgun biyofilm oluşturmak üzere farklılaşırlar (Taga ve Bassler 2003; March ve Bentley 2004).

Olgun biyofilmdeki mikrokoloniler genelde mantar benzeri yapılar sergilerler. Bu yapının baş kısmında hücresel yoğunluk sap kısmına oranla daha fazladır (Costerton 1999). Olgun biyofilmlerin üç boyutlu yapılarında bakteriyel kümeler arasında su dolu kanallar bulunmaktadır ve bu su dolu kanallar metabolik süreçlerde üretilen toksik maddelerin atılmasında ve besinsel öğelerin alınmasında görev yaparlar. Biyofilmlerin ilerleyen safhalarında biyofilmden kopmalar görülebilir. Biyofilm hücre topluluğundan köken alan yavru hücreler, hayatta kalabilmek ve yeniden kolonize olabilmek için biyofilmden ayrılabilirler. Bu ayrılma işlemi biyofilm oluşum sürecinin

bir parçası olarak veya dış kuvvetlerin etkisiyle tek bir hücrenin veya hücrelerin kopmasının bir sonucudur (Sauer vd. 2002; Aparna ve Yadav 2008).

## 1.2. Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar

Biyofilmler insan vücudunda kateterler, protez, kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, kontakt lens, rahim içi araçlar, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı ve cansız birçok yüzeyde oluşabilir. Biyofilmler özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ve kalıcı tıbbi araç veya kateteri olan hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir. (Lindsay ve Von Holy 2006).

Hastane enfeksiyon etkenleri arasında önemli bir yer tutan koagülaz-negatif stafilkoklar (KNS), yapay kalp kapakçıkları, kateter ve plastik malzemelerin yaygın olarak kullanımı sonucunda, bu biyomateriyaller üzerinde biyofilm tabakası oluşumuyla karakterize enfeksiyonlarda önemli bir artışa neden olmuştur (Vogel vd. 2000). Biyofilm oluşumu ile karakterize enfeksiyonlara en iyi örneklerden birisi, kistik fibrozis hastalarında *Pseudomonas aeruginosa*'ya bağlı olarak görülen kronik solunum yolu enfeksiyonlarıdır. Bu olguların solunum yolları, mukoid koloni fenotipinde *P. aeruginosa* ile kolonize ve enfekte olmakta ve kronik inflamasyona bağlı olarak toksik oksijen radikallerinin solunum yollarındaki konsantrasyonu giderek artmakta dolayısıyla solunum yollarında oksijen konsantrasyonu normale göre düşük olduğundan *P. aeruginosa* daha çok anaerob koşullarda biyofilm içinde canlılığını sürdürmeyi tercih etmektedir. Bu aşamadan sonra kolonizasyon ve enfeksiyonun eradikasyonu hemen hemen olanaksız hale gelmektedir (Spoering ve Lewis 2001).

Bakteriyel biyofilm ile ilişkili enfeksiyonları tedavi etmek özellikle sorunludur, çünkü sesil bakteriler planktonik olanlara göre konak organizmanın bağışık yanıtına daha dayanıklıdır ve antibiyotiklere, biyositlere ve hidrodinamik kuvvetlere karşı 1000 kat daha dirençlidirler. Biyofilmler ayrıca kronik enfeksiyonların sürekliliğinde de rol oynamaktadır (Costerton vd. 1995, 1999). Medikal aletlerin yüzeylerinde ve endokardit tablosunda görüldüğü gibi canlı dokular üzerinde de biyofilm oluşabilmekte ve oluşan bu biyofilmlerin yok edilmesinde antibiyotik tedavileri etkin olamamakta ve sürekli tekrarlayan semptomların görülmesi sonucunda cerrahi müdahaleyle biyofilmin vücuttan uzaklaştırılması gerekmektedir. (Costerton vd. 1999). Yapılan çalışmalar, nozokomial enfeksiyonların yaklaşık %65'inden mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin sorumlu olduğunu ve bu durumun tedavi giderlerini çok yükselttiğini ortaya koymaktadır (Potera 1999).

## 1.3. Biyofilm Oluşumuna Quorum Sensing'in Etkisi

Uzun yıllar boyunca, iletişim yeteneğinin çok hücreli "yüksek yapılı" organizmalara özgü bir özellik olduğu, bakteriler gibi tek hücreli canlıların ise sadece büyümek ve bölünmekten ibaret olan son derece basit bir yaşam tarzına sahip varlıklar oldukları düşünülüyordu. Ancak günümüzde, bakterilerin "asosyal", "yalnız yaşayan", "yalnız ölen" izole varlıklar olmadıkları, değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası iletişim sistemleri kullanan topluluklar

halinde buldukları kabul edilmektedir (Swift vd. 1994). Bakteriler iletişim kurabilme yetenekleri sayesinde yalnız olduklarını veya topluluk içinde olduklarını ayırt edebilmekte ve toplu halde davranabilmektedirler. Bakterilerde hücrelerarası iletişimi sağlayan çevreyi algılama sisteminin (Quorum Sensing, QS), antibiyotik üretimi, spor oluşumu, konjugasyon, kayma hareketi (swarming), yüzme hareketi (swimming), biyoışım, önemli virülens faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi çok çeşitli fizyolojik işlemlerde kullanıldığı bilinmektedir (Fuqua vd. 1994, Parsek ve Greenberg 2005). Bakteriler birbirleriyle iletişim kurabilmek için küçük sinyal moleküllerini kullanmaktadırlar. Bakteriler tarafından sentezlenen bu küçük kimyasal sinyal molekülleri, bakteri hücrelerinden kolaylıkla difüze olur ve bakteri sayısındaki artışla ortamda birikmeye başlar. Bakteriler bu sinyal molekülleri aracılığıyla yeterli yoğunluğa ulaşıp ulaşmadıklarını izlemekte ve yeterli yoğunluğa ulaştıkları anda da virülens faktörlerinin veya bir ekzotoksinin üretimi gibi kritik gen ekspresyonları tetiklenmektedir. Hücreler arası iletişimi sağlayan bu haberleşme sistemi quorum sensing (çevreyi algılama sistemi) olarak adlandırılır. Bu olay bakteriye kendi hücre popülasyonu yoğunluğunu izleme ve buna bağlı olarak davranışlarını düzenlenleyebilme olanağı verir. Böylelikle, kontakta enfeksiyon oluşturabilecek yeterli yoğunluğa ulaşmaya kadar bağışıklık sistemi tarafından patojen bakterinin fark edilmemesi sağlanarak başarılı bir enfeksiyon süreci oluşturulur (Fuqua vd. 1994; Jayaraman ve Wood 2008). Bakterilerdeki çevreyi algılama sistemi 3 ayrı sınıfa ayrılarak incelenmektedir. (i) Gram-negatif bakterilerde açil homoserin lakton (AHL) moleküllerinin sinyal molekülü olarak kullanıldığı LuxI/LuxR-tipi çevreyi algılama sistemi; (ii) Gram-pozitif bakterilerde küçük peptitlerin sinyal molekülü olarak kullanıldığı oligopeptit/iki komponentli tipte çevreyi algılama sistemi ve (iii) hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerde *LuxS* geninin kodladığı otoindükleyici 2 (AI-2) molekülünün sinyal molekülü olarak kullanıldığı LuxS/AI-2 tipi çevreyi algılama sistemi (Li ve Tian 2012).

Çevreyi algılama sistemleri, biyofilmdeki hücrelerin gelişimi ve farklılaşması ile biyofilm oluşumunun olgunlaşma basamağındaki düzenleyici etkileri ile kritik bir rol oynamaktadırlar. Çevreyi algılama sisteminin biyofilm oluşumundaki rolü ilk olarak 1998 yılında Greenberg ve arkadaşları tarafından *Pseudomonas aeruginosa*'da tanımlanmıştır (Davies vd. 1998). AHL temelli çevreyi algılama sisteminin Gram negatif bir bakteri olan *Serratia liquefaciens*'de biyofilm olgunlaşmasını etkilediği gösterilmiştir (Labbate vd. 2004). Yapılan başka bir çalışmada çevreyi algılama sisteminin *Aeromonas hydrophila*'da biyofilm gelişimini düzenlediği rapor edilmiştir (Lynch vd. 2002).

## 1.4. Biyofilm Direnci

Biyofilm sayesinde bakteriler antimikrobiyal maddeler, yüzey gerilimini değiştiren ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı korunurlar. Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara toleransında, planktonik şekillerine göre 100-1000 kat

daha fazla artış olduğu rapor edilmiştir (Ceri vd. 1999). Biyofilm ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir kısmında, prevalanslarının yüksek olması ve klinik önemlerinden dolayı *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* ve *Aspergillus fumigates* gibi insanlarda hastalıklara neden olan organizmalar üzerinde yoğunlaşmaktadır (Manavathu ve Vazquez 2014). Biyofilm oluşturan bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisi oldukça güç olmaktadır. Mikrobiyal biyofilmlerin neden olduğu kronik infeksiyonların artması ile birlikte biyofilm direncini anlamaya yönelik olarak yapılan çalışmalar da hız kazanmıştır.

Biyofilmin antimikrobiyal ajanlara karşı bilinen direnç mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir.

- i. Ekstraselüler biyofilm matriksi biyofilm etrafında fiziksel ve kimyasal bir bariyer oluşturmakta ve antimikrobiyal ajanların biyofilmin içine nüfuz etmesine engel oluşturmaktadır (Walters vd. 2003; Chiang vd. 2013). Yapılan bir çalışmada, implantlarda infeksiyonlara neden olan stafilokokların ürettiği EPS varlığında pefloxacin, teikoplanin ve vankomisin bakterisidal etkinliklerinde azalma olduğu gösterilmiştir (Souli ve Giamarellou 1998).
- ii. Biyofilm yüzeyi üzerindeki hücreler metabolik olarak aktiftirler ve bölünüp çoğalırlar. Biyofilm içinde gömülü olan hücreler ise düşük miktarda besin ve oksijen bulunduğu için daha yavaş büyürler. Bu durum iç katmandaki mikroorganizmaların metabolizmalarının minimuma inmesine neden olup, onları "uyku durumunda" tuttuğu için antibiyotiklere karşı hassasiyetlerini düşürmektedir (Walters vd. 2003; Bjarnsholt vd. 2005).
- iii. Ekstraselüler matriksin içerdiği bol miktardaki DNA (eDNA) ve beta laktamazlar biyofilm oluşturan bakterileri antibiyotiklere karşı korumaktadır (Bagge vd. 2004; Mulcahy vd. 2008). Yapılan bir çalışmada, ekzopolisakkarid tabakaya nüfuz eden beta-laktam antibiyotiklerin beta laktamazlar ile hidrolize olması ile nüfuz eden ilaç miktarının daha da azaldığı ve infeksiyonun eradikasyonunun güçleştiği gösterilmiştir (Mah ve O'Toole 2001).
- iv. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalarda mutasyon sıklığı planktonik şekillerine göre oldukça yüksektir. *P. aeruginosa*'da mutasyon oranında 105 kata kadar artış olduğu rapor edilmiştir (Driffield vd. 2008).
- v. Biyofilm varlığında atım pompalarının ekspresyonu da artmakta ve bunlar pek çok mikroorganizmanın antimikrobiyal direncinde rol oynamaktadırlar. Örneğin; MexAB-OprM pompasının *P. aeruginosa*'nın kinolonlara direncinde rol oynadığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, biyofilm içindeki *P. aeruginosa* hücrelerinde, biyofilm dışında kalanlara oranla bu pompanın ekspresyonunun daha çok indüklendiği gösterilmiş ve artmış direncin bir nedeni olarak ileri sürülmüştür (Stewart ve Costerton 2001).

- vi. Biyofilmi oluşturan hücreler birbirleriyle çok yakın olduklarından bu durum konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon yoluyla horizontal gen transferi için uygun ortam oluşturmaktadır. Direnç plazmidlerinin aktarılması sayesinde genetik yapısı değişen hücrelerin antimikrobiyal ajanlara karşı daha fazla direnç geliştirdiği gösterilmiştir (Ghigo 2001).
- vii. Biyofilmi oluşturan hücrelerinin metabolik faaliyetleri sonucunda dış ortama asidik atık maddeler bırakılmakta, bu ortamın pH'ının değişmesine neden olmaktadır. Ortam pH'ındaki değişiklikler ise bazı antibiyotikler üzerinde antagonistik etkiye neden olmaktadır (Sauer vd. 2002). Örneğin; aminoglikozitlerin asidik ve anaerobik ortamlarda alkali ortamlara göre 8 ila 60 kat daha az aktif olduğu rapor edilmiştir (Fong 2009).
- viii. Direnci etkileyen bir diğer faktör ise biyofilm içindeki oksijen yoğunluğudur. Biyofilmin yüzey katmanlarındaki oksijen burada yaşayan aerobik mikroorganizmalar tarafından kullanılıp tüketilmekte, biyofilmin dip kısımlarında ise anaerobik bir ortam oluşmaktadır. Bu durum aminoglikozitler gibi bazı antibiyotiklerin etkinliğini azaltmakta ve direnç geliştirmektedir. Aynı şekilde, *P. aeruginosa* biyofilmlerinde tobramisin ve siprofloksasin aktivitesinin yüzeye yakın şuşlarda daha yüksek olması da oksijen yoğunluğuna bağlanmaktadır (Mah ve O'Toole 2001; Drenkard 2003).

Biyofilmler klinik açıdan incelendiğinde özellikle kalıcı tıbbi araç kullanan ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda gelişen ciddi infeksiyonlarda önemli rollerinin olduğu, gelişen antimikrobiyal direncin ise tedavi maliyetleri ve mortaliteyi arttırdığı görülmektedir. Bu durum hem mikrobiyologlar hem de klinisyenler açısından ciddi bir problem oluşturmaktadır. Biyofilm direncini etkileyen tüm bu faktörler göz önüne alındığında, biyofilmi oluşturan bakteri türü ve kullanılan antimikrobiyal ajana bağlı olarak farklı direnç mekanizmalarının etkili olabileceği ve bu direncin multifaktöriyel olduğu görülmektedir.

## 1.5. Biyofilm Kontrol Stratejileri

### 1.5.1. Quorum Quenching

Günümüzde klasik bir yöntem olarak bakteriyostatik veya bakterisidal ajanlarla yeni antibiyotikler geliştirilmektedir. Ancak bakterilerin bu yöntemle geliştirilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri adaptasyon sonucu direnç geliştirmeleri hemen hemen tüm antibiyotikler için kaçınılmaz bir sonuç haline gelmiştir. Yeni antibiyotik geliştirilmesi çok yavaş bir süreçtir ve bu antibiyotiklerin içinde yeni bir antibakteriyel mekanizma ile etkinlik gösteren hemen hiç yeni bir molekül yoktur. Günümüzde kullanılan antibiyotiklere karşı yaygın bir direnç gelişimi söz konusudur ve gelişen bu direnç aynı zamanda farklı sınıftan antibiyotiklere karşı da direnç gelişimini kolaylaştırmaktadır. Klinikte ciddi tedavi sorunu yaratan bu durum yeni antibakteriyel hedeflerin bulunması ve bu hedeflere yönelik ilaç ve stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Son yıllarda bakteri infeksiyonlarına karşı mevcut antibiyotiklerle uygulanan tedavilere alternatif olarak, yeni tedavi stratejilerinin etkinliğini artırmak için, biyofilm büyümesinin önlenmesi, biyofilm parçalanması veya biyofilm eradikasyonuna yol açan faktörler araştırılmaktadır. Bu faktörler, enzimler, sodyum tuzları, metal nanopartikülleri, antibiyotikler, asitler, kitosan türevleri veya bitki özütlerini içermektedir (Taraszkiwicz vd. 2013). Bu faktörlerin hepsi çeşitli mekanizmalar ve farklı verimlilikler ile biyofilm yapısını etkilemektedirler.

Günümüzde yeni antibakteriyel hedeflerin bulunmasına yönelik araştırmalar arasında, bakterileri direk öldürmek yerine aralarındaki iletişimin engellenmesi konusundaki çalışmalar, henüz pratiğe yansımamış olsa da, gelecek için umut vaat eden yeni bir strateji olarak düşünülmektedir. Bakteri hücreleri arasında iletişimi sağlayan bu haberleşme sistemi "quorum sensing (çevreyi algılama sistemi)" olarak bilinmektedir. Çok sayıda Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizmada saptanmış olan bu sistemle bakteri hücreleri aynı topluluk içindeki türdeşlerinin yoğunluğunu algılayabilmekte ve bunun sonucunda topluluk içindeki tüm bireyler koordine biçimde davranışlarını düzenleyebilmektedirler. Bakteriler arasındaki bu haberleşme sisteminin farklı şekillerde inhibisyonunun antibakteriyel etki gösterebileceğine dair gözlem ve kanıtlar mevcuttur (Raffa vd. 2005). Bu noktadan hareketle, anti-quorum sensing (quorum quenching) araştırmaları ile mikroorganizmalar arasındaki sinyal iletişiminin bozularak mikroorganizma topluluklarının kontrol altında tutulabileceği düşünülmektedir.

Bakterilerdeki çevreyi algılama sisteminin engellenmesi ile ilgili araştırmaların üç temel stratejide toplandığı görülmektedir:

- i. Sinyal molekülünün üretiminin önlenmesi: Önemli sinyal moleküllerinden birisi olan açıl homoserin lakton (AHL), S-adenozil metiyoninden sentezlendiğinden dolayı, bu aminoasidin analogları sinyal molekülünün sentezini önlemek için denenmektedir (Rasmussen ve Givskov 2006a).
- ii. Sinyal molekülünün yıkılması veya inhibisyonu: Sentezlenen AHL sinyal molekülleri enzimatik olarak parçalanabilmektedir. *Bacillus* spp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Arthrobacter* spp. gibi bazı bakterilerin AHL moleküllerini yıkıma uğratabilecek enzimler üretebildiği bilinmektedir. AHL laktonaz ve AHL açılazlar sırasıyla AHL molekülündeki homoserin lakton halkasını ve amid bağlarını hiroliz etmektedirler (Dong vd. 2002; Carlier vd. 2003; Park vd. 2003). *Variovorax paradoxus* ise AHL molekülündeki amid bağlarını hidrolize ederek, AHL molekülünü azot ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadır (Leadbetter ve Greenberg 2000). Kırmızı bir makroalg olan *Delisea pulchra*'nın üretmiş ve veziküllerinde depolamış olduğu furanon bileşiklerinin insan patojeni *Pseudomonas aeruginosa* ve *Serratia liquefaciens*'de quorum sensing moleküllerini inhibe ettiği de gösterilmiştir (Manefield vd. 1999). Nitekim furanon türevleri insan ve diğer memelilerde toksik etki göstermektedir (Hentzer

ve Givskov 2003). Ancak temel etki mekanizmalarından hareketle toksik olmayan yeni türevlerin elde edilebilmesi için çalışmalar sürmektedir.

- iii. Quorum sensing sinyalinin alınmasının önlenmesi: Quorum sensing sinyalinin alınmasını önlemek amacıyla reseptöre karşı yarışan doğal ve sentetik AHL analogları Gram negatif bakterilerle yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılmışlardır (Givskov vd. 1996; McClean vd. 1997; Pesci vd. 1997; Kline vd. 1999). Bu analoglar genellikle AHL molekülünün yan zincirleri uzatılarak türetilmektedir.

Bitkiler âlemi, çok uzun zamandan beridir ilaçlara kaynak oluşturmaktadır. Bitki özütlerinden elde edilen tıbbi etkiye sahip bitkisel ilaç araştırmaları son yıllarda oldukça ilgi duyulan bir araştırma alanı haline gelmiştir. Bilindiği üzere, aromatik ve tıbbi öneme sahip birçok bitki türü mevcuttur. Bu bitkilerden elde edilen özütlerin veya uçucu yağların önemli insan patojenlerinde çevreyi algılama sistemine olan etkilerinin incelenmesi, bu patojenlerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayacaktır. Bugüne kadar yapılan bazı çalışmalarla *P. aeruginosa*'da ve diğer bazı önemli patojen bakterilerde çevreyi algılama sistemini bloke eden bazı maddeler tanımlanmıştır. Ancak bu maddelerin konağa karşı toksik olması veya konak tarafından tolere edilemeyecek konsantrasyonlarda etkili olmaları sebebiyle tedavide kullanılmaları mümkün değildir. Tanımlanmış çevreyi algılama sistemini engelleyici bileşenlerin çoğu insan kullanımına uygun değildir. Toksikite ve canlı içindeki etki testleri potansiyel adayları azaltmıştır. Örneğin; halojenlenmiş furanonlar son derece toksik ve reaktif olmaları sebebiyle endüstride, tıpta ve tarımda kullanımları mümkün değildir (Saraçlı 2006). Antibiyotik direnci çok fazla olan *P. aeruginosa* ve bunun gibi patojenitesi yüksek bakterilerin, çevreyi algılama ile düzenlediği virülens faktörlerini, antibiyotik yerine tıbbi öneme sahip olan bitkisel ürünlerle engellemek daha umut verici bir yaklaşımdır. Bitkilerden elde edilen AHL analoglarıyla yapılan bakteriyel üremenin veya sinyal alımının engellenmesine karşı bakteride bir direnç gelişimi söz konusu değildir. Antibiyotik olmayan bu engelleyicilerin tanımlanması, bitkiler ve hayvanlar gibi insanlarda da bakteriyel hastalıkların tedavisi için bize yeni fırsatlar sunabilir. Hem bitkiler hem de mantarlar milyonlarca yıldan beri çevreyi algılama sistemini kullanan bakterilerle işbirliği içindedirler. Bu mantar ve bitkilerin, çevreyi algılama sistemini engelleyen bileşenleri üreterek, bu bakterilerin hastalık oluşturmalarını, kolonize olmalarını ve bulaşmalarını azalttıkları görülmüştür (Rasmussen 2006b). Nielsen ve arkadaşları, çevreyi algılama sistemini kullanarak, sarımsaktan elde edilen bileşenlerin *LuxR* üzerinde engelleme etkisinin olduğunu bulmuşlardır (Ni vd. 2008). Choo ve arkadaşları, vanilya özütüyle yaptıkları çalışma ile *C. violaceum*'da pigment üretiminin engellendiğini bulmuşlardır (Choo vd. 2006). Rasmussen ve arkadaşları, bitkilerden burçak, havuç, soya fasülyesi, nilüfer, domates, bezelye tohumları, biber ve sarımsağın da bakteriyel çevreyi algılama sistemini engelleyen bileşikler ürettiğini bulmuşlardır (Rasmussen 2006b). Boşgelmez-Tinaz ve arkadaşları, *Scorzonera*

*sandrisica*'dan elde edilen bileşenlerin, *E. carotovora*'da, çevreyi algılama sistemi tarafından kontrol edilen, karbapenem antibiyotiği üretimini engelleyebildiğini göstermişlerdir. Bu bitki patojeninde, patojeniteleri için gerekli olan ekstraselüler enzimler ve karbapenem antibiyotiğinin üretimi çevreyi algılama sistemine bağlı olan 3-oxo-C6-HSL tarafından düzenlenir. Bu engelleyici bileşenlerin AHL reseptör proteinine bağlanarak AHL düzenleyici davranışları engelleyebildiğini rapor etmişlerdir (Boşgelmez-Tinaz vd. 2006). Bu nedenle, *S. sandrisica* tarafından salgılanan bileşenler aracılığıyla *E. carotovora*'nın çevreyi algılama sisteminin engellemesi, bitki hastalıklarına sebep olan bu fitopatojenlerin kontrol altında tutulmasına olanak sağlayabilir. Girenavar ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, grefurt suyundan elde edilen ve kanın pıhtılaşmasını önleyen furokumarin denen maddenin *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Salmonella typhimurium*'da biyofilm oluşumunu engellediği rapor edilmiştir (Girenavar vd. 2008). *Melia dubia* (boncuk ağacı) kabuğu özütü Ravichandiran ve arkadaşları tarafından incelenmiş; 30mg/mL'lik bir konsantrasyonda, bu özütün *E. coli*'de biyofilm oluşumunu %84 oranında azalttığı ve hemolizinler gibi virülens faktörlerini %20 inhibe ettiği rapor edilmiştir (Ravichandiran vd. 2012). Benzer sonuçlar Issac Abraham ve arkadaşları tarafından da bildirilmiştir. 2mg/mL'lik bir konsantrasyonda *Capparis spinosa* (kapari) özütünün *E. coli* bakterisinde biyofilm oluşumu %73 oranında azalttığı gözlenmiştir (Issac Abraham vd. 2011). Yapılan başka bir çalışmada, *Lagerstroemia speciosa* meyve ekstraktının anti-QS aktivitesi sayesinde *P. aeruginosa* PAO1 biyofilminde tobramisine duyarlılığı arttırdığı ve LasA proteaz, LasB elastaz ve piyoverdin gibi virülens faktörlerinin ekspresyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Singh vd. 2012). Taze sarımsak özütünün de (*Allium sativum*) son derece etkili antibiyofilminin olduğu ve *P. aeruginosa*'nın piyoverdin, hemolizin ve fosfolipaz C virülens faktörlerini inhibe ettiği yapılan başka bir çalışmada rapor edilmiştir (Harjai vd. 2010). Bu veriler, bitki özütlerinin anti-QS ve antivirülens faktörü özelliklerine sahip olduğunu ve olgun biyofilm yapısını bozmakla birlikte biyofilm oluşumunu kolayca engelleyebildiklerini doğrulamaktadır. Böylece, bitki özütleri antibiyotikler gibi diğer antimikrobiyal stratejiler ile birlikte çeşitli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkili bir bakterisidal araç sağlayabilirler.

Çevreyi algılama sistemi kullanılarak gen işleyişlerinin engellenmesiyle, bakteriyel enfeksiyonlarının kontrol edilmesi de yeni stratejiler arasındadır (Kline vd. 1999). Bu karmaşık düzenleyici sistemde birçok potansiyel hedef bölgenin varlığı mevcuttur. *P. aeruginosa*'da *in vivo* olarak gerçekleştirilen kromozomal *lasI* ve *rhII* genlerindeki mutasyonların, otoindükleyici sentezini ve virülens genlerinin ekspresyonunu güçlü bir şekilde azalttığı bilinmektedir (Ochsner ve Reiser 1995; Brint ve Ohman 1995; Pearson vd. 1997; Pessi ve Haas 2000). Ayrıca *P. aeruginosa*'nın patojenitesinde çevreyi algılama sisteminin önemi, çeşitli hayvan deneyleriyle ortaya konmuştur. Bunlar arasında *Caenorhabditis elegans* nematot modeli (Tan vd. 1999), neonatal pnömonili fare modeli (Tang vd. 1996) ve yanık fare modeli (Rumbaugh vd. 1999) sayılabilir. Bu hayvan deneylerinin tümünde,

çevreyi algılama sisteminde mutasyon olan suşların orijinallerine göre daha az virulent olduğu ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, birçok mikroorganizma türü sosyal bir davranış sergilemektedir. Üretmiş oldukları sinyal molekülleri aracılığı ile birbirleri ile iletişim kurmakta, belirli bir yoğunluğa ulaşıp ulaşmadıklarını izlemekte ve yeter yoğunluğa ulaştıkları anda da virülans faktörlerinin sentezi gibi kritik gen ekspresyonlarını tetiklemektedir. Böylelikle, konağın bağışıklık sistemini zamanından önce uyararak başarılı bir enfeksiyon sürecini oluşturmaktadır. Öte yandan, quorum sensing molekülleri aracılığı ile gerçekleştirilen iletişimin bozulması durumunda ise mikroorganizmaların koordineli davranamayacakları ve başarılı bir enfeksiyon süreci ortaya koyamayacakları açıktır. Bu açıdan bakıldığında, quorum quenching çalışmalarının yeni ve önemli bir antibiyoterapi alanı olduğu görülmektedir.

### 1.5.2. Enzimler

Biyofilm matriksi DNA, proteinler ve hücre dışı polisakaritlerden oluştuğu için, son çalışmalar, biyofilm yapısının çeşitli enzimler tarafından parçalanabildiğini göstermiştir.

Deoksiribonükleaz I (DNaz I): DNaz I'in etkisi biyofilm yapısında bulunan eDNA'yı sindirme kabiliyetine bağlıdır (Qin vd. 2007). Tetz ve arkadaşları tarafından, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* ve *K. pneumoniae* tarafından oluşturulan biyofilm yapıları üzerinde DNaz I'in güçlü bir olumsuz etkisi olduğunu bildirmiştir (Tetz vd. 2009). Yapılan başka bir çalışmada ise, 6 klinik *Streptococcus pneumoniae* suşu 6 gecelik inkübasyonun ardından DNaz I ile muamele edildiğinde biyofilm yıkımının %66,7-%95 oranında indüklendiği bildirilmiştir (Hall-Stoodley vd. 2008).

Lizostafin: Kokai-Kun ve arkadaşları, lizostafinin *S. aureus* suşlarına karşı yüksek antibiyofilmin etkinliğini belirlemek için bir fare modeli kullanmışlardır. Hayvanlar dört gün boyunca günde 3 kez 15 mg/kg lizostafin ve 50 mg/kg nafsilin ile tedavi edildiğinde metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) da dâhil olmak üzere *S. aureus* biyofilmlerinin tamamen yok edildiği gösterilmiştir (Kokai-Kun vd. 2009). α-Amilazlar: Craigen ve arkadaşları tarafından *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarına karşı α-amilazların antibiyofilmin aktiviteleri analiz edilmiş ve sonuç olarak test edilen enzimlerin *S. aureus*'da biyofilm oluşumunu 5 dakikalık inkübasyonda %79 ve 30 dakikalık inkübasyonda %89 oranında azalttığı ancak, *S. epidermidis* için analiz edilen enzimlerin antibiyofilmin etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Craigen vd. 2011).

Liyaz: Yapılan bir çalışmada, iki mukoid *P. aeruginosa* suşunun biyofilmleri, aljinat liyaz (20U/mL) ve gentamisin (64µg/mL) ile muamele edildiğinde, çalışılan enzimin biyofilm matriksinin sıvılaşmasına neden olduğu, biyofilmin liyaz ve gentamisin ile 96 saatlik inkübasyonunun ise, biyofilm yapısının ve canlı bakterilerin tamamen ortadan kaldırılmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Dolayısıyla, aljinat liyazın, *P. aeruginosa* ile infekte kistik fibrozisli hastaların tedavisinde iyi bir rolü olabileceği ifade edilmiştir (Alkawash vd. 2006).

Laktonaz: Kiran ve arkadaşları, laktonazı potansiyel bir antibiyofilm ajanı olarak tanımlamışlardır. *P. aeruginosa* suşları tarafından oluşturulan biyofilmlerde, kontrol örneğine kıyasla enzim varlığında (1U/mL) %68,8-%76,8 büyüme inhibisyonu gözlenmiştir. Aynı çalışmada, laktonazın bakterinin virülens faktörlerini de önemli ölçüde azalttığı (piyosiyenin üretiminde %85-%93, proteaz aktivitesinde %86-%95, elastaz aktivitesinde %69-%91 ve piyoselin sekresyonunda %40-%90 oranında inhibisyon) tespit edilmiştir (Kiran vd. 2011).

### 1.5.3. Gümüş Nanopartiküller

Bakteriler için gümüşün ölümcüllüğü kısmen enzimleri inaktive eden tiol grubu reaksiyonlarına bağlıdır (Chen ve Schluessener 2008). Yapılan çalışmalar, gümüş ile muamelenin bakteriyel DNA replikasyonu ile ribozomal ve diğer hücrel proteinlerin ekspresyonunu engellediğini ve elektron taşıma zincirini etkilediğini göstermiştir (Bragg ve Rainnie 1974; Feng vd. 2000, Yamanaka vd. 2005). İnsanlarda gümüşün potansiyel toksisitesi, bir süre için kullanımında giderek azalmaya yol açmıştır. Bununla birlikte, gümüşün popülaritesi nanoteknolojinin ortaya çıkışı ile yeniden artmıştır (Chen ve Schluessener 2008). Kalishwaralal ve arkadaşları, *P. aeruginosa* ve *S. epidermidis* suşlarına karşı gümüş nanopartiküllerin (AgNPs) antibiyofilm aktivitesini analiz etmişler ve AgNO<sub>3</sub> içeren bu nanopartiküller (100nM) ile 24 saatlik inkübasyonun oluşan biyofilm miktarını %98 oranında inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (Kalishwaralal vd. 2010). Mohanty ve arkadaşları ise AgNPs'in *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı doz bağımlı antibiyofilm aktivitesini araştırmışlardır. Biyofilmlerin 1µM ve 2µM gümüş nanopartiküllerin varlığında 24 saatlik inkübasyonunun, sırasıyla %50 ve %85'in üzerinde bir inhibisyon oluşturduğu ve test edilen konsantrasyonların hiçbirinde belirgin bir sitotoksik etki gözlenmediği rapor edilmiştir (Mohanty vd. 2012).

### 1.5.4. Lipozomlar

Lipozomlar, biyo-uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen, sulu hidrofilik çekirdek ve lipofilik çift katlı lipid tabakalarından oluşan küresel şekilli veziküllerdir (Alipour vd. 2010). Antibiyotiklerin etkinliğini arttırmak için lipozomların kullanımının, uygun bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Lipozomlar, ilaç moleküllerinin taşıyıcısı olarak görev yaparlar, bu da yaşam sürelerini artırır ve konakçıdaki toksisiteyi azaltır. Lipozom kapsüllü antimikrobiyal ajanlar, insanlarda ve hayvan modellerinde, protozoon, mantar ve bakteriyel infeksiyonların ortadan kaldırılmasına yönelik olarak başarıyla test edilmiştir. Oluşturulan biyofilmin yok edilmesinde lipozomlar uygulanabilmektedir, çünkü antibiyotik bir lipozom taşıyıcı içine kapsülendiğinde EPS ile etkileşime girmez, biyofilm matriksinde görülebilen antibiyotikleri inaktive eden enzimlerin (β-laktamazlar gibi) degradasyonundan korunur ve sonuçta antibiyotik etkisini biyofilmin sadece yüzeyinde değil çekirdeğinde de gösterebilir. Klaritromisin içeren lipozomlar, biyofilm oluşturan *P. aeruginosa*'ya karşı test edildiğinde, biyofilm üretiminde ve bakteriyel virülens faktörlerinden seçirme (twitching), yüzme (swimming) ve

kayma (swarming) hareketlerinde önemli bir düşüş gözlemlendiği, ayrıca serbest ilaçtan daha az sitotoksikite gösterdiği rapor edilmiştir (Soto 2014).

### 1.5.5. Düşük Enerjili Yüzey Akustik Dalgaları

Yüzey akustik dalgalar, bir sıvının veya katının yüzeyinde ilerleyen dalgadır. Elektromanyetik olmaktan çok mekanik (akustik) dalgalardır. Bu dalgaların planktonik mikroorganizmaların hücrel yüzeylere yapışmasına müdahale ettiği rapor edilmiştir (Soto 2014). Yapılan başka bir çalışmada ise, düşük enerjili yüzey akustik dalgaları bir antibiyotikle eş zamanlı olarak *E. coli*, *S. epidermidis* ve *P. aeruginosa* biyofilmlerine uygulandığında bakterileri %85'in üzerinde yok ettiği rapor edilmiştir (Kopel vd. 2011).

### 1.5.6. Yüzey Modifikasyonu veya Yüzey Kaplama

Birçok biyofilm, kateter veya plastik implantlar gibi abiyotik yüzeylerde oluştuğundan, biyofilm oluşumundaki ilk adım olan bakterilerin bu cihazlar üzerine yapışmasını önleyen kaplamalar üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Gümüş iyonları ile kaplanmış veya içine gümüş iyonlarının dahil edildiği materyaller, yavaş yavaş salınan antibiyotikleri içeren materyaller, içsel özellikleri (örneğin yüzey hidrofobisitesi) değiştirilmiş materyaller ve yapışkan olmayan yüzeylerin kullanıldığı materyallerin (heparin veya fosforikolin kaplamalar gibi) etkinliği çeşitli çalışmalarda test edilmiştir (Morris ve Stickler 1998; Tenke vd. 2004; Chilukuri ve Shah 2005; Chauhan vd. 2014). Bakteriyel kolonizasyonu önleyecek bu değişikliğin muhtemel infeksiyonları da azaltacağı düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, zwitteriyonik polimerik sülfobetain ile kaplanan kateterlerin hem *S. aureus* hem de *E. coli*'nin yapışmasını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Smith vd. 2012).

### 1.5.7. Faj Terapi

Bakteriyofajlar, antibiyotiklerin keşfinden önce Rusya ve Doğu Avrupa'da antibakteriyel tedavi amacıyla kullanılmış ve çoklu ilaç dirençli bakteri kökenli infeksiyonlarda yakın zamanda dramatik artışlar, bu yaklaşıma yeni bir ilgi uyandırmıştır (Knoll ve Mylonakis 2014). Fajlar, geleneksel antibiyotiklerden çok önemli avantajlar sunmaktadır. Fajlar bol miktarda bulunur ve çok çeşitli ortamlardan izole edilebilirler. Bakteriler, hatta belirli suşlar ve bakteri türleri için spesifiktirler, insan hücrelerine bulaşmazlar ve normal mikrobiyal flora üzerinde çok az veya hiç etkisi yoktur. Sınırlamalar arasında bakteriyel direnç ve bağışıklık tepkilerinin gelişimi, bakteriyel endo ve ekzotoksinlerden arındırmada güçlükler sayılabilir (Pires vd. 2015). Belirtilen gibi, fajların belirgin bir şekilde spesifik olma avantajı vardır, ancak bir tür içindeki birçok türü ve çoğu suşu hedeflemek için çoklu faj kokteylinin gerekliliği bir dezavantajdır. Bununla birlikte, birkaç faj kokteylinin hayvan infeksiyon modelinde etkinliği test edilmiştir (Knoll ve Mylonakis 2014). Yapılan bir çalışmada, Biophage-PA adı verilen 6 anti-*Pseudomonas aeruginosa* fajından oluşan kokteyl, kronik *P. aeruginosa* otiti olan 24 hastanın kulaklarındaki (her grupta 12) bakteri

sayısını azaltmak için plaseboya göre daha etkili olmuştur (Wright vd. 2009). Bu küçük klinik çalışmada Biophage-PA'nın güvenli ve etkin bir yöntem olduğu rapor edilmiştir. Fajlar biyofilm yapısındaki EPS'yi bozmak ve bakteri hücrelerine erişmek için polisakkarit depolimerazları üretmektedirler (Shapiro ve Kushmaro 2011). Yapılan bir çalışmada, doğal süreci taklit etmek için, polisakkarit depolimeraz genleri içermeyen T7 fajı, T7 $\phi$ 10 promotörünün kontrolü altında *Actinobacillus actinomycetemcomitans*'ın polisakkarit depolimeraz geni dspB'yi içerecek şekilde genetik olarak tasarlanmış ve oluşan bu mühendislik fajı, tek tür bir *E. coli* biyofilminde bakteri sayısını doğal türdeki T7 fajından 100 kat fazla azalttığı rapor edilmiştir (Lu ve Collins 2007). Bununla birlikte, enzim dspB ve diğer polisakkarit depolimerazlar genel olarak dar substrat özgüllüklerine sahiptir. Her bir enzim, doğal çok türlü biyofilmlerde polisakkarit havuzunun küçük bir bölümünü oluşturan az sayıdaki ilgili polisakkaridi parçalamaktadır. Dolayısıyla, bu fajların antibiyofilm etkinliği sınırlıdır (Flemming ve Wingender 2010; Kay vd. 2011). Bu kısıtlamaya rağmen, bir başka çalışmada *Bacillus anthracis*'ten AHL lactonase *aiiA* genini içeren bir mühendislik ürünü olan T7 fajının çeşitli bakterilerde AHL'ların laktin halkalarını parçaladığı ve *P. aeruginosa* ve *E. coli*'den oluşan karışık bir biyofilminde ise biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Pei ve Lamas-Samanamud 2014).

### 1.5.8. Prebiyotikler

Bakteriyel interferans ya da patojen olmayan suşların mesaneye yerleştirilmesi, üropatojen kolonizasyonunun engellenmesi yoluyla semptomatik infeksiyonun önlenmesi potansiyeline sahiptir (Reid vd. 2001). *In vitro* (Trautner vd. 2002; 2003) ve *in vivo* (Darouiche vd. 2001) çalışmalar, *E. coli* 83972'in patojen olmayan suşlarının, çeşitli üropatojenlerin kateter kolonizasyonunu azalttığını göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, *E. coli* 83972 ile aşılanmış 21 hastada bakteriüri semptomunun görülmediği; aynı hasta grubunda kolonizasyon öncesi yılda ortalama 3.1 semptomatik üriner sistem enfeksiyonunun görüldüğü rapor edilmiştir (Hull vd. 2000). Benzer bir çalışmada, üriner kateter yüzeyi *E. coli*'nin kolinesin üreten avirüent suşuyla kolonize edildiğinde, *E. coli*'nin üropatojenik klinik izolatının *in vitro* kolonizasyonunun engellendiği rapor edilmiştir (Trautner vd. 2005).

### 1.5.9. Antimikrobiyal Peptitler

Antimikrobiyal peptitler, 5 ila 50 amino asit uzunluğunda, amfipatik, hidrofobik ve pozitif yüklü küçük moleküller olarak tanımlanır (Kang vd. 2017). Enfeksiyöz ajanlara karşı doğal konak savunmalarında önemli bir bileşen olan antimikrobiyal peptitler doğada her yerde bulunmaktadır ve yeni antibiyotik tiplerinin geliştirilebilmesi açısından önemlidirler (Yang vd. 2002). Enfeksiyonlarla savaşmak için nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlar gibi immün hücreler tarafından doğal olarak üretilen bu peptitler (Friedrich vd. 2001; Perron vd. 2006; Padhi vd. 2014; Mattar vd. 2016), biyolojik numune gereksiniminin fazla olması ve ifade zorluğu gibi nedenlerle araştırmacılar

tarafından biyoaktivitelerini arttırmak için ya doğal antimikrobiyal peptitlerin amino asit sekansları değiştirilerek ya da biyoinformatik araçlar kullanılarak tamamen sentetik de novo moleküller olarak üretilmeye başlanmıştır (Zasloff 2002; Hilpert vd. 2009; Schr 2010; Corsado vd. 2016; Meneguetti vd. 2017). Bununla birlikte, olası terapi stratejileri olarak düşünülmeden önce etkinlik spektrumu ve etki mekanizmasının daha kesin tanımlanması gerekmektedir. Katelisinidler antimikrobiyal peptitlerin en önemli sınıflarından birini oluşturmaktadır. Son çalışmalarda, SMAP-29, BMAP-28 ve BMAP-27'nin, CF (kistik fibroz) hastalarından izole edilen çoklu ilaç dirençli (MDR) *P. aeruginosa* soylarında biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azalttığı ve önceden oluşmuş biyofilm içerisindeki bakterileri öldürdüğü gösterilmiştir (Pompilio vd. 2011).

Litik peptitler, biyofilm oluşumu üzerindeki inhibisyon etkileri açısından değerlendirilen bir grup antimikrobiyal peptitlerdir. Litik peptitler bakteri hücre zarının LPS (lipopolisakkarit) parçalarına bağlanarak membran stabilitesini bozar. *S. aureus* ile yapılan çalışmalar, litik peptit PTP-7'nin *in vitro* biyofilm oluşumunu engellediğini ve önceden oluşturulmuş biyofilmindeki derin tabakaya difüze olabildiğini ve biyofilm bakterilerinin %99.9'unu öldürdüğünü göstermiştir (Kharidia ve Liang 2011). Aktif peptitlerin izole edilebildiği doğal kaynaklar neredeyse sınırsızdır. Bu nedenle, potansiyel yeni peptitlerin ortaya çıkışı durmayacaktır. Gelecekte peptitlerin aşılarda, teşhis, kozmetik alanda ve hatta zararlıları kontrol etmek için tarımda işlevsel gıdalar ve nutrasötikler olarak kullanılmaları beklenmektedir. Bu alandaki gelişmelerle, peptid ilaçların potansiyeli büyüktür ve önümüzdeki birkaç on yıl boyunca, peptitler muhtemelen modern tıp ve eczacılıkta öncü bir rol üstlenecektir.

### 1.5.10. Ekzopolisakkaritler

Ekzopolisakkaritler, biyofilm oluşumu ve stabilizasyonu için kritik olan hücre-yüzey ve hücre-hücre etkileşimlerine aracılık ederler. Bu tür polisakkaritleri sentezleyemeyen mutantlar tipik olarak aderans ve biyofilm oluşumunda yetersizdirler ve bu nedenle antibiyotikler ve konak canlılığının bağışıklık sistemine oldukça duyarlıdır (Rendueles vd. 2012). Bununla birlikte, yapılan son çalışmalarda bazı bakteriyel ekzopolisakkaritlerin diğer türlerde biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Qin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *P. aeruginosa*'nın Pel ve Psl içeren kültür süpernatantlarının önceden oluşturulmuş *S. epidermidis* ve *S. aureus* biyofilmlerinin yapısını bozduğu gösterilmiştir (Qin vd. 2009). Non-biyosidal antibiyotik özelliklerine sahip polisakkaritler, çeşitli türlerin hücresiz biyofilm özlerinden izole edilmiştir. Ekzopolisakkaritlerin antibiyofilm özelliklerinin, (a) bakteri hücrelerinin veya abiyotik yüzeylerin fiziksel özelliklerini değiştirebilme, (b) duyarlı bakterilerin gen ifadelerini etkileyen sinyal molekülleri olarak hareket edebilme veya (c) çok değerlikli karbonhidrat-protein etkileşimlerini rekabetçi bir şekilde inhibe ederek yapışmayı engelleyebilme özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Antibiyofilm polisakkaritleri, biyofilm ile ilgili infeksiyonların tedavisi ve önlenmesi için uygun bir strateji olabilir. Ayrıca, yapılan bir çalışma

antibiyofilm polisakaritlerinin bir adjuvan olarak değerli olabileceğini düşündürmektedir, çünkü birlikte verildiğinde antibiyotik işlevlerini arttırmaktadırlar (Rendueles vd. 2012).

### 1.5.11. Şelatlayıcı Ajanlar

Kalsiyum, magnezyum ve demir gibi metal katyonlar, matriks bütünlüğünün korunmasıyla ilişkilendirilmiştir (Patrauchan vd. 2005; Raad vd. 2008). Bu gözlem ile uyumlu olarak, bu maddelerin, bakteri membranının stabilitesine müdahale etmenin yanı sıra biyofilm mimarisini de istikrarsızlaştırdığı gösterilmiştir (Donlan 2011). Örneğin, sodyum sitratın *in vitro* olarak birkaç Stafilokok türünde biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Shanks vd. 2006). Bir kalsiyum-spesifik şelatlayıcı ajan olan EDTA'nın ise *P. aeruginosa* biyofilminde hızlı ve büyük parçalar halinde kopmalara yol açtığı rapor edilmiştir (Banin vd. 2006).

### 1.5.12. D-aminoasitler

*B. subtilis*'ten elde edilen ekzojen D-amino asitlerin önceden oluşturulmuş biyofilmleri bozduğu ve *S. aureus* ve *P. aeruginosa* tarafından biyofilm oluşumunun önlenmesinde etkili olduğunu gösterilmiştir (Kolodkin-Gal vd. 2010). Hochbaum ve arkadaşları tarafından D-amino asitlerin hücre yüzeyinde protein lokalizasyonunu önleyerek, *S. aureus*'un biyofilm oluşumunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Hochbaum vd. 2011). D-amino asitlerin birçok bakteri türü tarafından üretildiği göz önüne alındığında, biyofilm yapısının bozulması için genel bir strateji sağlayabilir ve bu nedenle tıbbi ve endüstriyel antibiyofilm uygulamalarında faydalı olabilir. Yakın zamanda ise *B. subtilis*'te ikinci bir antibiyofilm molekülü keşfedilmiştir. Norspermidin de ekzopolisakkarit tabakayı hedefleyerek D-amino asitlere tamamlayıcı bir şekilde çalışmaktadır. D-amino asitlerde olduğu gibi, norspermidinin de *B. subtilis*, *S. aureus* ve *E. coli*'de biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Dolayısıyla, spesifik ekzopolisakkaritlere bağlanmak için sentezlenen norspermidin ve diğer poliaminler, yeni bir antibiyofilm yaklaşımı olarak D-amino asitlerle birlikte kullanılabilir (Kolodkin-Gal vd. 2012).

## 2. Sonuç

Biyofilm oluşumu, bakteriyel patojenlere çok çeşitli konukçuları kolonize etmelerini sağlar ve eradikasyonlarını zorlaştırır. Biyofilm özellikleri, hangi antimikrobik tedavilerin ne ölçüde etkili olabileceğini belirler. Biyofilmin yaşı ve bileşimi yerleşik mikroorganizmaların duyarlılığını etkileyen başlıca faktörlerdir. Biyofilm olgunlaştıkça, artan EPS birikimi ile birlikte biyofilme antimikrobiyal ajanların girişi ve aktivitesinde azalma meydana gelir.

Biyofilm infeksiyonlarının tedavisi şu anda mikrobiyologlar ve klinisyenler için zor ve karmaşık bir sorundur. Tek başına antibiyotik tedavisi genellikle biyofilm infeksiyonlarının üstesinden gelmek için yetersizdir. Bununla birlikte, mikrobiyal biyofilmlerin doğasını daha iyi anlamak için yapılan yeni araştırmaların ilerleyişi ile birlikte biyofilm infeksiyonlarıyla mücadelede fayda sağlayan ve

desteklemeye devam edecek olan daha ayrıntılı bilgilere ulaşılmaktadır. Günümüzde, biyofilm infeksiyonlarının tedavisi, klinik mikrobiyoloji, cerrahi, iç hastalıkları, farmakoloji ve temel bilimlerde (yani, çok disiplinli bir işbirliği) işbirliğine ihtiyaç duymaktadır.

Bu nedenle, bakterilerin yüzeye tutunmasını engelleyen maddelerinin kullanımı gibi bakterileri öldürmeden spesifik bir biyofilm basamağını engellemek veya bakteriyel biyofilm yapısını bozmayı teşvik etmek için doğal, bakteriyel olarak üretilen sinyalleri kullanmak üzere tasarlanan yeni stratejiler, hızlı etki eden, güçlü ve biyolojik olarak temin edilebilir tedavi stratejileridir. Sunulan bu alternatif tedavilerle kombinasyon, bakteriyel biyofilm infeksiyonlarında antibiyotik tedavisinin etkinliğini artırmak için büyük potansiyele sahip olabilir.

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

## Kaynaklar

- Alipour M, Suntres Z, Lafrenie R, Omri A. 2010. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors and Biofilms by Co-Encapsulation of Bismuth-Ethanedithiol with Tobramycin in Liposomes. *J Antimicrob Chemother*, 65/4: 684–693.
- Alkawash MA, Soothill JS, Schiller NL. 2006. Alginate Lyase Enhances Antibiotic Killing of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *APMIS*, 114/2: 131–138.
- Aparna MS, Yadav S. 2008. Biofilms: Microbes and Diseases. *Braz J Infect Dis*, 12/6: 526–530.
- Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg EP, Høiby N. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Imipenem Exhibit Changes in Global Gene Expression and  $\beta$ -lactamase and Alginate Production. *Antimicrob Agents Chemother*, 48/4: 1175–1187.
- Banin E, Brady KM, Greenberg EP. 2006. Chelator-Induced Dispersal and Killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cells in a Biofilm. *Appl Environ Microbiol*, 72/3: 2064–2069.
- Beveridge TJ, Makin SA, Kadurugamuwa JL, Li Z. 1997. Interactions Between Biofilms and the Environment. *FEMS Microbiol Rev*, 20: 291–303.
- Bjarnsholt T, Jensen PØ, Burmølle M, Hentzer M, Haagensen JA, Hougen HP, Calum H, Madsen KG, Moser C, Molin S, Høiby N, Givskov M. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* Tolerance to Tobramycin, Hydrogen Peroxide and Polymorphonuclear Leukocytes is Quorum-Sensing Dependent. *Microbiology*, 151: 373–383.
- Boşgelmez-Tinaz G, Ulusoy S, Ugur A, Ceylan O. 2006. Inhibition of Quorum Sensing-Regulated Behaviors by *Scorzonera sandrasica*. *Curr Microbiol*, 55/2: 114–118.
- Bragg PD, Rannie DJ. 1974. The Effect of Silver Ions on the Respiratory Chain of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*, 20: 883–889.
- Brint JM, Ohman DE. 1995. Synthesis of Multiple Exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is Under the Control of RhIR-RhII, Another Set of Regulators in Strain PAO1 with Homology to the Autoinducer-Responsive LuxR-LuxI Family. *J Bacteriol*, 177: 7155–7163.
- Brown MR, Allison DG, Gilbert P. 1988. Resistance of Bacterial Biofilms to Antibiotics: A Growth-Rate Related Effect? *J Antimicrob Chemother*, 22/6: 777–780.
- Cardoso MH, Ribeiro SM, Nolasco DO, de la Fuente-Núñez C, Felício MR, Gonçalves S, Matos CO, Liao LM, Santos NC, Hancock RE, Franco OL, Migliolo L.

2016. A Polyalanine Peptide Derived from Polar Fish with Anti-Infectious Activities. *Sci Rep* 6: 21385.
- Carlier A, Uroz S, Smadja B, Fray R, Latour X, Dessaux Y, Faure D. 2003.** The Ti Plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* Harbors an attM-Paralogous Gene, aiiB, also Encoding N-Acyl Homoserine Lactonase Activity. *Appl Environmental Microbiol*; 69: 4989–4993.
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. 1999.** The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol*, 37/6: 1771–1776.
- Chauhan A, Bernardin A, Mussard W, Kriegel I, Estève M, Ghigo JM, Beloin C, Semetey V. 2014.** Preventing Biofilm Formation and Associated Occlusion by Biomimetic Glycocalyxlike Polymer in Central Venous Catheters. *J Infect Dis*, 210/9: 1347–1356.
- Chen X, Schluesener HJ. 2008.** Nanosilver: A Nanoproduct in Medical Application. *Toxicol Lett*, 176/1: 1–12.
- Chiang WC, Nilsson M, Jensen PØ, Høiby N, Nielsen TE, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2013.** Extracellular DNA Shields Against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 57/5: 2352–2361.
- Chilukuri DM, Shah JC. 2005.** Local Delivery of Vancomycin for the Prophylaxis of Prosthetic Device-Related Infections. *Pharm Res*, 22/4: 563–572.
- Choo JH, Rukayadi Y, Hwang JK. 2006.** Inhibition of Bacterial Quorum Sensing by Vanilla Extract. *Lett Appl Microbiol*, 42/6: 637–641.
- Costerton JW. 1999.** Introduction to Biofilm. *Int J Antimicrob Agents*, 11/3-4: 217–221.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng K-J. 1978.** How bacteria stick. *Sci Am*, 238: 86–95.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995.** Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49: 711–745.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999.** Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284/5814:1318–1322.
- Craigen B, Dashiff A, Kadouri DE. 2011.** The Use of Commercially Available Alpha-Amylase Compounds to Inhibit and Remove *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Open Microbiol J*, 5: 21–31.
- Darouiche RO, Donovan WH, Del TM, Thornby JI, Rudy DC, Hull RA. 2001.** Pilot Trial of Bacterial interference for Preventing Urinary Tract Infection. *Urology*, 58: 339–344.
- Davies DG, Geesey GG. 1995.** Regulation of the Alginate Biosynthesis Gene *alg C* in *Pseudomonas aeruginosa* During Biofilm Development in Continuous Culture. *Appl Environ Microbiol* 61/3: 860–867.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. 1998.** The Involvement of Cell-To-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science*, 280/5361: 295–298.
- Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. 2002.** Identification of Quorum-Quenching N-Acyl Homoserine Lactonases from Bacillus Species. *Appl Environ Microbiol*, 68/4: 1754–1759.
- Donlan RM. 2011.** Biofilm Elimination on Intravascular Catheters: Important Considerations for the Infectious Disease Practitioner. *Clin Infect Dis*, 52/8: 1038–1045.
- Donlan RM, Costerton JW. 2002.** Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15/2: 167–193.
- Drenkard E. 2003.** Antimicrobial Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Microbes Infect*, 5/13: 1213–1219.
- Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. 2008.** Increased Mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 61/5: 1053–1056.
- Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. 2000.** A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*, 52/4: 662–668.
- Ferrières L, Hancock V, Klemm P. 2007.** Biofilm Exclusion of Uropathogenic Bacteria by Selected Asymptomatic Bacteriuria *Escherichia coli* Strains. *Microbiology*, 153: 1711–1719.
- Fey PD, Olson ME. 2010.** Current Concepts in Biofilm Formation of *Staphylococcus epi-dermidis*. *Future Microbiology*, 5/6: 917–933.
- Flemming HC, Wingender J. 2010.** The Biofilm Matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8/9: 623–633.
- Fong IW. 2009.** Emerging Issues and Controversies in Infectious Disease. Springer Science & Business Media, LLC, New York, USA.
- Friedrich CL, Rozek A, Patrzykat A, Hancock REW. 2001.** Structure and Mechanism of Action of an Indolicidin Peptide Derivative with Improved Activity Against Gram-Positive Bacteria. *J Biol Chem*, 276: 24015–24022.
- Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. 1994.** Quorum Sensing in Bacteria: The LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators, *J Bacteriol*, 176/2: 269–275.
- Ghigo JM. 2001.** Natural Conjugative Plasmids Induce Bacterial Biofilm Development. *Nature*, 412/6845: 442–445.
- Girenavar B, Cepeda ML, Soni KA, Vikram A, Jesudhasan P, Jayaprakasha GK, Pillai SD, Patil BS. 2008.** Grapefruit Juice and its Furocoumarins Inhibits Autoinducer Signaling and Biofilm Formation in Bacteria. *Int J Food Microbiol*, 125/2: 204–208.
- Givskov M, de Nys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R, Eberl L, Molin S, Steinberg PD, Kjelleberg S. 1996.** Eukaryotic Interference with Homoserine Lactone-Mediated Prokaryotic Signalling. *J Bacteriol*, 178/22: 6618–6622.
- Govan JR, Deretic V. 1996.** Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev*, 60/3: 539–574.
- Gupta SK, Berk RS, Masinick S, Hazlet LD. 1994.** Pili and Lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* Bind to the Glycolipid Asialo GM1. *Infect Immun*, 62/10: 4572–4579.
- Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, Johnson C, Hu FZ, Stoodley P, Erlich GD, Post JC. 2008.** Characterization of Biofilm Matrix, Degradation by DNase Treatment and Evidence of Capsule Downregulation in *Streptococcus pneumoniae* Clinical Isolates. *BMC Microbiology*, 8: 173.
- Harjai K, Kumar R, Singh S. 2010.** Garlic Blocks Quorum Sensing and Attenuates the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 58/2: 161–168.
- Heilmann C, Gerke C, Perdreau-Remington F, Götz F. 1996.** Characterization of Tn917 Insertion Mutants of *Staphylococcus epidermidis* Affected in Biofilm Formation. *Infection and Immunity*, 64/1: 277–282.
- Hentzer M, Givskov M, 2003.** Pharmacological Inhibition of Quorum Sensing for the Treatment of Chronic Bacterial Infections. *J Clin Invest*, 112/9: 1300–1307.
- Hilpert K, Elliott M, Jenssen H, Kindrachuk J, Fjell CD, Körner J, Winkler DFH, Weaver LL, Henklein P, Ulrich AS, Chiang SHY, Farmer SW, Pante N, Volkmer R, Hancock RE. 2009.** Screening and

- Characterization of Surface-tethered Cationic Peptides for Antimicrobial Activity. *Chem Biol*, 16/1:58–69.
- Hochbaum AI, Kolodkin-Gal I, Foulston L, Kolter R, Aizenberg J, Losick R. 2011.** Inhibitory Effects of D-Amino Acids on *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. *J Bacteriol*, 193/20: 5616–5622.
- Hull R, Rudy D, Donovan W, Svanborg C, Wieser I, Stewart C, Darouiche R. 2000.** Urinary Tract Infection Prophylaxis Using *Escherichia coli* 83972 in Spinal Cord Injured Patients. *J Urol*, 163/3: 872–877.
- Issac Abraham SV, Palani A, Ramaswamy BR, Shunmugiah KP, Arumugam VR. 2011.** Antiquorum Sensing and Antibiofilm Potential of *Capparis spinosa*. *Arch Med Res*, 42/8: 658–668.
- Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirliff ME. 2008.** Complicated Catheter Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*, 21/1: 26–59.
- Jayaraman A, Wood TK. 2008.** Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. *Annu Rev Biomed Eng*, 10: 145–167.
- Jesaitis AJ, Franklin MJ, Berglund D, Sasaki M, Lord CI, Bleazard JB, Duffy JE, Beyenal H, Lewandowski Z. 2003.** Compromised Host Defense on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Characterization of Neutrophil and Biofilm Interactions. *J Immunol*, 171/8: 4329–4339.
- Kahlmeter G. 2003.** An International Survey of the Antimicrobial Susceptibility of Pathogens from Uncomplicated Urinary Tract Infections: The ECO.SENS Project. *J Antimicrob Chemother*, 51/1: 69–76.
- Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. 2010.** Silver Nanoparticles Impede the Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 79/2: 340–344.
- Kang HK, Kim C, Seo CH, Park Y. 2017.** The Therapeutic Applications of Antimicrobial Peptides (AMPs): A Patent Review. *J Microbiol*, 55/1: 1–12.
- Kay MK, Erwin TC, McLean RJ, Aron GM. 2011.** Bacteriophage Ecology in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Mixed-Biofilm Communities. *Appl Environ Microbiol*, 77/3: 821–829.
- Kharidia R, Liang JF. 2011.** The Activity of a Small Lytic Peptide PTP-7 on *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J Microbiol*, 49/4: 663–668.
- Kiran S, Sharma P, Harjai K, Capalash N. 2011.** Enzymatic Quorum Quenching Increases Antibiotic Susceptibility of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol*, 3/1: 1–12.
- Kline T, Bowman J, Iglewski BH, de Kievit T, Kakai Y, Passador L. 1999.** Novel Synthetic Analogs of the *Pseudomonas* Autoinducer. *Bioorg Med Chem Lett*, 9/24: 3447–3452.
- Knoll BM, Mylonakis E. 2014.** Antibacterial Bioagents Based on Principles of Bacteriophage Biology: An Overview. *Clin Infect Dis*, 58/4: 528–534.
- Kokai-Kun JF, Chanturiya T, Mond JJ. 2009.** Lysostaphin Eradicates Established *Staphylococcus aureus* Biofilms in Jugular Vein Catheterized Mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64/1: 94–100.
- Kokare CR, Chakraborty S, Khobade AN, Mahadik KR. 2009.** Biofilms: Importance and Applications. *Indian J Biotechnol*, 8: 159–168.
- Kolodkin-Gal I, Cao S, Chai L, Bottcher T, Kolter R, Clardy J, Losick R. 2012.** A Self-Produced Trigger For Biofilm Disassembly That Targets Exopolysaccharide. *Cell*, 149/3: 684–692.
- Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R. 2010.** D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science*, 328/5978: 627–629.
- Kopel M, Degtyar E, Banin E. 2011.** Surface Acoustic Waves Increase the Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antibiotic Treatment. *Biofouling*, 27/7: 701–711.
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. 2013.** Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3/4: a010306.
- Kumar C, Anand S. 1998.** Significance of Microbial Biofilms in the Food Industry: A Review. *Int J Food Microbiol*, 42/1-2: 9–27.
- Kuramitsu HK. 2001.** Virulence Properties of Oral Bacteria: Impact of Molecular Biology. *Curr Issues Mol Biol*, 3/2: 35–36.
- Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S. 2004.** Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*, 186/3: 692–698.
- Leadbetter JR, Greenberg EP. 2000.** Metabolism of Acylhomoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol*, 182: 6921–6926.
- Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. 2005.** The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN-Gamma mediated Macrophage Killing. *J Immunol*, 175/11: 7512–7518.
- Li YH, Tian X. 2012.** Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors (Basel)*, 12/3: 2519–2538.
- Lindsay D, Von Holy A. 2006.** Bacterial Biofilms Within the Clinical Setting: What Healthcare Professionals Should Know? *J Hosp Infect*, 64/4: 313–325.
- Lu TK, Collins JJ. 2007.** Dispersing Biofilms with Engineered Enzymatic Bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 104/27: 11197–11202.
- Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil CW, Dodd CE, Williams P. 2002.** The Regulation of Biofilm Development by Quorum Sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol*, 4/1: 18–28.
- Mah TF, O'Toole GA. 2001.** Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents. *Trends Microbiol*, 9/1: 34–39.
- Manavathu EK, Vazquez JA. 2014.** Biofilms: Emerging Importance in Infectious Diseases. *J Multidiscip Pathol*, 1/2: 1–13.
- Manefield M, de Nys R, Kumar N, Read R, Givskov M, Steinberg P, Kjelleberg S. 1999.** Evidence that Halogenated Furanones from *Delisea pulchra* Inhibit Acylated Homoserine Lactone (AHL)-Mediated Gene Expression by Displacing the AHL Signal from its Receptor Protein. *Microbiology*, 145: 283–291.
- March JC, Bentley WE. 2004.** Quorum Sensing and Bacterial Cross-Talk in Biotechnology. *Curr Opin Biotech*, 15/5: 495–502.
- Mattar EH, Almehdar HA, Yacoub HA, Uversky VN, Redwan EM. 2016.** Antimicrobial Potentials and Structural Disorder of Human and Animal Defensins. *Cytokine Growth Factor Rev*, 28: 95–111.
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GSAB, Williams P. 1997.** Quorum Sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of Violacein Production and Inhibition for the Detection of N-Acylhomoserine Lactones. *Microbiology*, 143: 3703–3711.
- Meneguetti BT, Machado LD, Oshiro KGN, Nogueira ML, Carvalho CME, Franco OL. 2017.** Antimicrobial

- peptides from fruits and their potential use as biotechnological tools—a review and outlook. *Front Microbiol*, 7: 2136.
- Mohanty S, Mishra S, Jena P, Jacob B, Sarkar B, Sonawane A. 2012.** An Investigation on the Antibacterial, Cytotoxic, and Antibiofilm Efficacy of Starch-Stabilized Silver Nanoparticles. *Nanomedicine*, 8/6: 916–924.
- Morris NS, Stickler DJ. 1998.** Encrustation of Indwelling Urethral Catheters by *Proteus mirabilis* Biofilms Growing in Human Urine. *J Hosp Infect*, 39: 227–234.
- Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. 2008.** Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathog*, 4/11: e1000213.
- Ni N, Li M, Wang J, Wang B. 2008.** Inhibitors and Antagonists of Bacterial Quorum Sensing. *Med Res Rev*, 29/1: 65–124.
- Ochsner UA, Reiser J. 1995.** Autoinducer-Mediated Regulation of Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in *P. aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92/14: 6424–6428.
- O'toole GA, Kolter R. 1998.** Flagellar and Twitching Motility are Necessary for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *Mol Microbiol* 30/2: 295–304.
- Padhi A, Sengupta M, Sengupta S, Roehm KH, Sonawane A. 2014.** Antimicrobial Peptides and Proteins in Mycobacterial Therapy: Current Status and Future Prospects. *Tuberculosis*, 94/4: 363–373.
- Park SY, Lee SJ, Oh TK, Oh JW, Koo BT, Yum DY, Lee JK. 2003.** AhlD, an N-Acylhomoserine Lactonase in *Arthrobacter sp.*, and Predicted Homologues in Other Bacteria. *Microbiology*, 149: 1541–1550.
- Parsek MR, Greenberg EP. 2005.** Sociomicrobiology: The Connections Between Quorum Sensing and Biofilms. *Trends Microbiol*, 13/1: 27–33.
- Patrauchan MA, Sarkisova S, Sauer K, Franklin MJ. 2005.** Calcium Influences Cellular and Extracellular Product Formation During Biofilm-Associated Growth of a Marine *Pseudoalteromonas sp.* *Microbiology*, 151: 2885–2897.
- Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. 1997.** Roles of *P. aeruginosa las* and *rhl* Quorum-Sensing Systems in Control of Elastase and Rhamnolipid Biosynthesis Genes. *J Bacteriol*, 179/18: 5756–5767.
- Pei R, Lamas-Samanamud GR. 2014.** Inhibition of Biofilm Formation by T7 Bacteriophages Producing Quorum Quenching Enzymes. *Appl Environ Microbiol*, 80/17: 5340–5348.
- Perron GG, Zasloff M, Bell G. 2006.** Experimental Evolution of Resistance to an Antimicrobial Peptide. *Proc Biol Sci*, 273: 251–256.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. 1997.** Regulation of *las* and *rhl* Quorum Sensing in *P. aeruginosa*. *J Bacteriol*, 179/10: 3127–3132.
- Pessi G, Haas D. 2000.** Transcriptional Control of the Hydrogen Cyanide Biosynthetic Genes *hcnABC* by the Anaerobic Regulator ANR and the Quorum-Sensing Regulators LasR and RhlR in *P. aeruginosa*. *J Bacteriol*, 182/24: 6940–6949.
- Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. 2015.** Phage Therapy: A Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Virol*, 89/15: 7449–7456.
- Pompilio A, Scocchi M, Pomponio S, Guida F, Di Primio A, Fiscarelli E, Gennaro R, Di Bonaventura G. 2011.** Antibacterial and Anti-Biofilm Effects of Cathelicidin Peptides Against Pathogens Isolated From Cystic Fibrosis Patients. *Peptides*, 32/9: 1807–1814.
- Potera C. 1999.** Forging a Link Between Biofilms and Disease. *Science*, 283/5409: 1837–1839.
- Pratt LA, Kolter R. 1998.** Genetic Analysis of *Escherichia coli* Biofilm Formation—Roles of Flagella, Motility, Chemotaxis and Type I Pili. *Mol Microbiol* 30/2: 285–293.
- Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D. 2007.** Role of Autolysin-Mediated DNA Release in Biofilm Formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 153: 2083–2092.
- Qin Z, Yang L, Qu D, Molin S, Tolker-Nielsen T. 2009.** *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Products Inhibit Staphylococcal Growth, and Disrupt Established Biofilms Produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 155: 2148–2156.
- Raad II, Fang X, Keutgen XM, Jiang Y, Sherertz R, Hachem R. 2008.** The Role of Chelators in Preventing Biofilm Formation and Catheter-Related Bloodstream Infections. *Curr Opin Infect Dis*, 21/4: 385–392.
- Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT, Terleckyj OD, Young JM. 2005.** Bacterial Communication (Quorum Sensing) Via Ligands and Receptors: A Novel Pharmacologic Target for the Design of Antibiotic Drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 312/2: 417–423.
- Rasmussen TB, Givskov M. 2006a.** Quorum-Sensing Inhibitors as Antipathogenic Drugs. *Int J Med Microbiol*, 296/2-3: 149–161.
- Rasmussen TB, Givskov M. 2006b.** Quorum Sensing Inhibitors: A Bargain of Effects. *Microbiology*, 152: 895–904.
- Ravichandiran V, Shanmugam K, Anupama K, Thomas S, Princy A. 2012.** Structure-Based Virtual Screening for Plant-Derived SdiA-Selective Ligands as Potential Antiviral Agents Against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Med Chem*, 48: 200–205.
- Reid G, Howard J, Gan BS. 2001.** Can Bacterial Interference Prevent Infection? *Trends Microbiol*, 9/9: 424–428.
- Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo JM. 2012.** Antibiofilm Polysaccharides. *Environ Microbiol*, 15/2: 334–346.
- Reyes K, Zervos M. 2013.** Endocarditis Caused by Resistant Enterococcus: An Overview. *Curr Infect Dis Rep*, 15/4: 320–328.
- Rittmann BE, Nerenberg R, Lee K, Issam N, Gillogly TE, Lehman GE, Adham SS. 2004.** The Hydrogen- Based Hollow-Fiber Membrane Biofilm Reactor (HFMBfr) for Removing Oxidized Contaminants. *Water Sci Technol*, 49/11-12: 223–230.
- Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH, Hamood AN. 1999.** Contribution of Quorum Sensing to the Virulence of *P. aeruginosa* in Burn Wound Infections. *Infect Immun*, 67/11: 5854–5862.
- Sandoe JA, Witherden IR, Au-Yeung HK, Kite P, Kerr KG, Wilcox MH. 2002.** Enterococcal Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infection: Management and Outcome of 61 Consecutive Cases. *J Antimicrob Chemother*, 50: 577–582.
- Saraçlı MA. 2006.** "Quorum Sensing": Mikroorganizmalar İletişim mi Kuruyor? *Gülhane Tıp Dergisi*, 48: 244–250.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. 2002.** *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes During Development as a Biofilm. *Bacteriol*, 184/4: 1140–1154.
- Schr J. 2010.** Antimicrobial Peptides, *Methods in Molecular Biology*, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ.
- Singh BN, Singh HB, Singh A, Singh BR, Mishra A, Nautiyal CS. 2012.** *Lagerstroemia speciosa* Fruit Extract Modulates Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor

- Production and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 158/2: 529–538.
- Shanks RM, Sargent JL, Martinez RM, Graber ML, O'Toole GA. 2006.** Catheter Lock Solutions Influence Staphylococcal Biofilm Formation on Abiotic Surfaces. *Nephrol Dial Transplant*, 21/8: 2247–2255.
- Shapiro OH, Kushmaro A. 2011.** Bacteriophage Ecology in Environmental Biotechnology Processes. *Curr Opin Biotechnol*, 22/3: 449–455.
- Smith RS, Zhang Z, Bouchard M, Li J, Lapp HS, Brotske GR, Lucchino DL, Weaver D, Roth LA, Coury A, Biggerstaff J, Sukavaneshvar S, Langer R, Loose C. 2012.** Vascular Catheters with a Nonleaching Polysulfobetaine Surface Modification Reduce Thrombus Formation and Microbial Attachment. *Sci Transl Med*, 4/153: 153ra132.
- Soto SM. 2014.** Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. *Adv Biol*, 2014: 1–13.
- Souli M, Giamarellou H. 1998.** Effects of Slime Produced by Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci on Activities of Various Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 42/4: 939–941.
- Spoering AL, Lewis K. 2001.** Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *Bacteriol*, 183/23: 6746–6751.
- Starkey M, Gray AK, Chang SI, Parsek M. 2004.** Microbial Biofilms. ASM Press; Washington DC: A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms, 336: 478.
- Stewart PS, Costerton JW. 2001.** Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms. *Lancet*, 358/9276: 135–138.
- Swift S, Throup JP, Williams P, Salmund GP, Stewart GS. 1994.** Quorum Sensing: A Population-Density Component in the Determination of Bacterial Phenotype. *Trends Biochem Sci*, 21/6: 214–219.
- Taga ME, Bassler BL. 2003.** Chemical Communication Among Bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100/2: 14549–14554.
- Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM. 1999.** Killing of *Caenorhabditis elegans* by *P. aeruginosa* Used to Model Mammalian Bacterial Pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96/2: 715–720.
- Tang HB, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB, Prince A. 1996.** Contribution of Specific *P. aeruginosa* Virulence Factors to Pathogenesis of Pneumonia in a Neonatal Mouse Model of Infection. *Infect Immun*, 64/1: 37–43.
- Taraszkiewicz A, Fila G, Grinholc M, Nakonieczna J. 2013.** Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance. *BioMed Res Int*, 2013: 150653.
- Tenke P, Riedl CR, Jones GLI, Williams GR, Stickler D, Nagy E. 2004.** Bacterial Biofilm Formation on Urologic Devices and Heparin-Coating as Preventive Strategy. *Int J Antimicrob Agents*, 23/1: 67–74.
- Tetz GV, Artemenko NK, Tetz VV. 2009.** Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics. *Antimicrob Agents Chemother*, 53/3: 1204–1209.
- Trautner BW, Darouiche RO, Hull RA, Hull S, Thornby JI. 2002.** Pre-Inoculation of Urinary Catheters with *Escherichia coli* 83972 Inhibits Catheter Colonization by *Enterococcus faecalis*. *J Urol*, 167/1: 375–379.
- Trautner BW, Hull RA, Darouiche RO. 2003.** *Escherichia coli* 83972 Inhibits Catheter Adherence by a Broad Spectrum of Uropathogens. *Urology*, 61/5: 1059–1062.
- Trautner BW, Hull RA, Darouiche RO. 2005.** Colicins Prevent Colonization of Urinary Catheters. *J Antimicrob Chemother*, 56/2: 413–415.
- Vogel L, Sloos JH, Spaargaren J, Suiker I, Dijkshoorn L. 2000.** Biofilm Production by *Staphylococcus epidermidis* Isolates Associated with Catheter Related Bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 36/2: 139–141.
- Walters MC 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. 2003.** Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 47/7: 317–323.
- Watnick PI, Kolter R. 1999.** Steps in the Development of a *Vibrio cholerae* El Tor Biofilm. *Mol Microbiol* 34/3: 586–595.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. 2002.** Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science*, 295/5559: 1487.
- Wolfaardt GM, Lawrence JR, Robarts RD, Caldwell SJ, Caldwell DE. 1994.** Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community. *Appl Environ Microbiol*, 60/2: 434–446.
- Wright A, Hawkins CH, Anggard EE, Harper DR. 2009.** A Controlled Clinical Trial of a Therapeutic Bacteriophage Preparation in Chronic Otitis Due to Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A Preliminary Report of Efficacy. *Clin Otolaryngol*, 34/4: 349–357.
- Yamanaka M, Hara K, Kudo J. 2005.** Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli*, Studied by Energyfiltering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis. *Appl Environ Microbiol*, 71/11: 7589–7593.
- Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. 2002.** Mammalian Defensins in Immunity: More Than Just Microbicidal. *Trends Immunol*, 23/6: 291–296.
- Zasloff M. 2002.** Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. *Nature*, 415: 389–395.