

Atf İçin: Özdemir, F. İ. ve Korkmaz, T. (2023). Çevresel Koşulların Termofilik *Geobacillus kaustophilus*'da Biyofilm Oluşumu Üzerinde Etkisi. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(3), 1562-1572.

To Cite: Özdemir, F. İ. & Korkmaz, T. (2023). Effect of Environmental Conditions on Biofilm Formation in Thermophilic *Geobacillus kaustophilus*. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(3), 1562-1572.

Çevresel Koşulların Termofilik *Geobacillus kaustophilus*'da Biyofilm Oluşumu Üzerinde Etkisi

F. İnci ÖZDEMİR^{1*}, Tuba KORKMAZ²

Öne Çıkanlar:

- Termofilik *Geobacillus kaustophilus*'un polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşumu incelendi
- Çevresel faktörlerin biyofilm üzerindeki etkisi araştırıldı

Anahtar Kelimeler:

- Biyofilm,
- Geobacillus kaustophilus* DSM 7263T
- Polistiren yüzeyler

ÖZET:

Bacilluslar farklı çevrelerde yaygın olarak bulunan ve spor oluşturan mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmaların gıda endüstrisi, ısıtma ve arıtma sistemleri gibi pek çok alanda önemli kontaminant oldukları ve bu sistemler içinde biyofilm tabakaları oluşturdukları bilinmektedir. Bu bakterilerin büyük çoğunluğu hem gıda sektöründe önemli indikatörler olmaları, hem de pek çok endüstriyel sistemde enerji kaybına sebep olduklarından dolayı oluşturdukları biyofilm yapılarıyla mücadele son derece önem taşımaktadır. Bu çalışmada termofilik bir mikroorganizma olan *Geobacillus kaustophilus*'un polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşumuna çeşitli çevresel faktörlerin etkisi araştırılmıştır. Bu bakteri polistiren yüzey üzerinde biyofilm oluşturarak en iyi tutunmayı 168. saatte gerçekleştirmiştir. Optimum biyofilm oluşumu için gerekli sıcaklık maksimum büyümenin gerçekleştiği 55 °C olarak tespit edilmiştir. En yüksek biyofilm oluşumu %5 glikoz ve %3 NaCl'ün ayrı ayrı varlığında gözlenirken, şeker ve tuzun birlikte en etkili konsantrasyonları sırasıyla %3 ve %1.5 olarak belirlenmiştir. %5 glukoz ve %3 NaCl oranında ise biyofilm oluşumu inhibe olmuştur. Isı şoku ve UV uygulanan hücrelerde ise tutunma gözlenmemiştir. SDS ve lizozim gibi hücre duvarını denatüre edici ajanların varlığı vejetatif hücrelerde biyofilm oluşumunu azaltmış/engellerken lizozim muamelesinin SDS'e oranla biyofilm oluşumunda daha etkili olduğu saptanmıştır.

Effect of Environmental Conditions on Biofilm Formation in Thermophilic *Geobacillus kaustophilus*

Highlights:

- Biofilm formation of thermophilic *Geobacillus kaustophilus* on polystyrene surface was investigated
- The effect of environmental factors on biofilm was investigated

Keywords:

- Biofilm
- Geobacillus kaustophilus* DSM 7263T
- Polystyrene surfaces

ABSTRACT:

Bacillus are spore-forming microorganisms that are broadly found in many environments. It is known that these microorganisms are important contaminants of many systems such as the food industry, heating systems, treatment systems and they form biofilm layers in these areas. Since most of these bacteria are important indicators in the food industry and cause energy loss in many industrial systems, it is extremely important to combat the biofilm structures they form. In this study, the effect of various environmental factors on the biofilm formation of *Geobacillus kaustophilus* (*Gk*) a thermophilic microorganism, on the polystyrene surface was investigated. *Gk* formed a biofilm on the polystyrene surface and the best adhesion was obtained at 168 hours. The temperature required for optimum biofilm formation was determined as 55 °C, where optimum growth occurred. While the highest biofilm formation was observed in the presence of 5% glucose and 3% NaCl separately, the most effective concentrations of sugar and salt together were determined as 3% and 1,5%, respectively. Biofilm formation was inhibited in the combination of 5% glucose and 3% NaCl. Presence of cell wall denaturing agents such as SDS and lysozyme reduced/prevented biofilm formation in vegetative cells and lysozyme treatment was found to be more effective than SDS in biofilm formation.

¹F. İnci ÖZDEMİR ([Orcid ID: 0000-0003-0818-103X](https://orcid.org/0000-0003-0818-103X)), Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Gebze, Kocaeli, Türkiye

²Tuba Korkmaz ([Orcid ID: 0009-0006-6992-3112](https://orcid.org/0009-0006-6992-3112)), Doğu Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Patoloji Laboratuvar Teknikleri, İstanbul, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: F. İnci ÖZDEMİR, e-mail: i.ozdemir@gtu.edu.tr

Bu çalışma Tuba Korkmaz'ın Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir. Makale 3-7 Eylül 2012 tarihlerinde İzmir'de düzenlenen "21.Ulusal Biyoloji Kongresinde" sözlü olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Biyofilmler biyotik ve abiyotik yüzeylere yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelimsi bir matris içinde yaşayan ve yüksek oranda fonksiyonlaşmış mikroorganizmaların oluşturduğu mikrobiyal komünitelerdir (Satpathy ve ark., 2016; Sauer ve ark., 2022). Biyofilm tabakasının oluşumundaki ilk basamak mikroorganizmanın yüzeye tutunmasıdır (Garrett ve ark., 2008). Yüzeye dönüşümsüz tutunmada mikrobiyal biyofilmlerin temel yapısal organik bileşeni olan EPS (hücre dışı polisakkarit) oldukça önemlidir. EPS'nin miktarı ve içeriği farklı mikroorganizmalarda, farklı çevre koşullarında hatta biyofilm oluşumunun evrelerinde bile farklılıklar göstermektedir. EPS'nin kimyasal kompozisyonunu etkileyen en önemli faktör bakterinin tutunma yüzeyinin doğasıdır. Örneğin, üronik asit gibi polianyonik polisakkaritlerin varlığı, bu grup canlılardaki EPS'nin anyonik özelliğini artırarak kalsiyum ve magnezyum iyonları gibi divalent katyonlarla etkileşim sağlamayı ve böylece katyonik yüzeylerde biyofilm yapılarında bağlanma gücünü arttırmayı sağlamaktadır (Maunder ve Welch, 2017). Asidik polisakkaritlerin yanında proteinler, nükleik asitler ve lipitler de katyonik yüzeylere tutunmada önem teşkil etmektedir. Bakterinin tutunduğu yüzeyin iyon yükünün yanında mikroorganizmanın tipinin, biyofilmin oluştuğu çevredeki nitrojen, oksijen, besin miktarı, pH ve sıcaklık gibi çevresel koşulların ve biyofilm evresinin de EPS'nin miktar ve içeriğini etkilediği bilinmektedir. Bu durum biyofilm yapılarının değişken ve dinamik olduklarına kanıt oluşturmaktadır (Muhammad ve ark., 2020).

EPS üreten mikroorganizmalar; birçok su temaslı yüzey, insan dokusuna yerleştirilen medikal araç-gereç, ekipman ve protez üzerinde biyofilm oluşturmakta ve dezenfektanların hedef patojenlere ulaşmasını güçleştirmektedir (Maunder ve Welch, 2017; Muhammad ve ark., 2020). Bunun yanı sıra oluşturulan bu biyofilmlerden kopan parçalar vücudun diğer bölgelerine yayılmada rol oynayabilmektedir. Biyofilmler konakçı immün sisteme karşı direnci de sağlamaktadırlar. Bütün mikrobiyal kaynaklı enfeksiyonların %60'ından fazlasının biyofilm kaynaklı olması dikkat çekmektedir (Donlan, 2002). İnsanlarda mikrobiyal enfeksiyonların yanı sıra biyofilmler; birçok endüstriyel üretimde ürün kontaminasyonuna ve bozulmasına, ekipman hasarı ve üretimde düşümlere, artan enerji giderlerinden dolayı maddi kayıplara yol açmaktadırlar (Carrascosa ve ark., 2021; Satpathy ve ark., 2016).

Termofilik, spor oluşturan *Bacillus* türleri pek çok endüstriyel sistemin potansiyel kontaminantları olup, oluşturmuş oldukları biyofilm yapılarından dolayı pek çok işletmede önemli sorunlar meydana getirmektedir (Kumar ve ark., 2021). Hücreler oluşturmuş oldukları polisakkarit temelli bu biyofilm yapıları sayesinde çeşitli çevresel stres koşullarına, dezenfeksiyon gibi işlemlere karşı planktonik mikroorganizmalara göre daha dirençli hale gelmekte ve yüksek sıcaklık, osmotik basınç, denatüre edici ajanlar gibi yaşamlarını tehdit eden pek çok maddenin varlığında yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Vu ve ark., 2009).

Biyofilm oluşumu sıcaklık, pH, glikoz ve su aktivitesi gibi çeşitli çevresel koşullardan etkilenmektedir (Bezek ve ark., 2019; Moraes ve ark., 2018). Mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm yapıları incelendiğinde farklı mikroorganizmalarda, hatta aynı türün farklı soyları arasında bile farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir (López ve ark., 2010). Biyofilm oluşumu için mikroorganizmaların öncelikle bir yüzeye tutunması gerektiğinden ve yüzey ile etkileşimde hücre çeper yapısı büyük önem taşıdığından biyofilm oluşumunda gözlenen bu farklılıkların mikroorganizmaların hücre çeper yapılarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir (Satpathy ve ark., 2016). Termofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklarda yaşamaya uyum sağlaması ve bu uyumun bir sonucu olarak hücre çeperlerinin mezofilik mikroorganizmalara göre farklılıklar

göstermesi termofilik mikroorganizmalarca oluşturulan biyofilm yapılarını çok daha dikkat çekici hale getirmiştir.

Termofilik *Bacillus* türleri gıda üretim tesislerinden su dağıtım şebekelerine ve ısıtma sistemlerine kadar pek çok ortamda yaşamını sürdürebilen ve oluşturdukları biyofilm yapıları sayesinde dezenfektan, antimikrobiyal maddeler, sıcaklık, pH gibi varlıklarını tehdit eden pek çok koşul ile başa çıkabilen mikroorganizmalardır (Wang ve ark., 2021). Gerek gıda üretim sistemleri ve su arıtım sistemlerine karışarak insan sağlığını tehdit etmeleri, gerekse ısıtma sistemlerinde olduğu gibi enerji kaybına neden olmaları bu biyolojik yapılarla mücadeleyi gerektirmektedir. Termofilik *Bacillus* türlerinin, oluşturdukları biyofilm yapıları sayesinde dezenfeksiyon işlemlerine karşı dirençli hale gelmeleri bu yapılarla mücadeleyi daha da gerekli kılmaktadır. Literatürde bu ekstremofil organizmanın biyofilm oluşturma özelliği ve karakterizasyonu ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu amaçla, biyofilm oluşumunu etkileyen çeşitli çevresel faktörlerin biyofilm oluşumu üzerindeki rollerinin anlaşılması *Geobacillus kaustophilus* (*Gk*) biyofilm yapısının kontrolüne dair yarar sağlayacaktır.

MATERYAL VE METOT

Geobacillus kaustophilus DSM 7263^T, Ohio State Üniversitesi'ndeki Bacillus Genetic Stock Center'dan temin edilmiştir. Belirtilmediği sürece tüm kimyasallar ve tamponlar Merck (Darmstadt, Almanya) ve Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir.

Biyofilm Oluşumunun Derecelendirilmesi

Spektrofotometrik ölçümler sonucunda biyofilm oluşumu ve biyofilm oluşum derecesi Bose ve ark. (2009) çalışması referans alınarak belirlenmiştir (Bose ve ark., 2009). Buna göre 570 nm'de yapılan absorbans ölçümleri sonucunda 0.12'nin altında değer alınan kuyucuklar, tutunmanın olmadığı kuyucuklar (-), 0.12-0.24 arasında değere sahip olan kuyucuklar orta dereceli biyofilm oluşumunun (+), 0.24'nin üzerinde değere sahip olan kuyucuklar ise güçlü biyofilm oluşumunun görüldüğü kuyucuklar olarak kabul edilmiştir (++)

Vejetatif Hücrelerde Biyofilm Oluşumuna Hücre Miktarının Etkisi

Hücrelerin biyofilm oluşturma yeteneği, hücrelerin 96 kuyucuklu polistiren (düz tabanlı) doku kültür plakalarına tutunma miktarı belirlenerek ölçülmüştür. Kullanılan metot daha önce rapor edilen iki çalışmanın kısmi modifikasyonudur (Wang ve ark., 2007; Elhariry, 2008). *Gk* hücreleri TSB (Tryptic Soy Broth) besiyerinde 55 °C'de 100 rpm'de gece boyunca inkübe edilmiş ve daha sonra taze TSB besiyerine 1/10 oranında inoküle edilmiştir. Hücre sayısı 10⁶ CFU/mL (OD600 0.1) olana kadar büyütülen hücreler +4 °C'de 4500 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek toplanmış ve 3 kez PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH 7.2) ile yıkanmıştır. Optimum biyofilm oluşturma koşulları 96 kuyucuklu polistiren mikrolitre plakalarında toplam hacim 250 µL olacak şekilde farklı yoğunluktaki hücreler ile inoküle edilerek belirlenmiştir. Her bir deney düzeneği 55 °C'de farklı zaman aralıklarında (24-168 saat) inkübe edilmiştir.

Biyofilm oluşturan hücreler kristal violet boyama metodu kullanılarak belirlenmiştir (Wang ve ark., 2007). İnkübasyonun ardından kuyucukların içeriği pipet yardımıyla dikkatlice boşaltılmış ve kuyucuklar tutunmamış hücrelerden ve besiyeri kalıntılarından uzaklaştırılmak amacıyla 300 µL PBS (pH 7.2) ile üç kez yıkanmıştır. Kuyuların tabanlarında kalan tutunmuş bakterileri sabitlemek amacıyla her bir kuyucuk 250 µL %99.5 metanol ile 15 dk muamele edilmiştir. Kurutma işleminin ardından her bir kuyucukta tutunan bakteriler 5 dk boyunca 250 µL %1'lik kristal violet ile boyanmış ve fazla boya uzaklaştırıldıktan sonra mikro-plate su ile yıkanmıştır. Kuyucuklar tekrar kurutulduktan sonra %33'lük

asetik asit yardımıyla içeriğinin çözülmesi sağlanmış ve her bir kuyucuktaki biyofilm oluşumu spektrofotometrik olarak 570 nm'deki absorpsiyon ölçümleri ile belirlenmiştir.

Glukozun ve NaCl'nin Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Yukarıda belirtilen şartlarda, farklı glukoz ve NaCl konsantrasyonları (%1, %3, %5 ve %7) içeren TSB besiyeri kullanılarak hazırlanan deney düzenekleri 55 °C'de 96, 120, 144 ve 168 saat inkübe edilmiş ve hücrelerin tutunma miktarları kristal violet boyama metodu kullanılarak belirlenmiştir.

Denatüre Edici Ajanların Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda lizozim (%0.02, %0.05, %0.1, %0.2, %0.5 ve % 1) ve SDS (%0.1, %0.2, %0.3, %0.4, %0.5, %1 ve %2) ilave edilen hücre süspansiyonu, 55 °C'de 1 saat inkübe edilmiş ve ardından hücreler 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek toplanmıştır. Elde edilen hücre pelleti 1 ml TSB içinde çözüldükten sonra 230 µl TSB içeren her bir kuyucuğa 20 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. 55 °C'de 72, 96, 120, 144 ve 168'er saat inkübasyonun ardından biyofilm oluşumu daha önce belirtilen şartlarda hazırlanarak 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ayrıca hücrelerin farklı lizozim ve SDS konsantrasyonları varlığında ve çalkalamasız ortamda 81 saatlik büyüme eğrileri daha önce belirtildiği şekilde oluşturulmuştur. Glukoz ve NaCl'nin biyofilm oluşumu üzerine ortak etkisini incelemek amacıyla %1 glukoz-%0,5 NaCl, %2 glukoz-%1 NaCl, %3 glukoz-%1,5 NaCl, %4glukoz-%2 NaCl ve %5 glukoz-%3 NaCl konsantrasyonlardaki karışımları içeren besiyerleri kullanılarak hazırlanan deney düzenekleri 55 °C'da 96, 120, 144 ve 168 saat inkübe edilmiş ve hücrelerin tutunma miktarları kristal violet boyama metodu kullanılarak belirlenmiştir.

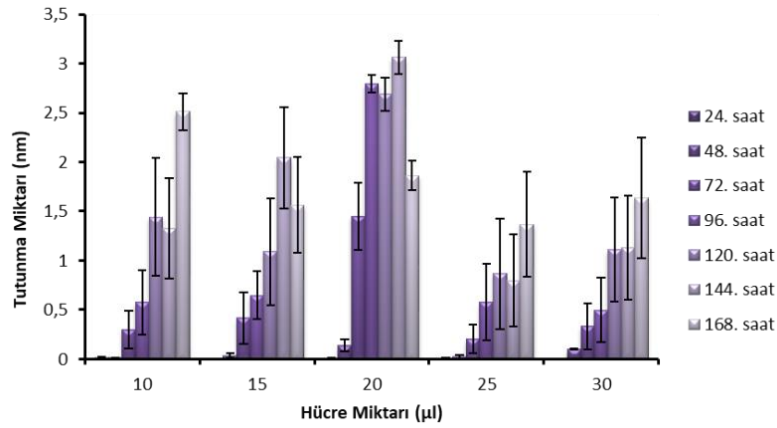
İstatistiksel Analizler

Bütün çalışmalar tesadüf blokları deneme desenine göre yapılmıştır. Verilerdeki değişkenliği hızlı bir şekilde görebilmek için tüm çalışma sonuçlarının tanımlayıcı analizleri SPSS 18.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Test edilen işlemler arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için veriler ANOVA testine tabi tutulmuştur. İstatistiksel önem görülen işlemler belirlendiğinde ortalama veriler arasındaki farklılıklar $P \leq 0.05$ seviyesinde LSD çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur.

BULGULAR VE TARTIŞMA

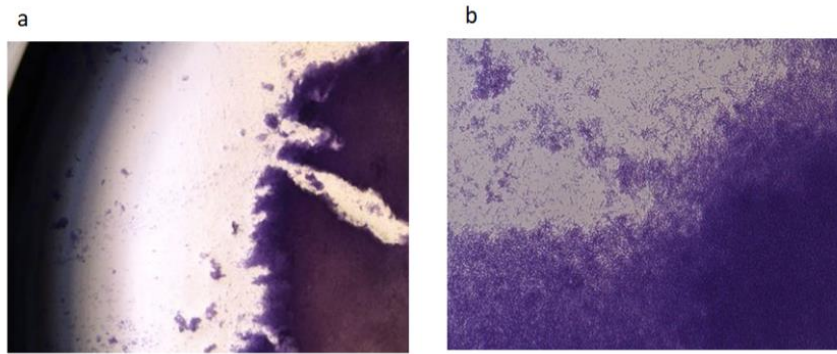
Gk biyofilm oluşumuna çevresel faktörlerin etkisinin araştırılabilmesi için ilk olarak biyofilm oluşumunda kullanılacak hücre süspansiyon yoğunluğu belirlenmiştir. Literatürde biyofilm çalışmalarında genel olarak kullanılan 10^6 CFU/mL hücre yoğunluğu esas alınmıştır (Harrison ve ark., 2005; Richter ve ark., 2023). Buna göre, bu hücre yoğunluğuna karşılık gelecek optik densidite değeri (OD_{600}) 0.1 olacak şekilde hazırlanmış ve 55 °C'de 96 kuyucuklu polistiren doku kültür platelerinde her bir kuyucuk için hücre süspansiyonu 20 µL olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda, hücrelerin tutunma dereceleri istatistiksel (Çizelge S1) olarak belirlenmiş ve derecelendirilmiştir (Çizelge S2). Buna göre en iyi tutunma süresi 144 ve 168. saatler olarak gözlemlenmiştir (Şekil 1).

Kristal violet boyama yöntemi ile gösterilen biyofilm oluşumunu desteklemek amacıyla kuyucuklara tutunan hücrelerin koloni sayımları gerçekleştirilmiştir. Biyofilm oluşturan hücreler kuyucuklardan toplanıp 10^0 - 10^{12} oranlarında seyreltilmiş ve nutrient agar üzerinde koloni sayımları gerçekleştirilmiştir. 24 saat aralıklarla yapılan hücre koloni sayımları arasında en az 10 kat artış gözlenmiş ve en yüksek koloni sayısına en iyi biyofilm oluşumunun gözlemlendiği 168 saat inkübasyon süresi sonunda ulaşılmıştır.



Şekil 1. İnkübasyon süresi ve hücre miktarına bağlı olarak biyofilm oluşumu

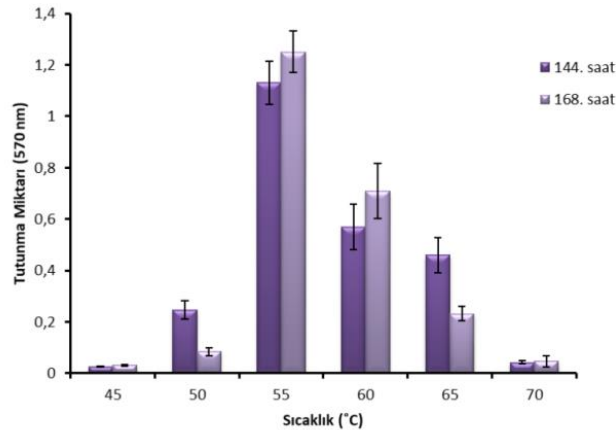
168. saat sonunda 96 kuyucuklu doku kültür platelerinin bir kuyucuğunda vejetatif hücreler tarafından oluşturulan biyofilm yapıları mikroskop ile görüntülenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. 168 saatlik inkübasyonun ardından oluşan biyofilm yapısının 4x (a) ve 10x (b) objektif büyütme ile mikroskopta görüntülenmesi

Çevresel Faktörlerin *Gk* Biyofilm Oluşumuna Etkisi

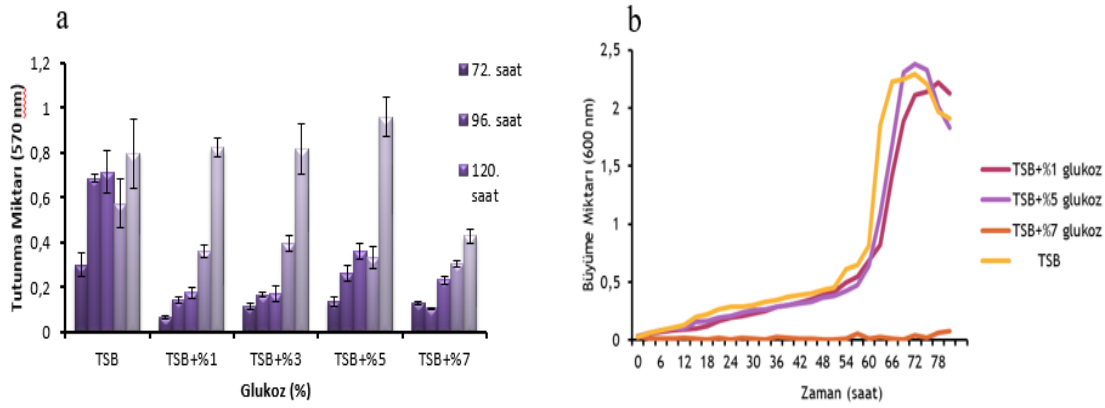
Biyofilm oluşumunun mikroorganizmaların metabolik olayları ile doğrudan ilişkisi olduğu ve bu nedenle mikroorganizmaların biyofilm oluşturmaları için gerekli en uygun sıcaklığın en iyi büyüme sıcaklığı olduğu bilinmektedir. (Wang ve ark., 2007). Bu nedenle hücreler farklı sıcaklıklarda en iyi tutunmanın gözlemlendiği 144. ve 168. saatlerde inkübe edilmiş ve en iyi biyofilm oluşumunun *Gk*'nin optimum büyüme sıcaklığı olan, 55°C olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 55°C'nin altındaki sıcaklıklarda biyofilm oluşumu önemli derecede azalırken *Gk* biyofilm oluşumunun yüksek sıcaklıklarda daha kararlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Sıcaklığa bağlı olarak biyofilm oluşumu

Gk'nın sıcaklığa bağlı olarak büyüme aralığı 37-74 °C olmakla birlikte biyofilm oluşumu 50 °C'nin altında ve 70 °C'nin üstünde gözlenmemiştir. Yüksek sıcaklıklarda biyofilm oluşumunun inhibe olmasının nedeninin tutunmada görevli yüzey proteinlerinin denatürasyonu ile ilgili olduğu, düşük sıcaklıklarda biyofilm oluşumunun inhibisyonunun ise hücre yüzey hidrofobisitesinin azalması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Elhariry, 2008).

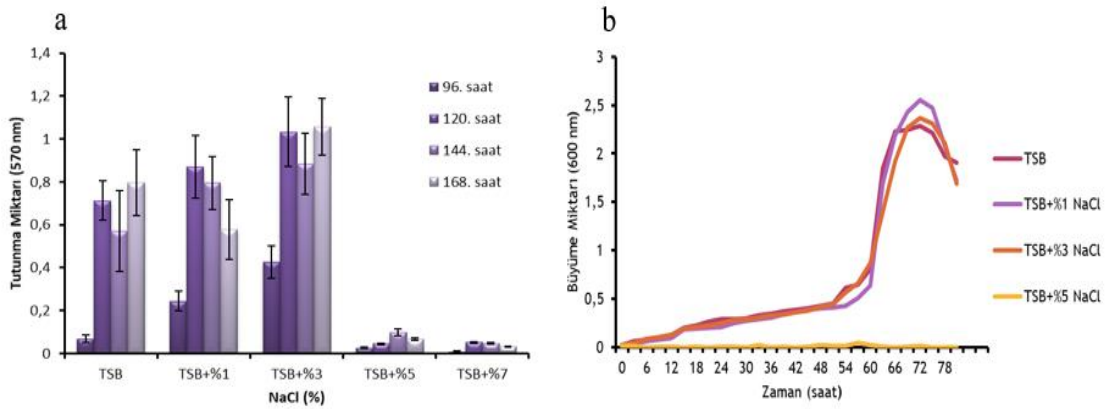
Besin miktarının mikroorganizmalarda biyofilm oluşumundaki etkisinin çok önemli olduğu bilinmektedir (Salgar-Chaparro ve ark., 2020). Glukoz birçok yiyecek ve içecek içinde bulunan temel gıda maddesi olup biyofilm oluşum miktarında artış meydana getirdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Elhariry (2008) *Bacillus* türleriyle yaptıkları çalışmada tutunma ortamına eklenen glukozun biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilediğini ve biyofilm oluşumu için en uygun glukoz konsantrasyonunun farklı suşlarda değişim gösterdiğini belirtmişlerdir (Elhariry, 2008). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında %1 ile %5 arasında glukoz içeren gruplarda artan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak 168. saatte biyofilm oluşumunda artış gözlenirken %7 glukoz varlığının biyofilm oluşumunu %50 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 4a).



Şekil 4. Glukozun biyofilm oluşumuna (a) ve *Gk* hücre büyümesine (b) etkisi

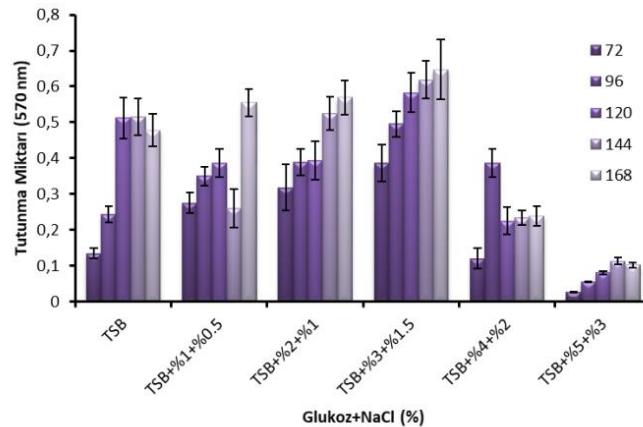
Glukozun biyofilm oluşumunun ilk aşamalarını olumsuz etkilemesinin ortamın azalan su aktivitesinden kaynaklandığı düşünülürken ilerleyen aşamalarındaki olumlu etkisi ise glukozun biyofilm oluşumunun sekonder kolonizasyon aşamasında rol alması ile ilişkilendirilmektedir (Waldrop ve ark., 2014). Biyofilm oluşumunda sekonder kolonizasyon basamağı EPS varlığında gerçekleştiğinden ve EPS'nin polisakkarit ağırlıklı polimerler içerdiğinden ortamdaki glukoz varlığının biyofilm oluşturma yeteneğini bu evrede arttırdığı düşünülmektedir (Lim ve ark., 2004). Ayrıca glukozun biyofilm oluşumuna olumlu etkisinin hücre yoğunluğundan bağımsız olarak gerçekleştiğini doğrulamak amacıyla *Gk* farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren büyüme ortamında (Tryptic Soy Broth) çalkalamasız olarak 81 saat büyütülmüştür. %1 ve %5 glukoz içeren TSB ortamlarındaki hücre büyümesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir değişim gözlenmemesi hücrelerin büyüme miktarı ile biyofilm oluşturma miktarı arasında doğrudan bir ilişkinin olmadığını göstermektedir. %7 glukoz varlığında ise osmotik basıncın artışına bağlı olarak hem hücre büyümesinde hem de biyofilm oluşumunda çarpıcı bir biçimde azalma gözlenmiştir (Şekil 4b).

NaCl hücreler için önemli olan diğer bir besinsel ihtiyaç olup bulunmadığı ortamlarda bakteriyel büyümenin gerçekleşmediği bilinmektedir. NaCl bakteriyel büyümenin yanında biyofilm oluşumu üzerinde de olumlu etki yaratmaktadır (Lim ve ark., 2004; Elhariry, 2008). Bu çalışmada da biyofilm oluşum ortamına eklenen NaCl biyofilm oluşumunda belirgin bir artışa neden olmuştur (Şekil 5a).



Şekil 5. NaCl'nin biyofilm oluşumuna (a) ve *Gk* hücre büyümesine (b) etkisi

En iyi tutunma %3 NaCl varlığında meydana gelmiş ancak %3 üzerindeki tuz konsantrasyonları biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tuz varlığı biyofilm oluşumu için gerekli süreyi de kısaltmıştır. Buna göre 96. saatin sonunda kontrol grubunda biyofilm oluşumu gözlenmezken, %1 ve %3 NaCl varlığında biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir. NaCl bu olumlu etkiyi katyonik yüzeylerde başlangıç tutunmasına etki etme yoluyla gerçekleştirmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada NaCl'nin iyonlaşması sonucu oluşan Cl^- iyonlarının yüzey yapısında bulunan katyonlarla etkileşime geçerek biyofilm oluşumunu desteklediği belirtilmiştir (Xu ve ark., 2010; Pan ve ark., 2010; Iliadis ve ark., 2018). Bununla beraber %3'ün üzerindeki tuz konsantrasyonunun biyofilm oluşumundaki olumsuz etkisi yüksek miktardaki tuzun hücreler üzerinde yarattığı osmotik şok etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Lim ve ark. (2004) göre ortamdaki fazla tuz varlığı nedeniyle hücrenin su aktivitesi azalmakta ve metabolik işlevler aksamaktadır (Lim ve ark., 2004). Ayrıca NaCl'nin biyofilm oluşumu üzerindeki olumlu etkisinin hücre büyümesinden bağımsız olarak gerçekleştiğini belirleyebilmek amacıyla büyüme ortamına farklı NaCl konsantrasyonları eklenen hücreler çalkalamasız olarak 55 °C'de 81 saat büyütülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre %1 ve %3 NaCl konsantrasyonlarının eklendiği ortamlarda hücre büyüme miktarında önemli bir değişim gözlenmezken hücrelerin biyofilm oluşturma miktarında değişimlerin gözlenmesi hücrelerin büyüme miktarı ile biyofilm oluşturma miktarında doğrudan bir ilişkinin olmadığını göstermektedir. %5 NaCl varlığında ise osmotik basıncın artışına bağlı olarak hem hücre büyümesi hem de biyofilm oluşumu çarpıcı bir biçimde azalma göstermiştir (Şekil 5b). Bu durum önceki yayınlarla tutarlıdır (Rath ve ark., 2017; Li ve ark., 2021).



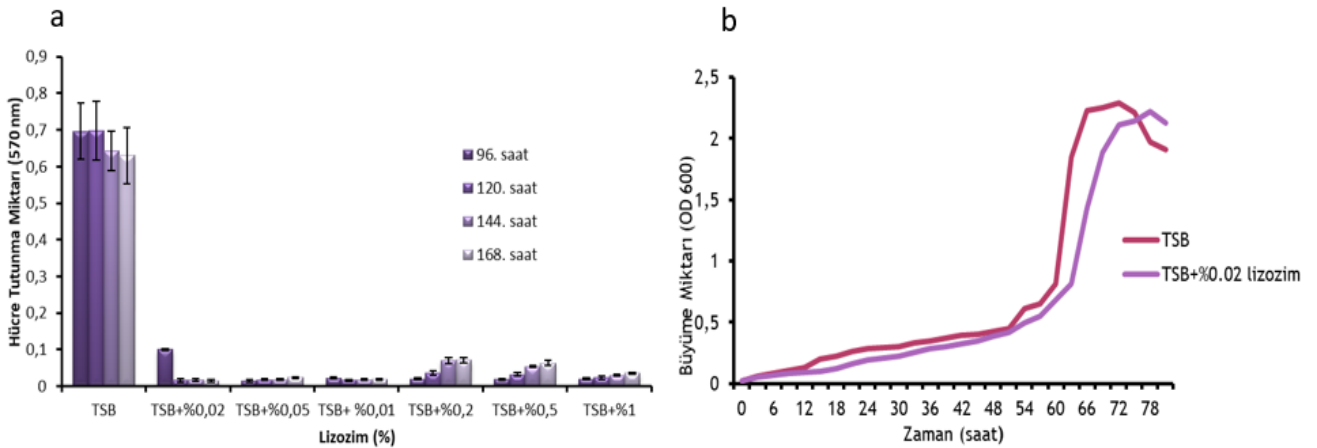
Şekil 6. Glukoz ve NaCl'nin ortak etkisine bağlı olarak biyofilm oluşumu

En iyi biyofilm oluşumunun %3 glukoz ve %1.5 NaCl derişimine sahip olan deney ortamında gerçekleştiği, konsantrasyonlar arttırıldığında ise biyofilm oluşumunun inhibe olduğu gözlenmiştir (Şekil 6).

En iyi biyofilm oluşumunun gerçekleştiği %5 glukoz konsantrasyonu ve %3 NaCl konsantrasyonunun bir arada kullanılmasının biyofilm oluşumunu inhibe etme sebebinin ise yüksek osmotik basınç ve azalan su aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar Rode ve ark. (2007) farklı glukoz ve tuz konsantrasyonlarını bir arada kullanarak yaptığı biyofilm çalışmaları ile uyum göstermektedir. Buna göre yüksek biofilm oluşturma kabiliyetine sahip *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*'in farklı suşlarının farklı glukoz ve tuz konsantrasyonlarından olumlu etkilendiği gösterilmiştir (Rode ve ark., 2007).

Denatüre Edici Ajanların Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Lizozim hücre duvarındaki N-asetil muramik asit ile N-asetil glukozamin arasındaki β -1,4 glikozitik bağlarını yıkarak peptidoglikan sentezini inhibe etmektedir (Hukić ve ark., 2018). Gram (+) mikroorganizmalarda peptidoglikan tabakası bulunmazken bu yapıdaki polisakaritler tutunma yüzeyi ile etkileşimde önemli bir rol oynamaktadır. Bu amaçla, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan lizozim ilave edilen hücre süspansiyonları, 55 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm lizozim konsantrasyonları kalın peptidoglikan tabakasına sahip Gram (+) bir bakteri olan *Gk*'da biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir (Şekil 7a).

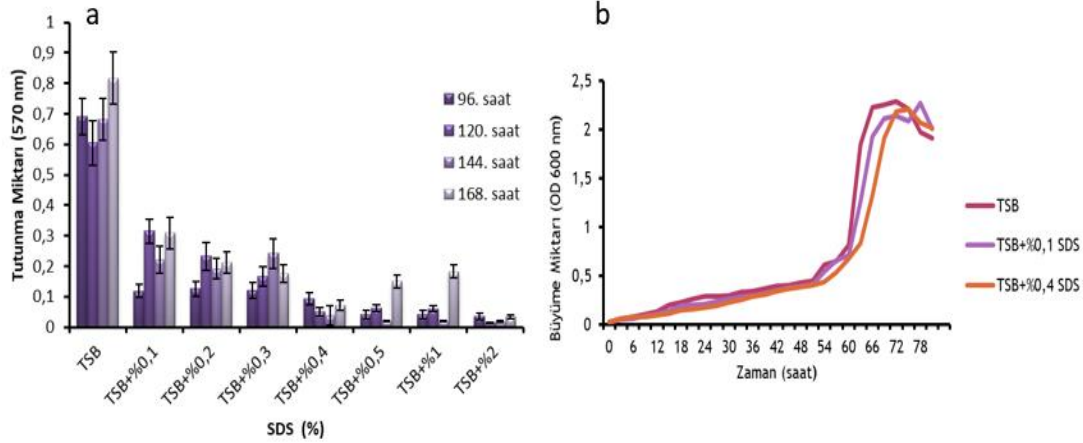


Şekil 7. Lizozimin biyofilm oluşumuna (a) ve *Gk* hücre büyümesine (b) etkisi

Ayrıca lizozimin biyofilm oluşumundaki olumsuz etkisinin hücre yüzeyini çevreleyen polisakaritler arasındaki bağları kırma yoluyla gerçekleştirerek ve hücre büyümesinden bağımsız olarak gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla *Gk*'nın büyüme ortamına biyofilm oluşumunu engelleyen en düşük lizozim konsantrasyonu (TSB+%0.02) ilave edilerek 81 saat çalkalamasız olarak büyütülmüştür. Elde edilen büyüme eğrisi grafiklerine göre biyofilm oluşumunun gözlenmediği bu konsantrasyonda kontrole yakın oranda hücre büyümesinin gerçekleşmesi büyüme miktarı ile biyofilm oluşturma miktarında doğrudan bir ilişkinin olmadığını göstermiştir (Şekil 7b).

SDS'in biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hücreler 55 °C'de 1 saat farklı SDS konsantrasyonlarına maruz bırakılarak deney düzenekleri hazırlanmış ve düzenekler inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kristal violet boyama yöntemi kullanılarak kuyucuklara tutunmuş hücrelerin boyanması sağlanmış ve 570 nm'de absorbanları okunarak biyofilm oluşturma miktarı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol grubu hücrelerde güçlü tutunma gözlenirken, SDS uygulamasının yapıldığı hücrelerde SDS konsantrasyonunun artışına bağlı olarak biyofilm oluşumunda azalma meydana gelmiştir (Şekil 8a). Bu azalma kontrol grubuyla karşılaştırıldığında %0.1 SDS

konsantrasyonunun uygulandığı hücrelerde en az iki kat, %0.2 SDS ve %0.3 SDS konsantrasyonunun uygulandığı hücrelerde ise en az üç kat olarak bulunmuştur. %0.3 değerinin üzerinde SDS konsantrasyonu uygulanan hücrelerde ise biyofilm oluşumuna rastlanmamıştır. SDS'in biyofilm oluşumundaki olumsuz etkisinin hücre yüzeyini çevreleyen proteinlerin denatürasyonu yoluyla ve hücre büyümesinden bağımsız olarak gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla *Gk* büyüme ortamına (TSB) farklı konsantrasyonlarda SDS (TSB, TSB+%0.1, TSB+%0.4) ilave edilerek büyüme eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 8b). Bu sonuçlara göre her üç ortamda da hücre büyümesi gerçekleşmiştir.



Şekil 8. SDS'nin biyofilm oluşumuna (a) ve *Gk* hücre büyümesine (b) etkisi

SONUÇ

Sıcaklık, özellikle gıda üretim endüstrisinde mikrobiyal canlılığı etkileyen önemli kontrol noktalarından biridir. Özellikle termal ortamlarda yaygın olarak bulunan *Geobacillus* türlerinin kontrolü önem arz etmektedir. Bu çalışmada termofilik bir bakteri olan *Gk*'un 96 kuyucuklu polistiren mikrotitre plakalarda oluşturduğu biyofilm miktarı crystal violet metodu kullanılarak belirlenmiş ve çeşitli fiziksel koşullar varlığında (glukoz, NaCl, SDS) biyofilm oluşumundaki değişimler zamana bağlı olarak incelenmiştir.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Çalışmayı F. İnci Özdemir tasarladı. Çalışmayı ve veri analizlerini Tuba Korkmaz ve F. İnci Özdemir yaptı. Makaleyi F. İnci Özdemir yazdı. Tüm yazarlar taslağı okudu ve onayladı.

KAYNAKLAR

- Bezek, K., Nipič, D., Torkar, K. G., Oder, M., Dražić, G., Abram, A., Žibert J., Raspor P., Bohinc, K. (2019). Biofouling of stainless steel surfaces by four common pathogens: the effects of glucose concentration, temperature and surface roughness. *Biofouling*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1575959>
- Bose S., Khodke M., Basak S., Mallick S.K. (2009). Detection of biofilm producing staphylococci: Need of the hour. *J Clin Diagn Res.*, 3:6 (1915–20).
- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., Raposo, A. (2021), Microbial biofilms in the food industry-A comprehensive review. *Int J Environ Res Public Health*, 18(4), 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.*, 8(881–890). <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.

- Elhariry, H.M. (2008). Biofilm formation by endospore-forming bacilli on plastic surface under some food-related and environmental stress conditions. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 3(69-78).
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18 (1049–1056) <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>.
- Harrison, J.J., Turner, R.J. & Ceri, H. (2005) High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC Microbiol.*, 5 (53). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-53>.
- Hukić, M., Seljmo, D., Ramovic, A., Ibrišimović, M.A., Dogan, S., Hukic, J., Bojic, E.F. (2018) The effect of lysozyme on reducing biofilms by *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Gardnerella vaginalis*: An In Vitro Examination. *Microb Drug Resist.*, 24 (353–358). <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0303>.
- Iliadis, I., Daskalopoulou, A., Simões, M., Giaouris, E. (2018). Integrated combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on biofilm formation by *Salmonella enterica* ser. Enteritidis and Typhimurium under low nutrient food-related conditions. *Food Research International*, 107 (10–18). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.015>.
- Kumar M, Flint S, Palmer J, Chanapha S, Hall C. (2021). Influence of the incubation temperature and total dissolved solids concentration on the biofilm and spore formation of dairy isolates of *Geobacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol.*, 15;87(8):e02311-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02311-20>.
- Li, F., Xiong, X.S., Yang, Y.Y., Wang, J.J., Wang, M.M., Tang, J.W., Liu, Q.H., Wang L, Gu, B. (2021). Effects of NaCl concentrations on growth patterns, phenotypes associated with virulence, and energy metabolism in *Escherichia coli* BW25113. *Front Microbiol.*, 16;12:705326. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705326>.
- Lim, Y., Jan, M., Luong, T.T., Lee, C.Y. (2004). Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.*, 186 (722–729). <https://doi.org/10.1128/jb.186.3.722-729.2004>.
- López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(7):a000398. <https://doi:10.1101/cshperspect.a000398>.
- Maunder, E. and Welch, M. (2017) Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett.*, 364 (120). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx120>.
- Moraes, J.O., Cruz, E.A., Souza, E.G.F., Oliveira, T.C.M., Alvarenga, V.O., Peña, W.E.L., Sant'Ana, A.S., Magnani, M., (2018). Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. *Int J Food Microbiol.*, 10:281(90–100). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.011>.
- Muhammad, M.H., Idris, A.L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., Huang, T. (2020) Beyond risk: Bacterial biofilms and their regulating approaches. *Front Microbiol.*, 11 (928). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928/bibtex>.
- Pan, Y., Breidt, F., Gorski, L. (2010). Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b strains. *Appl Environ Microbiol.*, 76 (1433–1441). <https://doi.org/10.1128/aem.02185-09>.
- Rath, H., Stumpp, S.N., Stiesch, M. (2017). Development of a flow chamber system for the reproducible in vitro analysis of biofilm formation on implant materials, *PLoS One*. 12 e0172095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172095>.

- Richter, A.M., Konra K., Oslan A.M., Broo E., Oastle C., Vestb L.K., Goslin R.J., Ness L.L, Arvand, M. (2023). Evaluation of biofilm cultivation models fore testing of disinfectants against *Salmonella typhimurium* biofilms. *Microorganisms*, 11, (761). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030761>.
- Salgar-Chaparro, S. J., Lepkova, K., Pojtanabuntoeng, T., Darwin, A., & Machuca, L. L. (2020). Nutrient level determines biofilm characteristics and the subsequent impact on microbial corrosion and biocide effectiveness. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.02885-19>
- Satpathy, S., Sen, S.K. Pattanaik, S., Raut, S. (2016). Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal Agric Biotechnol.*, 7 (56–66). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.002>.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D.M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P.S. Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20: 10 (608–620). <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Rode, T.M., Langsrud, S., Holck, A., Møretro, T. (2007). Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int J Food Microbiol.*, 116 (372–383). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.017>.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., Ivanova, E.P. (2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14 (2535–2554). <https://doi.org/10.3390/molecules14072535>.
- Waldrop, R., McLare A., Calar F., McLemor R. (2014). Biofilm growth has a threshold response to glucose in vitro. *Clin Orthop Relat Res.*, 472 (3305). <https://doi.org/10.1007/s11999-014-3538-5>.
- Wang N., Ji Y., H G., Yua L., (2021) Development of multi-species biofilm formed by thermophilic bacteria on stainless steel immersed in skimmed milk. *Food Research International*, 150 (110754). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110754>.
- Wang, C., Li, M., Dong, D., Wang, J., Ren, J., Otto, M., Gao, Q. (2007). Role of ClpP in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbes Infect.*, 9 (1376–1383). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.06.012>.
- Xu, H., Zou, Y., Lee, H.Y., Ahn, J. (2010). Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. *J Food Sci.*, 75 (M580–M585). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01865.x>.