

# BİYOFİMLER: YÜZEYLERDEKİ MİKROBİYAL YAŞAM

İlhan Gün<sup>\*1</sup>, Fatma Yeşim Ekinci<sup>2</sup>

1 Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu Süt ve Ürünleri Programı, Burdur  
2 Yeditepe Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul

Geliş tarihi / Received: 31.12.2007

Düzeltilerek geliş tarihi / Received in revised form: 20.02.2009

Kabul tarihi / Accepted: 02.03.2009

## Özet

Eksopolisakkarit matriks içinde sıvı bir yüzeye tutunan mikroorganizma topluluğundan oluşan biyofilmler gıda endüstrisi için ciddi problemlere neden olmaktadır. Hücre dışı polimerik matriks, biyofilmlerin önemli yapısal öğesidir. Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan hücre dışı matriks, biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar. Matriksin en önemli fonksiyonlarından birisi UV radyasyon, farklı pH koşulları, ozmotik basınç, su kaybı, antibiyotik gibi birçok faktöre karşı bakteriyi korumaktır. Bu makalede, gıda sanayisini ilgilendiren en önemli sorunlardan biri olduğu için, biyofilm oluşumu, yapısı ve önlenmesi hakkında bilgiler derlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyofilm, eksopolisakkarit matriks, gıda sanayisi

## BIOFILMS: MICROBIAL LIFE ON SURFACES

### Abstract

A biofilm is a community of microorganisms encased within an exopolysaccharide matrix attached to a surface and causes serious problems for food industry. The extracellular polymeric matrix is an important structural component of biofilms. The matrix, which is composed of polysaccharides, proteins, nucleic acids and water, enables the biofilms to attach to the surfaces. One of the most important functions of the matrix is to protect the bacteria from various stress factors such as UV radiation, extreme pH values, osmotic pressure, dehydration and antibiotics. This study presents a review of the information about formation, structure and prevention of biofilms since they are one of the most important problems in food industry.

**Keywords:** Biofilm, exopolysaccharide matrix, food industry

## GİRİŞ

Biyofilmler, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir (1). Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen terminolojide “hücre dışı polimerik yapı”; ekzopolisakkarit” ya da “ekzopolimer

(EPS)” adı verilen polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır (2). Bir başka tanımlamaya göre biyofilm, birbirine ya da bir yüzeye yapışık bakterinin organik bir polimer matriks içine gömülmesidir (3).

Biyofilmler hem endüstriye, hem de sağlık üzerine olan etkileri nedeniyle gıda sanayinde oldukça önemlidir.

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉ igun@mehmetakif.edu.tr, ☎ (+90) 248 234 5600 / 2174, 📠 (+90) 248 234 5604

Mikrobiyel biyofilmlerin; aletlerin üzerinde oluşturdıkları hasarlar, ürün kontaminasyonları, enerji kayıpları ve neden oldukları enfeksiyon hastalıkları Amerika Birleşik Devletleri'nde milyonlarca dolarlık kayıpların oluşmasına neden olmaktadır (2). İnfeksiyon hastalıklar ile biyofilm oluşturan mikroorganizmalar arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Bu mikroorganizmalar özellikle kalp iç zarı iltihabı, periodontit, kistik fibrioz gibi hastalıklara neden olur (4). 1930'lu yıllardan bugüne kadar yoğun bir şekilde araştırılan biyofilm tabakası, endüstriyel/evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, gemi karinalarında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde "biyofouling" olarak da adlandırılan istenmeyen tortu ve tabakalaşmalara yol açarak önemli derecede ekonomik kayıplara yol açmaktadır (5). Süt ve diğer gıda sanayilerinde biofouling; ısının yüzeyden akışını geciktirmesi, yüzeydeki sıvının sürtünme direncinin artması ve yüzeydeki kimyasal sürtünme oranının artması gibi ciddi sorunlar yaratmaktadır (6). Boru hatlarında oluşan biyofilm, boru hattı boyunca akışın azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca biyofilm oluşan borularda ısı taşınımı azalabilmekte, biyofilm ürüne kontamine olabilmekte (3) ve biyofilm içindeki asit oluşumu nedeniyle borular korozyona uğrayabilmektedir (7).

Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerin ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur. Besinlerin depolanmasının ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması da biyofilm oluşumunun getirdiği diğer avantajlardır. Bakterilerin kümeler halinde ve ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur (8).

Uygun koşullar oluştuğunda bozulma etmeni olanlar ile patojen özellik gösteren tüm mikroorganizmalar tarafından biyofilm oluşturulabilir. Biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeylere bağlanma düzeyi, ortamın pH'sı ve sıcaklığı, bakteri türü, bakteri hücre duvarının yapısı (Gram pozitif ya da Gram negatif oluşu), bakteri sayısı, bağlandığı yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin maddeleri içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok faktör ile değişebilmektedir (9, 10). Bazı bakteriler biyofilm oluşturmak için yüksek eğilime sahiptir. Bunlardan en yaygınları *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus*'dur. Bu mikroorganizmalar

besin maddelerinin çok olduğu birçok ekosistemde tüm yüzey tipleri üzerinde biyofilm oluşturabilir.

## BIYOFİLMİN YAPISI

Biyofilm kütlelerinin %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturur. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir. Ancak bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (11).

Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar. Yüzeye sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri, mikrokolonilerde büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir. Olgun bir biyofilmin kütlelerinin %75-90'ını EPS oluşturmaktadır (12). Kives ve ark., (13)'ün *Pseudomonas fluorescens* B52 suşundan planktonik ve biyofilm içindeki EPS üretimini karşılaştırdığı çalışmalarında, biyofilm içinde polisakkaritlerin ramnoz, glukoz ve glukozamin dışında glukoronik ve guluronik asitlerin de temel bileşikler olduğunu, miktarlarının cam malzemeye kıyasla paslanmaz çelik yüzeyde daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. EPS gel ya da viskoelastik davranış sergileyebilmekte, biyofilm yapısı protein, Ca<sup>+2</sup> iyonları ve polisakkaritler ile daha da sağlamlaşmaktadır (14). Bununla birlikte, hidrolaz, liyaz, glikozidaz, esteraz ve diğer enzimler biyofilmin bileşimine ve fiziksel özelliklerine etki edebilir. Biyofilm yapısındaki bu enzimlerin birçoğu düşük molekül ağırlıklı parçalanma ürünlerinin oluşumuna neden olmakta, bunlar da biyofilmde tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir (11).

Biyofilmin yapısı, saf kültürler için türe, çoklu kültürler için substrata özgüdür. Heterojenik biyofilmlerde yapı çoğunlukla düzensizdir. Biyofilmin yapısı, etrafındaki akış oranı, farklı türlerin sayı ve tipine bağlı olarak değişmektedir. Biyofilm kalınlığı laminer ve türbülant akış arasında maksimum seviyededir. Laminer alandaki kalınlık substrata ulaşabilirliğine, türbülant akışta ise aşınmaya bağlı olarak değişmektedir (3). Biyofilmler yoğun yüzeyler olarak bilinmekle birlikte, son yıllarda yapılan

çalışmalarda, su ve besin maddesinin dağıtıldığı kılcal damar su kanallarının bulunduğu gözenekli bir yapısının olduğu belirlenmiştir. Biyofilm yapısındaki su kanalları mikrokolonilerin hem altında hem de arasında bulunmaktadır. Besinlerin biyofilm tabanına taşınması bu özel kanallarla olmaktadır. Hücresel atık biyofilmin yüzeyinde kanallarla gizlenir. Taşıma işlemi, su yardımıyla ya da pasif difüzyonla kolaylaştırılır. Kolaylaştırılmış taşınma biyofilm içerisine molekül taşınmasına yardımcı olur. Ayrıca su kanallarının, içteki alanlara oksijen taşıdığı da belirlenmiştir (15).

Bakteriyel tutunmada, proteinler gibi organik moleküllerin yüzeye tutunmasının önemli bir rolü vardır. Yüzey proteinleri, biyofilm matriksi içinde düzenli bir şekilde oluşur (16). Bu proteinlerin bazıları, EPS varlığında biyofilm oluşumunu teşvik edebilmektedir. Biyofilm Birleşmiş Protein Yapısı (BAP-Biofilm associated protein), organizmanın yüzeye kolonize olması ve burada sürekli kalmasının sağlanması açısından da önemlidir (17).

Çizelge 1’de biyofilm birleşmiş proteinler ve biyofilm oluşumundaki fonksiyonları verilmiştir (18).

## BIYOFİLM OLUŞUM MEKANİZMASI

Biyofilm tabakası çok farklı çevrelerde oluşabilirken, en basit biyofilm tabakası bile karmaşık bir

dinamiğe sahiptir. Yapılan birçok çalışmada, biyofilmlerin sabit noktalarda biyolojik dönüşümlerini (başlangıç, olgunlaşma, muhafaza ve çözünme) tamamladıklarını gösterilmiştir (19). Bakteriler de biyofilm gelişiminin başlaması besinlerin var olup olmaması gibi spesifik çevresel etmenlere bağlı olarak değişmektedir. Biyofilm gelişimi taze besiyeri sağlandıkça devam eder. Ancak ortamdaki besin maddeleri tükenince yüzey bağlantıları zayıflar ve planktonik modlarına geri dönerler. Açlık durumu hücrelerin yeni taze besin kaynakları aramalarını, ortamlara daha iyi adapte olmalarını ve yayılmalarını sağlar (20). Bu nedenle O’Toole ve ark. (19), açlık durumunda kullanılan metabolik yolun bütün biyofilm gelişim döngüsünü kapsayabileceğini belirtmişlerdir. Diğer yandan biyofilm oluşumunda yüzey koşullarının özelliklerinin bilinmesi de son derece önemlidir.

Bakteriler yüzeye tutunarak koloni oluştururlar ve ileri aşamada eksopolisakkarit matriks içinde, mikroorganizma topluluğu şeklinde biyofilmler oluşmaktadır.

## Yüzey Koşulları

Biyofilm, bakterinin tutunma yüzeyi, sonradan bakteri tutunmasını etkileyen organik ve inorganik maddelere bağlı olarak içinde bakterilerin olduğu herhangi bir sulu yüzeyde oluşabilir (6).

Çizelge 1. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ve yüzey proteinlerinin fonksiyonu

Mikroorganizma	Yüzey proteini	BAP’la hemoloji	Fonksiyon
<i>Staphylococcus aureus</i>	BAP	-	Başlangıç tutunması ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumu
<i>Pseudomonas putida</i>	Mus 20	8e-136 %29 tanımlanmış	Başlangıç çekirdek kolonizasyonu
<i>Salmonella enteritidis</i>	BAPA	3e-114 %28 tanımlanmış	Biyofilm oluşumu Konukçu kolonizasyonu
<i>Burkholderia cepacia</i>	BAP	8e-135 %33 tanımlanmış	Son aşamada biyofilm oluşumu
<i>Enterococcus faecium</i>	Espfm	1e-125 %27 tanımlanmış	Ökaryotik hücrelerde yapışma
<i>Enterococcus faecalis</i>	Esp	2e-118 %26 tanımlanmış	Başlangıç tutunması ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumu
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LapA	8e-59 %25 tanımlanmış	Biyofilm oluşumunda dönüşümsüz tutunma aşamasında destekleme
<i>Escherichia coli</i>	YeeJ	5e-18 %21 tanımlanmış	Yapışma
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VP1443	3e-05 %20 tanımlanmış	Biyofilm olgunlaşması

Örneğin *P. aeruginosa* biyofilmleri büyük hücre yığınları geliştirdiği ve glukoprotein, musinin bulunduğu yüzeylerde geliştiğinde, tobramisin antibiyotikliğine karşı toleransının arttığı belirlenmiştir (21). Bakteriler, farklı tipteki yüzeylere tutunabilirler. Bu nedenle de biyofilm oluşturma ve gelişimleri de bu yüzey koşullarına göre değişebilmektedir (22). Örneğin *Legionella pneumophila* hücrelerinin kauçuk yüzeylere tutunma düzeyi  $2.2 \times 10^5$  kob/cm<sup>2</sup> civarında iken, etilen-propilen, polivinil klorür, polipropilen, yarı çelik, paslanmaz çelik ve cam yüzeylerde tutunma oranının daha az olduğu belirlenmiştir (23).

Patojen veya bozulma etmeni birçok mikroorganizma paslanmaz çelik, alüminyum, cam, ahşap, teflon ve plastik materyaller üzerinde biyofilm oluşturdıkları belirlenmiştir (12, 21, 24, 25, 26, 27). Naylon ve teflon yüzeyler düz olduğundan mikroorganizmalar yapışmış gibi görünürler. Bununla birlikte paslanmaz çelik yüzeyler çatlak ve yarımlar nedeniyle pürüzlü bir yüzeye sahip olabilirler. Alüminyum yüzeylerin geniş çatlakları sünger gibi görünüm sağladığından bu tür yüzeylerde mekanik yöntemlerle uygulanan temizlik işlemlerinde bile bakterilerin yüzeye tutunduğu belirlenmiştir.

Süt endüstrisi açısından biyofilm oluşumunda süt proteini önemli rol oynamaktadır. Paslanmaz çelik yüzey üzerinde yapılan bir çalışmada  $\alpha$ -kazein,  $\beta$ -kazein, k-kazein ve  $\alpha$ -laktalbumin gibi süt protein fraksiyonlarının *S. aureus* ve *L. monocytogenes* tutunmasını azalttığı (24, 28), ancak ortama glutaraldehit katıldığında *S. aureus* ve *L. monocytogenes* tutunmasının arttığı belirlenmiştir (24).

### **Bakterilerin Yüzeğe Tutunması ve Biyofilm Oluşumu**

Mikroorganizmalar gelişim evrelerine göre planktonik ve yerleşik (sessile) olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Planktonik hücreler bireysel olarak serbest yaşarlar. Yerleşik hücreler ise bir yüzeye tutunur ve bir araya gelerek topluluk halinde fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Bakterilerin yüzeye tutunmaları zamana bağlı bir oluşumdur ve bu durum dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki basamakta incelenebilir (8, 21).

### **Dönüşümlü Tutunma**

Dönüşümlü basamakta, bakteri hücresi yüzey ile tam olarak temas etmemekte, ancak bakteri hücresi ile yüzey arasında uzun mesafeli etkileşimler

meydana gelmektedir. Bunlar elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals güçleri olup zayıf etkileşimlerdir. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir, çünkü bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklüdür (3, 15).

Yüzeyle ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin katkısı büyüktür (15). Hücreler bu fazda, durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler. Dönüşümlü tutunma durumu, yapışan ve durgun haldeki hücreler arasındaki dengeli dağılımın bir sonucu olabilir. Burada mikroorganizma yüzeyin yakınındadır, ama henüz yüzeyle temas etmemiştir (21).

### **Dönüşümsüz Tutunma**

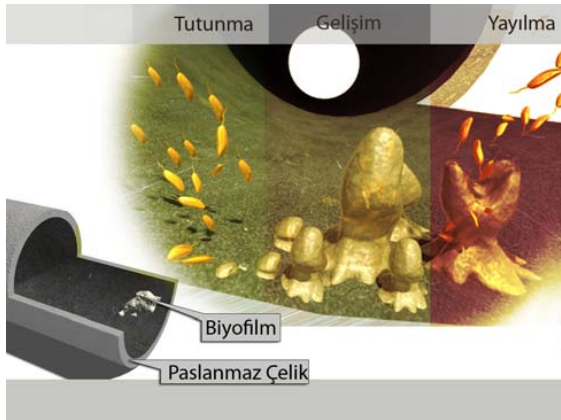
Dönüşümsüz tutunmada ise yüzeyle kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleri oluşmaktadır. Mikroorganizmalar dönüşümlü olarak bağlanırken, yüzeyde yaşamak için yeterli besin maddesini olup olmadığını araştırır. Bakteri hücreleri flagella ve pili gibi organelleri ile ve EPS oluşturarak yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanabilirler (3). Katyonlar, çeşitli makromoleküller ve koloidal materyaller boru hattında tutulduğunda, mikroorganizmalar öncelikle organik materyale dönüşümlü olarak tutunurlar. Yüzeye tutunan bakteri hücreleri, membrana bağlı proteinlerden EPS üretir. Ancak EPS oluşturmayan bazı bakteri türlerinin de yüzeylere bağlanabildiği belirtilmektedir. Dönüşümsüz basamakta, hücrelerin yüzeylerden uzaklaştırılması fırçalama ve kazıma gibi güçlü işlemlerin yapılmasını gerektirmektedir. Gıda endüstrisinde en yaygın olarak *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* türleri biyofilm oluşturmaktadır. Et yüzeylerine bağlanabilen bakteriler arasında ise *L. monocytogenes*, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. sayılabilir (3). Dondurma üreten bir işletmede yapılan çalışmada, üretimden 8 saat sonra dondurma makinesinin taşıyıcı kayışı üzerinde oluşan biyofilm tabakasında gram negatif bakterilerden *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Escherichia* ve *Edwardsiella* içeren enterobakterler, diğer gram negatif mikroflora olarak da *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Moraxella*, *Pseudomonas* ve *Alcaligenes* spp.

belirlemişlerdir. Ayrıca gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria* ve *Streptococcus*, *Leuconostoc* ya da *Pediococcus spp* gibi laktik asit bakterileri izole edilmiştir (29).

### Koloni Oluşumu

Biyofilm oluşumunun son aşaması yüzey kolonizasyonudur. Tutunan bakteri gelişir ve daha sonra bölünür. EPS de, diğer planktonik hücrelerin yakalanması da sağlanır. Bu aşamada bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), aynı yüzeye diğer bakteriler de koloni oluşturur (ikincil koloni). Biyofilm büyüdükçe, polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür (3).

Şekil 1'de bakterilerin paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşum aşamaları gösterilmiştir (12).



Şekil 1. Bakterilerin paslanmaz çelik yüzeyde biyofilm oluşum aşamaları

Daha sonraki evrede ise, mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler. Konfokal lazer mikroskopisi ile yapılan çalışmalar bakterilerin, kompleks ekzopolisakkarid ile çevrilmiş mikrokoloniler içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuşlardır. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (3, 6).

Biyofilm gelişiminin kopma veya ayrılma evresinde tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm

oluşum basamağının bir parçası olarak tek bir hücrenin veya çoklu hücrelerin kopmasının bir sonucu olabilir (3).

### Sinyal Molekülüyle İletişim (Quorum Sensing)

Biyofilm oluşumu, bakterilerin sadece bir araya gelerek belirli bir yüzeye tutunduktan sonra oraya yapışması ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam ettikleri şeklinde gerçekleşen rasgele bir olay değildir. Birçok organizma aktivitelerini koordine etmek için birbirlerine sinyal verirken küçük yayılabilir molekülleri kullanırlar. Biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizma olan ve "Quorum Sensing (QS)" olarak adlandırılan bu işlem ile bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmekte ve bu verileri diğerlerine iletmesine imkân sağlamaktadır (30). Başka bir ifadeyle, QS ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama 'Ben buradayım' mesajı veren bir molekül salgılar. Yüze tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artar. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani, biyofilm içerisindeki bakteriler interselüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla haberleşmektedirler (9).

Şekil 2'de bakterilerin sinyal molekülleri ile iletişimi gösterilmiştir.



Şekil 2. Bakterilerin sinyal molekülleri ile iletişimi

Bununla birlikte QS'in gelişim, spor oluşumu, antibiyotik sentezlenmesi, virülens faktör oluşumu, hücre ayırımı ve patojen bakteri enfeksiyonlarında diğer fiziksel olaylarla birlikte mikroorganizmanın beslenme değişimini düzenlediğine inanılmaktadır (31).

Bu hücreler arası iletişimi sağlayan mekanizma, kendiliğinden sinyal üretebilen ve "Oto-Endükleyici [Auto-inducer (AI)]" adı verilen moleküllerden oluşur. QS moleküllerinin oto-endükleyici olarak da ifade edilmelerinin nedeni, üretildikleri hücrenin metabolizması üzerinde düzenleyici etki göstermeleridir (32, 33). Bazı mikroorganizmalar ise birden fazla farklı QS molekülü kullanmaktadır. QS'in iki şekilde gerçekleşir; Türler arası ve tür içi sinyal molekülleriyle iletişim. Gram negatif bakterilerde türden türe QS mekanizmasında oto-endükleyici olarak N-acyl homoserin lakton (AHL, AHLs, acyl-HSL veya HSL), gram pozitif bakterilerde çoğunlukla oligopeptidler (autoinducering peptitler) (28), hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler ortak olarak oto-endükleyici -2 (AI-2's) kullanmaktadır (34). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *E. coli* ve *Salmonella enterica*'nın hücreden hücreye sinyalinde AI-2 sinyalleriyle gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu sinyal moleküllerinin üstel gelişim süresince üretildiği ve bakteri membranına serbestçe geçebildiği ifade edilmektedir (35). Bir başka deneysel çalışmada ise, *S. aureus*'un QS mekanizması bloke edildiği zaman biyofilm oluşumunun arttığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda *S. aureus*' un düşük miktarlarda biyofilm oluşumunu artırırken, yüksek miktarda bulunduğu ortamda biyofilm oluşumunu bırakarak konuk hücreyi işgal ettiği düşünülmektedir (33). Benzer bir çalışmada, *Bacillus cereus*'un biyofilm oluşturmak üzere, küçük peptitlerin aktive ettiği PlcR (pleiotropic regulator) sinyal moleküllerini kullandığı ifade edilmektedir (36).

### **Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesi**

Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesinde ilk aşama biyofilm oluşmadan gerekli tedbirlerin alınmasıdır. İşletmelerde, belirli aralıklarda işletmeye uygun ve etkili bir temizlik işlemiyle mikroorganizmaların tutunabileceği organik maddeler uzaklaştırılmalı ve bunu etkili bir dezenfeksiyon uygulaması izlemelidir. Gıda işletmelerinin büyük

bir kısmında, temizlik sırasında biyofilmin uzaklaştırılması için yüzeye mekanik kuvvet uygulanmaktadır. Mekanik işlemler arasında yer alan otomatik fırça veya yüksek basınçla temizlik yapılması, jel temizleyiciler veya düşük basınçla yapılan temizlikten daha etkilidir. Son yıllarda biyofilm oluşumunu engelleme yöntemleri arasında elektriksel alanlar, katalize modifiye yüzeyler, ultrason, enzimler, amonyak ve formaldehit, deterjan maddeleri, yüksek basınçlı temizleme sistemleri kullanımı tercih edilmektedir. Ancak her birinin etkinliği uygulanan yüzeye, biyofilm oluşturan bakteri türüne ve uygulama şekillerine göre farklılık gösterebilmektedir (37). Planktonik hücrelerle kıyaslandığında, biyofilm oluşturan hücreler; antibakteriyel maddelere, iodin, iodinpolivinil-pirollidon kompleksi, klorin, monokloramin, peroksijenler ve glutraldehit gibi biositlere ve ısıya karşı daha dayanıklıdır (38). Bu nedenle biyofilm üzerine yapılan araştırmaların bir diğer yönü de mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ve her bir mikroorganizma için farklı kompozisyona sahip biyofilmin engellenmesi ve/veya ortadan kaldırılması üzerinedir (37). Biyofilm hücrelerinin antibakteriyel maddelere karşı dayanımının, planktonik hücrelerden en az 500 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir (15).

Süt işletmesinde, ürün işleme ve paketleme aşamalarında taşıyıcı sistemlere kontamine olan *L. monocytogenes*'in oluşturduğu biofilmin kontrolünde 10 mg/L isotiazolon mikrobisit (2-methyl-5-chloro-2-methyl isothiazolone) kullanımının etkili olduğu belirlenmiştir. Klorin gibi, ozon da paslanmaz çelik yüzeye kolonize olan *P. aeruginosa* ve *Alcaligenes faecalis*'e karşı önemli bir dezenfektandır. Hücre ölümüyle sonuçlanan ozon uygulanmasında, bakteri hücrelerinin membran lipitleri, karbohidrat ve proteinleri okside olur (39). Niemire ve Solomon (40)'ın biyofilm oluşturan *Salmonella enterica* üzerine yaptıkları bir çalışmada, iyonize radyasyon uygulamasının biyofilm oluşumunu önemli derecede etkilediğini belirlemişlerdir.

Gıda kaynaklı patojenlerin biyofilm gelişimini engellemek için tercih edilen biyokontrol uygulamalarında bakteriyosinlerin kullanıldığı görülmektedir. Konu ile ilgili bir çalışmada, ticari bir starter kültür olan *Oenococcus oeni* tarafından oluşturulan biyofilme karşı pediosin PD-1, plantarisin 423 ve nisin kullanımının etkili olduğu belirlenmiştir (41). Bunların dışında ekstraselüler polimerlerin temizlenmesinde enzimlerden de yararlanılmaktadır

(7). Konu ile ilgili bir çalışmada, *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmin içinde üretilen katalaz enziminin hidrojen peroksit içeren dezenfektanlara karşı dayanımlarını artırmada kısmen sorumlu olduğu ifade edilmektedir (42). Biyofilm matrisi içindeki bakterilerin ilaca dayanıklı suşları  $\beta$ -Laktamaz enzimi üretebilmektedir. Benzer bir şekilde *E. coli* biyofilmleri de ilaca karşı dayanıklı olan  $\beta$ -Laktamaz aktivitesi göstermekte, inpenam ve sefoksitin gibi antibiyotiklere karşı dayanımı artırmaktadır (43).

Son yıllarda yapılan çalışmalardan bir diğeri de, biyofilm oluşumunu engellemede biyoelektrik alanların kullanımınıdır. Bu konuda yapılan araştırmanın birinde 200-400  $\mu$ A gibi çok düşük akımda, gümüş, karbon ve platin elektrotların kullanıldığı elektriksel alanda, gram negatif ve gram pozitif bakterilerin planktonik hücreleri yanında *Candida albicans* hücrelerinin de imha edildiği belirtilmektedir (44). Bir başka çalışmada biyofilm oluşturan *P. aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin tobramisin antibiyotiği ile birlikte 1 mA elektrik uygulamasıyla bakteri düzeyinde 8 log'luk bir azalma meydana geldiğini belirlenmiştir (45). Paslanmaz çelik yüzeyde *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmi üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada, biyositlerle birlikte 5 V/cm – 1.15 mA/cm<sup>2</sup> gibi düşük kuvvette elektrik alanı ( $\pm$ 12 V/cm) ve düşük akım yoğunluğunda ( $\pm$ 2.1 mA/cm<sup>2</sup>) elektriksel alan uygulamasının bakteri inhibisyonu üzerine etkisinin olduğu belirlenmiştir (46).

Biyofilm organizmalarını yok etmek veya ortadan kaldırmak için, biyosit EPS'e nüfuz etmelidir ve mikrobiyel hücreye geçişi sağlanmalıdır (37). EPS'nin kimyasal bileşimi biyofilm çeşitlerine göre değiştiğinden, spesifik olmayan mekanizmalar tercih edilmektedir. Bu amaçla genellikle paslanmaz çelik üzerinde *Listeria* ve *Pseudomonas*'ların oluşturduğu biyofilmlerin yok edilmesinde klorin ve peroksoasetik asit gibi oksidatif maddeler kullanılmaktadır (47). Bir biyofilm içindeki bakteri sayısını azaltmak için 1000 ppm den fazla aktif klorin konsantrasyonu gerekli iken, planktonik hücreler için 10 ppm yeterli olmaktadır. Biyofilmle mücadelede aktif klorin öncelikle tercih edilmesinin sebebi, mikroorganizmaları öldürmesi yanı sıra, yüzeyden EPS'in uzaklaştırılmasını sağlamasıdır (37). Güçlü bir okside edici olan ozon, oligotrofik su sistemlerinde gelişen biyofilmlerin uzaklaştırılması ve yok edilmesi için başarıyla uygulanmaktadır (48).

## SONUÇ

Gıda işletmelerinde sanitasyon aşamalarında meydana gelen eksiklikler herhangi bir yüzeyde kolaylıkla biyofilm oluşmasına sebep olmaktadır. Ayrıca biyofilm oluşumunu engellemenin mümkün olmadığı, bakterilerin biyofilm yapısı içinde genetik değişimlere uğrayabileceği düşünüldüğünde gıda işletmelerinde HACCP kriterlerinin çok iyi belirlenmesi gerekmektedir. Konu ile ilgili günümüze kadar birçok araştırma yapılmakla birlikte, özellikle biyofilm oluşumunun engellenmesiyle ilgili yeni teknolojik gelişmeler konunun önemini ve güncelliğini korumaktadır.

Son yıllarda, genetik ve moleküler tekniklerin mikroskopik teknikler ile kombinasyonu ile biyofilm gelişiminin moleküler mekanizması daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların çok iyi organize edilmiş bir gelişim prosesi sonucu oluşturdukları kompleks organizma toplulukları olarak görülebilir. Biyofilmlerin oluşumunda çoğu mikroorganizma için genel mekanizma aynı olsa da, türlere spesifik davranışlar her bir mikroorganizmanın kendine özel değerlendirilmesi gerektiğini de vurgulamaktadır. Saf kültürlerin yanı sıra, biyofilm oluşumu farklı birçok türün kombinasyonlarından da kaynaklanabileceği için bunlar arasındaki ilişkilerin iyi anlaşılması da şarttır.

## Teşekkür

Kullanılan resimlerin bilgisayarda tasarlanmasında yardımcı olan Can Yastioğlu'na sonsuz teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Donato A, Parrilli M. 2006. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr Res*, 341: 2456 – 2461.
2. Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM. 2006. A feeling for the microorganism: structure on a small scale. *Biofilms on plant roots. Bot J Linnean Soc*, 150 (1): 79-88.
3. Poulsen LV. 1999. Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. Wiss. u. Techn.*, 32 (6): 321-326.
4. Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms : Survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiol*, 15 (2): 167-193.

5. Hallam NB, West, JR, Forster, CF, Simms J. 2001. The potential for biofilm growth in water distribution systems *Wat Res*, 35: 4063-4071
6. Kumar CG, Anand SK. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol*, 42: 9–27.
7. Jayaraman A, Cheng ET, Earthman JC, Wood TK. 1997. Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 18: 396–401.
8. Çiftçi Z. 2005. Kronik tonsillitte biofilmin rolü, T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi, 69 sayfa, Basılmamıştır
9. Arnold JW, Silvers S, 2000. Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation, *Poul Sci*, 79: 1215-1221.
10. Lindsay D, Brözel VS, Mostert JF, Von Holy A. 2002. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate *J Appl Microbiol* 92: 352 – 361.
11. Allison DG. 2003. The biofilm matrix. *Biofouling*, 19 (2): 139-150.
12. Padera RF. 2006. Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovasc Pathol* 15: 264– 270.
13. Kives J, Orgaz B, SanJos'e C. 2006. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids Surfaces B*, 52: 123–127.
14. Hussain M, Wilcox MH, White PJ. 1993. The slime of coagulase negative Staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol.*10: 191-207.
15. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49: 711-745.
16. Lasa I, Penadés JR. 2006. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 157: 99–107.
17. Tormo MA, Knecht E, Götz F, Lasa I, Penadés JR. 2005. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* 151: 2465–2475.
18. Latasa C, Solano C, Penadés JR., Lasa I. 2006. Biofilm-associated proteins. *C. R. Biologies* 329; 849–857.
19. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
20. Kolter R, Tormo A. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 855 – 874.
21. Lindsay D, Von Holy A. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*, 1-13.
22. Mafu AS, Roy D, Goulet J. 1990. Magny P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *J Food Prot* 53: 742 - 746.
23. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. 1994. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl Environ Microbiol* 60:1842-1851.
24. Barnes LM, Lo ME, Adams MR, Chamberlain AHL. 1999. Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces. *Appl Environ Microbiol*, 65 (10): 4543-4548.
25. Trachoo N. 2003. Biofilms and the food industry. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 25 (6): 807-815.
26. Kim H, Ryu JH, Beuchat LR. 2006. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. *Appl Environ Microbiol*, 72 (9): 846–5856.
27. Planchon S, Gaillard-Martinie B, Dordet-Frisoni E, Bellon-Fontaine MN, Leroy S, Labadie J, Hébraud M, Talon R. 2006. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosum* *Int J Food Microbiol.* 109: 88–96.
28. Wong ACL. 1998. Biofilms in food processing environments. *J Dairy Sci*, 81: 2765–2770.
29. Gündüz GT, Tuncel G. 2006. Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 89 (3-4): 329-336.
30. Camara M. 2007. Quorum sensing: A cell-cell signaling mechanism used to coordinate behavioural changes in bacterial populations <http://wmc7.liacs.nl/proceedings/WMC7Camara.pdf> (Erişim tarihi 24.08.2007)
31. March JC, Bentley WE. 2004. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 15: 495–502.
32. Novick RP, Muir WM. 1999. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2: 40-45.
33. Donabedian H. 2003. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect*; 46: 207-214.
34. Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, 2005. Bacterial communication (“Quorum Sensing”) via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 312: 417-423.



35. Ahmer BMM. 2004. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, 52: 933-945.
36. Hsueh YH, Somers EB, Lereclus D, Wong AMC. 2006. Biofilm Formation by *Bacillus cereus* Is Influenced by PlcR, a Pleiotropic Regulator. *Appl Environ Microbiol*, 72 (7): 5089–5092.
37. Meyer B. 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int. Biodeterioration Biodegrad*, 51: 249 – 253.
38. Cloete TE. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int Biodeterioration Biodegrad* 51: 277 – 282.
39. Mittelman MW. 1998. Structure and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms in Fluid Processing Operations. *J Dairy Sci*, 81: 2760–2764.
40. Niemira AB, Solomon EB. 2005. Sensitivity of Planktonic and Biofilm-Associated *Salmonella* spp. to Ionizing Radiation. *Appl Environ Microbiol*, 71: 2732–2736.
41. Nel HA, Bauer R, Wolfaardt GM, Dicks LMT. 2002. Effect of bacteriocins Pediocin PD-1, Plantaricin 423, and Nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *American Society for Enology and Viticulture*. 53(3):191-196.
42. Stewart PS, Roe F, Reyner J. 2000. Effect of catalase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> penetration into *P. aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 66: 836-838.
43. He P, Li N, Li S. 2001. A study on beta lactamase activity of biofilm *E. coli*. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 24: 537 – 538.
44. Davis VC, Wagle N, Anderson MD, Warren MM. 1991. Bacterial and fungal killing by iontophoresis with Long-Lived Electrodes. *Antimicrob Agents Chemother*, 35 (10): 2131-2134.
45. Wellman N, Fortun SM, McLeod BR. 1996. Bacterial biofilms and the bioelectric effect. *American Society for Microbiology* 40 (9): 2012–2014.
46. Blenkinsopp SA, Khoury AE, Costerton JW. 1992. Electrical Enhancement of Biocide Efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 58 (11): 3770-3773.
47. Jang A, Szabo J, Hosni AA, Coughlin M, Bishop PL. 2006. Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 368–376.
48. Barnes RL. and Caskey DK. 2002. Using ozone in the prevention of bacterial biofilm formation and scaling, *Water Conditioning&Purification*, <http://www.prozone-int.com/pdf/biofilms.pdf> (Erişim tarihi 25.11.2007)