











Bizmut-BAL Şelati Sentezinin Optimizasyonu ve *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* ve Aktif Çamur Üzerindeki İnhibisyon Etkisi

Synthesis Optimization and Inhibition Effects of Bismuth-BAL Chelate on *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, and Activated Sludge

Börte Köse-Mutlu^{1,2} , Türker Türken^{1,3} , Selin Okatan¹ , Gamze Durmaz¹ ,
Melike Ürper-Bayram^{1,3} , Serkan Güçlü^{1,3} , Süleyman Övez³ , İsmail Koyuncu^{1,3,*} 

¹ Prof. Dr. Dincer Topacık Ulusal Membran Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, TÜRKİYE

² Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü, İstanbul, TÜRKİYE

³ İstanbul Teknik Üniversitesi, İnşaat Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İstanbul, TÜRKİYE

Sorumlu Yazar / Corresponding Author*: koyuncu@itu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 15.11.2018

DOI:10.21205/deufmd.2019216215

Kabul Tarihi / Accepted: 22.01.2019

Araştırma Makalesi/Research Article

Atıf şekli/How to cite: KÖSE MUTLU, B., TÜRKEN, T., OKATAN, S., DURMAZ, G., ÜRPER BAYRAM, M., GÜÇLÜ, S., ÖVEZ, S., KOYUNCU, İ. (2019).

Bizmut-BAL Şelati Sentezinin Optimizasyonu ve *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* ve Aktif Çamur Üzerindeki İnhibisyon Etkisi. DEUFMD, 21(62), 499-508.

Öz

Teknoloji ve mühendisliğin gelişmesi ile beraber yüksek kalitede pek çok ürünün üretimi ve geniş kullanım alanlarında yeralması mümkün olmaktadır. Bu yüksek kalitedeki mikro- ve nanoteknolojik malzemeler bakteri kolonileri ve biyofilm tabakaları tarafından kolayca sarılmaktadırlar. Araştırmacılar, bu probleme çözüm bulabilmek adına pek çok farklı antibakteriyel kimyasal sentezlemişlerdir. Uzun bir süredir, hücre dışı polimerik maddeler (EPS) ve çözünmüş mikrobiyal ürünler (SMP) sebebiyle porlarda ve yüzeylerde gerçekleşen biyofilm oluşumu mühendislik uygulamalarının bir problemi olarak gösterilmektedir. Mikroorganizmalar sentezlenen bizmut-BAL şelati (Bis-BAL) na maruz kaldığında toplam polisakkaritleri ve proteinleri daha az salgırlar. Bu çalışmada *Escherichia coli* ve *Streptococcus pyogenes* tarafından salgılanacak EPS ve SMP'nin engellenmesi öngörülmüştür. Bizmut metali ve lipofilik tiyolün çeşitli konsantrasyonlarının kombinasyonlar halinde denenmesi ile sentezlenen kimyasallar arasından en yüksek inhibisyon etkisini gönderenin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bis-BAL'ın uygulanmasında izlenebilecek stratejiler ve stabilitesi de çalışılmıştır. İlgili şelat membran biyoreaktörlerde kullanılacak olan membranların bünyesine ilave edilebilir ve böylelikle doğal su kaynaklarının kalitesinin korunarak su ihtiyacının karşılanmasında tercih edilen membran teknolojisinde biyotıkanmanın önüne geçilebilir.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel Ürün, Bizmut, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu, Karışık Kültür; Saf Bakteri Kültürü.

Abstract

With the development of technology and engineering, different highly qualified products can be manufactured and used with a wide range. This highly qualified micro- and nano-technological materials can be easily covered with bacteria colonies and biofilms. Researchers have tried to synthesize different anti-bacterial chemicals to solve this problem. The formation of biofilm on the surface and in the pores, which is caused by the extracellular polymeric substances (EPS) and soluble microbial products (SMP), has long been identified as a problem for engineering applications. The total polysaccharides and proteins secreted by microorganisms can be decreased when exposed to the synthesized bismuth-BAL chelate (BisBAL). Our proposal is to inhibit the EPS and SMP from *Escherichia coli* and *Streptococcus pyogenes*. The anti-bacterial properties of synthesized chemicals that have several combinations of bismuth metal with lipophilic thiol compound were examined to get the optimum inhibitor. The application strategies and stability of BisBAL were also studied. The chelate can be used as a compound of membranes used in membrane bioreactors, which will be an obligation of advanced wastewater treatment with the aims of the protection of natural water sources' quality and supply the water demand, to prevent the biofouling.

Keywords:Anti-bacterial Product, Bismuth, Minimum Inhibition Concentration, Mixed Culture, Pure Bacteria Culture.

1. Giriş

Membran teknolojisi, su ve atıksu arıtımında kullanılan arıtma teknolojileri arasında en yüksek arıtma verimine sahip ve elverişli olanıdır. Membranlar por çaplarına göre partiküllere karşı seçici geçirgen davranış sergileyen ara yüzeylerdir [1]. Membran biyoreaktörler (MBR) ise membran teknolojisi ile biyolojik arıtma prosesini biraraya getirir ve dünya pazarındaki yerini son 10 yılda işletme maliyetlerinde ortaya çıkan azalma sayesinde hızla arttırmıştır [2]. Üretilen membranlara anti-biyotikanma özelliğinin verilebilmesi amacıyla üretim sırasında çeşitli malzemeler ve/veya kimyasallar ilave edilebilir. Biyotikanma problemine çözüm bulunabilmesi, daha az hacim ihtiyacı ve daha kısa hidrolik bekletme süreleri gibi avantajlara sahip MBR teknolojisinin pazardaki yerini büyütmesinin önündeki en büyük engelin kalkması anlamına geleceği için oldukça önemlidir.

Malzemelerde iki tip biyotikanma gözlenir: tersinir ve geri dönüşümsüz biyotikanma. Mühendislik ürünleri kullanım ömürleri içerisinde fiziksel ve kimyasal temizlemeye tabi tutulurlar fakat bazen temizleme prosedürünün sonunda kirliliğin kalabildiği gözlenir. Bu kirlenme, geri dönüşümsüz kirlenme olarak sınıflandırılır ve biyokek de bu sınıftaki oluşumlardan biridir. Genellikle, biyofilmler kolonize yüzeyler, içiçe geçmiş hücre dışı polimerler, mikrobiyal hücreler tarafından oluşturulmuş iyon kanallarından oluşur ve kalınlıkları mikron boyutlarındadır [3, 4].

Biyotikanmanın çözümü için biyofilm oluşumunun en başından engellenmesi gerekmektedir. Tarihsel uygulamalara bakıldığında, gümüş, altın, çinko, bakır, titanyum, selenyum ve bizmut gibi metallerin antibakteriyel ve anti-biyotikanma özellikleri sebebi ile kullanıldığı görülmektedir [5-19]. Bu metaller, eklendikleri ürüne antibakteriyel özelliği kazandırır ve bu antibakteriyel özellik ise üç ana mekanizmaya dayanmaktadır: 1) yeni bakteri hücrelerinin hücre duvarı sentezinin bloklanması, 2) bakterinin hücre duvarının seçiciliğinin zedelenmesi ve 3) protein sentezinin durdurulması [20]. Antibakteriyel maddeler, bakterilerin ölümüne sebep olabilir ya da mikrobiyal ürünlerinin sentezini durdurabilir. Antibakteriyel etkinin hangi seviyede gözleneceği bakteri türüne göre değişkenlik gösterir. Bu durum genellikle türün gram-negatif veya gram-pozitif olması ile alakalıdır. İnhibisyon seviyesi çoğunlukla minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ile ifade edilir ve gram-pozitif bakteriler peptidoglikan molekülleri ile negatif yükleri sebebiyle gram-negatif bakterilerden daha hassastırlar [21]. Daha önce, gümüş metalinin gram-pozitif bir tür olan *Staphylococcus aureus* üzerindeki antibakteriyel etkisi çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur [7, 8]. Altın metalinin de hem gram-pozitif hem de gram-negatif türler için antibakteriyel olarak başarı ile kullanılmıştır [9, 10]. Çinko oksit, bakır, titanyum ve selenyum üzerine de çalışmalar mevcut olup her iki grupta da (gram-pozitif ve gram-negatif) etkili oldukları gözlenmiştir [11-

15]. Bizmut metali ve çeşitli bizmut bileşenlerinin de antibakteriyel ajan olarak kullanıldığı bilinmektedir [16, 17]. En bilinen ant-biyotikanma özellikli bizmut bileşenleri, bizmut tiyolleridir. Bu tiyol bileşikler, EPS üretimini azaltır ve biyofilm oluşumunu kontrol altına alır. Bizmut tiyolleri bakterileri %70-90 aralığında bir verim ile etkiler ve diğer antibakteriyel kimyasallardan daha güvenlidirler [18, 19]. Bizmut ve lipofilik tiyoller, $\mu\text{mol/L}$ seviyelerindeki düşük konsantrasyonlarda bile antibakteriyel özellik gösterirler [20] ve hem gram-pozitif hem de gram-negatif türler üzerinde etkilidirler [21]. BisBAL ise laboratuvarında sentezlenen ve diğer bizmut bileşiklerinden 1000 kat daha fazla antibakteriyel özellik sergileyebilen bir bizmut tiyolüdür [22]. BisBAL'ın EPS ve SMP üretimini ve salgılanmasını ve dolayısı ile biyofilm oluşumunu azalttığı bilinmektedir [21].

Bu çalışmada, BisBAL sentezi çeşitli koşullar denenerek optimize edilmiş ve şelatın inhibisyon etkisi gram-negatif ve gram-pozitif bakteriler üzerinde denenmiştir. Gram-negatif bakterileri temsil etmesi açısından *Escherichia coli* tercih edilirken gram-pozitif bakteri olarak *Streptococcus pyogenes* ile çalışılmıştır. Ayrıca, karışık kültür üzerindeki etkilerin de gözlenebilmesi amacıyla aktif çamur üzerinde de denemeler gerçekleştirilmiştir. BisBAL'ın membran üretiminde katkı maddesi olarak kullanılabilmesi için potansiyelinin ortaya konulmasının MBR teknolojisinin geleceği açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

2. Materyal ve Metot

2.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

BisBAL sentezinde kullanılan propilen glikol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$, $\geq\%99,5$, fcc), bizmut nitrat pentahidrat ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ acs reagent $\geq\%98,0$) ve 2,3-dimerkapto-1-propanol Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. Tüm pH ayarlamaları 1 N NaOH ile (ekstra saf, Sigma-Aldrich, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Bakteriler, saf kültür olarak Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve uygulama Merkezi (KÜKENS)'nden temin edilmiştir. LB sıvı besiyeri Sigma-Aldrich'ten temin edilmiş tripton, maya, ve NaCl kullanılarak hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm cam ve plastik malzemeler 121°C sıcaklık ve 1,06 bar basınç koşullarında otoklavlanmıştır (NÜVE OT032, Türkiye). Optik yoğunluk (OD) değerleri

UV spektrofotometre (Pharmacia LKB-Novaspek, ABD, quartz hücre ve 1 cm optik mesafe) kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.BisBAL Sentezi

BisBAL sentezindeki koşulların optimizasyonu için üç parametre seçilmiştir: sıcaklık, pH ve Bis:BAL molarite oranları. Sıcaklığın optimizasyonunda 25°C ve 45°C olmak üzere iki farklı ortam sıcaklığı denenmiştir. Asidik, nötral ve bazik koşulların simule edilebilmesi amacıyla 4, 7 ve 10 pH değerlerinde çalışılmıştır. Son olarak, bizmut ve tiyol molar oranları (Bis:BAL) 3:1, 2:1 ve 1:1 olarak belirlenmiştir. Propilen glikol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$, $\geq\%99,5$, fcc, Sigma-Aldrich, Almanya) içerisinde çözünmüş bizmut nitrat pentahidratın ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ acs reagent $\geq\%98,0$, Sigma-Aldrich, Almanya) 2,3-dimerkapto-1-propanol üzerine (Sigma-Aldrich, Almanya) ilave edilmiştir [23]. pH ayarlamaları 1 N NaOH ile (ekstra saf, Sigma-Aldrich, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık ayarı ise, sıcaklık ölçümü ile sıcaklığı ayarlayabilen ısıtıcı karıştırıcılar ile gerçekleştirilmiştir. 18 farklı kombinasyon ile üretilen BisBAL kimyasallarının listesi daha önce gerçekleştirilmiş çalışmada görülebilmektedir [24].

2.3. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Bakteri Suşları

Belirtildiği üzere, gram-negatif bakterileri temsil etmesi açısından *E. coli* tercih edilirken gram-pozitif bakteri olarak *S. pyogenes* ile çalışılmıştır. Liyofilize halde alınan türlerin bilgileri Tablo 1'de verilmektedir.

Tablo 1. Suş bilgileri.

Suş Adı	Liyofilizasyon Tarihi
<i>E. coli</i>	12.08.1998
<i>S. pyogenes</i>	13.02.1994

Liyofilize bakteri ampüllerinin üst noktasının 2,5-3 cm aşağısına bir kesik atılmış ve alkole daldırılmış pamuk ile kesigi üzerinde kalan kısım tutularak ampülün kırılması sağlanmıştır. Üst kısmı kırılmış ampül dezenfektan dolu bir behere oturtulmuştur. Ardından, bu ampülün içerisine steril bir pastör pipet yardımı ile $0,2 \text{ cm}^3$ Luria Bertani (LB) sıvı besiyeri ilave edilmiştir.

Besiyeri Hazırlanışı

LB sıvı besiyeri, 10 g/L Tripton, 5 g/L maya, 5 g/L NaCl kullanılarak hazırlanmıştır. LB agar için ise bu kimyasallara ilave olarak 15 g/L baktioagar kullanılmıştır. Solüsyonlar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve 121°C sıcaklık ve 1,06 bar basınç koşullarında otoklavlanmıştır. Otoklavın ardından her bir agar plakaya 20 ml LB agar solüsyonu dökülüp 60°C'ye gelene kadar bunsen alevinin yanında bekletilmiştir. Yoğunlaşan buharın su damlaları şeklinde agarların üzerine dökülmesini engellemek amacıyla yarı açık bırakılan kapaklar kapatıldıktan sonra plakalar parafilmlemlenmiştir. Sıvı besi yerleri ise steril falkon tüplerine 5 ml hacim ile doldurulmasının ardından tekrar otoklavlanarak hazırlanmıştır.

İnokulasyon

İnhibisyon testlerinde kullanılacak olan tekil koloniyi elde edebilmek adına LB agarlara inokulasyon (ekim) yapılmıştır. Bakteri süspansiyonundan steril öze ile alınan bir damla agara damlatılmış ve çizgiler çizilerek plakanın dört çeyreğine de yayılmıştır. Her çeyrek için yapılacak ekim öncesi özenin ucu steril edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonucunda dördüncü çeyrekte tekil koloniler elde edilebilmiştir. Elde edilen tekil koloniler öze ile alınarak falkon tüplerdeki sıvı besiyerine aktarılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Tüm ekim işlemler iki tür için de aynı prosedürler ile gerçekleştirilmiş ve üçlü tekrar ile deneyler yapılmıştır. İşlemler karanlık, serin ve steril ortamlarda gerçekleştirilmiştir.

Bakteri Sayımı

İnhibisyon testlerinde kullanılacak olan bakteri süspansiyonlarındaki bakteri sayısının belirlenmesi için seyreltme motodu kullanılmıştır. Süspansiyonlar izotonik su kullanılarak (1:10, 1:100, 1:1000 ve 1:10000) seyreltilmiş ve membran filtrasyona tabi tutulmuştur. Membranlar, üzerlerindeki kalan bakteriler ile agar plakalara yatırılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloniler sayılmıştır ve deney başlangıcındaki toplam bakteri sayısı her iki tür için de 2.10^8 CFU/ml olarak belirlenmiştir.

Aktif Çamur

Tüm inhibisyon testleri saf kültürlerin yanı sıra aktif çamur yani karışık kültür ile de gerçekleştirilmiştir. Aktif çamur, Paşaköy İleri

Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisinin havalandırma tankından alınmıştır (İstanbul, Türkiye).

2.4. İnhibisyon Testleri

Falkon tüpler içerisinde saklanan steril sıvı besiyerlerinin (5 ml) üzerine 0,2 ml bakteri solüsyonu eklenmiştir. Ardından 24 saatlik inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübe bakteri solüsyonları yaklaşık olarak 8000 bakteri/L içerik elde edilecek şekilde izotonik su ile seyreltilmiştir. Bu şekilde hedef bir başlangıç bakteri içeriğinin seçilmesindeki sebep UV spektrofotometre okumalarında okuma limitlerinin üzerinde bir OD elde edilmesinin önüne geçilmesidir. Bakteri ilavesinin ardından çeşitli son molar konsantrasyonlar (5, 12, 15, 20, 30 ve 40 µM) doğrultusunda BisBAL eklemesi yapılmıştır. Hedef molar konsantrasyona ulaşmak için eklenecek BisBAL hem doğrudan ilave edilmiştir hem de seyreltilerek (aynı son molar konsantrasyona ulaşacak şekilde) ilave edilerek seyreltmenin etkisi gözlenmek istenmiştir. BisBAL ilavelerinin ardından numuneler 24 saat inkübe edilmiş ve OD ölçümleri yapılmıştır.

Doğrudan BisBAL İlavesi

Sentezlenen 18 farklı BisBAL kimyasalı, doğrudan *E. coli*, *S. pyogenes* veya aktif çamur içeren sıvı besiyerlerine ilave edilmiştir. Değişik BisBAL kimyasalları (S1, S2, ..., S18) hedef son molar konsantrasyonunun aynı olabilmesi için farklı miktarlarda ilave edilmiştir çünkü ekleme hacimleri Bis: BAL molar oranları (1:1, 2:1 and 3:1) ile lineer bir ilişki içerisinde değildir. Ekleme hacimlerinin hesaplanması Denklem 1'de verilmektedir. Sentezlenen BisBAL şelatlarının molar konsantrasyonları ise 3:1, 2:1 ve 1:1 oranları için sırası ile 67 mM, 75 mM ve 100 mM'dır. Eklenen hacim 0,4-2,7 µl arasında değişmiştir.

$$M_1 \cdot V_1 + M_2 \cdot V_2 = M_3 \cdot V_3 \quad (1)$$

Burada;

V_1 : İlave edilen BisBAL hacmi

M_1 : İlave edilen BisBAL'ın molaritesi

M_2 : 0 mM (LB sıvı besiyeri+bakteri süspansiyonundaki BisBAL molaritesi sıfırdır.)

M_3 : 5, 12, 15, 20, 30 veya 40 µM

V_3 : (5+ V_1) ml

Seyreltilmiş BisBAL İlavesi

Son BisBAL molar konsantrasyonu (M_3) aynı olacak şekilde 100 kat seyreltilmiş (distile su ile) BisBAL ilavesi gerçekleştirilmiştir. Hacim hesaplamaları tekrar Denklem 1 kullanılarak yapılmıştır.

Optik Yoğunluk Ölçümleri

Doğrudan ve seyreltilmiş BisBAL ilavelerinin ardından inkübasyona tabi tutulan numunelerin ardından OD değerleri UV spektrofotometre ile ölçülmüştür. Ölçümler 420 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. İnhibisyon etkisi (İE) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$IE = (OD_{0\mu M} - OD_{40\mu M}) / OD_{0\mu M} * 100 \quad (2)$$

Burada;

$OD_{0\mu M}$: 0 μ M BisBAL ilavesi olan numunenin OD değeri

$OD_{40\mu M}$: 40 μ M BisBAL ilave edilmiş numunenin OD değeri

EPS ve SMP Analizleri

En yüksek inhibisyonun gözleendiği beş BisBAL şelatı için (S1, S3, S6, S11 ve S14) doğrudan ve seyreltilmiş BisBAL ilavesi durumlarındaki minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) gözleendiği numunelerde (sırası ile 15 μ M ve 30 μ M) EPS ve SMP analizleri de gerçekleştirilmiştir. EPS ve SMP ekstaksiyonları fiziksel ayırım metoduyla yapılmıştır. İlk olarak, 5 ml numune 4000 rpm ve 4°C sıcaklıkta 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Ardından, üst faz 13200 rpm ve 4°C sıcaklıkta 20 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. İkinci santrifüjün üst fazı SMP'yi temsil etmiştir. İlk santrifüjün peleti 5 ml distile su ile tekrardan süspansiyon hale getirilmiştir. Bu süspansiyona 6 μ L formaldehit (%37) ilave edilmiştir ve 4°C sıcaklıkta 1 saat bekletilmiştir. Bir saatin sonunda 0,5 ml NaOH (1 N) eklenmiştir ve 4°C sıcaklıkta 3 saat saklanmıştır. Ardından 13200 rpm ve 4°C sıcaklıkta 20 dakika süreyle santrifüj uygulanmıştır ve bu üst faz EPS'yi temsilen kullanılmıştır. Elde edilen EPS ve SMP bileşenlerinin protein ve karbonhidrat içerikleri de ortaya koymak amacı ile sırası ile Lowry ve Fenol sülfürik asit [25] metodları kullanılmıştır.

Karışık Kültür ile İnhibisyon Testi

Aktif çamurdaki bakteri sayımı gerçekleştirilmiş ve inhibisyon testinin başlangıcındaki bakteri sayısının saf kültür çayışmasındaki bakteri

sayısına denk olmasına dikkat edilmiştir. Aktif çamur üzerindeki inhibisyon etkisi doğrudan BisBAL (S3) ilavesi ile değişik son molar konsantrasyonlar (5, 12, 15, 20, 30 ve 40 μ M) ile çalışılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun sonucunda OD değerleri ölçülmüştür.

Tüm inhibisyon çalışmalarının sonunda BisBAL kimyasalının stabilitesi de kontrol edilmiştir. Bu amaçla 12 hafta boyunca haftalık periyotlar ile inhibisyon deneylerine devam edilmiştir.

3. Bulgular

3.1. BisBAL Sentezi Optimizasyonu

Bu çalışmada, pH, sıcaklık ve Bis:BAL molar konsantrasyon oranlarının optimize edilmesi amacıyla 18 farklı BisBAL şelatları sentezlenerek, sentezlenen bu kimyasalların farklı oldukları çıplak gözle gözlenebilen renk değişimlerinden anlaşılmıştır. Aynı sıcaklık ve bizmut içeriği ile sentezlenen BisBAL'lar farklı pH değerlerinde sentezlendiğinde değişik renklere sahip olmuşlardır. pH'nın düşmesi ile birlikte renk öncelikle yeşilden sarıya ardından somon rengine dönmüştür. Bu renk değişikliğinin sebebi BAL tiyolünün bünyesindeki sülfürün değişik pH koşullarında farklı kimyasal bağlar oluşturması şeklinde yorumlanmıştır. Buna ek olarak, sıcaklığın artması ile daha heterojen ve koyu renkte kimyasalların elde edildiği de söylenebilir. Sentezlenen kimyasalların görüntüleri Ek dosyasında Şekil Ek.1 olarak sunulmuştur.

3.2. İnhibisyon Çalışmaları

Doğrudan BisBAL İlavesinin *E. coli* Üzerindeki Etkisi

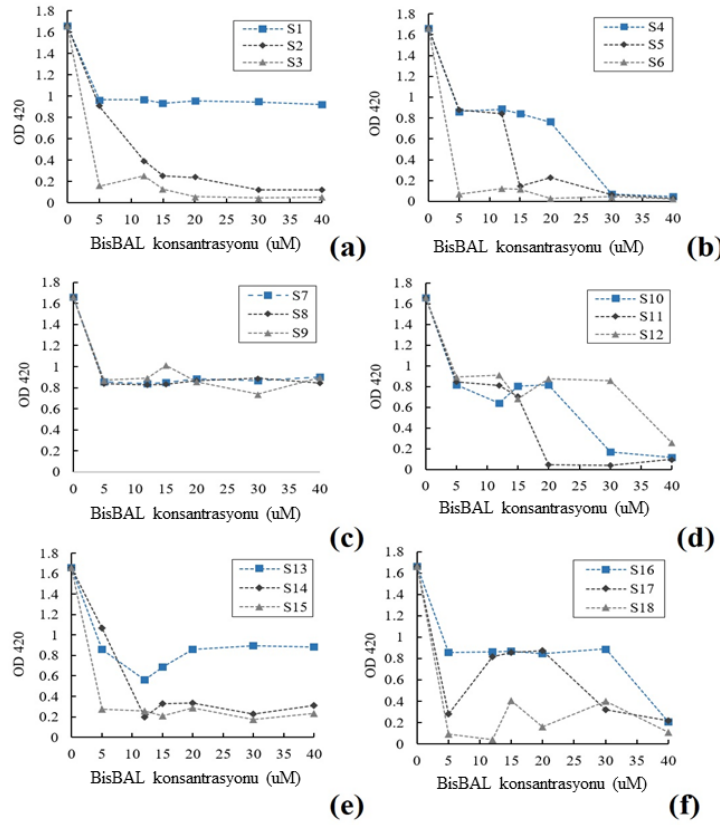
İnhibitör olarak kullanılan BisBAL kimyasalı çeşitli hacimlerde bakteri süspansiyonlarına ilave edilmiş ve MİK değerinin belirlenmesine çalışılmıştır. *E. coli* numunelerinde 24 saatin sonunda okunan OD değerleri Şekil 1'de verilmektedir. İnhibisyon profilleri, sonuçların daha net sergilenebilmesi açısından 6 grup halinde sunulmuştur: Grup I (S1, S2 ve S3), Grup II (S4, S5 ve S6), Grup III (S7, S8 ve S9), Grup IV (S10, S11 ve S12), Grup V (S13, S14 ve S15), ve Grup VI (S16, S17 ve S18). Optimum sentez koşullarının belirlenmesi adına inhibisyon profilleri incelenmiş ve *E. coli* türü için 15 μ M'dan yüksek BisBAL konsantrasyonlarında önemli MİK 15 μ M olarak belirlenmiştir. BisBAL konsantrasyonunun arttırılması ile birlikte inhibisyon etkisi de hızla artmıştır. Bu tür üzerinde en etkili olan kombinasyonlar S3, S6

ve S18 olarak belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi %42-93 aralığında değişiklik göstermekteyken, en etkili kombinasyonların inhibisyon etkisi ise %79-93 aralığında değişmiştir (Şekil 2).

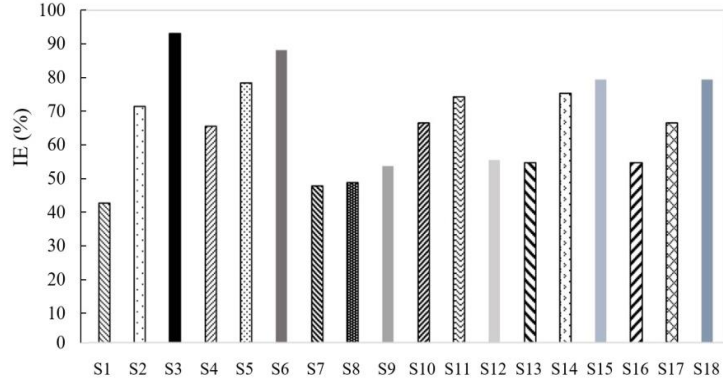
Doğrudan BisBAL İlavésinin *S. pyogenes* Üzerindeki Etkisi

S. pyogenes üzerindeki etkinin inhibisyon profilleri ile ortaya konulmasında *E. coli* çalışmasında olduğu için 6 grup halinde grafiklendirme tercih edilmiştir (Şekil 3).İE

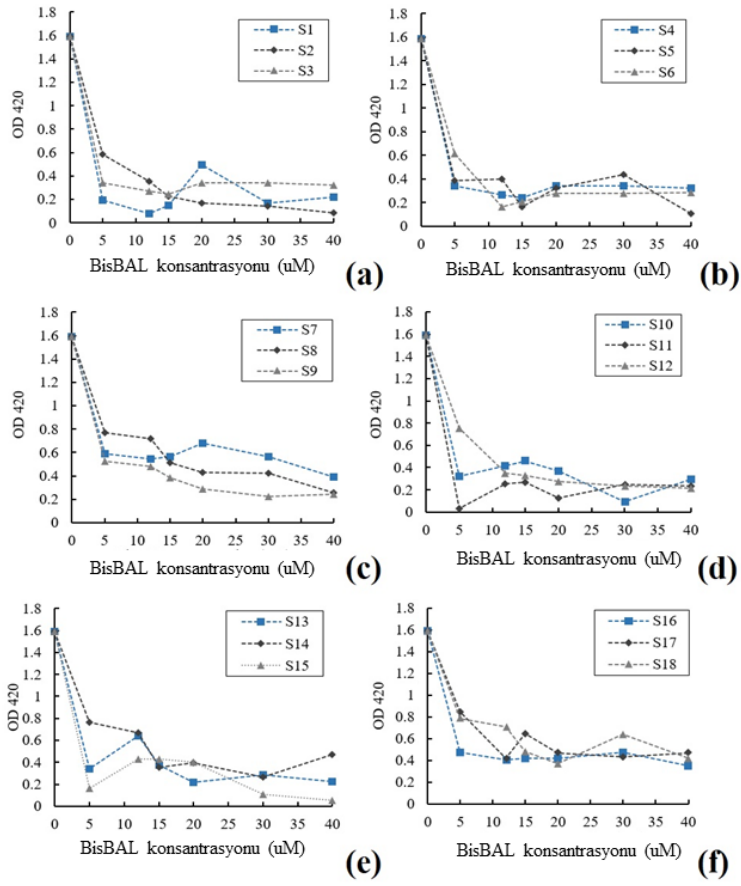
değerleri ise Şekil 4'te sunulmuştur. Açık bir şekilde görülebileceği üzere, 15 μ M'dan yüksek konsantrasyonlarda bakterinin çoğalması imkansız hale gelmiştir. En başarılı kombinasyonlar S3, S11 ve S1 olarak belirlenmiştir. İE değerleri ise %65-90 aralında seyretmiştir. Sonuçların ışığında, *S. pyogenes* türünün *E. coli* türünden daha fazla etkilendiği söylenebilir. Bu sonuç, gram-pozitif bakterilerin gram-negatif bakterilerden daha hassas olduğu bilindiğinden olağan bir sonuçtur.



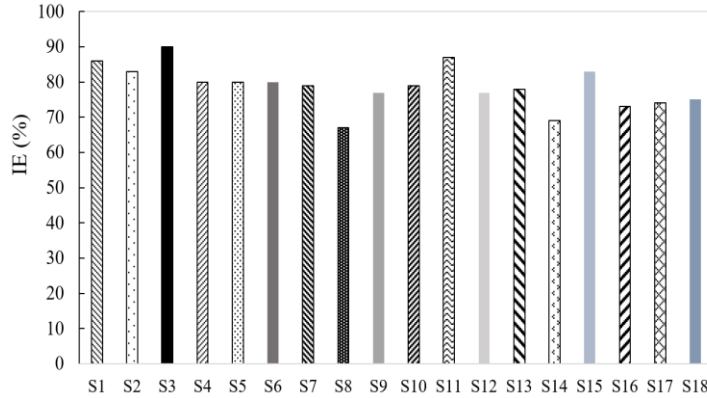
Şekil 1. BisBAL'ın *E. coli* üzerindeki etkisinin profilleri



Şekil 2. *Escherichia coli* üzerindeki etkisinin İE değerleri



Şekil 3. BisBAL'ın *S. pyogenes* üzerindeki etkisinin profilleri



Şekil 4. *S. pyogenes* üzerindeki etkisinin İE değerleri

Seyreltilmiş BisBAL ilavesi ve İnkübasyon Süresinin İE Üzerindeki Etkisi

Gerçek ölçekli membran ve/veya başka bir mühendislik ürünü üretiminde BisBAL ilavesinin seyreltilmiş olarak yapılabileceği ihtimali de göz önüne alındığından böyle bir uygulamanın inhibisyon üzerine etkisi de çalışılmıştır. Son molar konsantrasyon aynı olacak şekilde seyreltik BisBAL'dan daha fazla ilave edilmiş ve 24 saatin sonun OD değerleri incelenmiştir. İnhibisyon profilleri incelendiğinde (data sunulmamıştır) MİK değerinin *E. coli* türü için 30 μM olduğu görülmüştür. İE yüzdeleri ise ilave edilen bizmut metalinin son molaritesi aynı olmasına rağmen düşmüştür. İE yüzdelerinde en az düşüş S3, S6 ve S18 kimyasallarında gözlenmiştir ki bu kombinasyonlar doğrudan ilavelerde de en yüksek inhibisyon etkisini gösteren kombinasyonlardır. İE'deki ortalama düşüş doğrudan ilave çalışmaları ile karşılaştırıldığında %50 civarında olmuştur. İnhibisyon etkisi bazı durumlarda sıfır seviyelerine inmiş ve hatta az sayıda numunede türün inhibitör varlığında büyümeye devam edebildiği görülmüştür. *S. pyogenes* ile gerçekleştirilen çalışmalarda ise inhibisyon etkisindeki ortalama düşüş %5 civarında olmuştur. Bunun sebebi olarak, bu türün zaten hali hazırda daha hassas olması ve su ile seyreltilmiş inhibitöre maruz kalmanın bile etkili olabilmesi gösterilebilir.

48 saat devam eden inkübasyonun sonuçları incelendiğinde ise, doğrudan BisBAL ilavesinde dahi ilk 24 saat sonrasında inhibisyon etkisinin azalmaya başladığı fakat ancak inhibitör konsantrasyonu 15 μM 'dan yüksek olduğu durumlarda inhibisyon etkisinin sürdürülebilir

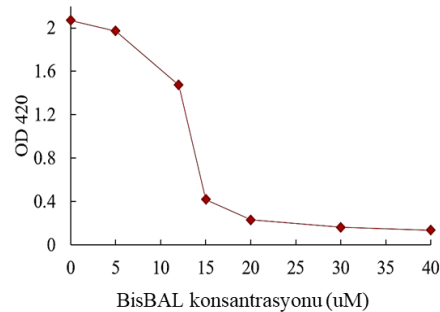
olduğu görülmüştür. Her iki tür için de İE değerleri %80-92 aralığında değişmiştir.

BisBAL'ın EPS ve SMP Üzerindeki Etkisi

En etkili üç BisBAL kimyasalı ile (S1, S3 ve S6) gerçekleştirilen deneylerde 24 saatin sonunda EPS ve SMP'nin protein ve karbonhidrat içerikleri ölçülmüştür. EPS'nin protein içeriği açısından bakıldığında, *E. coli* türünün salgılanması %43-59 oranında azalmakta iken *S. pyogenes* türünde bu salgılanma azalması %23-68 oranında seyretmiştir. EPS'nin karbonhidrat içeriğinin salgılanması ise her iki türde de %100 azaltılmıştır.

BisBAL'ın Karışık Kültür Üzerindeki Etkisi

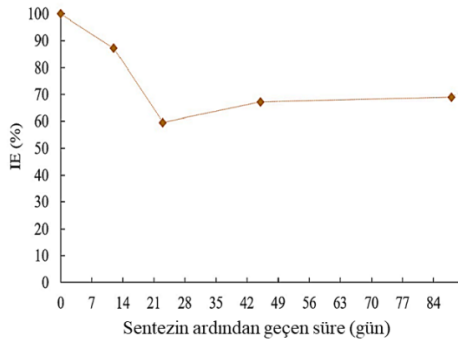
Tek bir BisBAL kimyasalı (S3) ile aktif çamur üzerinde gerçekleştirilen inhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen inhibisyon profili grafiği Şekil 5'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere, MİK değeri 15 μM olarak elde edilmiştir. Bu değer, *E. coli* ve *S. pyogenes* ile yürütülen saf kültürde inhibisyon çalışmalarında elde edilen sonuç ile aynıdır. Karışık kültür üzerinde inhibisyon etkisi %93 olmuştur.



Şekil 5. Aktif çamur için inhibisyon profili

BisBAL'ın Stabilitesi

Doğada bulunmayan laboratuvar ortamında sentezlenen antibakteriyel kimyasallar zaman içerisinde inhibisyon etkilerini kaybetmektedirler. Böyle olası bir durumu kontrol edebilmek amacı ile en etkili BisBAL kimyasalı (S3)'nın *E. coli* türü üzerindeki etkisi uzun süreli olarak (106 gün boyunca) araştırılmıştır. İnhibisyon profili Şekil 6'da görülebilir. İnhibisyon etkisi ilk günden başlayarak azalmaktadır fakat azalma hızının düşük olduğu söylenebilir.



Şekil 6. Aktif çamur için inhibisyon profili

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, kullanılan Bis: BAL oranı optimize edilmiştir. Antibakteriyel kimyasalın hem saf kültürler olan *E. coli* ve *S. pyogenes* hem de karışık bir kültür olan aktif çamur üzerindeki inhibisyon etkisi ortaya konulmuştur. Gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler üzerindeki etkilerinde farklılıklar gözlenmiştir. Gram-pozitif bakteriler daha kolay etkilenirken, karışık kültür aktif çamur da saf kültür *E. coli*'den daha fazla etkilenmiştir. Sentez sırasındaki çevresel koşulların önemi de ortaya konulmuştur. En etkili antibakteriyel BisBAL, oda sıcaklığında, asidik pH'ta (pH:4) ve 1:1 Bis: BAL oranında sentezlenen kimyasal olmuştur. Buna dayanarak eş molar konsantrasyonlarındaki bizmut metali ve tiyol grubu ilavesi ile tiyolün doğal pH'sına yakın asidik bir pH değerinde (pH:4) çalışmanın başarısını artırdığı söylenebilir. Bakteri büyümesini kolayca engelleyebilen BisBAL aynı zamanda canlılığını devam ettirebilen kalan bakterilerin de protein sentezini yavaşlatmış, karbonhidrat sentezini de tamamen durdurmuştur. Sonuç olarak, anti-biyotik kullanım çalışmalarında kullanılabilmesi mümkün yenilikçi ve üretimi kolay bir kimyasal sentezi ortaya konulabilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No:111Y275).

Kaynakça

- [1] Padaki, M., Murali, R. S., Abdullah, M. S., Misdan, N., Moslehyani, A., Kassim, M. A. & Ismail, A. F. 2015. Membrane technology enhancement in oil-water separation. A review. *Desalination*, 357, s. 197-207.
- [2] Fazal, S., Zhang, B., Zhong, Z., Gao, L., Chen, X. 2015. Industrial wastewater treatment by using MBR (membrane bioreactor) review study. *Journal of Environmental Protection*, 6(06), s. 584.
- [3] Lee, S. H., Hong, T. I., Kim, B., Hong, S., Park, H. D. 2014. Comparison of bacterial communities of biofilms formed on different membrane surfaces. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2), s. 777-782.
- [4] Luo, J., Lv, P., Zhang, J., Fane, A. G., McDougald, D., Rice, S. A. 2017. Succession of biofilm communities responsible for biofouling of membrane bioreactors (MBRs). *PloS one*, 12(7), e0179855.
- [5] Gurunathan, S., Han, J. W., Kwon, D. N., Kim, J. H. 2014. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale research letters*, 9(1), s. 373.
- [6] Lee, W., Kim, K. J., Lee, D. G. 2014. A novel mechanism for the antibacterial effect of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biometals*, 27(6), s. 1191-1201.
- [7] Priyadarshini, E., Pradhan, N., Sukla, L. B., Panda, P. K. 2014. Controlled synthesis of gold nanoparticles using *Aspergillus terreus* IFO and its antibacterial potential against Gram negative pathogenic bacteria. *Journal of Nanotechnology*, 2014.
- [8] Suganya, K. U., Govindaraju, K., Kumar, V. G., Dhas, T. S., Karthick, V., Singaravelu, G., Elanchezhiyan, M. 2015. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. *Materials Science and Engineering: C*, 47, s. 351-356.
- [9] Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Mohamad, D. 2015. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), s. 219-242.
- [10] Meghana, S., Kabra, P., Chakraborty, S., Padmavathy, N. 2015. Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles. *RSC advances*, 5(16), s. 12293-12299.
- [11] Besinis, A., Hadi, S. D., Le, H. R., Tredwin, C., Handy, R. D. 2017. Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver,

- titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. *Nanotoxicology*, 11(3), s. 327-338.
- [12] Verma, P. 2015. A Review on Synthesis and Their Antibacterial Activity of Silver and Selenium Nanoparticles against Biofilm Forming *Staphylococcus Aureus*. *World J. Pharm Pharmaceut. Sci*, 4, s. 652-677.
- [13] Stolzoff, M., Wang, S. Q., Webster, T. J. 2016. Efficacy and mechanism of selenium nanoparticles as antibacterial agents. In *Front. Bioeng. Biotechnol. Conference Abstract: 10th World Biomaterials Congress*. s. 3040.
- [14] Barton, L. L., Lyle, D. A., Ritz, N. L., Granat, A. S., Khurshid, A. N., Kherbik, N., Lin, H. C. 2016. Bismuth (III) deferiprone effectively inhibits growth of *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *BioMetals*, 29(2), s. 311-319.
- [15] Flores-Castañeda, M., Vega-Jiménez, A. L., Almaguer-Flores, A., Camps, E., Pérez, M., Silva-Bermudez, P., Rodil, S. E. 2015. Antibacterial effect of bismuth subsalicylate nanoparticles synthesized by laser ablation. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(11), s. 431.
- [16] Hernandez-Delgadillo, R., Del Angel-Mosqueda, C., Solís-Soto, J. M., Munguia-Moreno, S., Pineda-Aguilar, N., Sánchez-Nájera, R. I., Cabral-Romero, C. 2017. Antimicrobial and antibiofilm activities of MTA supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles. *Dental Materials Journal*, 36(4), s. 503-510.
- [17] Mahdiun, F., Mansouri, S., Khazaeli, P., Mirzaei, R. 2017. The effect of tobramycin incorporated with bismuth-ethanedithiol loaded on niosomes on the quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial pathogenesis*, 107, s. 129-135.
- [18] Li, M., Bradley, J. C., Badireddy, A. R., Lu, H. 2017. Ultrafiltration membranes functionalized with lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles: Anti-fouling behavior and mechanisms. *Chemical Engineering Journal*, 313, s. 293-300.
- [19] Badireddy, A. R., Hernandez-Delgadillo, R., Sánchez-Nájera, R. I., Chellam, S., Cabral-Romero, C. 2014. Synthesis and characterization of lipophilic bismuth dimercaptopropanol nanoparticles and their effects on oral microorganisms growth and biofilm formation. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(6), s. 2456.
- [20] Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., Galdiero, M. 2015. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), s. 8856-8874.
- [21] Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., Gholami, A., Hemmateenejad, B., Dorostkar, S., Nabavizadeh, M., Sharghi, H. 2015. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. *Journal of Nanomaterials*, 16(1), s. 53.
- [22] Varposhti, M., Ali, A. A., Mohammadi, P. 2014. Synergistic effects of Bismuth Thiols and various antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(3).
- [23] Badireddy A. R., Chellam S., Yanina S., Gassman P., Rosso K. M. 2008. BisBAL inhibits the expression of extracellular polysaccharides and proteins by *Brevundimonas diminuta* Implications for membrane microfiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(3).
- [24] Ovez S., Turken T., Kose-Mutlu B., Okatan S., Durmaz G., Guclu M. C., Koyuncu I. 2016. Manufacturing of antibiofouling polymeric membranes with bismuth-BAL chelate (BisBAL). *Desalination and Water Treatment*, 57(28), s. 12941-12955.