

Polietilen ve Demir Boru Sistemlerinde Oluşan Mikrobiyel Biyofilmlerin Karakterizasyonu

Nalan Oya SAN KESKİN^{1,2*}, Emine Feride KAHVECİ^{2,3}

¹ Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi, Polatlı Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Polatlı, 06900, Ankara

² Gazi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi, Gölbaşı, 06830, Ankara

³ Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü, Besevler, 06560, Ankara

*¹ nalan.san@hbv.edu.tr

(Geliş/Received: 12/10/2017;

Kabul/Accepted: 11/02/2019)

Özet: Bakteriye adezyon ve biyofilm oluşumuna doğada ve endüstriyel süreçlerde sıklıkla karşılaşılmaktadır. Adezyon ve biyofilm yapısının biyoteknolojik süreçlerde (atıksu arıtımı, biyoremediasyon, immobilizasyon vb.) kullanımı ile yarar sağlanabilirken, endüstriyel sistemler (fauling ve korozyon gibi) ve tıp alanında kullanılan malzemelerde (implant, protez ve dental sistemlerde) zararlı etkilere örneğin malzeme, sermaye, emek, enerji ve bilgi kaybı yolu ile büyük zararlara yol açmaktadır. Bu nedenle bakteriye adezyon mekanizması ve biyofilm tabakasının detaylı incelenmesi önem taşımaktadır. Elektrokimyasal aktif mikrobiyel biyofilmler (başka bir ifade ile mikroorganizmalar ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen hücre dışı polimerik matriks (EPS) buldukları çevreyle redoks reaksiyonları ile etkileşimleri mühendislik alanlarında özellikle mikrobiyel biyoelektrokimyasal sistemlerde kullanılmaktadır. Biyoelektrokimyasal süreçlerdeki başarılı iletişim, biyofilm tabakalarının içeriği, yapısı ve dinamikliğine bağlıdır. Çalışmada, endüstriyel sistemlerde sıklıkla kullanılan polietilen (PE) ve demir (FE) boru sistemlerinde oluşan biyofilm tabakasında meydana gelen değişimler çeşitli spektroskopik teknikler ile detaylı karakterize edilmiştir. Bu amaçla biyofilm tabakasının non invaziv karakterizasyonu: Konfokal Raman Mikroskopisi ve EPS'in yapısındaki fonksiyonel grupların araştırılması: Fourier Dönüşümlü Kıızılötesi (FTIR) ile incelenmiştir. Çalışmada standart tekniklerin, özgün teknikler ile kombinasyonları sonucunda elde edilen veriler, bakteriye adezyon ve biyofilm tabakalarının yapısını aydınlatmış olup biyofilmin yapısal, fiziksel ve diğer özellikleri araştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Biyofilm, Hücre dışı polimerik matriks, Konfokal Raman Spektroskopisi, FTIR

Microbial Biofilm Characterization of Polyethylene and Iron Pipe Systems

Abstract: Bacterial adhesion and biofilm formation processes are encountered both in natural environments and in industrial processes. Their end results can be either beneficial, such as in biotechnology (wastewater treatment, bioleaching, bioremediation, immobilized cells in reactors), or detrimental, such as in industrial systems (fouling, corrosion) and in medicine (accumulation on teeth, implants and prosthetic devices). In these systems, biofilm formation generally leading to loss materials, effect and cost. In these reason investigation of bacterial adhesion and formation has huge significance. Electrochemically active microbial biofilms, i.e. microbial cells embedded in a self-produced extracellular polymeric matrix and interacting with their environment by redox reactions, can be exploited in engineered systems like microbial bioelectrochemical systems. As the success of bioelectrochemical processes relies on the microbial catalysis, the understanding of these biofilms, their composition, structure and dynamics is of utmost importance. Here, we present a non-invasive method based on confocal Raman microscopy for the morphological characterisation of living electrochemically active microbial biofilms in their physiological environment and Fourier transform infrared (FTIR) spectral analyses revealed characteristic functional groups of the polysaccharides for biofilm structure were used. In this study, data from combination of standart techniques and specific techniques were represented diversity of structural, physical, rheological and other unique properties biofilm thus that's maked EPSs a potential source for potential applications to biotechnological system.

Key words: Biofilm; Confocal Raman Spectroscopy; Extracellular polymeric matrix; FTIR

1. Giriş

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

* Sorumlu yazar: nalan.san@hbv.edu.tr. Yazarların ORCID Numarası: ¹ 0000-0001-6645-3561, ² 0000-0002-3946-0659

üretilen terminolojide “hücre dışı polimerik yapı”, “ekzopolisakarit” ya da “ekzopolimer (EPS)” adı verilen polisakarit bazlı bir ağ yapısıdır [2]. EPS jel ya da visko elastik davranış sergileyebilmekte, biyofilm yapısı protein, Ca^{+2} iyonları ve polisakaritler ile daha da sağlamlaşmaktadır [3]. 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 biyofilme tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir [4]. Biyofilm, bakterinin tutunma yüzeyi, sonradan bakteri tutunmasını etkileyen organik ve inorganik maddelere bağlı olarak içinde bakterilerin olduğu herhangi bir sulu yüzeyde oluşabilir. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmleri büyük hücre yığınları geliştirdiği ve glikoprotein, ve musinin bulunduğu yüzeylerde geliştiğinde, tobramisin antibiyotikine karşı toleransının arttığı belirlenmiştir [5]. Bakteriler, farklı tipteki yüzeylere tutunabilirler. Bu nedenle de biyofilm oluşturma ve gelişimleri de bu yüzey koşullarına göre değişmektedir [6]. Örneğin *Legionella pneumophila* hücrelerinin kauçuk yüzeylere tutunma düzeyi $2,2 \times 10^5$ kob/cm² civarında iken, etilen-propilen, polivinil klorür, polipropilen, yarı çelik, paslanmaz çelik ve cam yüzeylerde tutunma oranının daha az olduğu belirlenmiştir [7].

Su sistemlerinde bakteriler tarafından biyofilm oluşumun en büyük etkisi korozyona sebep olmalarıdır. Mikrobiyel Korozyon Etkisi (MIC), mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu hem doğrudan hem de dolaylı olarak meydana gelen korozyon olayı ile metalin bozulmasıdır [8]. MIC ayrıca biyolojik korozyon, biyolojik olarak desteklenen korozyon ve biyokorozyon olarak da adlandırılmaktadır [9]. Korozyon hızı ve korozyonun mekanizması mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ve gelişen biyofilmin farklı tiplerine göre değişmektedir. Suyun akış dinamiği ve kimyası, biyofilmin gelişmesini etkilemektedir. Tartışa bilinir üç biyofilm sistemi vardır [10]:

1. Tamamen aerobik biyofilm; sıvıda oksijen vardır ve tüm biyofilmin içine nüfuz etmektedir.
2. Tamamen anaerobik biyofilm; hem sıvı hem de biyofilme oksijen yoktur.
3. Aerobik/anaerobik biyofilm; sıvıda oksijen vardır ve biyofilmin içinde anaerobik mikro nişler ve/veya anaerobik bir tabaka mevcuttur.

Su kalitesinin düşmesinde en önemli etken suda bulunan mikroorganizmaların sayısıdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirlediği standartlara göre içme suyundaki HPC (Heterotrofik Bakteri Sayısı) miktarı en fazla 100 CFU/ml (Koloni Oluşturan Birim/ml), total ve fekal koliform bakteri miktarı 0 CFU/100 ml olmalıdır. Türkiye'de de 1997 tarihinde uygulanmaya başlanan Türk Standartları 266 numaralı standardına göre Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği standartlar kullanılmaya başlanmıştır. Suyu karışan mikroorganizmalar sistemde taşınırken boruların iç yüzeylerine tutunarak çoğalırlar. Mikroorganizmaların boru ve depo yüzeylerine yapışıp, çoğalarak oluşturduğu bu tabakaya “biyofilm” adı verilir [11]. Biyofilm tabakası mikroorganizmaları çeşitli etkenlerden korumaktadır ve çeşitli avantajlar sağlamaktadır [12]. Biyofilm tabakasında üreyen mikroorganizmalar yüzeyden zaman içinde koparak sudaki serbest yüzen mikroorganizma sayısında da artışa neden olur, dolayısıyla suyun hijyenik ve estetik kalitesi düşer. Ayrıca biyofilm sağlık açısından su dağıtım sistemleri ve gıda endüstrisinde de önemli sorunlara yol açmaktadır [13]. Mesela, biyofilm suda serbest halde bulunan patojen mikroorganizmaların kaynağını oluşturabilir ve patojen mikroorganizmanın biyofilmden koparak suya karışması ile salgınlar ortaya çıkabilir. Örneğin patojen bir mikroorganizma olan *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm tabakasında sıkça rastlanan bakterilerdendir, aynı zamanda bu konuda en sık çalışılmış bakterilerin başında gelir. Bunun yanı sıra biyofilm üyesi mikroorganizmalar metal yüzeylerde korozyonu artırabilir. Williams ve Braun-Howland [14], yaptıkları bir çalışmada dinamik bir model sistemden yararlanarak hipoklorik asit ve monokloramin varlığında *Escherichia coli* bakterisinin cam ve demir yüzeylerde biyofilm oluşturabilme kapasitesini ölçmüşlerdir. Çeşitli bakteri türlerinin biyofilm oluşumunda yapısal bir grup yüzey proteinleri önemli bulunmuştur. Bu grupta ilk üyesi olarak *Staphylococcus aureus* mastitli sığırdan (*S. aureus* V329) izole edilen “biofilm associated protein” (bap) biyofilm oluşumu için gerekli yapılardan birisi olarak bildirilmiştir. Bap bakteriyel yüzeyinde yerleşmiş, yüksek molekül ağırlıklı, ardı ardına tekrarlayan C- domainleri içeren, bakterilere yüksek biyofilm oluşturma kapasitesi sağlayan ve enfeksiyon sürecinde önemli rol oynayan 2276 amino asitlik bir proteindir. Yapılan çalışmalarla abiyotik yüzeylere yapışma ve intersellüler adezyon basamaklarının her ikisinde de görev yaptığı gösterilmiştir [15]. Meng-Ying vd., [16] çevre kirliliğindeki biyolojik bozulma ve ekosistemdeki besin döngülerinde önemli rol oynayan biyofilm ile ilişkili bazı mikroorganizmalar ile yaptıkları çalışmada, toprak ve atık su sistemlerinden izole ettikleri 18 izolat ile çalışmış ve bu izolatlardan 7'sinin yüksek derecede biyofilm oluşturma kapasitesine sahip olduklarını görmüşlerdir. Bu izolatlar içerisinde yer alan *Pseudomonas* sp. *Pseudomonas putida*, *Aeromonas caviae* (*A. caviae*), *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila* ve *Comamonas testosteroni* gibi bakterileri içeren grupta *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*)'nın biyofilm oluşumunda en yüksek sonucu verdiği görülmüştür. Bu çalışmada *A. hydrophila* ve *A. caviae* karşılaştırıldığında *A. caviae*'nin *A. hydrophila*'ya göre daha düşük bir biyofilm oluşumu gösterdiği görülmüştür.

Çalışmada, endüstriyel sistemlerde sıklıkla kullanılan polietilen (PE) ve demir (FE) boru sistemlerinde oluşan biyofilm tabakasında meydana gelen çeşitli spektroskopik teknikler ile detaylı karakterize edilmiştir. Bu amaçla biyofilm tabakasının non invaziv karakterizasyonu: Konfokal Raman Mikroskopisi ve EPS'in yapısındaki fonksiyonel grupların araştırılması: *Fourier Dönüşümlü Kızılötesi* (FTIR) ile incelenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1 Biyofilm tabakası incelenmiş bakteriler

Çalışmada araştırılan biyofilm yapılarının üretilmesi amacıyla kullanılan bakteri, Türkiye'nin en büyük içme suyu arıtma tesisi olan Ankara İvedik Su Arıtma Tesisinin boru sistemlerinden alınan kazıntı ve su örneklerinden izole edilmiştir. İzole edilen bakterinin 16S rRNA filogenetik analizlerinin yapılmış ve izolatlar gen bankası veri tabanına kayıt ettirilmiştir. İzole edilen bu bakteri *Aeromonas eucrenophila* olduğu bulunmuştur [17].

2.2. Polietilen ve Demir Borular

Bu çalışmada su sistemlerinde sıklıkla kullanılan polietilen (PE) ve demir (FE) borulardan 5 cm uzunluğunda, 2 cm çapında kesilmiş bilezik şeklinde malzemeler kullanılmıştır.

2.3. Deney Düzenegi

Belirli ölçülerde kesilip hazırlanmış deney materyalleri, öncelikle alkol ve ultra viyole (UV) ile steril edilmiştir. PE ve demir bilezikler 250 ml'lik beherlerde 100 ml Mineral Salt Medium (MSM) içerisine yerleştirmiş ve bileziklerin iç yüzeyindeki biyofilm oluşumu 7, 15, 30 ve 60. günlerde biyofilm analizleri yapılması için hazırlanan deney düzenegi içerisinde yukarıda belirtilmiş sürelerde bekletilmiştir. Çalışmalar kontrollü bir şekilde, 3 paralel olacak şekilde dizayn edilmiştir. Kontrol grubu olarak içerisinde mikroorganizma bulunmayan MSM besiyeri içinde PE ve FE materyaller kullanılmıştır.

2.4. pH ve Çözünmüş Oksijen Ölçümleri

Sistemde yer alan su örneklerinin pH değerleri ve çözünmüş oksijen (DO) değerleri, pH metre ve DO cihazı (WTW Oxi-330) ile düzenli bir şekilde takip edilmiştir. Her kullanımdan önce cihaz kalibre edilmiştir.

2.5. Biyofilm Örneklerinde Mikroorganizmaların Sayımı

Biyofilm örneklerinin bakteriyolojik açıdan incelenmesi için belirlenmiş zaman aralıklarında PE ve demir boruların iç yüzeylerinden steril eküvyon ile toplanan sürüntü, içerisinde 10 ml steril fosfat tamponu (PBS) bulunan tüplere aktarılmıştır. Bu tüplerden 3 tekrarlı ekimler yapılmıştır. Korozyon etkisi belirlenmiş ve proje çalışmasında biyofilm tabakalarının araştırılması planlanmış bakteriler 'aerobik' olduklarından sayılarının tespit edilmesi için, selektif olmayan R2A agar besiyerine biyofilm süspansiyonlarından hazırlanan seri dilüsyonlardan 100 µl ekim yapılarak ve 30 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılmıştır.

2.6. EPS Eldesi

Yıkama işlemi: Biyofilm yüzeylerden steril eküvyon ile toplandıktan sonra 10 ml steril PBS içeren santrifüj tüplerinde 60 sn vortekslenerek süspanse elde edilmiştir. Biyofilm süspansiyonu 6000 devir/dakika'da 10 dk santrifüj edilerek ve üst sıvı fazı başka bir santrifüj tüpüne aktararak saklanmıştır.

Ayırma: Yıkama işleminden arda kalan biyofilm pelleti üzerine 10 ml % 8,5 NaCl ve % 0,22 formaldehit içeren çözeltiden konulmuş ve 1 dk vortekslenmiştir. Karıştırma işleminden sonra 1. ve 2. basamaktaki örnekler birleştirilmiştir.

Ekstraksiyon: Birleştirilmiş örnek kombinasyonu 11000 devir/dk'da 30 dk süresince santrifüj edilmiştir.

Filtrasyon ve toplama: Santrifüj sonunda üst sıvı fazı 0,22 µm por çaplı steril membran filtreden geçirilmiş ve analiz için kullanılmıştır.

2.7. Biyofilm Tabakasının Konfokal Raman Spektroskopisi Analizi

Biyofilm tabakası Konfokal Raman spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Bu amaçla, PE ve FE borulardan steril eküvyonlar ile toplanan sürüntülerin direkt olarak yüzeye sürülmesi ile spektrumlar elde edilmiştir. Konfokal Raman Spektroskopisi çalışmalarında, 20x objektifte, 1 saniye süre ile 10 tekrar olacak şekilde, 9 mW lazer gücünde çalışılmıştır.

2.8. Fourier-Dönüşümlü İnfrared Spektroskopi (FT-IR)

EPS'nin yapısındaki majör yapısal grupların araştırılmasında FT-IR (Shimadzu) kullanılmıştır. PE ve demir bilezikler, belirlenen sürelerde ortamlarında bekletilmiş ve direkt olarak 4000-400 cm^{-1} spektrum aralığında analizler tamamlanmıştır.

2.9. Anti-biyofilm Aktivitesi

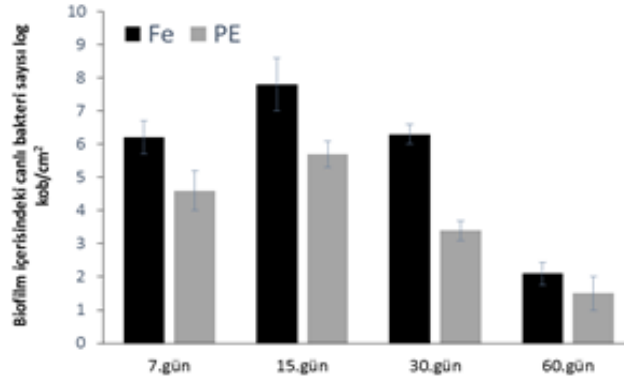
Bakteriden elde edilen EPS tabakasının anti-biyofilm aktivitesinin ölçülmesi amacıyla *S. aureus* ATCC 25923 bakterisi kullanılmıştır. Nutrient Broth besiyerinde 24 saat 37 °C'de inkübe edilen bakterinin OD değeri 620 nm absorbansta OD: 0,1 olarak ayarlanmıştır. Bakteri ile birlikte ekstrakte edilmiş EPS tabakası 96 kuyucuklu mikroplate'e aktarılmış ve 37 °C'de 100 rpm'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak sadece bakteri içeren mikroplate'ler kullanılmıştır. EPS tabakasının bakteri üzerinde gelişme etkinine CFU metodu kullanılarak bakılmıştır. Kuyucuklar yıkanmış, kurutulmuş ve %1'lik kristal viyole ile boyandıktan sonra 200 μl etanol eklendikten sonra 590 nm'de absorban değerleri okunmuştur. Analizler üç paralel olacak şekilde yapılmış olup verilere standart sapma değerleri eklenmiştir. $\text{OD}_{590} > 1,00$ güçlü biyofilm üreticisi, $0,31 < \text{OD}_{590} < 1,00$ zayıf biyofilm üreticisi ve $\text{OD}_{590} < 0,31$ ise biyofilm oluşturmaz olarak değerlendirilmiştir.

2.10. Hidrokarbonlara Mikrobiyel Adezyon (MATH) Testi

MATH testi 24 saat geliştirilmiş bakteri örnekleri ile yapılmaktadır. 10 dakika 10,000 rpm'de santrifüj edilerek toplanmış hücreler, PBS ile iki kez yıkanmış ve biyokütle 150 mM KCl (pH 7) içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir. 1 ml OD_{595} değeri 1 olan hücre steril polistiren tüplere alınarak ve n-hekzadekan ilave edilmiştir. Bu karışım 15 dk, 30 °C'de inkübe edilmiş ve 2 dk vorteklendikten sonra oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüp içerisinde iki farklı faz oluşacak ve sıvı faz üst kısımdan dikkatli bir şekilde alınarak 595 nm'de absorban değerinde okutulmuştur.

3. Sonuçlar

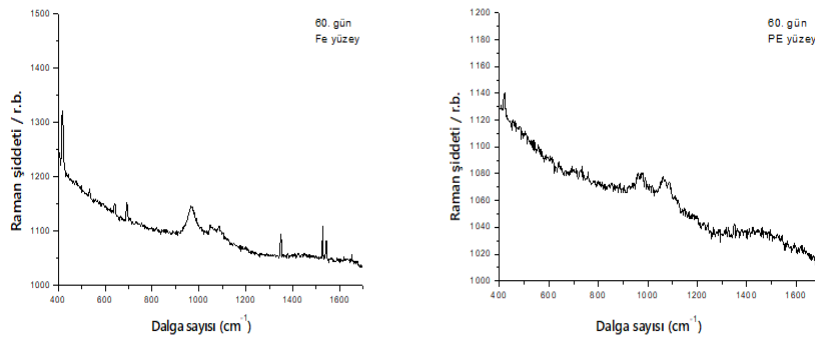
Şekil 1'de deney süresince malzemeler üzerinde tespit edilmiş olan canlı *A. eucrenophila* bakterisinin sayıları verilmiştir. Veriler, üç tekrarlı analizlerin ortalamalarıdır ve log10 tabanında gösterilmiştir. Su sistemlerinde çelik, polipropilen, polietilen, polibütan, ve bakır gibi birbirinden çok farklı maddelerden üretilmiş borular kullanılabilir [18]. Kullanılan boru tipleri sistemin biyofilm tutabilme özelliğini değiştirmektedir. *Aeromonas eucrenophila* bakterisinin hem demir hem de PE borularda tutunma ve biyofilm oluşturma özelliğinin güçlü olduğu bulunmuştur. *A. eucrenophila* bakterisi 15. günde hem PE hem de FE boru sistemlerinde en fazla koloni sayısına ulaşmıştır. Bakteriyi malzemeler ile karşılaştırdığımızda ise PE yüzeylerde FE yüzeye göre daha az sayıda bakteri yer almakta ve etkisiz bir biyofilm tabakası oluşturduğu belirlenmiştir.



Şekil 1. Deney süresince malzemeler üzerinde tespit edilmiş olan canlı *A. eucrenophila* bakteri sayıları. Veriler, üç tekrarlı analizlerin ortalamalarıdır ve log₁₀ tabanında verilmiştir.

Deney süresince, bakteri inoküle edilmiş PE ve FE yüzeyler içeren ortamların pH değerleri zamana bağlı olarak takip edilmiştir. Yüzeyler üzerinde oluşan biyofilm tabakaları içerisinde gelişen bakteriler ve malzemelerden korozyon sebebi ile oluşan kopmalar nedeni ile besiyerinin pH'ında değişimler gözlenmiştir. İnkübasyonlardan önce pH 7,0 civarında iken inkübasyon sonrası bu değerlerde asidik tarafa doğru azalmalar gözlenmiştir. pH değişimi en çok *A. eucrenophila* bakterisinin FE yüzeylerinde göstermiş ve pH değeri 6,1 değerlerine kadar düşmüştür. Bakteri özellikle FE yüzeylerde korozyon sonrası açığa çıkan korozyon ürünlerinden dolayı pH değerleri asidik değerlere doğru kaymaktadır [17].

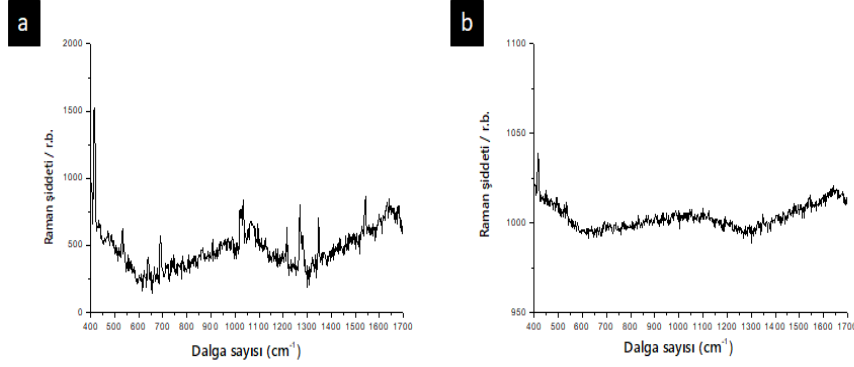
Konfokal Raman spektroskopisi analizlerinde, bakterilerin FE ve PE yüzeylerde oluşturdukları biyofilm tabakalarının analiz sonuçları direkt yüzeyden yapılan kazıma sonucu elde edilen tabakanın Konfokal Raman cihazının mikroskop aparatına yerleştirilmesi ile çalışılmıştır. Öncelikle optimum koşulların bulunması amacıyla biyofilm örneği farklı lazer güçlerinde, farklı objektifler ve farklı lazer sürelerinde analizler yapılmıştır. Bu çalışmalar sonunda, biyofilm tabakaları 20x objektifte, 1 saniye süre ile 10 tekrar olacak şekilde, 9 mW lazer gücünde çalışılmasına karar verilmiştir. İnkübasyon süresinin artması ile birlikte biyofilm tabakasının kalınlaşmasından kaynaklı Raman spektrumları 60 gün sonunda elde edilmeye başlanmıştır. Şekil 2'de *A. eucrenophila* bakterisinin FE ve PE yüzeylerde 60 gün sonra oluşturduğu biyofilm tabakasının Konfokal Raman spektrumu verilmektedir.



Şekil 2. *Aeromonas eucrenophila* bakterisinin Fe ve PE yüzeylerde 60 gün sonra oluşturduğu biyofilm tabakası Raman spektrumu

Her iki spektrumda da 405 cm⁻¹ (karbonhidrat) piki mevcuttur. Raman spektrumlarında bakterinin etkili biyofilm tabakası oluşturduğu ve 1020-1080 cm⁻¹'de yer alan pik, karbonhidrat, -C-C ve -C-O yapılarına karşılık gelmektedir. 1340-1350 cm⁻¹'de ise özellikle protein (amid III) ve polisakarit yapılarına denk gelen pikler elde edilmiştir.

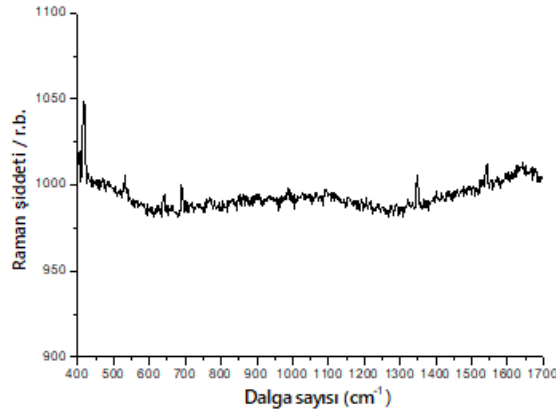
Raman analiz sonuçlarından görüldüğü üzere 60 gün sonunda oluşan ve direkt sürüntüden alınan spektrumlardan anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır. Bu nedenle proje çalışmasında 120 gün sonunda FE yüzeylerde *A. eucrenophila* bakterisinin oluşturduğu direkt sürüntü biyofilm (Şekil 3a) ve EPS yapıları (Şekil 3b), biyofilm tabakasının detaylandırılması amacıyla incelenmiştir.



Şekil 3. 120 gün sonunda *A. eucrenophila* bakterisinin Fe yüzeyde oluşturduğu biyofilm yapısının (a) direkt sürüntü ve (b) ekstraksiyon sonrası EPS'nin Raman spektrumu

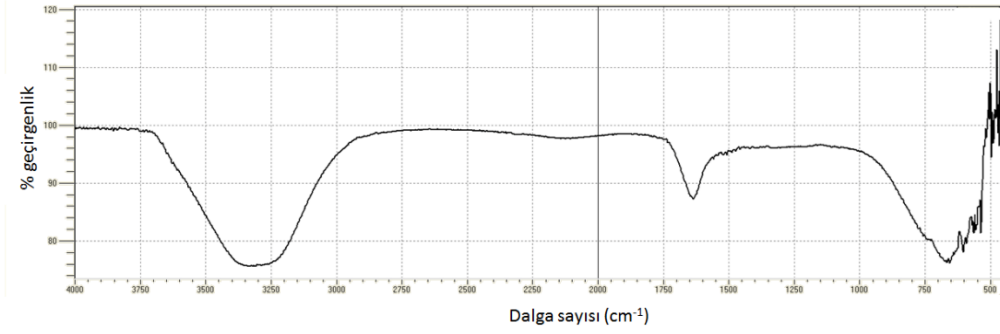
Yüzeyden alınan sürüntüden elde edilen Raman spektrumların pikler belirginleşmiş ve 60 gün sonundan elde edilen spektruma benzer bir spektrum elde edilmiştir. En belirgin pikler, 1200-1000 cm^{-1} 'de polisakarit bölgesidir.

A. eucrenophila bakterisinin PE yüzeyde 120 gün sonunda oluşturduğu biyofilm yapısının Raman spektrumuna (Şekil 4) bakıldığında ise karbonhidrat (405 cm^{-1}) piki ve zayıf protein (amid III) piki elde edilmiştir.



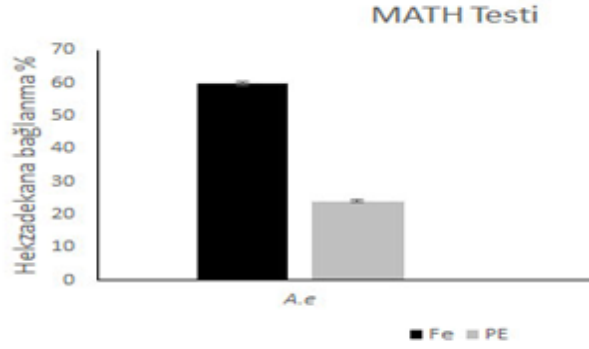
Şekil 4. 120 gün sonunda *A. eucrenophila* bakterisinin PE yüzeyde oluşturduğu biyofilm yapısının ekstraksiyon sonrası EPS'nin Raman spektrumu

ATR-FTIR analizleri direkt olarak yüzeylerden alınmış biyofilm tabakasının ATR aparatına yerleştirilmesi ile alınmıştır. Şekil 5'de 60 gün sonunda, Fe yüzeyde oluşan *A. eucrenophila* bakterisine ait biyofilm tabakasının ATR-FTIR spektrumu verilmektedir. Biyofilm tabakasının ana bileşenleri polisakarit, protein ve hidrokarbonlardır. Bu bileşenlerden, C=O (amid I) ve C-N (amid II) iki bant sırası ile 1639 ve 1544 cm^{-1} 'de elde edilmiştir. $3060-2800 \text{ cm}^{-1}$ bölgesi ise C-H esnemesine karşılık gelmektedir.



Şekil 5. 60 gün sonunda Fe yüzeyde oluşan *A. eucrenophila* bakterisine ait ekstraksiyon sonrası biyofilm tabakasının ATR-FTIR spektrumu

MATH testi ile bakterilerin hücre yüzey hidrofobitelerin belirlenmesi sağlanmaktadır. Bu çalışmaya göre (Şekil 6), *A. eucrenophila* bakterisi PE yüzeylerde daha hidrofobik olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 6. *A. eucrenophila* bakterilerinin MATH testi

4. Tartışma ve Sonuç

Dünya üzerinde en başarılı yaşam formu olarak kabul görmüş olan mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, 'biyofilm tabakası' ile mücadele, modern çağın en önemli savaşlarından biridir. İstenmediği ortamlarda oluşmasını önlemek mümkün olmadığı için biyofilm tabakası ile mücadelede strateji belirlemek oldukça zordur. Farklı ve değişen ortam şartlarına son derece hızlı bir şekilde adapte olabilen biyofilmle ilişkili mikroorganizmalar, birçok alanda maddi zarara yol açmaktadır.

Bu konuda yapılan araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmada su dağıtım sistemlerinde sıklıkla kullanılan demir, paslanmaz çelik vb. metal esaslı malzemeler ve bunların yerine son yıllarda tercih edilmeye başlanan polietilen ve polipropilenden yapılmış borularda meydana gelen biyofilm tabakası oluşumu ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla demir ve polietilen boru sistemlerinde çalışılmıştır. Bu boruların tercih nedenleri arasında korozyona dirençli olması, bakteri tutunmalarının azlığı, kurulum kolaylığı ve daha düşük maliyetli olması gelmektedir.

Bu çalışmada, 2 aylık deney periyodu sonunda, demir ve polietilen boruların iç yüzeyinde gözle görülebilen, beyaz ve kahverengi renkte, jel kıvamında ve heterojen yapıda ince bir biyofilm tabakasının oluştuğu gözlenmiştir. Bu tabaka özellikle demir boru sisteminde beyaz renkte olup oldukça kaygan ve kalın bir tabaka olduğu gözlemlenmiştir. Biyofilm kalınlığını etkileyen başlıca faktörler arasında, kullanılan malzemenin yüzey özelliği gelmektedir [19]. Sonuçlarımızı destekler nitelikte yapılan çalışmalarda plastik esaslı malzemelerde (polipropilen, polietilen vb.) biyofilm oluşumunun gözlemlendiği ancak demir ve çelik gibi metal malzemelere göre biyofilm yoğunluğunun genellikle ya aynı ya da daha düşük olduğu rapor edilmiştir [20].

Sonuçta, yapılan bu çalışma ile yakın zamana kadar üzerinde çok fazla durulmayan fakat insanlar ve hayvanlar için fırsatçı patojen olarak değerlendirilen *Aeromonas* türünün farklı yüzeylerde etkili kolonize olma ve

biyofilm oluşturmalarından ötürü su arıtma ve gıda işletim sistemlerinde ki önemi dikkate alınarak biyofilm oluşumu üzerine daha fazla çalışmalar yapılması gerektiği ortaya konulmuştur.

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlenmiştir;

Mikroorganizmalar, yüzeyin türüne bağlı olarak değişkenlik gösterebilir olsa bile, yüzeyde kısa sürede biyofilm oluşturabilme kapasitesine sahiptirler.

Bu çalışma sonucunda polietilen boruların iç yüzeyinde ince bir biyofilm tabakasının oluştuğu gözlenmiştir.

Demir boru sistemlerinde ise oldukça kalın biyofilm tabakası ve ilaveten oksit tabakası oluşmuştur.

A. eucrenophila bakterisi PE yüzeylerde daha hidrofobiktir olduğu bulunmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK 114Z102 kodlu 1002 programı desteği ile tamamlanmıştır.

Kaynaklar

- [1] Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Donato A, Parrilli M. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr Res* 2006; 34: 2456–2461.
- [2] Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM. A feeling for the microorganism: structure on a small scale. *Biofilms on plant roots. Bot J Linn Soc* 2006; 150(1): 79-88.
- [3] Hussain M, Wilcox MH, White PJ. The slime of coagulase negative Staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol* 1973; 10: 191-207.
- [4] Allison DG. The biofilm matrix. *Biofouling* 2003; 19(2): 139-150.
- [5] Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what health care professionals should know. *J Hosp Infect* 2006; 1-13.
- [6] Mafu AS, Roy D, Goulet J, Magny P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *J Food Prot* 1990; 53: 742-746.
- [7] Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *J Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 1842-1851.
- [8] Hadley RF. Corrosion by micro-organisms in aqueous and soil environments. In: UHLIG, H.H. (ed), *Corrosion handbook*, USA: John Wiley & Sons, 1948. pp. 466-470.
- [9] Borenstein SW. *Microbiologically influenced corrosion handbook*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 1994.
- [10] Videla HA. Prevention and control of biocorrosion. *Int Biodeterior Biodegradation* 2002; 49: 259-70.
- [11] Chang WS, Mortel M, Nielsen L, Guzman N, Li X, Halverson LJ. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water limiting conditions. *J Bacteriol* 2007; 8290-8299.
- [12] Schwartz T, Hoffmann S, Obst U. Formation and bacterial composition of young, natural biofilms obtained from public bank-filtered drinking water systems. *Water Res* 1998; 32: 2787-2297.
- [13] Storey MV, Ashbolt NJ. A comparison of methods and models for the analysis of water distribution pipe biofilms. *Water Sci Technol* 2002; 2: 73-80.
- [14] Williams MM, Braun-Howland EB. Growth of *Escherichia coli* in model distribution system biofilms exposed to hypochlorous acid or monochloramine. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 5463-71.
- [15] Rodriguez GG, Phipps D, Ishiguro K, Ridgway HF. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization actively respiring bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1992; 6(58): 1801-1808.
- [16] Meng-Ying LI, Ji Z, Peng LU, Jing-Liang XU, Shun-Peng LI. Evaluation of biological characteristics of bacteria contributing to biofilm formation. *Pedosphere* 2009; 19: 554-61.
- [17] San NO, Nazır H, Dönmez G. Microbial corrosion of Ni–Cu alloys by *Aeromonas eucrenophila* bacterium. *Corros Sci* 2011; 53: 2216-2221.
- [18] Batte M, Appenzeller BMR, Grandjean D, Fass S, Gauthier V, Jorand F, Mathieu I, Boualam M, Saby S, Block JC. Biofilms in drinking water distribution systems. *Rev Environ Sci BioTechno* 2003; 2: 147-168.
- [19] Meltzer TH. *High-purity water preparation for the semiconductor, Pharmaceutical, and Power Industries*. Littleton, Colorado: Tall Oaks Publishing, Inc, 1997.
- [20] Türetgen İ, Çotuk A. Monitoring of biofilm-associated *Legionella pneumophila* growth. *Ann Microbiol* 2005; 55(3): 219-224.