

## Exopolysaccharide (EPS) production of halophilic bacteria

Hilal BAŞER<sup>1\*</sup>, Zehranur YÜKSEKDAĞ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD, Ankara, Türkiye

\*Corresponding author : baserrhilal@gmail.com  
Orcid No: https://orcid.org/0000-0002-3729-2372

Received : 26/07/2019  
Accepted : 29/10/2019

**Abstract:** Exopolysaccharides (EPS), which are produced by halophilic bacteria and have protective properties against adverse environmental conditions, have wide application areas. In this study, EPS production of *Halomonas aquamarina* (NB2) and *Halobacillus trueperi* (NB7, NB8, NB9, NB10, NB11) strains in culture media was determined. EPS production of the strains was range from 15-55 mg/L. One strain with the highest EPS production capacity and the best development in the culture medium (NB7-47 mg/L) was selected and the influence of different concentrations of salt (5, 10, 15, 17.5, 20, 25, and 30%) and different carbon sources (sucrose, glucose, galactose, mannose) on EPS production was studied. When NB7 strain was grown in medium containing different concentrations of salt, the EPS production was changed (0-40 mg/L). The highest level of EPS production of the NB7 strain was observed in the medium with sucrose (488 mg/L) while the lowest level of EPS production of the NB7 strain was observed in the medium with galactose (144 mg/L). In this study, also, biofilm activities of these strains was determined. NB2, NB7, NB8, NB9 and NB10 strains were found to be strong biofilm producers and NB11 strains were intermediate biofilm producers. Finally, emulsification of lyophilized EPS (I-EPS) were designated. Emulsification activity of I-EPSs on hydrocarbons was found in the range of 3-26%. In the field of environment application of lyophilized EPS obtained from halophilic bacteria used in this study; it has the potential for use as an emulsifying agent.

**Keywords:** Halophilic bacteria, exopolysaccharide, emulsification, biofilm

### Halofilik bakterilerde ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

**Özet:** Halofilik bakteriler tarafından üretilen ve olumsuz çevre şartlarına karşı koruyucu özelliği olan ekzopolisakkaritler (EPS) geniş kullanım alanlarına sahiptirler. Bu çalışmada, halofilik bakterilerden *Halomonas aquamarina* (NB2) ve *Halobacillus trueperi* (NB7, NB8, NB9, NB10, NB11) suşlarının kültür ortamlarındaki EPS üretim yetenekleri belirlenmiştir. Suşların EPS üretimi miktarları 15-55 mg/L arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kültür ortamında en iyi gelişim gösteren ve yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan halofilik bakteri suşu seçilerek (NB7-47 mg/L), farklı tuz konsantrasyonları (%5, %10, %15, %17,5, %20, %25 ve %30) ve farklı karbon kaynaklarının (sükroz, glikoz, galaktoz, mannoz) EPS üretimine etkisi tespit edilmiştir. Farklı tuz konsantrasyonlarında NB7 suşunda EPS üretiminin konsantrasyon değişikliğine bağlı olarak değiştiği (0-40 mg/L) tespit edilmiştir. NB7 suşu, farklı karbon kaynaklarından, sükrozlu ortamda en yüksek (488 mg/L), galaktozlu ortamda ise en düşük (144 mg/L) EPS üretimi göstermiştir. Çalışmada ayrıca, bakterilerin biyofilm üretme yetenekleri belirlenmiştir. NB2, NB7, NB8, NB9 ve NB10 suşlarının güçlü biyofilm üreticisi, NB11 suşunun orta düzey biyofilm üreticisi olduğu bulunmuştur. Son olarak, bakterilerden izole edilen EPS'ler liyofilize edilerek, I-EPS'lerin emülsifikasyon aktivitesi belirlenmiştir. I-EPS'lerin kullanılan hidrokarbonları %3-26 arasında değişen oranlarda emülsifiye ettiği gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan halofilik bakterilerden elde edilen liyofilize EPS'lerin çevre uygulama alanında; emülsifiye ajan olarak kullanım potansiyeli olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Halofilik bakteri, ekzopolisakkarit, emülsifikasyon, biyofilm

### 1. Giriş

Halofilik mikroorganizmalar, hipersalin koşullarda yaşayabilen ve gelişmeleri için yüksek konsantrasyonlarda tuza (2-5 M NaCl) ihtiyaç duyan mikroorganizmalardır. Halofiller, Dünya'da aşırı tuzlu ortamlarda, çok yoğun tuzlu suların bulunduğu kurak bölgelerde, denizlerin derin bölgelerinde, denizden tuz elde etmek için oluşturulmuş yapay tuzlalarda ve salamura besinlerde bulunmaktadır

(Baltacı ve ark., 2017). Ekzopolisakkaritler (EPS), dallanmış veya tekrar eden birimlerde şekerler/şeker türevleri ve diğer karbonhidrat olmayan bileşenlerden oluşmaktadır (Sethi ve ark., 2019). Mikroorganizmalar genellikle yüksek bir hücresel yoğunluklu biyofilm ile bağlantılıdır ve stabilitesi polisakkarit zincirleri arasındaki etkileşimler yoluyla EPS'ler tarafından kontrol edilmektedir. Biyofilm oluşumuna, hücrelerin bir yüzeye yapışması, ardından çoğalması, mikrokolonilerin oluşumu

ve hücre dışı polimerik maddelerin (EPS) üretimi ile başlanmaktadır. Hücreleri saran EPS matrisi esas olarak proteinlerden, polisakkaritlerden, lipitlerden ve nükleik asitlerden oluşmaktadır (Völkel ve ark., 2018). EPS'lerin bakteriyi olumsuz çevre şartlarından korunması ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlaması özelliklerinden yola çıkarak bilim insanları halofilik mikroorganizmaların, benzersiz EPS'lerin yeni biyoteknolojik işlemlerde değerli bir kaynak sağlayacağı yaygın olarak kabul edilmektedir (Gu ve ark., 2017; Yang ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019). Yüksek viskoziteli ve psödoplastik yapıya sahip halofilik EPS'ler, tuza toleranslı bir yüzey aktif madde görevi görebilir ve jelleştirici ajanlar, emülsifiye edici ajanlar ve metal bağlayıcılar olarak geniş kullanım alanına sahiptirler (Arias ve ark., 2003; Chikkanna ve ark., 2018).

Çevre sorunlarının artmasıyla birlikte aranan biyoteknolojik çözümler hayatımızın bir parçası olmaktadır. Dünyada birçok alanda tuz birikmesi nedeniyle aşırı tuzluluk göstermekte ve bu da alanları verimsiz hale getirebilmektedir. Aşırı tuzcul ortamlar birçok canlı için yaşamın mümkün olmadığı alanlardır. Bu nedenle bu salin alanlarda yaşayan halofilik mikroorganizmaların sahip oldukları özelliklerin ve yeteneklerin araştırılması önem taşımaktadır. Bu amaçla bu çalışmada, hipersalin ortamlardan izole edilen 6 halofilik bakterinin kültür ortamlarındaki EPS üretimlerinin belirlenmesi, iyi gelişim gösteren ve yüksek EPS üretim kapasitesine sahip bir suşun seçilerek farklı tuz konsantrasyonlarının ve farklı karbon kaynaklarının EPS üretimine etkisinin tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca, bakterilerin kültür ortamında biyofilm üretim kapasitesi ve liyofilize EPS'lerin (l-EPS) emülsifikasyonu belirlenerek emülsifiye ajanı olarak kullanılabilirliğinin açığa çıkartılması hedeflenmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

Araştırma, G. Ü. Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, Türkiye'nin çeşitli halofilik bölgelerinden izole edilen ve 16S rRNA bölgesine göre moleküler tanımlamaları yapılan *Halomonas* (1) ve *Halobacillus* (5) cinsine ait bakteriler ile yürütülmüştür. Bakterilerin geliştirilmesinde Medyum C Besiyeri (175 g NaCl; 20 g Mg.Cl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 5 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 5 g yeast ekstrakt; 1 L distile su) kullanılmıştır.

### 2.1. Halofilik bakterilerin EPS üretimlerinin belirlenmesi ve EPS izolasyonu

Kültür ortamında EPS miktarını belirlemek ve izole etmek amacıyla Tsuda ve ark.,'nın (2008) metodu uygulanmış ve izole edilen EPS'ler liyofilize (l-EPS) edilmiştir. Liyofilize EPS'lerdeki EPS miktarlarını belirlemek için standart olarak glikoz kullanılarak fenol-sülfürik asit metodu (Dubois ve ark., 1956) ve protein içeriği, standart olarak BSA kullanılarak Bradford metodu (Bradford, 1976) ile belirlenmiştir.

### 2.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında ve karbon kaynaklarında EPS üretimlerinin belirlenmesi

Kültür ortamında en iyi gelişim gösteren ve yüksek EPS üretim kapasitesine sahip olan halofilik bakteri suşu seçilmiş (NB7), Medyum C besiyerinde farklı tuz konsantrasyonları (%5, %10, %15, %17,5, %20, %25 ve %30) ve farklı karbon kaynakları (%1 sükröz, glikoz, galaktoz, mannoz) ilave edilerek EPS üretim miktarlarındaki değişimler Tsuda ve ark.,'nın (2008) metoduna göre tespit edilmiştir.

### 2.3. Halofilik bakterilerde biyofilm aktivitesi

6 halofilik bakterinin biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi için Liaqat ve ark., (2014) tarafından önerilen yöntem modifiye edilmiştir. Bakterilerin biyofilm üretim kapasiteleri Stepanovic ve ark., 2000; Vestby ve ark., 2009 tarafından verilen sınır değerlerinin dönüşümleriyle üretici değil, zayıf, orta düzey ve güçlü üretici olarak değerlendirilmiştir.

### 2.4. l-EPS'lerde emülsifikasyon aktivitesi

l-EPS'lerin emülsifikasyon aktiviteleri Cooper ve Goldenberg (1987) ile Patel ve Desai (1997) tarafından tanımlanan metoda göre yapılmıştır. Kontrol için Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100 kimyasal yüzey aktif maddeleri kullanılmıştır (Mata ve ark., 2006).

### 2.5. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizlerde SPSS 22.0 Evaluation programı kullanılmıştır. Pearson korelasyonuna göre, suşların EPS üretimi ile biyofilm aktivite, l-EPS ile emülsifikasyon aktivitesi arasında korelasyon olup olmadığı incelenmiştir. ANOVA analizine göre, suşların EPS üretimi-farklı karbon kaynağı, EPS üretimi-farklı tuz konsantrasyonlarına göre farklılık olup olmadığı incelenmiştir.

## 3. Sonuçlar

### 3.1. Halofilik bakterilerin ekzopolisakkarit (EPS) üretimi

Çalışmada kullanılan suşların kültür ortamındaki EPS üretim miktarları Tablo 1'de gösterilmiştir. EPS üretim kapasitesi yüksek olan suşlar *Halobacillus trueperi* NB11 (55±2 mg/L), NB7 (47±1 mg/L), NB10 (42±4 mg/L) iken, düşük EPS üreten suşlar *Halobacillus trueperi* NB9 (15±2 mg/L) ve NB8 (22±3 mg/L) olarak belirlenmiştir.

Çalışmada, halofilik bakterilerden izole edilen EPS'lerin liyofilizasyon sonrası EPS'lerdeki (l-EPS) EPS miktarları belirlenmiştir (Tablo 1). Sonuçlara göre, NB9 suşu hariç suşların kültür ortamında belirlenen EPS miktarı ile liyofilizasyon sonrası EPS miktarları paralellik göstermiştir ve tüm suşlarda liyofilizasyon sonrası EPS miktarının daha fazla olduğu dikkat çekmektedir.

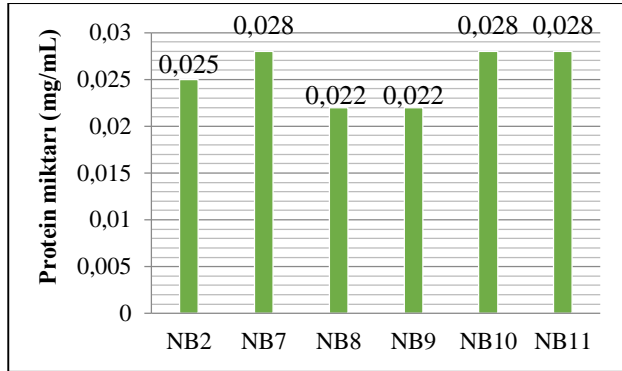
**Tablo 1.** Liyofilizasyon öncesi ve sonrasında suşların EPS üretim miktarları.

Suşlar	EPS <sup>1</sup> (mg/L)	EPS <sup>2</sup> (mg/L)
<i>Halomonas aquamarina</i> NB2	33±1	449±1
<i>Halobacillus trueperi</i> NB7	47±1	798±1
<i>Halobacillus trueperi</i> NB8	22±3	448±2
<i>Halobacillus trueperi</i> NB9	15±2	684±7
<i>Halobacillus trueperi</i> NB10	42±4	841±6
<i>Halobacillus trueperi</i> NB11	55±2	647±3

1: Kültürlerin inkübasyon sonrası EPS üretim miktarı

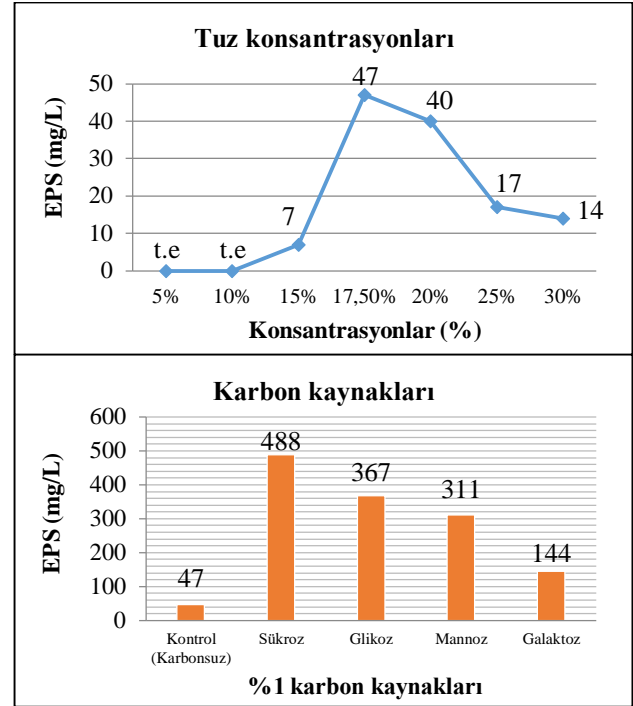
2: Saflaştırılmış ve liyofilize edilmiş toz halindeki EPS'deki toplam karbohidrat miktarı

Liyofilize edilmiş EPS'lerin protein miktarı sonuçları Şekil 1'de verilmiştir. Kültür ortamından saflaştırılıp liyofilizasyon sonrası elde edilen EPS'lerin (I-EPS) protein miktarı analizinde, en düşük protein miktarı NB8 ve NB9 (0,022 mg/mL) suşlarında, en yüksek protein miktarı NB7, NB10 ve NB11 (0,028 mg/mL) suşlarında bulunmuştur.

**Şekil 1.** I-EPS'lerin protein miktarları.

### 3.2. Farklı tuz konsantrasyonlarında ve karbon kaynaklarında EPS üretiminin belirlenmesi

Elde edilen sonuçlara göre halofilik bakteriler arasında hem kültür ortamında EPS üretim miktarı hem de I-EPS miktarı diğer bakterilere göre daha iyi sonucu veren *H. trueperi* NB7 suşunun, farklı tuz konsantrasyonlarında ve farklı karbon kaynaklarında ürettiği EPS miktarları Şekil 2'de gösterilmiştir. NB7 suşunda %5 ve 10 tuz konsantrasyonlarında EPS üretimi tespit edilmezken en yüksek EPS üretimi %17,5'lük (kontrol) tuz konsantrasyonunda (47 mg/L) belirlenmiştir. NB7 suşu, farklı karbon kaynaklarından, sükrözlu ortamda en yüksek (488 mg/L), galaktozlu ortamda ise en düşük (144 mg/L) EPS üretimi göstermiş ve besiyerine karbon kaynağının eklenmesi EPS üretimini arttırmıştır.

**Şekil 2.** NB7 suşunun farklı tuz konsantrasyonlarında ve karbon kaynaklarında EPS üretim miktarları.

t.e: tespit edilmedi.

### 3.3. Halofilik Bakterilerin Biyofilm Üretim Karakteristikleri

Mikro plak yöntemi ile belirlenen halofilik bakterilerin biyofilm üretim karakteristikleri Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre NB2, NB7, NB8, NB9, NB10 suşları güçlü üretici, NB11 suşu ise orta düzey üretici olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 2.** Halofilik bakterilerin biyofilm üretim karakteristikleri.

Suşlar	Sınır değeri (cut off)	Biyofilm üretim karakteristiği
NB2	2,212<2,548	Güçlü üretici
	2,096<2,539	
NB7	0,980<2,055	Güçlü üretici
	1,052<2,073	
NB8	1,764<2,251	Güçlü üretici
	1,776<2,254	
NB9	1,140<2,095	Güçlü üretici
	1,084<2,081	
NB10	1,788<2,257	Güçlü üretici
	1,708<2,234	
NB11	1,242<2,431≤2,484	Orta düzey üretici
	1,294<2,457≤2,588	

### 3.4. l-EPS' lerde emülsifikasyon aktivitelerinin belirlenmesi

Suşlardan izole edilen liyofilize EPS'lerin emülsifikasyon aktiviteleri zeytinyağı, mineral yağ, oktan, izopropil miristat, benzen, n-hekzan, toluen ve ksilol hidrokarbonları ile çalışılmıştır (Tablo 3). l-EPS'lerin emülsifikasyon aktivitesinde suşlardan izole edilen l-EPS'nin kullanılan hidrokarbonlar için emülsifiyer özelliklerinin değiştiği belirlenmiştir. l-EPS'lerin genel olarak *H. aquamarina* NB2 suşuna ait l-EPS hariç, en yüksek ksilol ve toluen

hidrokarbonlarını; izopropil miristat yağını ise tüm l-EPS'lerin emülsifiye ettiği görülmüştür. *H. trueperi* NB10 suşunun deneyde kullanılan tüm yağları ve hidrokarbonları emülsifiye ettiği görülmüştür. Suşlar arasında NB10 suşundan elde edilen l-EPS'nin ksilolu (%26), NB7 suşundan elde edilen l-EPS' nin tolueni (%23) en fazla emülsifiye ettiği belirlenmiştir. Kontrollerle karşılaştırıldığında l-EPS'lerin düşük emülsifiye özellikte olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 3.** l-EPS' lerin ve kontrollerin emülsifikasyon aktiviteleri.

Test edilen suşlar	Emülsifikasyon aktiviteleri (%E <sub>24</sub> )							
	Zeytin yağı	Mineral yağ	Oktan	İzopropil miristat	n-hekzan	Benzen	Ksilol	Toluen
NB2	3±0	-	5±2	3±0	-	-	-	-
NB7	-	3±0	14±0	8±2	3±0	10±0	17±0	23±0
NB8	6±0	-	3±0	9±0	11±1	8±0	22±0	11±0
NB9	3±0	3±0	5±2	9±0	-	14±0	8±2	8±1
NB10	13±2	9±0	10±0	8±2	6±0	19±1	26±2	15±2
NB11	9±0	3±0	-	8±2	-	5±2	6±0	13±0
<b>Kontroller</b>								
Tween 20	-	Homojen	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	Homojen	-	-	-	-
Triton X-100	71	74	74	77	74	45	91	86

--: sonuç vermedi.

### 4. Tartışma

Ekstremofilik organizmalardan elde edilen endüstriyel olarak önemli biyopolimerler yalnızca sağlam özelliklere sahip değil, aynı zamanda düşük maliyetlidirler (Chikkanna ve ark., 2018). Ekzopolisakkaritler bakteriler için koruyucu bariyer görevi yapmaktadırlar. EPS üretim miktarı birçok farklı örneğin ağır metal konsantrasyonu, tuz iyonları, pH derecesi, sıcaklık, oksijen konsantrasyonu veya besiyeri bileşimi gibi koşullardan etkilenmektedir (Gupta ve Diwan, 2017; Kılıç ve Dönmez, 2019). Yapılan çalışmalarda, halofilik bakterilerde optimum tuz konsantrasyonlarında EPS üretiminin en yüksek olduğu bildirilmiştir. Optimum %7,5 tuz konsantrasyonunda *H. ventosae* ve *H. anticariensis* türlerine ait suşlarda 28 – 49 g/L arasında EPS üretimi (Mata ve ark., 2006), *H. almeriensis* M8T suşunda 1,7 g/L EPS üretimi (Llamas ve ark., 2012), optimum %10 tuz konsantrasyonunda *Chromohalobacter canadensis* 28 suşunda 58 µg/mL EPS üretimi (Radchenkova ve ark., 2018) ve optimum %5 tuz konsantrasyonunda *H. nitroreducens* WB1 suşunda 125 mg/mL EPS üretimi (Chikkanna ve ark., 2018) olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, EPS üretim miktarları *Halomonas aquamarina* NB2 suşunda 33 mg/L ve *Halobacillus trueperi* (NB7, NB8, NB9, NB10, NB11) suşlarında 15-55 mg/L arasında olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, halofilik bakterilerin EPS üretim miktarının aynı tür içerisinde suşlara göre değiştiğini göstermektedir. *H. trueperi* NB7 suşu, %5 ve %10 tuz konsantrasyonunda gelişme

göstermediği için, bakteri bu tuz konsantrasyonlarında EPS üretimi göstermemiştir.

Mikrobiyolojik çalışmalarda mikroorganizmaların büyümesini ve EPS üretimlerini etkileyen en önemli faktörlerden birisi de kullanılan karbon kaynağıdır (Nour El-Dein ve ark., 2004). Ekzopolisakkarit üretiminde en çok kullanılan karbon kaynakları sükröz ve glikozdur. Yapılan çalışmalarda, *H. almeriensis* M8T suşunda (1,7 g/L) glikozlu ortamda (Llamas ve ark., 2012), *Halomonas* sp. AAD6 suşunun (1,0726 g/L) sükrözlu ortamda (Kazak, 2009), *Chromohalobacter canadensis* 28 suşunun (130 µg/mL) laktozlu ortamda (Radchenkova ve ark., 2018) en yüksek EPS üretimine sahip oldukları bildirilmiştir. Bu çalışmada, *H. trueperi* NB7 suşunun en yüksek sükrözlu ortamda (448 mg/L) EPS ürettiği tespit edilmiştir. Besi ortamı kompozisyonu EPS üretiminde önemli rolü olduğundan, tüm karbon kaynaklarında EPS üretimini oldukça artırması bir avantaj olarak görülmüştür. İstatistiksel olarak, kullanılan karbon kaynakları- tuz konsantrasyonları ve EPS üretimi arasında p=0,00<0,05 düzeyinde anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada, suşların kültür ortamında belirlenen EPS miktarı ile liyofilizasyon sonrası EPS (l-EPS) miktarları belirlenmiştir. En yüksek EPS üretimine sahip *Halobacillus trueperi* NB10 suşundan elde edilen l-EPS'nin miktarı 841±6 mg/L; en düşük EPS üretimine sahip *Halobacillus trueperi* NB8 suşundan elde edilen l-EPS'nin miktarı 448±2

mg/L olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar liyofilizasyon öncesi ve sonrasında, NB9 suşu hariç, paralellilik göstermiş olup, liyofilizasyon sonrası EPS miktarının çok daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun nedeni olarak, liyofilizasyonda yüksek hacimde kültürlerin kullanılması ve yüksek hacimde EPS'nin kısmi olarak saflaştırılarak elde edilmiş olmasından kaynaklı olduğu düşünülmüştür.

EPS'lerin esas organik fraksiyonları karbonhidratlar ve proteinlerdir (Nouha ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda, halofilik *Salipiger mucosus* A3T suşuna ait EPS'nin % 1,6 (w/w) (Llamas ve ark., 2010), *Halomonas* sp. AAD6 suşuna ait EPS'nin %0,5125 (Kazak, 2009), *H. almeriensis* suşuna ait EPS'de %1,1 (w/w) (Llamas ve ark., 2012) protein içeriğine sahip oldukları bildirilmiştir. Bu çalışmada, kültür ortamından saflaştırılıp liyofilizasyon sonrası elde edilen EPS'lerin (I-EPS) protein miktar analizinde, en düşük protein miktarı NB8 ve NB9 (0,022 mg/mL) suşlarında, en yüksek protein miktarı NB7, NB10 ve NB11 (0,028 mg/mL) suşlarında bulunmuştur. Literatürlere göre çalışmada kullanılan bakterilerin düşük protein içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. İstatistiksel olarak, I-EPS miktarı ile protein miktarı ( $p=0,618$ ) arasında orta düzey pozitif yönde anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Mikrobiyal biyofilmlerin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilerinin (Sarikaya ve ark., 2017) yanı sıra yer altı su kaynaklarının kontaminasyonun engellenmesi, kullanılmayan ve çevreye zararlı olabilecek petrol yataklarının çevrenmesi ve maden yataklarından çevreye yayılan sülfür ve benzeri yan ürünlerin detoksifikasyonu şeklinde olumlu etkileri de gösterilmiştir (Ünal, 2011). Bu çalışmada, tüm suşların biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu her ne kadar sağlık için tehdit oluştursa da özellikle hipersalin ortamlar için biyofilm üreticisi olan suşların kontaminasyon önleyici ve endüstriyel atıkları uzaklaştırma gibi çevre uygulamalarında olumlu yönleri bulunmaktadır. Ancak biyofilmin etkisi hakkında daha detaylı çalışılması gerekmektedir. Biyofilm kapasitesini belirlerken ekzopolisakkarit miktarı esas alındığından, EPS üretimi ile biyofilm üretimi arasında bir ilişki olduğu bildirilmektedir (Coenye ve Nelis, 2010). Bu çalışmada, EPS üretimi ile biyofilm aktivitesi arasında orta düzey pozitif yönde ( $p=0,515$ ) bir korelasyon bulunmuştur.

EPS'ler, farklı yağ ve su karışımlarını verimli bir şekilde stabilize eder. Hidrofobik fazlar bitkisel yağ, mineral yağ veya bir hidrokarbondur. Endüstriyel işlemlerde, emülgatörler aşırı sıcaklık, çevre, pH ve tuzluluk değerlerine maruz kalabilir (Freitas ve ark., 2009). Proteinler, bazı EPS'lerin emülsifiye edici kapasitesinde önemli bir rol oynamaktadır (Mata ve ark., 2006; Llamas ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda, halofilik bakterilere ait suşlarda emülsifikasyon aktivitelerinin %35,5 ila %85 arasında değişen oranlarda olduğu bildirilmiştir (Mata ve ark., 2006; Chikkanna ve ark., 2018). Bu çalışmada, literatürlerle karşılaştırıldığında daha düşük emülsiyonlaştırıcı etki görülmüştür. Bunun nedeni, I-EPS içerisindeki protein miktarının düşük olmasından kaynaklı olabilir. İstatistiksel olarak, I-EPS ile emülsifikasyon

aktivitesi arasında zayıf düzeyde anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir.

## 5. Sonuç

Çalışma sonucunda elde edilen veriler ile *H. aquamarina* (NB2) ve *H. trueperi* (NB7, NB8, NB9, NB10, NB11) suşlarının ekzopolisakkarit üretim yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir. *H. trueperi* NB7 suşunun optimum tuz konsantrasyonu ve karbon kaynağı belirlenerek, ekzopolisakkarit üretim yeteneğinin artırılması biyoteknolojik uygulamalarda bir avantaj olarak görülmüştür. Ekzopolisakkarit üretim yeteneğine sahip suşların biyofilm üreticisi olduğu ve I-EPS'lerin emülsiyon yapıcı olarak uygulamalarda kullanılabilir özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Halofilik bakterilerin ürettiği I-EPS'lerin verimini ortalama 20 kat artırarak yükseltmesi, protein açısından düşük olması ve farklı hidrokarbonlarda emülsifikasyon aktivite göstermesi nedeniyle birçok alanda emülgatör olarak kullanılabilmesi düşünülmüştür. Ekstrem şartlarda gelişme gösteren halofilik bakteriler ile çalışmak zaman alıcı ve maliyetlidir. Ancak hipersalin ortamlar için potansiyel uygulamalara sahiptir. Bu çalışmada kullanılan halofilik bakterilerin, elde edilen EPS'lerin (özellikle I-EPS'lerinin) ilk kez çalışılmış olması, çevre için geri kazanımda ve biyoteknolojik potansiyel uygulamalarda kullanılabilir olabileceğini düşündürmüştür. Daha net sonuçlar elde edilebilmesi için daha fazla çalışma yapılarak desteklenmesi gerekmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2018-04 kodu ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Arias S, del Moral A, Ferrer MR, Tallon R, Quesada E, Bejar V 2003. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* 7: 319–326.
- Baltacı N, Yüksekdağ ZN, Aslım B 2017. Biodegradation of petroleum hydrocarbon pollutants by Halophilic bacteria and archaea strains. *Fresen Environ Bull* 26(1): 686-694.
- Bradford M 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Chikkanna A, Ghosh D, Kishore A 2018. Expression and characterization of a potential exopolysaccharide from a newly isolated halophilic thermotolerant bacteria *Halomonas nitroreducens* strain WB1. *PeerJ* 6(e4684): 1-18.
- Coenye T, Nelis HJ 2010. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *J Microbiol Meth* 83(2): 89–105.
- Cooper DG, Goldenberg BG 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 53(2): 224-229.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28(3): 350 -356.
- Freitas F, Alves VD, Carvalheira M, Costa N, Oliveira R, Reis MAM 2009. Emulsifying behaviour and rheological properties

- of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol by product. *Carbohydr Polym* 78(3): 549–556.
- Gu D, Jiao Y, Wu J, Liu Z, Chen Q 2017. Optimization of EPS production and characterization by a Halophilic Bacterium, *Kocuria rosea* ZJUQH from Chaka Salt Lake with response surface methodology. *Molecules* 22: 814.
- Gupta P, Diwan B 2017. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol Rep* 13: 58-71.
- Kazak H 2009. Exopolysaccharide production by *Halomonas* strains isolated from Turkey. Thesis For The Degree of Master of Science in Bioengineering, Marmara University, Institute for graduate studies in pure and applied sciences, İstanbul 1-54.
- Kılıç NK, Dönmez G 2019. Farklı ortam koşullarının *Micrococcus* sp. ekzopolisakkarit üretimine etkisi. *AKÜ FEMÜBİD* 19: 40-46.
- Liaqat I, Bachmann RT, Edyvean RGJ 2014. Type 2 Quorum sensing monitoring, inhibition and biofilm formation in marine microorganisms. *Curr Microbiol* 68: 342-351.
- Llamas I, Amjres H, Mata JA, Quesada E, Bejar V 2012. The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules* 17: 7103–7120.
- Llamas I, Mata JA, Tallon R, Bressollier P, Urdaci MC, Quesada E, Bejar V 2010. Characterization of the exopolysaccharide produced by *Salipiger mucosus* A3T, a halophilic species belonging to the Alphaproteobacteria, isolated on the Spanish Mediterranean Seaboard. *Mar Drugs* 8: 2240-2251.
- Mata JA, Bejar V, Llamas I, Arias S, Bressollier P, Tallon R, Urdaci MC, Quesada E 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Res Microbiol* 157: 827-835.
- Nouha K, Hoang NY, Yan Song, Tyagi RD, Surampalli RY 2015. Characterization of Extracellular Polymeric Substances (Eps) Produced by *Cloacibacterium normanense* Isolated from Wastewater Sludge for Sludge Settling and Dewatering. *J Civil Environ Eng*, 5:6.
- Nour El-Dein MM, El-Fallal AM, El-Shahat Toson A, Hereher EF 2004. Exopolysaccharides production by *Pleurotus pulmonarius*: Factors affecting formation and their structures. *Pak J Biol Sci* 7(6): 1078-1084.
- Patel RM, Desai AJ 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett Appl Microbiol* 25: 91-94.
- Radchenkova N, Boyadzhieva I, Atanasova N, Poli A, Finore I, Di Donato P, Nicolaus B, Panchev I, Kuncheva M, Kambourova M 2018. Extracellular polymer substance synthesized by a halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 4937-4949.
- Sarikaya H, Belma A, Yüksekdağ Z 2017. Assessment of anti-biofilm activity and bifidogenic growth stimulator (BGS) effect of lyophilized exopolysaccharides (l-EPSs) from *Lactobacilli* strains. *Int Food Prop* 20: 362–371.
- Sethi D, Mohanty S, Pattanayak SK 2019. Effect of different carbon, nitrogen and vitamin sources on exopolysaccharide production of *Rhizobium* species isolated from root nodule of redgram. *Indian J Biochem Biophysics* 56: 86-93.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Meth* 40(2): 175-9.
- Tsuda H, Hara K, Miyamoto T 2008. Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *J Dairy Sci* 91: 2960-2966.
- Ünal D 2011. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* ve *Candida* cinsi mikroorganizmalarda biyofilm varlığının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 1-298.
- Vestby LK, Moretro T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. *BMC Veterinary Res* 5: 20.
- Völkel S, Fröls S, Pfeifer F 2018. Heavy metal ion stress on *Halobacterium salinarum* R1 planktonic cells and biofilms. *Front Microbiol* 9: 3157, 1-14.
- Wang J, Salem DR, Sani RK 2019. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydr Polym* 205: 8-26.
- Yang Y, Shao Z, Du J, He Q, Chai H 2018. Enhancement of organic matter removal in an integrated biofilm-membrane bioreactor treating high-salinity wastewater. *Archaea Vol* 2018: 8.