

Avcı Bakteri *Bdellovibrio bacteriovorus* Hücre Özütünün Biyofilm Oluşumunu Engelleme Etkisi

Melek ÖZKAN, Hilal YILMAZ

Gebze Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Gebze, Kocaeli

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada Gram negatif bakterileri besin olarak kullanan Gram-negatif avcı bir bakteri olan *Bdellovibrio bacteriovorus* hücre özütünün, aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm tabakayı temizleme ve biyofilm oluşumunu engelleme etkisi incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Farklı pH, sıcaklık ve mineral konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus*'un aktivitesine olan etkisi incelenmiştir. *B. bacteriovorus* hücre özütünün atıksu bakterilerine ait biyofilm oluşumunu engelleme etkisi 96 kuyucuklu polisitren plakalar kullanılarak kristal viyole yöntemiyle ölçülmüştür. *B. bacteriovorus*'un hücre özütünün filtrasyon membranı üzerinde oluşan biyofilm tabakayı temizleme etkisi ölü uçlu reaktor sistemi kullanılarak ölçülmüştür.

Bulgular: 8-8.8 pH, 29.5°C sıcaklık ve 5 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂ mineral konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus* aktivitesi için optimum olduğu bulunmuştur. *B. bacteriovorus* hücre özütünün çamur bakterilerine ait biyofilm oluşumunu engelleme etkisi %39 olarak ölçülmüştür. Atıksu filtrasyonunda kullanılmış membran üzerinde birikmiş olan biyofilm tabaka *B. bacteriovorus* hücre özütü ile yıkanmış ve bu uygulamanın membran performansına etkisi ölçülmüştür. Tamponla yıkanan kontrol membranına kıyasla *B. bacteriovorus* hücre özütü ile yıkanan membran akısında 12.44 L.m⁻².sa⁻¹ lik iyileşme gözlemlenmiştir.

Sonuç: Litik enzimlere sahip olan *B. bacteriovorus* hücre özütünün farklı materyaller üzerinde istenmeyen biyofilm oluşumunu engelleyebileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bdellovibrio bacteriovorus*, biyofilm giderimi, litik enzimler

ABSTRACT

Biofilm Inhibition Effect of Cell Extracts of *Bdellovibrio bacteriovorus*, a Predator Bacterium

Objective: In this study, cell extract of *Bdellovibrio bacteriovorus*, a Gram-negative predator bacterium that feeds on other gram negative bacteria was investigated for its potential for eradicating or inhibiting biofilm formation by active wastewater bacteria.

Material and Methods: The effect of several pH, temperature and mineral concentrations on the activity of *B. bacteriovorus* was investigated. The inhibition effect of *B. bacteriovorus* cell extract on biofilm formation by wastewater bacteria was measured by crystal violet method using 96 well polystyrene plates. Cleaning effect of cell extracts of *B. bacteriovorus* on biofilm layer formed on filtration membrane was measured by using fouled membrane and dead-end reactor system.

Results: It was found that 8-8.8 pH, 29.5°C temperature and mineral concentrations of 5 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂ are optimum for *B. bacteriovorus* to acquire highest activity. The effect of *B. bacteriovorus* cell extract to inhibit the biofilm formation by sludge bacteria was measured to be 39%. When the biofilm layer accumulated on the surface of filtration membrane used for wastewater filtration was cleaned by *B. bacteriovorus* cell extract, an improvement of 12.44 L.m⁻².sa⁻¹ was observed in the flux of membrane as compared to the control that was cleaned by buffer.

Conclusion: The results show that *B. bacteriovorus* cell extract which is rich in lytic enzymes can be used for inhibition or cleaning of undesired biofilm layer formed on different surfaces.

Keywrds: *Bdellovibrio bacteriovorus*, biofilm inhibition, lytic enzymes

GİRİŞ

Biyofilmler, kendi ürettikleri polimerik jelsi bir tabaka sayesinde bir yüzeye tutunarak yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu yapı olarak

tanımlanabilir. Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen, “hücre dışı polimerik yapı”, “ekzopolisakarit” ya da “ekzopolimer (EPS)” olarak adlandırılan polisakarit bazlı bir ağ yapıdır. Biyofilm kümelerinin %97’lik kısmı sudan

Alındığı tarih: 14.06.2017

Kabul tarihi: 20.12.2017

Yazışma adresi: Melek Özkan, Gebze Teknik Üniversitesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Gebze / Kocaeli

e-posta: mozkan@gtu.edu.tr

meydana gelmektedir. Diğer bileşenler ise %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipid, fosfolipitlerdir⁽¹⁾. Biyofilm hücrelerinin yüzeye tutunmasına polisakkaritler, proteinler, DNA ve ekstraselüler matris yardımcı olmaktadır. Biyofilmler bazı biyoteknolojik uygulamalarda yararlı olmasına karşın birçok teknolojide sorun yaratan istenmeyen bir oluşumdur. Atıksu arıtım teknolojilerinin bazı uygulamalarında biyofilm oluşumuna gereksinim duyulsa da biyomateryaller, gemi gövdeleri, membranlar, su boruları gibi yapılar üzerinde oluşan biyofilm tabaka hem sağlık hem de ekonomik açıdan sorun oluşturmaktadır. İnsan vücudunda kataterler, kontakt lens, protez kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı akciğer dokusu gibi canlı ve cansız çoğu alanda biyofilmlere rastlanılmaktadır⁽²⁾. Araştırmalar nozokomiyal enfeksiyonların ortalama %65'ine mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin neden olduğunu ve bu durumun tedavi masraflarının artmasına neden olduğunu göstermektedir⁽³⁾. Biyofilm oluşumunun sorun yarattığı durumlardan biri de membran biyoreaktörlerde kullanılan membranların yüzeyinde oluşan biyofilm tabakanın yarattığı kirlenmeye bağlı tıkanma (fouling) sorunudur. Membran biyoreaktör (MBR) teknolojisi aktif çamurdaki biyolojik parçalanma prosesi ile direkt olarak katı-sıvı ayrımı işlemini membran filtrasyonu kullanarak birleştiren bir teknolojidir. MBR sistemi mikro veya ultrafiltrasyon membran teknolojilerinin kullanımıyla (por büyüklüğü 0.05-0.4 µm arasında değişen) bakteri floklarının ve askıdaki katıların fiziksel olarak biyoreaktörde kalmasını sağlar. Bu uygulama sırasında membranların yüzeyinde biriken katı partiküller ve mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilm tabaka zamanla membranın tıkanmasına neden olmaktadır.

Son yıllarda, membranların temizlenmesi için kullanılan çeşitli fiziksel ve kimyasal uygulamaların yanı sıra yeni yaklaşımlar da geliştirilmek-

tedir. Titreşimli elektriksel alanlar; düşük voltaj (-0.5 ile 5 volt arasında) elektriksel uyarımların uygulanması, fiziksel ve kimyasal yüzey modifikasyonları, nitrik oksit kullanımı, yeni yaklaşımlar arasında sayılabilir⁽⁴⁾. Biyofilm giderimi amacıyla a biyolojik yöntemlerin de temizleme potansiyeli araştırılmaktadır. Quorum sensing mekanizmasının inhibisyonu, EPS'nin enzimatik bozulması, bakteri hücre duvarının enzimatik olarak parçalanması ve bakterileri parçalayan bakteriyofajların kullanılmasına dayalı uygulamalar bu yöntemler arasında sayılabilir⁽⁵⁾.

Bdellovibrio bacteriovorus Gram negatif bakterilerle beslenen avcı bir bakteridir ve bakteriyel popülasyonların dengesini sağladığı için özellikle çevre açısından önemli bir bakteri cinsidir. Daha önce yapılan çalışmalarda *B. bacteriovorus*'un parçalama aktivitesi çoğunluğu patojenik olan birçok Gram negatif bakteri üzerinde gösterilmiştir⁽⁶⁾. Bu patojenler tarafından oluşturulan biyofilmlerin de *B. bacteriovorus* tarafından başarılı bir şekilde parçalandığı rapor edilmiştir.

Bdellovibrio bacteriovorus yalnızca canlı değil ayrıca ölü hücreleri de parçalarlar⁽⁷⁾. Stolp et al. ⁽⁸⁾ *B. bacteriovorus*'un *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia* gibi Gram negatif bakterileri tükettiğini göstermiştir.

Bdellovibrio bacteriovorus'un dişlerde periodontitis hastalığına neden olan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'ı parçalandığı ve oluşturduğu biyofilm tabakayı bozduğu rapor edilmiştir⁽⁹⁾. *Alcaligenes*, *Campylobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Shigella* türleri ve *Helicobacter pylori* bakterisinin *B. bacteriovorus* tarafından parçalandığı Markelova⁽¹⁰⁾ tarafından gösterilmiştir. Bu konuda çalışmaları bulunan Markelova, bu bakterinin biyokontrol ajanı olarak kullanım potansiyeli üzerinde durmuştur. *B. bacteriovorus* istila sırasında av olan hücrenin yapısında

önemli değişikliklere neden olur. Bu değişikliklerin hepsi tam olarak bilinmemektedir.

Avcı hücre avının dış zarını ve peptidoglikan tabakayı öncelikle yapıyı parçalamadan modifiye eder, modifikasyonda glikanazlar, deasetilazlar, peptidazlar ve lipopolisakkaridazlar rol oynar^(11,12). Modifikasyon ve saldırı istila edilen hücrenin şeklini ve diğer karakteristik özelliklerini değiştirir ve hücre yuvarlaklaşır şişmeye başlar⁽¹³⁾. *B. bacteriovorus* avın iç zarını da modifiye eder, böylece degradatif enzimlerin ve parçalanmış materyallerin av ve avcı sitoplazması arasındaki transferi sağlar⁽¹⁴⁻¹⁷⁾.

Bdellovibrio bacteriovorus'un avını öldürmek için proteaz ve nukleaz gibi ekstraselüler enzimler salgıladıkları bilinmektedir⁽¹⁶⁾. Penetrasyon mekanizmasını detaylı inceleyen Burnham et al.⁽¹⁸⁾, konakçı veya av olan hücrenin parçalanabilmesi için hem fiziksel hem de enzimatik aktivitenin işlevinin olduğunu belirtmişlerdir.

Aktif *B. bacteriovorus* kültürü ve aynı zamanda kültür supernantının (çöktürme veya filtrasyonla hücrelerden arındırılmış) bir alg türü olan *Oscillatoria* hücrelerini parçalayabildiği Burnham et al.⁽¹⁹⁾ tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Bu parçalanmaya büyük ölçüde *B. bacteriovorus*'un salgıladığı enzimler neden olmaktadır. Parçalanmayı sitoplazmik hücre içeriğinin kaybı ve hücre duvarının çözünmesi takip etmektedir.

Bu çalışmada, *B. bacteriovorus* hücre içi enzimlerine sahip olan hücre özütünün biyofilm oluşumunu engelleme potansiyeli araştırılmıştır. Filtrasyon membranı yüzeyinde oluşan biyofilm tabakanın çözünmesine olan etkisi ölü uçlu reaktör sisteminde yapılan membran akı çalışmaları ile gösterilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kullanılan Mikroorganizmaların Üretimi

Escherichia coli S17 ve *B. bacteriovorus* Nottingham Üniversitesi (İngiltere) öğretim üyesi Dr. Liz Sockett'ten sağlanmıştır. *E. coli* S17, *B. bacteriovorus*'un üretimi için av bakterisi olarak kullanılmıştır. Hücreler nutrient agar [NA (maya özütü 3 g/L, pepton 5 g/L, NaCl 5 g/L, agar 15 g/L)] üzerinde üretilip saklanmıştır. *E. coli* hücreleri bir gün önceden NA'a ekilmiştir. Daha sonra hücreler toplanarak HM tamponuna (10 mM Hepes, 0.1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ pH:7.2), OD₆₀₀ absorbans değeri 0.3-0.4 olacak şekilde eklenmiştir. Önceden üretilmiş olan *B. bacteriovorus* hücreleri bu karışıma eklenmiştir. Hücreler 29°C'de 180 rpm'de çalkalanarak 2-3 gün inkübasyona bırakılmış, absorbans değerindeki azalma (0.1-0.05 civarına düşüş) *B. bacteriovorus* hücrelerinin *E. coli* hücrelerini parçaladığını göstermektedir. Hazırlanan her yeni kültür ile birlikte bir kontrol kültürü de başlatılmıştır. Kontrol kültürüne aynı miktarda *E. coli* eklenmiştir ancak *B. bacteriovorus* yerine aynı hacimde tampon eklenmiştir. *B. bacteriovorus*'un hücre parçalamaya aktivitesi denklem 1'de gösterildiği şekilde hesaplanmıştır.

Denklem 1: *Bdellovibrio bacteriovorus*'un hücre parçalamaya aktivitesinin hesaplanması

$$\left(\begin{array}{c} \% B. bacteriovorus \\ \text{hücre parçalamaya aktivitesi} \end{array} \right) = \frac{\left(\begin{array}{c} \text{kontrol} \\ \text{biyokütlesi} \end{array} \right)_t - \left(\begin{array}{c} B. bacteriovorus \\ \text{biyokütlesi} \end{array} \right)_t}{\left(\begin{array}{c} \text{kontrol} \\ \text{biyokütlesi} \end{array} \right)_t} \times 100$$

Sıcaklık, pH ve Mineral konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisi

Bdellovibrio bacteriovorus hücrelerinin av hücrelerini parçalamaları için uygun koşulların saptanması amacıyla, inkübasyon sıcaklığı, besiyeri pH'sı ve MgCl₂ ve CaCl₂ minerallerinin konsantrasyonları değiştirilmiştir. Hücrelerin olağan koşullarda üretildiği HM tamponu 10 mM

Hepes, 0.1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ içermektedir ve pH 7.2'dir. MgCl₂ konsantrasyonu 0.001-1 mM arasında değişen beş farklı konsantrasyonda ve CaCl₂ konsantrasyonu 0.1-10 mM arasında değişen beş farklı konsantrasyonda, ayrıca pH 7-8.8 arasında değişen 7 farklı pH değerinde HM tamponları hazırlanmıştır. *B. bacteriovorus* ve av hücre *E. coli* "Kullanılan Mikroorganizmaların Üretimi" başlığı altında verildiği şekilde besiyerlerine ekilerek üretim gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık deneyi için HM tampon içeriği değiştirilmeden inkübatör sıcaklığı 26°C, 29°C, 32°C, 35°C olacak şekilde ayarlanarak hücreler üretilmişlerdir. Deney sonunda *B. bacteriovorus* aktivitesi Denklem 1'de verildiği gibi hesaplanmıştır.

***Bdellovibrio bacteriovorus* Hücre Özütünün Hazırlanması**

Bdellovibrio bacteriovorus hücre özütünün 1982'de von Stein ve ark.⁽²¹⁾ tarafından kullanılan prosedür modifiye edilerek hazırlanmıştır. *B. bacteriovorus* kültürü 0.45 µm porlu steril filtreden geçirilmiş *E. coli* hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra 7000 rpm'de 20 dk çöktürülmüştür. Pellette toplanan hücreler PBS tamponunda (pH: 7.2; 1X NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L) çözüldükten sonra 90 W güce ayarlanmış sonik hücre parçalayıcı homojenizatör (Hielsher, Almanya) aracılığıyla buzda tutularak parçalanmıştır (1 dk. homojenizasyon, 1 dk. buzda bekletme, 30 yinleme). Parçalanmış hücre solusyonu 10000 rpm'de 10 dk. çöktürülerek hücre kalıntılarının çökmesi sağlanmıştır. Enzimlerce zengin supernatant kısmı -30°C'de saklanmıştır.

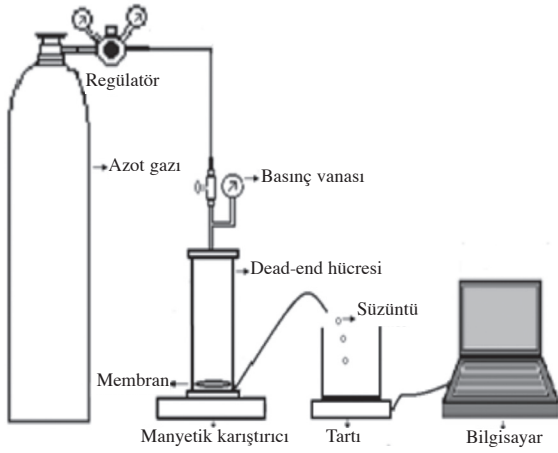
***Bdellovibrio bacteriovorus*'un Biyofilm Oluşumunu Engelleme Etkisi**

Aktif çamur tankından alınan numunenin beher içinde 5 dk. çökmesi beklenmiştir. Daha sonra üstteki supernatant alınmıştır. 190 µl superna-

tant, 40 µl *B. bacteriovorus* hücre özütü olacak şekilde birbirine karıştırılarak 96 kuyucuklu polistiren plakalara eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına *B. bacteriovorus* hücre özütü yerine 40 µl tampon ilave edilmiştir. Deney 30°C'de 3 saat inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Üç saat sonunda 2 kez çeşme suyuyla yıkanan plaklar kurutulduktan sonra plakalarda oluşan biyofilm miktarı kristal viyoleto yöntemi ile ölçülmüştür⁽²⁰⁾. Kuyucuklarda kalan biyofilm %1'lik kristal violet ile 5 dk. boyanmıştır. 2 kez çeşme suyuyla yıkanıp fazla olan kristal violet ortamdan uzaklaştırılmıştır. Son olarak 70:30 etanol:aseton karışımı plakalara eklenip 30 dk. beklenmiştir. Spektrofotometrede OD₅₇₀ nm'de absorbans değerleri alınarak biyofilm kalınlığı hesaplanmıştır.

***Bdellovibrio bacteriovorus* Hücre Özütünün Membran Kirlenmesini Giderme Etkisinin Ölü Uçlu Reaktör Sistemi Kullanılarak İncelenmesi**

Bdellovibrio bacteriovorus hücre özütünün membrane yüzeyinde oluşan biyofilmi giderme etkisi Ölü Uçlu Basınçlı Reaktör Sistemi ve mikro filtrasyon polietersülfon (PES) (gözenek büyüklüğü 0.05 mm) kullanılarak ölçülmüştür. Evsel arıtım tesisinden alınan ikincil atıksu laboratuvara getirilerek 10 L'lik havalandırılmalı kesikli reaktörde sentetik atıksu (mg/L: glukoz, 650; pepton, 50; üre, 100; (NH₄)₂SO₄, 50; KH₂PO₄, 50; K₂HPO₄, 5; NaHCO₃, 100; eser elementler gerekli miktarlarda eklenmiştir.) kullanılarak her gün beslenmiştir. Atık suyun askıda katı madde oranı 3.000 mg/L partikül boyutu ise 80-97 µm olarak ölçülmüştür. Besleme hacmi ve zamanı atık suyun çamur bekleme süresi (SRT) 20 gün hidrolik bekleme süresi (HRT) 48 saat olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneylerde Sterlitech Corporation Dead-End membran sistem (Model HP4750, ABD) kullanılmıştır (Şekil 1)⁽²⁰⁾. Tam karışımli hücrenin toplam hacmi 300 mL, kullanılabilen membran alanı ise 14.6



Şekil 1. Sterlitech Ölü Uçlu Reaktör Sisteminin şematik gösterimi.

cm²'dir. Membran Ölü Uçlu Reaktör hücrenin taş filtresi üzerine yerleştirilmiştir. Hücreye basınç, regülatörlü hortumla bağlantı yapılarak sağlanmıştır. Atık suyu membrandan filtre etmek için kullanılan sürücü kuvvet 1.5 bar basınçtaki azot gazıdır.

Atık suyun homojenliğini Ölü Uçlu Reaktör sisteminde sağlayabilmek için hücre manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Filtrasyon süresince 500 rpm'de karıştırılmıştır. Filtrasyon sonunda süzüntü akışı aşağıda verilen denklem (2) ile hesaplanmıştır.

Denklem 2: Süzüntü akışı hesaplanması

$$J = \Delta V / A \times \Delta t$$

- dV = belirli zaman periyodunda toplanan süzüntü hacmi (L)
- Δt = zaman (sa)
- A = kullanılan membran alanı (m²)
- J = akı (L.m⁻².sa⁻¹)

Kontrol için bir ve deney için bir olmak üzere toplam iki membran kullanılmıştır. *B. bacteriovorus* hücre özütü ile (veya kontrol için tampon ile) temizleme işlemi için Ölü Uçlu Reaktör Sisteminde kullanılan membranın yüzeyinde oluşan kek tabakası sıyrılmıştır. Membran *B. bacteriovorus* hücre özütü ile oda sıcaklığın-

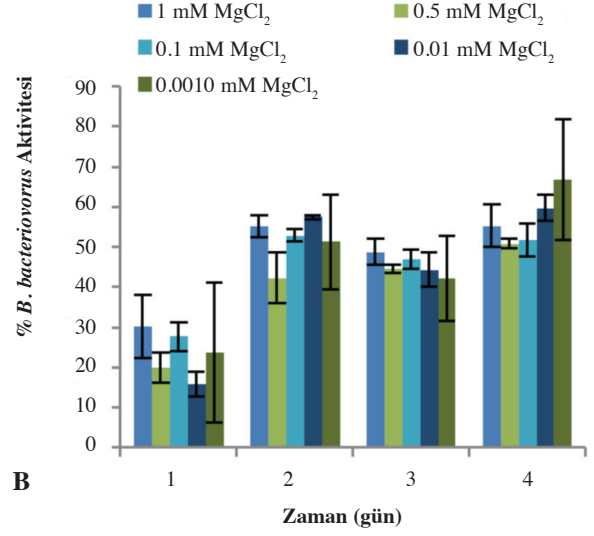
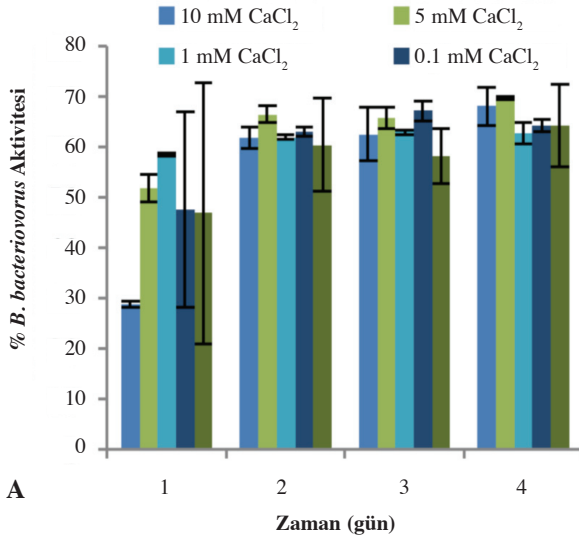
da 100 rpm'de 3 saat boyunca inkübasyonda bırakılmıştır. Kontrol membranı olarak kullanılan ikinci membran ise aynı koşullarda tamponda inkübasyona bırakılmıştır. Membranlar bir sonraki filtrasyonda kullanılmışlardır.

Temizleme işlemi sonrasında membranlardan yine çamur filtrasyonu yapıp ve yine temizleme işlemi uygulanmıştır. İlk filtrasyon temizleme işlemi öncesi yapılmıştır. İlk filtrasyon sayılmadığı takdirde temizleme ve ardından filtrasyon işlemi beş kez yinelenmiştir.

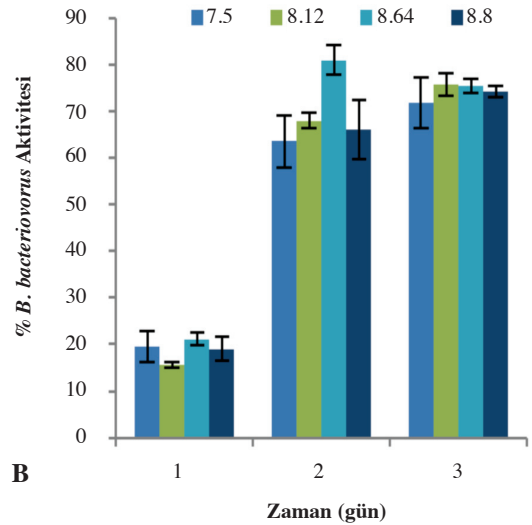
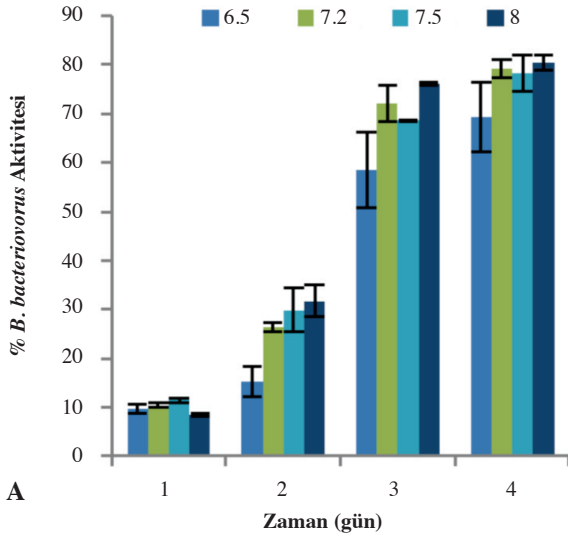
BULGULAR

Bdellovibrio bacteriovorus hücre içi litik enzimlerinin biyofilm giderimine olan etkisini incelemeye önce hücrelerinin aktivitelerini etkileyen fiziksel ve kimyasal parametreler incelenmiştir. Bu amaçla sıcaklık, pH ve mineral konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus* aktivitesine olan etkilerine bakılmıştır. Farklı sıcaklıklarda (26°C, 29°C, 32°C, 35°C) üretilen *B. bacteriovorus* kültürlerinde 3 günlük yapılan inkübasyonda diğer sıcaklıklara kıyasla %15'lik bir artış görülmüştür ancak 35°C'de av olarak kullanılan *E. coli* hücrelerinin kendi kendine parçalanma oranı daha yüksek olduğu için deneylere 29°C'de devam edilmiştir.

Mineral konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisini görmek amacıyla CaCl₂ (10 mM, 5 mM, 1 mM, 0.1 mM) ve MgCl₂ (1 mM, 5 mM, 0.1 mM, 0.01 mM, 0.001 mM) mineralleri belirtildiği şekilde eklenmiştir. CaCl₂ ve MgCl₂'nin HM tamponunda kullanılan konsantrasyonları sırasıyla 1 mM ve 0.1 mM'dır. Her iki mineralin test edilen konsantrasyonların aktiviteye çarpıcı bir etkisi olmamasına karşın, 5 mM CaCl₂'nin yüksek aktivite için optimum olduğu söylenebilir. MgCl₂'nin ise inkübasyonun ilk iki gününde yüksek konsantrasyonlarının daha etkili olduğu 4 günlük inkübasyonda ise 0.001 mM MgCl₂'nin daha verimli aktivite sağladığı belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. HM tamponunda farklı CaCl₂ ve MgCl₂'nin konsantrasyonlarının *Bdellovibrio bacteriovorus* aktivitesine etkisi. A) MgCl₂ (0,1 mM) CaCl₂'nin farklı konsantrasyonları. B) CaCl₂ (1 mM) MgCl₂ farklı konsantrasyonları.

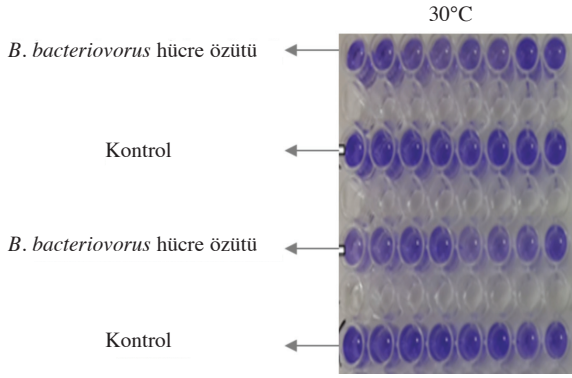


Şekil 3. pH'nin *Bdellovibrio bacteriovorus*'un aktivitesine etkisi (A) 6.5-8 pH aralığı; (B) 7.5-8.8 pH aralığı.

pH 6.5-8.8 arasında farklı pH'lara sahip kültürlerde *B. bacteriovorus*'un pH 8-8.6 arasındaki değerlerde daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3). Enzimlerin aktivitelerini etkileyen en önemli parametreler ortam pH'sı ve sıcaklıktır. Mezofilik bakteriler 30-37°C de yüksek aktivite göstermektedirler. Enzimlerin yüksek aktivite gösterdiği dolayısıyla bakterilerin de optimum üreme gösterdiği pH değeri ise genellikle nötr pH değeri olan 7 civarındadır. Ancak

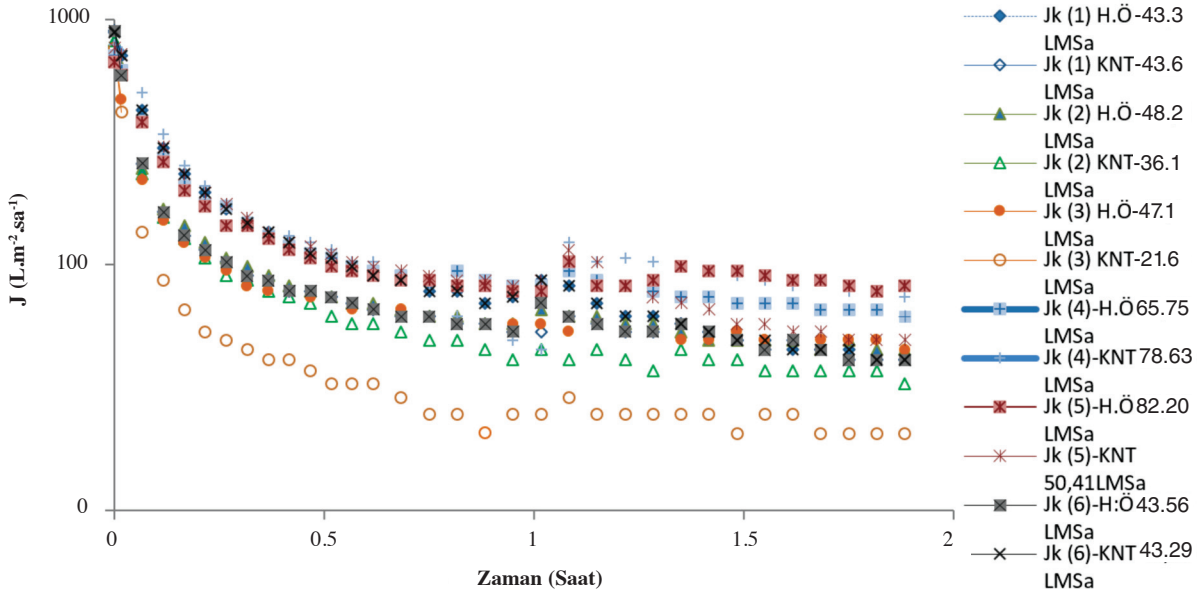
B. bacteriovorus'un pH 8 civarında daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 1 ve Şekil 4'te *B. bacteriovorus* hücre özütünün 96 kuyucuklu plakalarda aktif çamur biyofilminin oluşumunu inhibe etme etkisi gösterilmiştir. Şekilde *B. bacteriovorus* eklenen kuyucuklarda aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm miktarının hücre özütü eklenmeyen kontrol kuyucuklarına kıyasla daha düşük



Şekil 4. *Bdellovibrio bacteriovorus* hücre özütünün atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilm oluşumunu engelleme etkisi.

olduğu görülmektedir. *B. bacteriovorus* hücre özütü litik enzimler de dâhil olmak üzere farklı proteinler içermektedir. Bu enzim ve proteinlerin hücrelerin plakanın duvarlarına tutunmasına engel olarak veya hücreleri parçalayarak biyofilm oluşumunu engelliyor olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 5. *Bdellovibrio bacteriovorus* hücre özütünün membran filtrasyonuna etkisi. (HÖ: Hücre özütü ile temizlenen membran, KNT: Kontrol membran, Jk: Kararlı akı değerleri)

Tablo 1. *Bdellovibrio bacteriovorus* hücre özütünün atık su bakterilerinin oluşturduğu biyofilm oluşumunu engelleme etkisi.

	Biyofilm miktarı (OD ₅₇₀) 30°C	Biyofilm miktarı (OD ₅₇₀) 37°C	İnhibisyon etkisi (%) 30°C	İnhibisyon etkisi (%) 37°C
Atıksu + <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> hücre özütü	0.894±0.13	0.853±0.120	39.34	32.36
Atıksu + Tampon (Kontrol)	1.474±0.065	1.261±0.078		

Şekil 5'te MP005 membranı ile yapılan filtrasyonlara ait akı değerleri görülmektedir. İlk akı değerleri (J1) membran hücre özütü ile yıkanmadan önceki akı değeridir. *B. bacteriovorus* hücre özütü ile yıkanan membranın kararlı akı değerlerinin ortalaması (Jk2-Jk6 ortalaması) 57.4 L.m².sa⁻¹ iken, kontrol membranlarının bu beş filtrasyona ait kararlı akı ortalaması 46 L.m².sa⁻¹ olarak hesaplanmıştır. *B. bacteriovorus* hücre özütünde bulunan enzimlerin membran yüzeyindeki biyofilm tabakayı zayıflatarak membranın gözeneklerinin daha geç tıkanmasına yardımcı olduğu dolayısıyla membranın kullanım ömrünü uzattığı sonucuna varılmıştır. Ancak membranlardan daha fazla sayıda atık su filtrasyonu yapıldığında membran yüzeyi geri dönüşümsüz olarak kirlenecektir. Bu durumda *B. bacteriovorus* hücre özütü ile yıkama işlemi yetersiz kalacağından membranın zaman zaman geri yıkama veya kimyasal işlemlerle temizlenmesi gerekmektedir.

TARTIŞMA

Çeşitli yüzeylerde bakterilerin oluşturduğu biyofilm çoğu zaman sorunlara neden olmakta ve giderimi için maliyeti yüksek prosesler gerekebilmektedir. Biyofilmin oluşmaması veya giderimi için fiziksel veya kimyasal çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemler rutin olarak kullanılmasına rağmen, biyolojik çözümler hâlen gelişme aşamasında sayılabilir. Bakteriyel biyofilm tabakanın temizlenmesinde Qurum sensing mekanizmasının engellenmesi, çeşitli litik enzimlerin kullanımı yoğunlukla çalışılan konular arasındadır.

Bu çalışmada, Gram negatif bakterileri besin olarak kullanan avcı bir bakteri türü olan *B. bacteriovorus* hücre özütünün atıksu bakterilerinin biyofilm oluşumunu engelleme etkisi araştırılmıştır. Ayrıca bu hücre özütünün membran yüzeyinde oluşan biyofilm tabakayı temizleme etkisi incelenmiştir. Avcı bir bakteri türü olan *B. bacteriovorus* Gram negatif bakteriler ile beslenerek yaşamını sürdürür. Bakteriyel popülasyonu dengede tuttuğundan çevre açısından önemli bir bakteridir. *B. bacteriovorus*'un parçalama aktivitesinin patojenik Gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur⁽⁶⁾. Bu çalışma kapsamında ilk önce *B. bacteriovorus*'un çoğalması için gerekli optimum koşullar araştırılmıştır. *B. bacteriovorus* üretimi için kullanılan besiyerleri genellikle Nunez et al.⁽¹⁷⁾ 2003 yılında yapmış olduğu çalışmada belirlendiği şekilde uygulanmaktadır. Bu çalışmada, sıcaklık, pH, mineral konsantrasyonu etkisi test edilmiş ve 35°C'nin, 8-8.5 arası pH değerinin aktivite için daha uygun olduğu görülmüştür.

Doksan altı kuyucuklu plakalarda *B. bacteriovorus* hücre özütü atıksu bakteri kültürüne karıştırıldığında biyofilm oluşumunu %39 oranında engellediği belirlenmiştir. *B. bacteriovorus*'un dişlerde periodontitis hastalığına neden olan *A.*

actinomycetemcomitans'ı parçaladığı ve oluşturduğu biyofilm tabakayı bozduğu daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir⁽⁹⁾. *Alcaligenes*, *Campylobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Shigella* türleri ve *H. pylori* bakterisinin *Bdellovibrio* tarafından parçalandığı 2010 yılında Markelova⁽¹⁰⁾ tarafından gösterilmiştir. Bu konuda birçok çalışması bulunan Markelova bu bakterinin biyokontrol ajanı olarak kullanım potansiyeli üzerinde durmuştur.

MBR sistemleri bakteri floklarını ve askıda kalan maddeleri fiziksel olarak tümüyle tutuştundan konvansiyonel arıtıma göre daha avantajlıdır. Ancak, MBR kirlenmesi (membrane fouling) bu sistemin ticarileşmesini zorlaştırmaktadır. Kirlenmiş membranların temizlenmesi veya değiştirilmesi işletim maliyetini yükselten bir faktördür. Kullanılan geleneksel temizleme metodları (örneğin, yüzeyin modifikasyonu, işletim parametrelerinin kontrolü, düzenli fiziksel ve kimyasal yıkama gibi) fiziko-kimyasal prensiplere dayalıdır ve enerji isteyen işlemlerdir.

Literatür araştırıldığında membran yüzeyinde tıkanmalara neden olan biyofilmi *B. bacteriovorus* ile giderilebilme potansiyeli ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. *B. bacteriovorus* hücre kültürünün aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm tabakayı temizleme etkisi olduğu daha önceki çalışmamızda gösterilmiştir⁽²²⁾. Bu çalışmada ise hücreler toplanmış ve biyofilm giderimi amacıyla hücre özütü kullanılmıştır. *B. bacteriovorus*'un av hücreleri parçalamak için birçok aktif litik enzime sahiptir^(11,12). 2013 yılında Kim et al.⁽²³⁾ *B. bacteriovorus*'un *E. coli* hücrelerinin membran yüzeyinde oluşturduğu kirlenmeyi temizlediğini rapor etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında atık su arıtımı sırasında MP005 membran yüzeyinde oluşan biyofilm tabaka *B. bacteriovorus* hücre özütü kullanılarak temizlenmiş ve akıda kontrole kıyasla %24.8

oranında iyileşme görülmüştür. *B. bacteriovorus* çok çeşitli konakçı profiline sahip virutik özellik gösteren bir bakteridir. Bu özelliği nedeniyle çeşitli alanlarda patojen gideriminde veya istenmeyen biyofilm tabakanın gideriminde kullanımına ilişkin araştırmalar devam etmektedir. Yapılan araştırmalardan alınan pozitif sonuçlar bu avcı bakterinin etkisi her geçen gün azalan antibiyotiklerin yerine kullanılabilir doğal bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

Teşekkür

112Y156 no'lu proje ile bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

- Allison DG. The biofilm matrix. *Biofouling*. 2003;19(2):139-50. <https://doi.org/10.1080/0892701031000072190>
- Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know? *J Hosp Infect*. 2006;64(4):313-25. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.06.028>
- Altun UH, Şener B. Biyofilm enfeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Derg*. 2008;39:82-8.
- Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. Biofilms in wounds: management strategies. *J Wound Care*. 2008;17(11):502-8. <https://doi.org/10.12968/jowc.2008.17.11.31479>
- Xiong Y, Liu Y. Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;86(3):825-37. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2463-0>
- Dashiff A, Junka RA, Libera M, Kadouri DE. Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Appl Microbiol*. 2011;110(2):431-44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04900.x>
- Varon M, Shilo M. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria I. Kinetic studies of attachment and invasion of *Escherichia coli* B by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol*. 1968;95(3):744-53.
- Stolp H. The bdellovibrios: bacterial parasites of bacteria. *Annu Rev Phytopathol*. 1973;11:53-76. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.11.090173.000413>
- Van Essche M, Quirynen M, Slieden I, Van Eldere J, Teughels W. *Bdellovibrio bacteriovorus* attacks *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Dent Res*. 2009;88(2):182-6. <https://doi.org/10.1177/0022034508329693>
- Markelova NY. Predacious bacteria, *Bdellovibrio* with potential for biocontrol. *Int J Hyg Environ Health*. 2010;213(6):428-31. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.08.004>
- Rittenberg SC, Hespell R. Energy efficiency of intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol*. 1975;121(3):1158-65.
- Ruby EG. The genus *Bdellovibrio*. In: Balows A, Starr MP, Stolp H, Truper HG, Schlegel HG, Eds, *The Prokaryotes*. 2nd Ed. Springer: 1992. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1_25
- Tudor JJ, McCann MP, Acrich I. A new model for the penetration of prey cells by bdellovibrios. *J Bacteriol*. 1990;172(5):2421-6. <https://doi.org/10.1128/jb.172.5.2421-2426.1990>
- Pritchard M, Langley D, Rittenberg S. Effects of methotrexate on intraperiplasmic and axenic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol*. 1975;121(3):1131-6.
- Rittenberg SC, Langley D. Utilization of nucleoside monophosphates per Se for intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol*. 1975;121(3):1137-44.
- Saier M Jr. Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol Rev*. 1994;58(1):71-93.
- Nú-éz ME, Martin MO, Duong LK, Ly E, Spain EM. Investigations into the life cycle of the bacterial predator *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J at an interface by atomic force microscopy. *Biophys J*. 2003;84(5):3379-88. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)70061-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)70061-7)
- Burnham JC, Hashimoto T, Conti S. Electron microscopic observations on the penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into gram-negative bacterial hosts. *J Bacteriol*. 1968;96(4):1366-81.
- Burnham JC, Stetak T, Locher G. Extracellular lysis of the bluegreen alga *Phormidium luridum* by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Phycol*. 1976;12(3):306-13. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1976.tb02849.x>
- Kadouri D, O'Toole GA. Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(7):4044-51. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4044-4051.2005>
- Von Stein RS, Barber LE, Hassan MH. Biosynthesis of oxygen-detoxifying enzymes in *Bdellovibrio*. *J Bacteriol*. 1982;152(2):792-6.
- Özkan M, Yılmaz H, Akay Çelik M, et al. Application of *Bdellovibrio bacteriovorus* for reducing fouling of membranes used for wastewater treatment. *T J Biochem*. 2018; (Baskıda).
- Kim EH, Dwidar M, Mitchell RJ, Kwon YN. Assessing the effects of bacterial predation on membrane biofouling. *Water Res*. 2013;47(16):6024-32. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.07.023>