

**T.C.  
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ATIKSU ARITIMINDA MEMBRAN FİLTASYON PERFORMANSININ  
ARTTIRILMASINDA BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS'UN BİYOFİLM  
GİDERME ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**HİLAL YILMAZ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GEBZE**

**2016**

T.C.  
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ATIKSU ARITIMINDA MEMBRAN FİLTASYON  
PERFORMANSININ ARTTIRILMASINDA  
*BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS* 'UN BİYOFİLM  
GİDERME ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HİHAL YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANI

PROF. DR. MELEK ÖZKAN

GEBZE

2016

**T.R.**  
**GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY**  
**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**INVESTIGATION OF BIOFILM REMOVAL EFFECT**  
**OF *BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS***  
**FOR ENHANCING MEMBRANE FILTRATION**  
**PERFORMANCE IN WASTEWATER TREATMENT**

**HİLAL YILMAZ**

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF**  
**MASTER OF SCIENCE**  
**DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING**

THESIS SUPERVISOR  
PROF. DR. MELEK ÖZKAN

**GEBZE**

**2016**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/06/2016 tarih ve 2016/37 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 30/06/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Hilal Yılmaz'ın tez çalışması Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Doç. Dr. Pınar ERGENEKON

ÜYE

: Doç. Dr. Fatma Neşe KÖK



**ONAY**

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

Mikrobiyel tutunma temelli biyoteknolojik uygulamalar birçok alanda yaygın kullanılmasına karşın biyofilm oluşumunun çevre, endüstriyel uygulamalar ve canlı sağlığına negatif etkiler yarattığı durumlar da bulunmaktadır. Atıksu arıtımında ise biyofilm oluşumu filtrasyonla arıtımda kullanılan membranların tıkanmasına dolayısıyla kullanım ömürlerinin kısalmasına neden olmaktadır. Biyofilm oluşumunun önlenmesi amacıyla fiziksel, kimyasal veya biyolojik çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında Gram (-) bakterileri besin olarak kullanan Gram (-) avcı bir bakteri olan *Bdellovibrio bacteriovorus*'un aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm tabakayı giderme potansiyeli araştırılmıştır. Canlı *B. bacteriovorus* hücrelerinin yanısıra litik enzimler içeren hücre özütlerinin de biyofilm giderme etkisi incelenmiştir. Farklı pH, sıcaklık ve mineral konsantrasyonu, farklı besiyerleri denenmiş, 8-8.8 pH, 29.5°C sıcaklık ve 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1mM MgCl<sub>2</sub> mineral konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus*'un yüksek aktivitesi için optimum olduğu bulunmuştur. Biyofilm giderme etkisi ise öncelikle *E. coli* hücrelerinin oluşturduğu biyofilm üzerinde denenmiştir. 96 kuyucuklu polistiren plakalarda oluşturulan biyofilm tabaka üzerine *B. bacteriovorus* hücre kültürü eklenmiş ve inkübasyondan sonra kalan biyofilm kalınlığını krsital violet yöntemiyle ölçülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda *B. bacteriovorus* hücrelerinin *E. coli* biyofilmini %66, *B. bacteriovorus*'un çamur bakterileri tarafından (gerçek atıksu kullanılarak) oluşturulan biyofilmi ise %22.2 oranında giderdiği tespit edilmiştir. Hücre özütünün çamur bakterileri tarafından oluşturulan biyofilmi inhibisyon etkisi %39 olarak ölçülmüştür. Son olarak atıksu arıtımında kullanılan 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* ile yıkanan membranda 12.44 L/m<sup>2</sup>.h'lik iyileşme akıda gözlemlenmiştir. Sonuçlar *B. bacteriovorus*'un aktif çamur bakterilerinin membran yüzeylerinde oluşturduğu biyofilm tabakanın gideriminde kullanım potansiyeli olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler: *Bdellovibrio bacteriovorus*, Biyofilm Giderimi, Biyofilm Oluşumu.**

## SUMMARY

Although biotechnological applications based on microbial attachment are commonly used in many fields, formation of biofilm creates negative effects on the environment, industrial applications and health of the living organisms. In treatment of wastewater, the formation of biofilm on membrane surface causes fouling of the membrane and decreases membrane lifetime. A variety of physical, chemical, and biological methods are being used to prevent the formation of biofilm. The potential of *Bdellovibrio bacteriovorus* to remove the biofilm layer formed by active sludge bacteria is investigated in this thesis study. The effect of cell extracts that contain lytic enzymes as well as the effect of living *B. bacteriovorus* cells on removal of biofilm is investigated. In this study effect of pH's, temperatures and mineral concentrations are tested, and it was found that 8-8.8 pH, 29.5°C temperature and mineral concentrations of 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1mM MgCl<sub>2</sub> are optimum for *B. bacteriovorus* to acquire a high activity. Effect of *B. bacteriovorus* on removal of biofilm was firstly tried on the biofilm that was formed by *E. coli* cells. Cell culture of *B. bacteriovorus* was added on biofilm layers that are made on 96-well polystyrene plates, and the thickness of the biofilm layer remained after incubation was determined with crystal violet method. According to the results of the study, it was determined that *B. bacteriovorus* cells remove the *E. coli* biofilm at a ratio %66, and the biofilm formed (using real wastewater) by sludge bacteria at a ratio of %22.2. The effect of cell extract to inhibit the biofilm formed by sludge bacteria was measured to be %39. Finally, the biofilm layer, which accumulated on the membrane surface was used for wastewater filtration, was washed *B. bacteriovorus* cell extract, and the effect of this application on the performance of membrane was measured. Membrane washed *B. bacteriovorus*, 12 L/m<sup>2</sup>.h improvement was observed in flux as compared the control membrane. The results show that *B. bacteriovorus* has a potential of being used in the removal of biofilm layer formed by active sludge bacteria formed on membrane surfaces.

**Key Words: *Bdellovibrio bacteriovorus*, Biofilm Removal, Biofilm Formation.**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca her türlü bilimsel katkıyı sunup, tezimin oluşmasında ve tamamlanmasında yoğun katkıları olan, Sayın Prof. Dr. Melek ÖZKAN'a, sağlamış olduğu motivasyon ve yakın ilgiden dolayı,

Laboratuvar çalışmalarında bana son derece değerli tecrübeler kazandıran, deneysel çalışmalarda bana önemli desteklerde bulunan ve imkan sağlayan,

Tezin oluşumuna sebep olan 112Y156 No'lu "Avcı bakteri *Bdellovibrio bacteriovorus* kullanılarak membran biyoreaktörlerdeki membran kirlenme probleminin azaltılması ve bakteri populasyon profili ve biyofilm oluşumu ilişkisinin incelenmesi" projesini destekleyen ve bana Proje Asistanı olarak çalışma imkanı sağlayan TÜBİTAK'a,

Çalışmalarım boyunca desteğini hiç esirgemeyen sevgili aileme, yapılan bütün çalışmalarda benimle birlikte mesai harcayan, her türlü maddi ve manevi desteği gösteren Ar. Gör. Faruk CAN'a, Çisel ŞENGEZER'e, Tülay CAN'a ayrıca tezimin oluşumu ve düzenlenmesinde yardımlarından dolayı Osman Cahit DEMİRCİ' ye teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. BİYOFİLM	3
2.1. Biyofilm Yapısı	3
2.2. Biyofilm Oluşum Basamakları	6
2.3. Biyofilm Oluşumu ile Quorum Sensing Haberleşme Sistemi İlişkisi	7
2.4. Biyofilmlerin Endüstriyel Önemleri	8
2.4.1. Yararlı Biyofilm İşlevleri	8
2.4.2. Zararlı Biyofilm İşlevleri	9
2.4.3. Biyofilm Oluşumunun Kontrolü Ve Engellenmesi	9
3. MEMBRAN BİYOREAKTÖRLER VE MEMBRAN KİRLENMELERİ	12
3.1. Membran Kirlenmesinin Azaltılması	13
3.2. Membran Kirlenmesini Geciktirmeye Yönelik Biyolojik Yöntemler	14
4. <i>BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS</i>	16
4.1. <i>B. bacteriovorus</i> Yaşam Döngüsü	16
4.1.1. Saldırı Fazı	17
4.1.2. Büyüme Fazı	18
4.2. Konakçı-Bağımsız (HI: Host Independent) <i>B. bacteriovorus</i>	19
4.3. <i>B. bacteriovorus</i> Litik Enzimleri	19
5. MATERYAL VE METOT	21
5.1. Kullanılan Mikroorganizmaların Üretimi	21



5.2. Besiyeri Ve Ortam Koşullarının <i>B. bacteriovorus</i> Aktivitesine Etkisi	21
5.3. <i>B. bacteriovorus</i> Hücrelerinin ve <i>B. bacteriovorus</i> Hücre Özütünün Biyofilm Giderimine Etkisi	25
5.3.1. <i>B. bacteriovorus</i> Hücre Özütünün Hazırlanması	25
5.4. <i>B. bacteriovorus</i> 'un Biyofilm Oluşumunu Engelleme Etkisi	26
5.5. <i>B. bacteriovorus</i> Hücre Özütünün Membran Kirlenmesini Giderme Etkisinin Dead End Sistemi Kullanılarak İncelenmesi	26
5.6. Atıksu Beslenmesi	28
5.7. Atıksu Parametrelerinin Ölçümü	28
5.7.1. AKM Ölçümü	28
5.7.2. KOİ Ölçümü	28
5.8. Çökeltide ve Süzüntüde Karbonhidrat ve Protein Tayini (EPS ve SMP Analizi)	29
5.8.1. Protein Analizi	29
5.8.2. Karbonhidrat Analizi	30
6. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
6.1. <i>B. bacteriovorus</i> Hücrelerinin Üretimi	31
6.2. Besiyeri Ve Ortam Koşullarının <i>B. Bacteriovorus</i> Aktivitesine Etkisi	32
6.2.1. Av hücre ( <i>E.coli</i> ) Konsantrasyonu Etkisi	32
6.2.2. Av Hücre ( <i>E.coli</i> ) Yaşı Etkisi	33
6.2.3. <i>B. bacteriovorus</i> Aşı Yaşının Etkisi	34
6.2.4. Farklı Besiyeri Tamponlarının <i>B. bacteriovorus</i> Aktivitesine Etkisi	34
6.2.5. Mineral Konsantrasyonlarının <i>B. bacteriovorus</i> Aktivitesine Etkisi	35
6.2.6. Sıcaklığın Etkisi	36
6.2.7. pH'ın Etkisi	37
6.2.8. <i>B.bacteriovorus</i> Kültürünün Filtrasyonunun Etkisi	38
6.3. <i>B. bacteriovorus</i> Hücrelerinin Biyofilm Giderimine Etkisi	39
6.4. <i>B. bacteriovorus</i> Hücre Özütünün Biyofilm Giderimine Etkisi	48
6.5. <i>B. bacteriovorus</i> Hücre Özütünün Membran Filtrasyonu Üzerindeki Etkisi	50
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR	55

ÖZGEÇMİŞ  
EKLER

61  
62



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
AKM	: Askıda katı madde
<i>B. bacteriovorus</i>	: <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>
EPS	: Hücre dışı polimerik maddeler
HRT	: Hidrolik bekleme süresi (saat)
J	: Akı (LMH)
KOİ	: Kimyasal oksijen ihtiyacı
LMH	: Litre/m <sup>2</sup> .saat
MF	: Mikrofiltrasyon
MBR	: Membran biyoreaktör
SMP	: Çözünmüş mikrobiyal hücre ürünleri
SRT	: Çamur alıkonma süresi (saat)
QS	: Quorum Sensing

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Biyofilm yapısı.	4
2.2: Biyofilm oluşum basamakları.	6
3.1: Membran Tıkanması.	13
4.1: <i>B. bacteriovorus</i> Yaşam Döngüsü.	17
5.1: Sterlitech Dead-end sistem düzeneği.	27
6.1: <i>B. bacteriovorus</i> 'un <i>E. coli</i> hücrelerini parçalaması a) <i>B. bacteriovorus</i> içermeyen (kontrol), b) <i>B. bacteriovorus</i> içeren <i>E. coli</i> kültürü.	31
6.2: <i>B. bacteriovorus</i> hücrelerinin ışık mikroskopu altındaki görünümü.	32
6.3: Av hücresi ( <i>E.coli</i> ) konsantrasyonunun <i>B.Bacteriovorus</i> aktivitesine etkisi.	33
6.4: Av hücre ( <i>E.coli</i> ) yaşının <i>B. bacteriovorus</i> aktivitesine etkisi.	33
6.5: <i>B. bacteriovorus</i> aşısı yaşının <i>B. bacteriovorus</i> aktivitesine etkisi.	34
6.6: Farklı tamponların <i>B. bacteriovorus</i> aktivitesine etkisi a) 1-3 gün inkübasyon, b) 1-6 gün inkübasyon.	35
6.7: HM tamponunda farklı $\text{CaCl}_2$ ve $\text{MgCl}_2$ 'nin konsantrasyonlarının <i>B. bacteriovorus</i> aktivitesine etkisi a) $\text{MgCl}_2$ (0,1mM) $\text{CaCl}_2$ 'nin farklı konsantrasyonları, b) $\text{CaCl}_2$ (1mM) $\text{MgCl}_2$ farklı konsantrasyonları.	36
6.8: Sıcaklığın <i>B. bacteriovorus</i> aktivitesine etkisi.	37
6.9: pH'ın <i>B. bacteriovorus</i> 'un aktivitesine etkisi a) 6,5-8 pH aralığı, b) 7,5-8,8 pH aralığı.	38
6.10: <i>B. bacteriovorus</i> kültürünün filtrasyonunun <i>B. bacteriovorus</i> aktivitesine etkisi.	39
6.11: Çamur miktarının biyofilm oluşumuna etkisi.	40
6.12: <i>E. coli</i> 'nin yoğunluk ve inkübasyon süresinin biyofilm kalınlığına etkisi.	41
6.13: <i>B. bacteriovorus</i> ' un biyofilm oluşturma kapasitesi (3-22 saat).	42
6.14: <i>B. bacteriovorus</i> ' un biyofilm oluşturma kapasitesi (1-4 gün).	43
6.15: <i>B. bacteriovorus</i> ile <i>E. coli</i> biyofilminin giderimi.	43

6.16: <i>B. bacteriovorus</i> 'un atıksu bakterileri tarafından oluşturulan biyofilmi giderme etkisi.	45
6.17: <i>B. bacteriovorus</i> hücre özütünün aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm giderimine etkisi.	49
6.18: <i>B. bacteriovorus</i> hücre özütünün atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilm oluşumunu engelleme etkisi.	50
6.19: <i>B. bacteriovorus</i> hücre özütünün membran filtrasyonuna etkisi.	51



## TABLolar DİZİNİ

<b><u>Tablo No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
5.1: Besi yeri ve ortam koşullarının <i>B. bacteriovorus</i> aktivisine etkisini araştırmak için yapılan deneyler.	24
6.1: <i>E.coli</i> 'nin yoğunluk ve inkübasyon süresinin biyofilm kalınlığına etkisi.	41
6.2: <i>B. bacteriovorus</i> ile <i>E. coli</i> biyofilminin giderimi.	44
6.3: <i>B. bacteriovorus</i> 'un atıksu bakterileri tarafından oluşturulan biyofilmi giderme etkisi.	45
6.4: Biyofilm oluşumunda kullanılan atıksuyun kimyasal özellikleri.	45
6.5: Yüksek EPS'ye sahip atıksu biyofilminin <i>B. bacteriovorus</i> ile giderimi.	46
6.6: Düşük EPS'ye sahip atıksu biyofilminin <i>B. bacteriovorus</i> ile giderimi.	47
6.7: <i>B. bacteriovorus</i> tarafından atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilminin giderimi.	47
6.8: <i>B. bacteriovorus</i> hücre özütünün atıksu bakterileri tarafından oluşturulan biyofilm giderimine etkisi.	48
6.9: <i>B. bacteiovorus</i> hücre özütünün atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilm oluşumunu engelleme etkisi.	49

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Evsel ve endüstriyel atıksu deşarjları ve kontamine olmuş yüzey suları su kaynaklarında sakıncalı etkiler yaratmaktadır. Atıksu arıtımı için kullanılan fiziko-kimyasal ve mikrobiyel arıtımı içeren çok sayıda teknoloji vardır [Topare et al., 2011]. Bu teknolojiler arasında en yenisi sayılabilecek Membran biyorekatör (MBR) teknolojisi membran prosesleri ve suspanse biyoreaktörleri birleştiren bir teknolojidir ve günümüzde atıksu arıtımı için tercih edilmektedir [Malaeb et al., 2013]. Yüksek askıda katı madde konsantrasyonlarında işletilen MBR'da membran yüzeyi atıksu ile temas ettiğinde partiküller ve bakteri hücreleri membran yüzeyinde birikmeye başlar. Bu kirlenme (fouling) ve biyofilm oluşumu mikroorganizmaların giderimini sağlayan ikinci bir bariyer olmakla beraber akıyı ve mebranın geçirgenliğini azaltır [Hirani et al., 2014].

MBR sistemlerinde kirlenme sürekli membranın temizlenmesini veya değiştirilmesini gerektirdiği için işletim maliyetini yükseltmektedir [Chang and Kim, 2005]. Membranın ömrünü uzatmak ve maliyeti düşürmek için kirlenme probleminin kontrol edilmesi gerekmektedir. Kirlenme membranın çeşidinden ve çamur parametrelerinden etkilenmektedir. Kirlenmenin gideriminde fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bakterisidal ürünlerin kullanımını içeren yerinde temizleme yöntemi de uygulanabilmektedir. Ancak bu yerinde temizleme işlemi membran yüzeyindeki biyokütleyi tamamen giderememektedir [Armstrong et al., 2009]. Quorum sensing (QS) mekanizmasının inhibisyonu, litik enzim kullanımı gibi birçok biyolojik temizleme yöntemi günümüzde araştırma aşamasındadır.

Gram (-) bir bakteri olan *Bdellovibrio bacteriovorus* *B. bacteriovorus* *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* gibi birçok bakterinin oluşturduğu biyofilmi temizleyebilmektedir [Dashiff et al., 2011]. Bu bakterilerin çoğu atıksularda da bulunmakta ve membran yüzeyine yapışarak kirlenmesine sebep olmaktadır. Ayrıca membran yüzeyini kolonize eden bakterielrin çoğunun Proteobakteriler olarak bilinen Gram (-) bakteri türleri oldukları rapor edilmiştir [Zhang et al., 2008]. *B.*

*bacteriovorus*'nun biyofilm giderme özelliği nedeniyle biyofilmin sorun yarattığı çeşitli alanlarda uygulama potansiyeli bulunmaktadır [Nunez et al., 2005]. Ancak, MBR'da oluşan biyofilm çok çeşitli bakteriyel türler içermektedir ve günümüze kadar atık çamurun oluşturduğu kirliliğin veya biyofilmin *B. bacteriovorus* kullanılarak giderimine ilişkin bir çalışma yapılmamıştır.

Bu tez kapsamında Gram (-) bakterileri tüketme özelliğine sahip avcı bir bakteri olan gram negatif *B. bacteriovorus*'un aktivitesinin artırılması için ortam koşullarının optimize edilmesi ve aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm tabaka üzerindeki etkisinin artırılması amaçlanmıştır. Bu sayede atıksu arıtımında kullanılan membranların yüzeyinde oluşan ve tıkanmaya neden olan bakteriyel biyofilm tabakanın azaltılması ve membranın daha uzun süre tıkanmadan kullanılması sağlanacaktır. Aktivitesi yüksek *B. bacteriovorus* kültürünün daha etkili olacağı beklenmektedir.



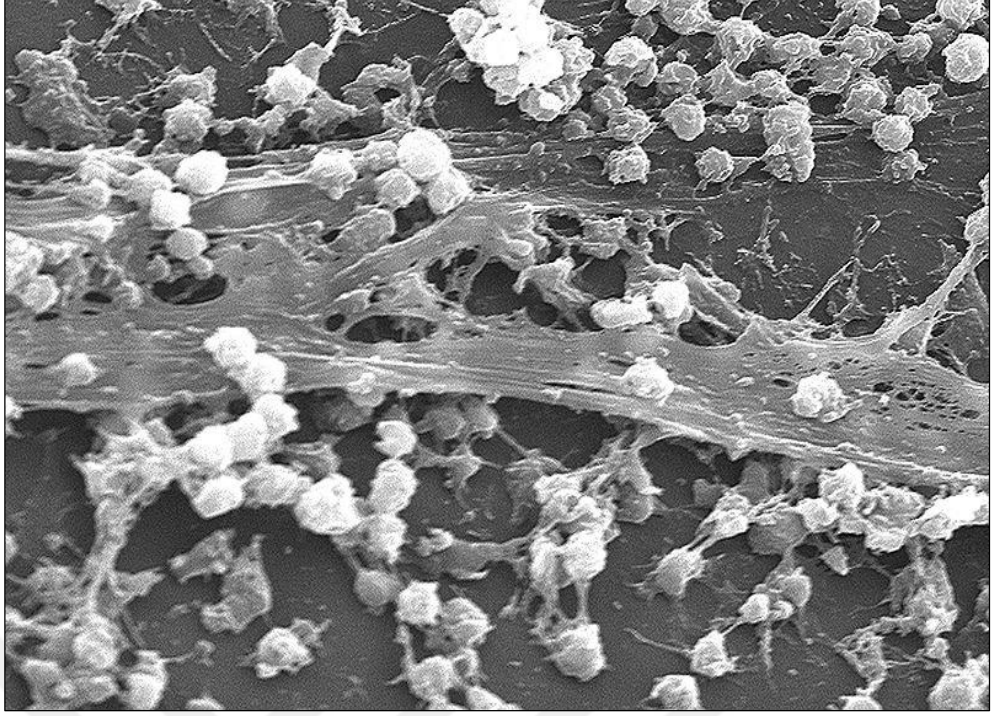
## 2. BİYOFİLM

Biyofilmler, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu bir yapı olarak tanımlanabilir. Bu jelsi tabaka, bakteri hücreleri tarafından üretilen terminolojide “hücre dışı polimerik yapı”, “ekzopolisakarit” ya da “ekzopolimer (EPS)” adı verilen polisakarit bazlı bir ağ yapısıdır. Biyofilm canlı hücrelerde veya cansız yüzeylerde oluşabilir. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar tek bir mikroorganizma türü veya birçok farklı mikroorganizma türünün bir araya gelmesiyle de oluşabilir. Nem miktarındaki artış ve besin maddelerinin ortamda olması biyofilm oluşumunu arttırmaktadır. Biyofilmlerin oluşumuna ve olgunlaşmasına bakteri suşu [Borucki et al., 2003], [Chae and Schraft, 2000], yüzey özellikleri, pH, besin miktarı, sıcaklık [Donlan, 2002] gibi çeşitli çevresel etmenler etkili olmaktadır. Biyofilm oluşturma mikroorganizmalara dezenfektanlardan, bakterileri yiyerek beslenen canlılardan, virüslerden ve pH dalgalanmalarından koruma gibi birçok avantaj sunmaktadır [Costerton and Stewart, 2001].

### 2.1. Biyofilm Yapısı

Biyofilm kümelerinin %97 lik kısmı sudan meydana gelmektedir. Diğer bileşenler ise; %1-2 EPS %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipit, fosfolipitlerdir. Fakat bu oranlar ortamda bulunan mikroorganizma türüne, fizyolojik nitelikleri, büyüme ortamı tabiatına, genel fiziksel özelliklere bağlı olarak değişiklik göstermektedir [Allison, 2003]. Biyofilm yapısının örnek gösterimi Şekil 2.1’de verilmiştir [Monroe, 2007].

Biyofilm hücrelerinin yüzeye tutunmasına polisakaritler, proteinler, DNA ve ekstraselüler matriks yardımcı olmaktadır. Yüzeye tutunanan bakteriler öncelikle mikrokolonileri, mikrokoloniler de gelişerek ve yayılarak biyofilm katmanlarını oluşturmaktadır. EPS salgılanması dönüşümsüz biyofilm oluşumu için gereklidir ve bu biyofilm kütesine bir işarettir. Olgun bir biyofilm kümesinin %75-90’nını EPS meydana getirmektedir [Padera, 2006].



Şekil 2.1: Biyofilm yapısı.

EPS'nin miktarı ve içeriği değişik mikroorganizmalarda, değişik çevre şartlarında ve biyofilm oluşumunun her bir evresinde farklılık sergileyebilmektedir. Bakterinin zemine tutunma tabiatı EPS'nin kimyasal bileşimini etkileyen en önemli sebeptir. Örneğin polianyonik bir polisakkarit olan üronik asitin ortamda bulunması canlılardaki EPS'nin anyonik özelliğini fazlalaştırarak kalsiyum ve magnezyum iyonlarına benzer şekilde divalent katyonlarla etkileşime girmesine ve bu şekilde katyonik alanlarda biyofilm yapılarında tutunma performansının artmasına neden olmaktadır [Sutherland, 2001]. Asidik polisakkaritlerin dışında proteinler, nükleik asitler ve lipitler de katyonik alanlara tutunmada önem arz etmektedir.

Bakterinin bağlandığı alanın iyon yükünün yanısıra mikroorganizmanın çeşidinin, biyofilmin oluştuğu çevredeki nitrojen, oksijen, besin miktarı, pH ve sıcaklık gibi çevresel etmenlerin ve biyofilm aşamalarının da EPS'nin niceliğine ve muhteviyatına tesir ettiği bilinmektedir. Bu hal biyofilm yapılarının değişebilir ve etkin olduklarına delil sunmaktadır [Mayer et al., 1999].

Düşük ve yüksek sıcaklık, tuzun yüksek niceliklerde bulunması gibi birçok durumda EPS'nin belli başlı spesifik konfigürasyonlarda bulanabildiği ortaya konmuştur. Bu spesifik konfigürasyonlar incelendiğinde birbirine iç içe geçmiş heliks

yapılarının oluşumuna çokça rastlanmıştır. Bu heliks yapıları meydana getiren bağların türünün biyofilm yapılarının elastikiyetini veya stabil olmasında mühim rol oynadığı düşünülmektedir [Sutherland, 2001].

Bunun yanı sıra birden fazla türün beraber meydana getirdiği biyofilm yapılarının çevresel stres şartlarına tek bir tür tarafından oluşturulmuş biyofilm yapılarına kıyasla daha stabil olduğu *Lactobacillus plantarum* ve *Listeria monocytogenes* üstünde yapılan araştırmalar ortaya çıkarmıştır [Van der Veen and Abee, 2011].

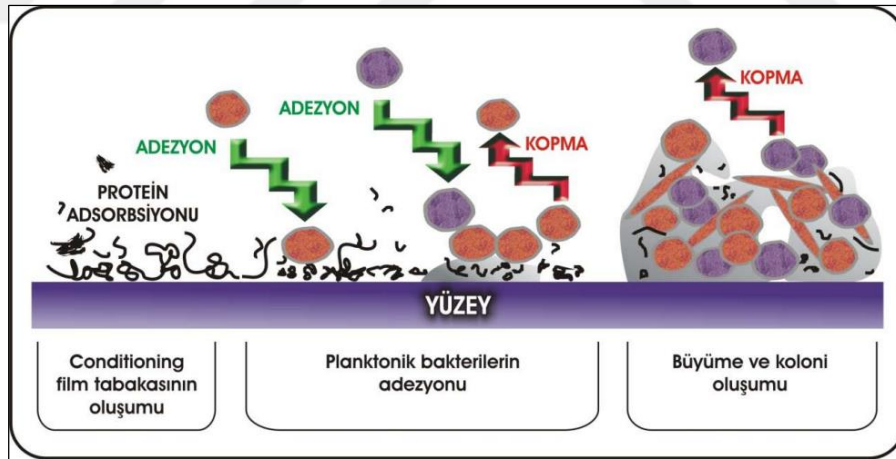
EPS üretebilen mikroorganizmaların dünya yüzeyinde bilinen mikroorganizmaların %99'undan fazla olduğu bilinmektedir. Değişik matrikslere başlangıç tutunmasına yardım etmek EPS'nin en önemli işlevidir. EPS ayrıca:

- Hücreye gerekli olan besinleri, eser miktardaki organik bileşikleri, iyonları bağlamak ve ortmadaki besinin tamamen tükenmesi durumunda bakterilerin kendilerinin veya biyofilm içinde bulunan diğer türlerin salgıladığı EPS tabakasını parçalayarak beslenme gayesiyle kullanmalarını sağlama [Christensen, 1989],
- Hücreleri fizksel olarak, parçalanmaya, pH değişikliklerine, biositlere, antibiyotiklere, toksik ağır metallerin meydana getireceği zararlara karşı muhafaza [Ophir and Gutnick, 1994],
- Birtakım patojenik hallerde konak canlıının makrofajlarının bağlanması ve antikollarının penetrasyonuna karşı muhafaza [Douglas, 2003],
- Biyofilm içinde varolan hücrelerinin hücrelerarası porlarını besleyerek hücreleri birlikte tutma gibi fonksiyonlara sahiptir [Vu et al., 2009].

Biyofilmler, hücre dışı DNA (eDNA), hücre dışı polisakkaritler, amiloid fiberler, biyofilm ile bağlantılı proteinler (BAP), çeşitli enzimler (DNAazlar, proteazlar, hücre dışı polisakkaritleri yıkan enzimler vb.) gibi bir çok biyopolimeri yapısında bulundurmaktadır. Biyofilm içinde olan bu sindirim enzimlerinin biyofilmlerin ortamda yayılabilmesine önemli katkılarının olduğu varsayılmaktadır.

## 2.2. Biyofilm Oluşum Basamakları

Biyofilm oluşumu fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçlerin birbirini takip etmesiyle oluşmaktadır. Biyofilm katmanının oluşmasındaki ilk aşama mikroorganizmaların yüzeye yaklaşmasıdır [Van Loosdrecht et al., 1990]. Fakat bundan öncelikle zeminin tutunmaya elverişli bir yapısının bulunması gerekmektedir. Bu süreçte suda bulunan partiküller organik ve/veya inorganik moleküller zemine yapışarak ince bir tabaka meydana getirerek mikrobiyal biyofilm oluşumu için zemini elverişli hale getirmektedir (Şekil 2.2). Bu tabaka zeminin niteliklerini farklılaştırarak mikrobiyal tutunmayı kolaylaşmasını sağlamaktadır [Simões et al., 2010]. Tutunma için zeminle yeterli aralık oluştuğunda (yaklaşık 1nm) mikroorganizmalar hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler, hidrojen ve Van der Waals bağlarının kuvveti, asit-baz etkileşimi ve sterik etkileşimler aracılığıyla zemine dokunmadan spesifik olmayan bir şekilde bağlanmaktadır. Primer tutunmanın oluşması için hidrofobik etkileşimler oldukça önemli bir yer teşkil etmektedir. Ayrıca yüzey çeşidi, besin miktarı, su akış hızı, sıcaklık pH da yüzeye bağlanma da önem arz eder.



Şekil 2.2: Biyofilm oluşum basamakları.

Primer tutunma dönüşümlü ve dönüşümsüz olarak ikiye ayrılmaktadır. Bakterilerin bir kısmı, yüzeye geri dönüşümlü (reversible) olarak bağlanırken diğer bir kısmı da ortamda bulunan besinleri kullanarak büyüyüp, EPS salgılayarak geri dönüşümsüz olarak (irreversible) bağlanırlar [Costerton and Stewart, 2001], [Donlan, 2002]. EPS oluşturarak geri dönüşümsüz olarak bağlanan bakteriler primer

kolonizasyonu oluştururlar. Oluşan bu yapı mikrokoloni olarak isimlendirilmektedir ve mikrokoloniler biyofilmin en kk yapı taşıdır. Primer kolonilerin ürettiği EPS katmanı yeni mikroorganizmalar için bağlanma zemini oluşturarak sekonder kolonizasyon gerçekleşmektedir. Bu Şekilde biyofilm tepeleri oluşmaktadır. Sekonder koloniler, primer kolonilerin metabolik artıklarından beslenmektedirler. Sonuç olarak farklı türleri içinde barındıran metabolik faaliyetlerini birarada gerçekleştirerek yaşamaya adapte olmuş olgun biyofilm öbeklerini oluşturmaktadır. Mikrokoloniler içersinde besinlerin aktarımı ve atık maddelerin atılımından sorumlu su kanalları bulunmaktadır. Olgun biyofilmlerden zamanla ayrılan mikrokoloniler bazı etmenlerin katkısıyla değişik bağlanma yüzeylerine taşınabilmektedir. Bunun sonucun da yeni biyofilm tepeleri oluşumu meydana gelmektedir [Schachter, 2003].

### **2.3. Biyofilm Oluşumu ile Quorum Sensing Haberleşme Sistemi İlişkisi**

Bakterilerin yaşamlarını izole popülasyonlar olarak srdrmedikleri, farklılaşan vre Şartlarına uyum sağlamak için kompleks hücreler arası iletişim mekanizmaları kullanarak topluluklar Şeklinde varlıklarını sürdürdükleri bilinmektedir. Bu iletişim mekanizması QS Şeklinde isimlendirilmektedir. Farklı bakteri türlerinde biyoluminesens, antibiyotik biyosentezi, konjugasyon gibi türlü fizyolojik muameleler ile hayvan, bitki ve balık patojenleri aracılığıyla meydana gelen virulens faktörlerinin üretimi bu iletişim mekanizmasıyla denetlenmektedir. Biyolojik proseslerden olan biyofilm üretimi de bu mekanizma ile denetlenmektedir [Waters and Bassler, 2005].

Genel olarak baktığımızda QS sistemi hücre dışı işaretleşmeler vasıtasıyla faaliyet göstermektedir [Morikawa, 2006]. Bu sinyaller bakteriler tarafından lokal dağılımlarını yorumlamak gayesi için kullanılmaktadır. Bu sinyaller elverişli yoğunluğa geldiğinde organize bir geri bildirim sistemi çalıştırılarak hücre popülasyonundaki fenotiplerin hızlıca artması sağlanmaktadır [Labbate et al., 2004].

QS mekanizması sinyal molekülleri gram-negatif bakterilerde aıl homoserin lakton (AHL), Gram-pozitif bakterilerde ise ufak peptitler ve iki grupta da bulunabilen 'autoinducer-2' (AI-2) diye isimlendirilen türlü gruplardan meydana gelmektedir. Üretilen bu moleküller hücre dışına salgınlılar ve burda yığılırlar. Difüzyon, atım

pompaları veya özgün taşıyıcılar vasıtasıyla hücre zarından geçmeleri sağlanmaktadır. Yeterince sinyal oluştuğunda ekspresyondan sorumlu gen uyarılarak gerekli ürünler meydana getirebilmektedir [Lazazzera and Grossman, 1998], [Hentzer et al., 2003].

QS mekanizmasının moleküllerini hücreSEL metobolitlerden farklı kılan başlıca etmenler; özel şartlar varlığında salgılanmaları, hücre dışında birikmeleri ve spesifik reseptörlerce bilinmeleri, molekül miktarı belli bir değere eriştiğinde tasarlanan bir cevabın meydana gelmesi şeklinde açıklanabilir. Birtakım QS mekanizması molekülleri bir türe ait olabiliyorken bazı moleküller de bir çok bakteri tarafından üretilebilmekte ve zaman zaman özdeş sinyal molekülü iki değişik bakteri aracılığıyla kullanıldığında birbirlerinin virulans etkenlerin üretilmesine etki edebilmektedir.

EPS salgılanarak biyofilm oluşumu ve sürdürülebilirliği için hücre dışı sinyaller önemli rol oynamaktadır [Labbate et al., 2004]. Düşük molekül ağırlığına sahip hücre sinyal moleküllerinin hücreler arası intikaline olanak sağlayan ve hücreler arasında etkileşimi fazlalaştırmaya yardımcı EPS'nin lifli ve gözenekli yapısı, hücre sinyal moleküllerinin aksiyon derecesini fazlalaştırabilmektedir.

## **2.4. Biyofilmlerin Endüstriyel Önemleri**

### **2.4.1. Yararlı Biyofilm İşlevleri**

Mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilm doğada bulunan ve insanoğlu için sağlık tehditi oluşturacak birçok maddeyi inhibe edebilmektedir. Yer altı sularının kirlenmesinin önlenmesi, kullanılmayan petrol yataklarının biyofilm tabakasıyla kaplanmasıyla çevreye verebilecekleri tehdidin önlenmesi biyofilmin bu işlevine örnek gösterilebilir. Ayrıca biyofilm oluşum mekanizmasından endüstride ve tıpta çeşitli amaçlar için yararlanılmaktadır.

- Temizlik maddeleri, kozmetik ürünleri için kimyasal katkı maddeleri veya gıda, ilaçlarda kullanılmakta olan katkı maddesi olarak saflaştırılmış EPS ürünlerinden faydalanılmaktadır. EPS içeriği antijenik özellik taşıyan patojenik biyofilmler saflaştırılarak sebep oldukları enfeksiyonları önlemede aşı olarak kullanılmaktadırlar.

- Mikroorganizmalar vasıtasıyla maden cevherlerinden metallerin geri elde edilmesi işlemi olan biyoliç işleminde biyofilmler kullanılmaktadır.
- Bitki köklerine tutunan biyofilmler bazı tarımsal bitkilere besin sağlamaları nedeniyle tarımsal üretimimin artmasına olanak sağlamaktadır [Hall-Stoodley et al., 2004].

#### **2.4.2. Zararlı Biyofilm İşlevleri**

Çeşitli yüzeylerde oluşan biyofilmler sistemin sağlıklı çalışmasını engelleyebileceği gibi sağlık açısından da risk oluşturabilir. Endüstriyel üretimde de çoğu zaman ürünlerde bulaşmalara ve bozulmalara, üretimde kullanılan sistemlerin hasar görmesine ve buna bağlı olarak üretimde azalmalara, enerji maliyetlerinde artışa sebep olabilmektedir [Elhariry, 2008]. Biyofilm oluşumu su borularının tıkanması, tarımsal ürünlerin tehlikeye girmesi, medikal implantların kontamine olması gibi problemlere neden olabilir [Vo, 2010b]. Su borularında oluşan bakteriyel biyofilm nedeniyle suyun kalitesi bozulabilmektedir.

İstenmeyen biyofilm oluşumunun etkili olduğu teknolojilerden biri de Membran biyoreaktör (MBR) teknolojisidir.

#### **2.4.3. Biyofilm Oluşumunun Kontrolü Ve Engellenmesi**

Biyofilmler birçok proses (çevresel kirleticilerin biyolojik ayrışması ya da insan vücudu içinde oluşan mikrobiyal denge) için çok önemli olmasına rağmen gıda, biyomedikal, çevresel ve endüstriyel alanlarda istenmeyen ciddi problemlere yol açmaktadırlar. Bazı proseslerde biyofilm oluşumu kamu sağlığını tehdit eden çevre sorunlarına, üretim ekipman ve bakım maliyetlerinin artması gibi etkilere sebep olabilmektedir. Biyofilm kontrolü için kullanılan güncel yöntemlerin bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Yüksek maliyet, yüzeyden biyofilmi gidermede yeterince etkili olamama, ve dirençli mikroorganizmaların oluşmasına neden olma bu kısıtlamalar arasında sayılabilir. İstenmeyen biyofilm kontrolü genellikle biyosit ve yüzey aktif maddeleri gibi antimikrobiyal özelliklere sahip kimyasal ürünlerin kullanımını içermektedir. Bu ürünler çevreye zararlı olabileceği için düşük miktarlarda kullanılmaları gerekmektedir. Ayrıca şimdiye kadar kullanılan biyosidal ürünlerin

mikroorganizmalar üzerinde tamamen etkili olmadığı görülmüştür. Buna ek olarak mikroorganizmalar bu ürünlere karşı direnç geliştirebilmektedir. Son on yıldır etkili dezenfektan ürünlerinin oluşturduğu yan ürünlerin ciddi halk sağlığı ve çevre sorunları oluşturabileceğine dair ikilemler oluşmuştur [Ferreira et al., 2010]. Biyofilm kontrolünde yaşanan bu sorunlar nedeniyle yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir. Aşağıda bu yeni teknolojilere örnekler verilmiştir:

- Titreşimli elektriksel alanlar; düşük voltaj (-0.5 ile 5 volt arasında) elektriksel uyarımların uygulanması *P.aeruginosa*'nın biyofilm gelişimini engellediği Perez-Roa ve diğerleri tarafından 2006 yılında gösterilmiştir.
- Fiziksel ve kimyasal yüzey modifikasyonları; Tüm malzemeler hava, nem yada farklı çevresel koşullara maruz kaldığı için bakteriyel kontaminasyonla karşı karşıya kalmaktadır. Spesifik olarak katyonik yan zincir ile polimetakrilat türevinin uygulaması ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonu sayesinde antimikrobiyel ve hidroliz sonucu kirlenmeye özelliğini bir arada bulunduran bir kaplama teknolojisi geliştirilmiştir. Cheng ve arkadaşları (2008) kaplamanın hidroliz oranının ayarlanmasıyla bu teknolojinin vücuda yerleştirilen tıbbi cihazlara uyarlanabileceğini bildirmiştir [Cheng et al., 2008].
- *P. aeruginosa* tarafından oluşturulan biyofilm nitrik oksit tarafından uzaklaştırıldığı belirlenmiştir [Romeo, 2006]. Nitrik oksitin etkinliği Gram (+) patojenlerde de görülmüştür. Nitrit kaynaklı stres, *Staphylococcus aureus* ve *S. epidermidis*'in hücrelerarası yapışkan polisakkarit sentezini azalttığı için biyofilm oluşumunu da azaltmaktadır. Nitrit oksit süpürücülerin (scavengers) biyofilm oluşumunu indirgediği görülmüş ve *Staphylococcus aureus* için aktif molekül olarak belirlenmiştir [Schlag et al., 2007].
- Biyolojik yöntemler; Bakteriyofajlar ve biyofilm ilişkisiyle ilgili yapılan çalışmalar, bakteriyofajların enfekte olmuş biyofilm hücrelerini ve EPS tabakasını parçalayabildiğini göstermiştir [Doolittle et al., 1995]. Bakteriyel biyofilmler ile bakteriyofajlar arasındaki etkileşimi izlemek için floresan ve kromojenik probalar kullanılmaktadır [Hughes et al., 1998].
- Glukoz oksidazın biyofilm üzerinde diğer enzimlerle birlikte kullanıldığında etkili olduğu bildirilmiştir [Johansen et al., 1997]. Johansen ve arkadaşları tarafından



yapılan çalışmada polisakkarit hidroliz enziminin biyofilm tabakasını parçaladığı fakat önemli bir bakterisidal etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

- Lu ve diğerleri, biyofilm parçalayıcı enzimler ekleyerek yeni bakteriyofajlar tasarlamışlardır ve bu enzimtaik bakteriyofaj stratejisinin enzim etkinliği olmayan bakteriyofajlara göre daha çok biyofilm giderimi gerçekleştirdiğini göstermişlerdir [Lu and Collins, 2007].
- Bazı bakteriler *P. aeruginosa* de dahil olmak üzere önemli miktarda hücre dışı DNA (eDNA) salgılamaktadır. eDNA biyofilm stabilitesi için önemli bir işleve sahiptir. Yapılan çalışmalarda DNase I eklenmesi biyofilmin dağılmasına neden olduğu görülmüştür; DNase I uygulaması *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının akciğerde oluşturduğu kistik fibroz (CF) tedavisinde de kullanılmaktadır. eDNA keşfinin *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında biyofilmi azaltmak için yararlı olduğunu düşündürmektedir [Whitchurch et al., 2002].

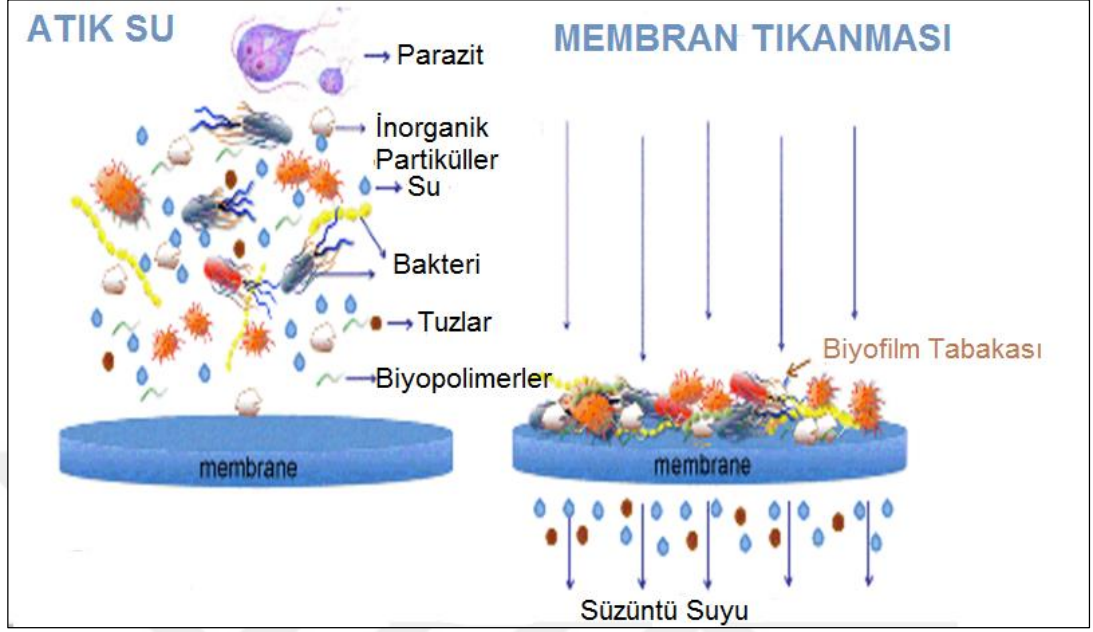
### 3. MEMBRAN BİYOREAKTÖRLER VE MEMBRAN KİRLENMELERİ

Biyofilm oluşumunun etkili olduğu teknolojilerden biri olan MBR teknolojisi aktif çamurdaki biyolojik parçalanma prosesi ile direk olarak katı-sıvı ayrımı işlemini membran filtrasyonu kullanarak birleştiren bir teknolojidir. Su arıtımı ve diğer ayırma proseslerinde yaygınlıkla tercih edilmektedir. MBR sistemi mikro veya ultrafiltrasyon membran teknolojilerinin kullanımıyla (por büyüklüğü 0.05-0.4 µm arasında değişen) bakteri floklarının ve tüm askıdaki katıların fiziksel olarak biyoreaktörde kalmasını sağlar. Bu yüzden MBR konvansiyonel arıtım sistemlerine kıyasla bir çok avantaja sahiptir. İlk MBR çamur bekleme sürelerinin (SRT) 100 gün kadar olduğu ve karışım sıvısındaki askıda katı miktarının (MLSS) 30 g/l olduğu koşullarda çalışırken, günümüzdeki uygulamalar daha düşük SRT (10-20 gün) ile daha kolay idare edilebilen bir MLSS (10-15 g/L) eldesi sağlar. Bu yeni işletim koşulları sayesinde MBR'lerdeki kirlenme problemi azalmaya başlamış ve membranın daha az temizlenmesi sayesinde sistemin bakımı kolaylaşmıştır.

Biyoreaktörde SRT (solid retention time, çamur bekleme süresi: F/M oranı) biyomas özelliğini değiştiren en önemli parametrelerden biridir, ve kirlenmeyi etkileyen en önemli parametredir. Yüksek SRT da çalıştırılması MLSS konsantrasyonunu artırır ancak bu her zaman membranın daha çabuk tıkanacağı anlamına gelmez. Tam tersine çok düşük SRT da çalışmak (2 gün gibi, F/M oranı 2.4 gKOİ/gMLVSS/gün, MLSS 7.8-6.9 g/l) membranı daha çabuk tıkayabilir. Dolayısıyla en uygun F/M oranını 0.5 olarak belirlenmiştir. Çok düşük SRT da membranın daha çabuk tıkanmasının sebebi ise düşük besin varlığında fazla EPS üretimine bağlanmıştır [Le-Clech et al., 2006].

Günümüzde daha sıkı atık kontrolü, membran fiyatlarındaki düşüş ve suyun tekrar kullanımına yönelik girişimler nedeniyle MBR belediye ve endüstriyel uygulamalarda atıksu arıtımı için yaygınlıkla kullanılmaktadırlar. Ancak membranın kirlenmesi (membrane fouling) (Şekil 3.1) MBR'lerin hızlı ticarileşmesinin önüne geçen bir engellerdir. Membran biyoreaktörlerdeki fouling problemi membranların porlarının tıkanması veya membran üzerinde çamur yığılmasından kaynaklanan akış azalması veya transmembran basıncının artmasına bağlanabilir. Kirlenmiş

membranların temizlenmesi veya değiştirilmesi işletim maliyetini yükselten bir faktördür.



Şekil 3.1: Membran Tıkanması.

Membranların kirlenme probleminin önüne geçmek için birçok yöntem denenmiştir. Düşük akışla işletim, membranın modifikasyonu, geri yıkama, kimyasal temizleme ve iri baloncuklu havalandırma bu yöntemler arasında sayılabilir. Ancak membran yüzeyindeki biofouling biyolojik sistemin doğası gereği kaçınılmazdır [Mafirad et al., 2011]. Tıkanmış membranların sık sık temizlenmesi ve değiştirilmesi proses maliyetinin yükselmesine neden olmaktadır. Membran kirlenmesinin önüne geçmek amacıyla şimdiye değin birçok çalışma yapılmıştır.

Lee and Yeon biyofilmin neden olduğu biyolojik kirlenmenin (biofouling) inhibisyonu için geliştirmiş oldukları tekniğin patentini almışlardır. Bu teknikte QS mekanizmasını bozan bir enzim taşıyan bir manyetik taşıyıcı ile reaktör enzim aktivite kaybı ve inaktivasyonu olmadan stabil bir şekilde işletilmiştir [Lee and Yeon, 2011].

### 3.1. Membran Kirlenmesinin Azaltılması

Membran kirlenmesinin önüne geçmek amacıyla farklı temizleme yöntemleri uygulanır, bunlardan en yaygın kullanılanlarından biri olan geri yıkama membranı geri dönüşümlü olarak tıkayan materyallerin temizlenmesi ve membranın rahatlatılması

için etkin bir yöntemdir. Ancak geri dönüşümsüz kirlenmeler oldukça geri yıkama yetersiz kalmaktadır. Membrana geri dönüşümsüz yapışan bu maddelerden kurtulmak amacıyla kimyasal ajanlarla günlük yıkama, kimyasal miktarının artırıldığı haftalık veya aylık yıkamalar yapılır. Organik maddeler için sodyum hipoklorit inorganikler için ise sitrik asit en yaygın kullanılan kimyasal temizleme ajanlarıdır. Membranın kirlenmesini önlemek veya azaltmak amacıyla değişik stratejiler uygulanmaktadır. Örneğin membranın yapısının kimyasal modifikasyonlarla değiştirilmesi ve membranın daha hidrofilik hale getirilmesi (oksijen veya nitrojen grupları eklenmesiyle) veya TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin eklenmesiyle filtrasyon yeterliliği artırılmış membranlar üretmek mümkün olmuştur (kirlenme nedeniyle gelişen akı düşüşü azaltılmıştır). Diğer çözümler ise havalandırmanın ve akış hızının ayarlanmasıdır. Bir çok MBR hızlı kirlenmeyi önlemek amacıyla düşük akış hızlarında çalıştırılmaktadır. Biyomas özelliği koagulant veya flokulant eklenerek değiştirilebilir. Alum, ferric klorid veya zeolit eklenerek flokların membrana yapışmaması sağlanabilir [Le-Clech et al., 2006].

### **3.2. Membran Kirlenmesini Geciktirmeye Yönelik Biyolojik Yöntemler**

Kullanılan geleneksel metodlar (örneğin yüzeyin modifikasyonu, işletim parametrelerinin kontrolü, düzenli fiziksel ve kimyasal yıkama gibi) fiziko-kimyasal prensiplere dayalıdır ve enerji isteyen işlemlerdir. Günümüzde mikrobiyel yapışmanın ve kirlenmenin engellenmesi amacıyla çeşitli biyolojik yöntemler de geliştirilmektedir. Xiong ve Liu (2010) derlemesinde bu biyolojik yöntemleri detaylı olarak açıklamıştır. Bu yöntemler QS mekanizmasının inhibisyonu, nitrik oksit kullanımı, EPS'nin enzimatik bozulması, bakteri hücre duvarının enzimatik olarak parçalanması ve bakterileri parçalayan bazı virüslerin kullanılmasına dayalı yöntemler şeklinde sıralanabilir [Xiong and Liu, 2010]. Bu biyolojik yöntemler arasında bu tez kapsamındaki uygulamaya en yakın yöntem bakteriyofaj kullanımıdır. Bakteriyofaj kullanımı Goldman tarafından 2009 yılında çalışılmıştır. Bu çalışmada steril edilmiş atıksu örneğine *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter johnsonii* ve *Bacillus subtilis* bakterileri tek başlarına veya kombine halde ekilmiştir. Bakteriyofaj varken ve yokken

yapılan ultrafiltrasyonda bakterileri parçalayan bakteriyofajların membran geçirgenliğini 2.5 kat arttırdığı saptanmıştır [Goldman et al., 2009]. Bakteriyofajların en önemli dezavantajlarından biri konakçılarının çok spesifik olmasıdır. Etkin bir lizis için birçok fajın üretilip ortama eklenmesi gerekmektedir.

Bakteriyofaj yerine *B. bacteriovorus* bakterisinin kullanımı daha avantajlı bir yöntem gibi görünmektedir. Çünkü bu bakteriler ölü bakterilerle bile beslenebilirler ve gram negatif çoğu bakteriyi parçalayabilirler. *B. bacteriovorus* bir çok gram negatif bakteriyi av olarak kullanabilmektedir. Ayrıca, bu avcı bakterinin av olarak seçtiği bakterilerin biyofilmdeki konsantrasyonlarının da azalmasını sağladığı görülmüştür [Dashiff et al., 2011].



## 4. BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS

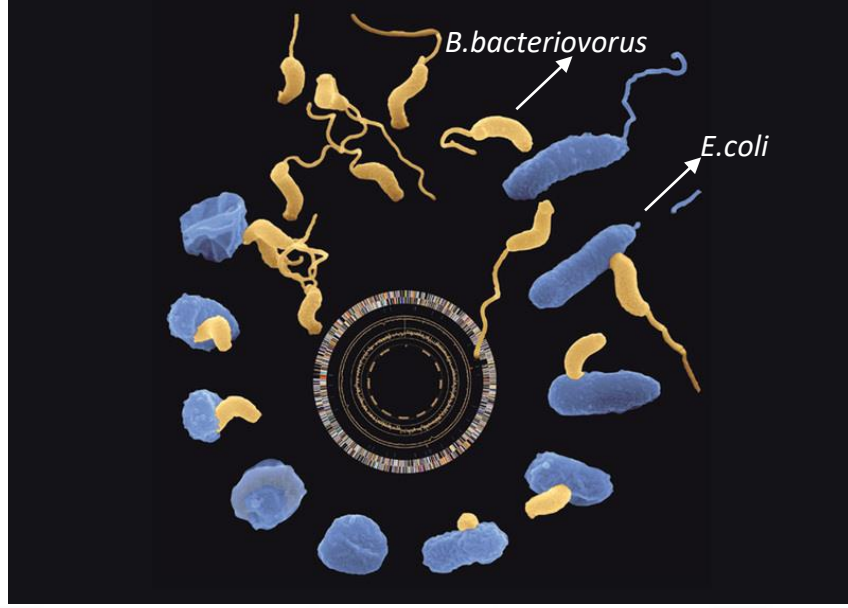
*B. bacteriovorus* 1962 yılında Stolp ve Petzhold tarafından keşfedilmiştir. Işık mikroskobu altında küçük, oldukça hareketli ve spiral şekilli hücreler gözlemlenmiştir [Stolp, 1973]. *B. bacteriovorus* gram negatif bakterilerle beslenen 0,2-0,5 µm X 0,5-2,5 µm boyutlarında Gram (-) küçük bir bakteridir [Ruby, 1992]. *B. bacteriovorus* mezofilik bir bakteridir. Optimum büyüme sıcaklığı 28°C-30°C'dir. Bazı deniz suşları 6°C'de ve 37°C üzerindeki sıcaklıklarda da büyüyebilir.

*B. bacteriovorus* avının periplazmasına girer ve avın bünyesinde bulunan metabolitleri besin maddesi olarak kullanarak çoğalırlar. Bu bakteriler büyük bir genomu sahiptirler (3,8 Mb); diğer bakterileri konakçı olarak kullanmalarına ve boyut olarak küçük olmalarına karşın başka parazitik bakteriler gibi genlerini kaybetmemişlerdir. *B. bacteriovorus* parazitik olmaktan çok avcı gibi davranır ve 15 dk içinde avını öldürür, uzun süre avın içinde yaşamını sürdürmez. Konakçıya bağımlı (HD:host dependent), ve bağımsız (HI: host independent) formları olabilir, özellikle zengin besin şartlarında HI formunda bulunabilirler.

*B. bacteriovorus* yaşam döngüsü iki fazlıdır. Serbest yüzme saldırı aşaması ve büyüme fazı olarak adlandırılmaktadır. Serbest yüzme saldırı aşamasında *B. bacteriovorus* etrafta Gram(-) bir bakteri bulmak için yüzer [Rittenberg and Hespell, 1975]. Doğru hedefle karşılaştığı zaman *B. bacteriovorus* av hücrelerine yapışır ve av hücre periplazmasının içinde çoğalmaya başlar. Av hücreleri ve içinde büyüyen *B. bacteriovorus* bdelloplastı oluşturur. *B. bacteriovorus* av hücrelerindeki besinleri kullanarak büyüme ve bölünmesini gerçekleştirir. Av hücrelerindeki besinlerin tükenmesi sonucunda bdelloplast parçalanır ve çoğalan yeni *B. bacteriovorus* yeni döngüler başlatmak üzere çevreye salınırlar [Vo, 2010a].

### 4.1. *B. bacteriovorus* Yaşam Döngüsü

*B. bacteriovorus*'un yaşam döngüsü (Şekil 4.1) iki fazdan oluşmaktadır. Bu fazlar; saldırı ve büyüme fazı olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 4.1: *B. bacteriovorus* Yaşam Döngüsü.

#### 4.1.1. Saldırı Fazı

Saldırı aşamasında *B. bacteriovorus* av belirlemek için etrafta yüzer. Thomashow ve Rittenberg, (1985) *B. bacteriovorus*' un komplike ve karakteristik bir flagellaya sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu flagellalar birçok proteinden meydana gelmektedir. Thomashow ve Rittenberg *B. bacteriovorus* flagellasının altı farklı flagella filament proteinine sahip olduğunu bulmuştur. Fakat sadece bir tane flagella tutunma, hareketlilik ve avlanma için gereklidir. Bu özellik *B. bacteriovorus* çok hızlı hareket etmesini ve gerektiğinde flagelladan vazgeçebilmesini sağlamaktadır [Lambert et al., 2006]. *B. bacteriovorus*'un bir hücreye yapıştığı avını tanımak için kısa bir süresi olduğu görülmektedir[Shilo, 1969]. *B. bacteriovorus* doğru hücreye bağlanmadığını (Gram pozitif bakteri) birkaç saniye içinde farkına varabilir. Hücre yüzeyinden ayrılır ve yüzerek ordan uzaklaşır. *B. bacteriovorus* Gram negatif bir bakteriyle karşılaştığında ise saldırı girişimine başlamaktadır. Bu süreç genellikle 5-10 dakika sürmektedir. *B. bacteriovorus*'un flagellası düştükten sonra penetrasyon kutubu üstünde ekspresyonu gerçekleşen pilus benzeri elyaf yapısı kullanarak hücre yüzeyine yapıştığı öne sürülmüştür.

*B. bacteriovorus* ve av hücrelerinin arasındaki çarpışma dış membranın düzleşmesi ile sonuçlanır. Avına sıkı bağlanması sonucunda av hücrelerinin hücre duvarı zayıflar. Osmotik kuvvetlere duyarlı olan duvar av hücresi içinde şişkin bir alan

oluşturur [Abram et al., 1974]. *B. bacteriovorus* av hücresi içine girdiğinde av hücre duvarındaki boşluk kapatılır. Bu noktadan sonra *B. bacteriovorus* büyüme fazına geçmeye hazırdır [Thomashow and Rittenberg, 1978].

#### 4.1.2. Büyüme Fazı

*B. bacteriovorus* periplazma içinde hücrelerinin çoğalmasını hazırlamak üzere büyüme fazının ilk 30 dakikasını kullanır. İlk yapılan çalışmalarda *B. bacteriovorus* av hücresinde membran ile hücre duvarı arasındaki tüm alanı kaplamasına gerek olmadığı belirtilmiştir [Scherff et al., 1966].

Avcı *B. bacteriovorus* peptidoglikan yapıdaki kimyasal modifikasyon sonucunda av hücrelerinde toplanmaya başlar. *B. bacteriovorus*'un av hücresi içindeki boyutu içinde bulunduğu yaşam döngüsünün evresine bağlıdır. Av hücresinin besinlerini tamamen kullanan *B. bacteriovorus* orijinal boyutuna en fazla 3-4 saatte ulaşır [Starr and Baigent, 1966]. Av hücresi içinde uzun süre kalırsa *B. bacteriovorus* daha fazla büyüebilmektedir. İstatiksel olarak tek bir *E. coli* av hücresinden 3-6 arasında *B. bacteriovorus* hücresi meydana gelmektedir. Daha büyük av hücrelerinden daha fazla *B. bacteriovorus* üretilir. Büyüme fazının 45. dakikasında *B. bacteriovorus* DNA replikasyonunu başlatır. *B. bacteriovorus* kendi biyosentezi ve üremesi için av hücresinin makromoleküllerini kullanır. Av hücresinin DNA'sını kesmek için endonükleaz ve egzonükleaz salgıdığını Martin ve Rittenberg (1972) gözlemlemiştir. *B. bacteriovorus* genom replikasyonu tamamlanana kadar av hücresinin deoksiribonükleotidleri *B. bacteriovorus* tarafından kendi DNA'sı içine dahil edilir. Bu noktada av hücresinin stoplazması çok dağınık ve ciddi bir şekilde hasar görmüştür. Av moleküllerinin bozulmasıyla birlikte, avcı hücre ATP sentezi, uzun lifli hücre üretimi ve hücrenin bölünmesiyle pek çok sayıda yeni hücre oluşumu aynı anda meydana gelmektedir. Oluşan yeni hücreler flagelları oluşana ve av hücresi içindeki tüm besinler tükenene kadar av hücresinde kalır. Son olarak bdelloplast parçalanır ve oluşan hücreler çevreye dağılır. Yeni hücreler serbest yüzme ve saldırı fazı haline geçerek yeni hedeflerini istila etmek için hazırdırlar [Varon and Shilo, 1968].



## 4.2. Konakçı-Bağımsız (HI: Host Independent) *B. bacteriovorus*

*B. bacteriovorus* konakçıya bağımlı (HD: host dependent) yaşam tarzı sergilemesine rağmen, konakçıya bağımsız (HI: host independent) yaşam tarzı da gösterebilmektedir. Konakçıya bağımlı *B. bacteriovorus* için yüksek av yoğunluğu gerektirirken konakçıya bağımsız *B. bacteriovorus* için ortamda yüksek besin miktarı gereklidir ve konakçıya bağımlı *B. bacteriovorus*' a göre on kat daha fazla büyüyebilir [Cotter and Thomashow, 1992].

*B. bacteriovorus* çoğunlukla avcı yaşam tarzına kilitli durumdadır ve HI fazında fazla bulunmaz [Sockett, 2008].

## 4.3. *B. bacteriovorus* Litik Enzimleri

*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 [Rittenberg and Hespell, 1975], [Ruby, 1992]. Modifikasyon ve saldırı istila edilen hücrenin şeklini ve diğer karakteristik özelliklerini değiştirir ve hücre yuvarlaklaşıp şişmeye başlar [Tudor et al., 1990]. *B. bacteriovorus* avın iç zarını da modifiye eder, böylece degradatif enzimlerin ve parçalanmış materyallerin av ve avcı sitoplazması arasındaki transferi sağlanır [Pritchard et al., 1975], [Rittenberg and Langley, 1975], [Saier, 1994], [Núñez et al., 2003]. *B. bacteriovorus*'un avını öldürmek için proteaz ve nukleaz gibi ekstraselüler enzimler salgıladıkları bilinmektedir [Saier, 1994]. Penetrasyon mekanizmasını detaylı inceleyen Burnham, Hashimoto ve Conti (1968), 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 tarafından 1977 yılında yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu parçalanmaya büyük ölçüde *B. bacteriovorus*'un salgıladığı enzimler sebep olmaktadır. Parçalanmayı

sitoplazmik hücre içeriğinin kaybı ve hücre duvarının çözünmesi takip etmektedir [Burnham et al., 1968].

Teropatik amaçla geliştirilen membranların antimikrobiyel ve enzimatik etkiye sahip olmaları istenen bir özelliktir. Bu tip materyallerin fabrikasyonu antimikrobiyel maddeler ve enzimlerin polimerin yapısına immobilizasyonu ile sağlanabilir. Ancak polimer sistemi ve immobilizasyon protokolu bu biyolojik aktiviteyi etki eden önemli bir parametredir. Yudonova et al., (2000) poröz yapıya sahip Proteaz C enzimi içeren polivinil alkol film membran geliştirmişlerdir. Biyolojik olarak aktif madde içeren film yüzeylerinin geliştirilmesi sırasında kullanılan maddelerin biyolojik aktiviteye zarar vermeyecek şekilde fabrikasyonunun çok önemli olduğuna da dikkat çekmişlerdir.



## 5. MATERYAL VE METOT

### 5.1. Kullanılan Mikroorganizmaların Üretimi

*E. coli* S17 ve *B. bacteriovorus* Nottingham Üniversitesi öğretim üyesi Liz Sockett'ten temin edilmiştir. *E.coli* S17, *B. bacteriovorus'* un üretimi için av bakterisi olarak kullanılmıştır. Hücreler Nutrient agar (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 (Nutrient Agar)'a ekildi. Daha sonra hücreler toplanarak HM tamponuna (10mM HEPES, 0,1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub> pH:7.2), OD<sub>600</sub> absorbans değeri 0.3-0.4 olacak şekilde eklenir. Önceden üretilmiş olan *B. bacteriovorus* hücreleri bu karışıma eklenir. Hücreler 29° C'de 180 rpmde çalkalanarak 2-3 gün inkübasyona bırakılır, absorbans değerindeki azalma (0.1-0.05 civarına düşüş) *B. bacteriovorus* hücrelerinin *E.coli* hücrelerini parçaladığını göstermiştir. Hazırlanan her yeni kültür ile birlikte bir kontrol kültürü de başlatılmıştır. Kontrol kültürüne aynı miktarda *E. coli* eklenir ancak *B. bacteriovorus* yerine aynı hacimde tampon eklenmiştir.

$$\left( \% B. bacteriovorus \text{ hücre parçalaması} \right) = \frac{\left( \text{kontrol} \right)_t - \left( B. bacteriovorus \text{ biyokütlesi} \right)_t}{\left( \text{kontrol} \right)_t} \times 100 \quad (5.1)$$

Burada t, zaman (gün); biyokütle ise kuru hücre ağırlığını (mg) ifade etmektedir.

### 5.2. Besiyeri Ve Ortam Koşullarının *B. bacteriovorus* Aktivitesine Etkisi

*B. bacteriovorus* aktivitesine etkisi olabilecek ortam koşulları aşağıdaki gibi belirlenip uygun deney setleri hazırlanmıştır.

- Av Hücre (*E.coli*) Konsantrasyonu; NA üzerindeki *E.coli* hücreleri toplanarak konsantrasyonları sırasıyla OD<sub>600</sub> 0.17, 0.50, 0.65, 0.76 olacak şekilde HM tamponunda çözdürülmüştür. Her bir konsantrasyon için aynı miktarda *B.*

*Bacteriovorus* aşısı olarak eklenmiştir. Her bir konsantrasyon için kontrol kültürü de başlatılmıştır. Hücreler 29° C'de 180 rpmde çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 3. günü ve 5. günün de OD<sub>600</sub> 'de absorbans değerleri okunup *B. bacteriovorus* aktivitesi hesaplanmıştır.

- Av Hücre (*E.coli*) Yaşı; Üretilen *E.coli* hücreleri 1 gün, 4 gün, 8 gün ve 20 gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra her bir petriden ayrı ayrı *E.coli* hücreleri toplanmıştır. OD<sub>600</sub>'de absorbansı 0,27 olacak şekilde HM tamponuna eklenmiştir. Her bir konsantrasyon için aynı *B. bacteriovorus* aşısı eklenmiştir. *B. bacteriovorus* aşısı kültürü 1/10 oranında eklenmiştir. Her bir konsantrasyon için kontrol kültürü de başlatılmıştır. Kontrollere *B. bacteriovorus* aşısı kültürü miktarı kadar HM tamponu eklenmiştir. Hücreler 29° C' de 180 rpmde çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 1, 2 ve 3. gününde OD<sub>600</sub> 'de absorbans değerleri okunup *B. bacteriovorus* aktivitesi hesaplanmıştır.
- *B. bacteriovorus* Hücre Yaşı; *E.coli* S17 hücreleri bir gün önceden NA'ya eklenmiştir. Hücreler petriden alınarak OD<sub>600</sub> 'de absorbansı 0,27 olacak şekilde HM tamponuna eklenmiştir. Bu şekilde yedi numune hazırlanmıştır. Altı tane numune farklı yaşlara sahip *B. bacteriovorus* aşısı kültürleri (3 saat, 1 gün, 2 gün, 8 gün, 15 gün, 35 gün) içermiştir. *B. bacteriovorus* aşısı kültürleri 1/10 oranında eklenmiştir. Kontrole *B. bacteriovorus* aşısı kültürü oranında HM tamponu eklenmiştir. Hücreler 29° C' de 180 rpmde çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 1, 2 ve 3. gününde spektrofotometrede OD<sub>600</sub> 'de absorbans değerleri okunup *B. bacteriovorus* aktivitesi hesaplanmıştır.
- Farklı Tamponlar; Av hücre (*E.coli*) konsantrasyonu OD<sub>600</sub> 0.26-0.28 arasında olacak şekilde Tris tamponu (0,05M 0,02M MgCl<sub>2</sub> 0,015M CaCl<sub>2</sub>), HM tamponu (0,01M 0,1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>), Pbs tamponu (0.01M 0,1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>) ve Nutrient Broth (NB) NB/10, NB/30, NB/50 (0,1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>) içine eklenmiştir. Kültür yaşı 3 gün olan *B. bacteriovorus* 1/10 oranı olacak şekilde eklenmiştir. Her biri için kontrol de başlatılmıştır. Kontroller *B. bacteriovorus* içermeyen ancak av bakterisi içeren tamponlardır. Kültürler 29° C' de 180 rpmde çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 1, 2 ve

3. gününde OD<sub>600</sub> 'de absorbands değerleri okunup *B. bacteriovorus* aktivitesi hesaplanmıştır.

- Farklı Mineral Konsantrasyonları; *B. bacteriovorus* üretiminde kullanılan HM tamponun içerdiği minerallerden MgCl<sub>2</sub> (0,1mM) konsantrasyonu sabit tutularak, CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonu sırasıyla 10mM, 5mM, 0,1mM, 0,01mM olacak şekilde tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Ayrıca CaCl<sub>2</sub> (1mM) konsantrasyonu sabit tutularak, MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu sırasıyla 1mM, 0,5mM, 0,1mM, 0,01mM, 0,001mM olacak şekilde tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Bu tamponlara av hücresi ve *B. bacteriovorus* gerekli oranlarda eklenmiş ve kültürler 29° C' de 180 rpmde çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 1, 2, 3 ve 4. gününde spektrofotometrede OD<sub>600</sub> 'de absorbands değerleri okunmuştur ve *B. bacteriovorus* aktivitesi hesaplanmıştır.
- Sıcaklık; 5.1 Kullanılan Mikroorganizmaların Üretimi başlığında verildiği gibi av hücre (*E.coli*) HM tamponuna eklenmiştir. 3 günlük *B. bacteriovorus* aşı kültüründen eklendikten sonra inkübasyon sıcaklığı sırasıyla 26°C, 29°C, 32°C, 35°C olacak şekilde ayarlanmıştır. İnkübasyonun 3 ve 5. gününde OD<sub>600</sub> 'de absorbands değerleri okunup *B. bacteriovorus* aktivitesi hesaplanmıştır.
- pH; *B. bacteriovorus* hücrelerinin üretiminde kullanılan HM tamponun pH'sı ilk önce 6.5, 7.2, 7.5, 8.0 olacak şekilde hazırlanmıştır ve av ve avcı bakteri ekimi yapıldıktan sonra inkübasyonun 1, 2, ve 3. günü OD<sub>600</sub> 'de absorbands değerleri okunup *B. bacteriovorus* aktivitesi hesaplanmıştır.
- *B. bacteriovorus* Aşısının Av Hücrelerinden (*E.Coli*) Temizlenmesi; *B. bacteriovorus* hücrelerini üretmek için kullanılan *B. bacteriovorus* aşı kültürü 0.45 µm, 1.2µm por çapına sahip filtrelerden geçirilmiştir. Bir gün önceden ekilen av hücresi (*E.coli*) konsantrasyonu OD<sub>600</sub> 0.27-0.28 olacak şekilde HM tamponuna eklenmiştir. *B. bacteriovorus* aşı kültürü olarak kültür yaşı 3 gün olan filtrelerden geçirdiğimiz kültürler ve filtreden geçirmediğimiz kültür eklenmiştir. İnkübasyonun 5. saati, 1., 2. ve 3. günü OD<sub>600</sub> 'de absorbands değerleri okunup *B. bacteriovorus* aktivitesi hesaplanmıştır.

Aşağıda besiyeri ve ortam koşulları deneyleri Tablo 5.1'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1: Besi yeri ve ortam koşullarının *B. bacteriovorus* aktivisine etkisini araştırmak için yapılan deneyler.

Deney seti	<i>E.coli</i> Konsantrasyonu (OD <sub>600</sub> )	<i>E.coli</i> yaşı (Gün)	<i>B.bacteriovorus</i> kültür yaşı (Gün)	Tampon	Mineral Konstrasyonu (mM)	Sıcaklık (°C)	pH	Filtrasyon
1.	0,17 0,50 0,65 0,76	1	3	HM	0,1 MgCl <sub>2</sub> 1 CaCl <sub>2</sub>	29	7,2	-
2.	0,26-0,30	1 4 8 20	3	HM	0,1 MgCl <sub>2</sub> 1 CaCl <sub>2</sub>	29	7,2	-
3.	0,26-0,30	1	3 saat 1 2 8 15 35	HM	0,1 MgCl <sub>2</sub> 1 CaCl <sub>2</sub>	29	7,2	-
4.	0,26-0,30	1	3	HM Tris Pbs NB/10 NB/30 NB/50	0,1 MgCl <sub>2</sub> 1 CaCl <sub>2</sub>	29	7,2	-
5.	0,26-0,30	1	3	HM	0,1 MgCl 10 CaCl <sub>2</sub> 5 CaCl <sub>2</sub> 0,1 CaCl <sub>2</sub> 0,01 CaCl <sub>2</sub>	29	7,2	-
6.	0,26-0,30	1	3	HM	1 CaCl <sub>2</sub> 0,5 MgCl <sub>2</sub> 0,1 MgCl <sub>2</sub> 0,01 MgCl <sub>2</sub> 0,001 MgCl <sub>2</sub>	29	7,2	-
7.	0,26-0,30	1	3	HM	0,1 MgCl <sub>2</sub> 1 CaCl <sub>2</sub>	26 29 32 35	7,2	-

Tablo 5.1: Devam.

8.	0,26-0,30	1	3	HM	0,1 MgCl <sub>2</sub> 1 CaCl <sub>2</sub>	29	6,5 7,2 7,5 8,0 8,6 8,8	-
9.	0,26-0,30	1	3	HM	0,1 MgCl <sub>2</sub> 1 CaCl <sub>2</sub>	29	7,2	- 1,2µm 0,45µm

### 5.3. *B. bacteriovorus* Hücrelerinin ve *B. bacteriovorus* Hücre Özütünün Biyofilm Giderimine Etkisi

Laboratuvarda stabil hale getirilmiş aktif çamur tankından alınan numune 5 dk bekletildikten sonra supernatant kısmı biyofilm oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. *E. coli* biyofilm oluşumu için 24 saatlik *E. coli* kültürü kullanılmıştır. Bu numunelerden 230µl alınarak 96 kuyucuklu polistiren plakalara eklenmiştir. Biyofilm oluşumu için (3 saat - 3 gün arasında değişen sürelerde) 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kuyucuklar su ile iki kez yıkandıktan sonra kalan biyofilm tabakanın üzerine *B. bacteriovorus* veya *B. bacteriovorus* hücre özütü eklenmiştir. Kontrol olarak ise HM tamponu eklenerek 30°C de değişik sürelerde bekletilmiştir. Bu şekilde bekletilen kuyucuklar önce çeşme suyuyla 2 kere yıkanmıştır, kurutulduktan sonra %1'lik kristal violet çözeltisi (1ml kristal violet, 99ml distile su) ile tekrar yıkanmıştır. 5 dakika kristal violette bekletildikten sonra kuyucuklar çeşme suyuyla 2 kere yıkanarak kurutulmuştur. İçine 70:30 etanol:aseton karışımı eklenmiştir. 20-30 dk beklendikten sonra 570 nm'de absorbans değerleri okunmuştur.

#### 5.3.1. *B. bacteriovorus* Hücre Özütünün Hazırlanması

*B. bacteriovorus* hücre kültürü 0.45 µm porlu steril filtreden geçirilip *E. coli* hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra 7000 rpm de 20 dk çöktürülmüştür. Pellette toplanan hücreler PBS tamponunda (pH: 7.2 1X NaCl 8g/L, KCl 0.2g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.44g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g/L) çözüldükten sonra homojenizatör aracılığıyla buzda tutularak parçalanmıştır. Parçalanmış hücre solusyonu 10000 rpm'de 10 dakika çöktürülerek hücre kalıntıları dibe çökmesi sağlanmıştır. Enzimlerce zengin süpernatant kısmı -30 °C'de saklanmıştır.

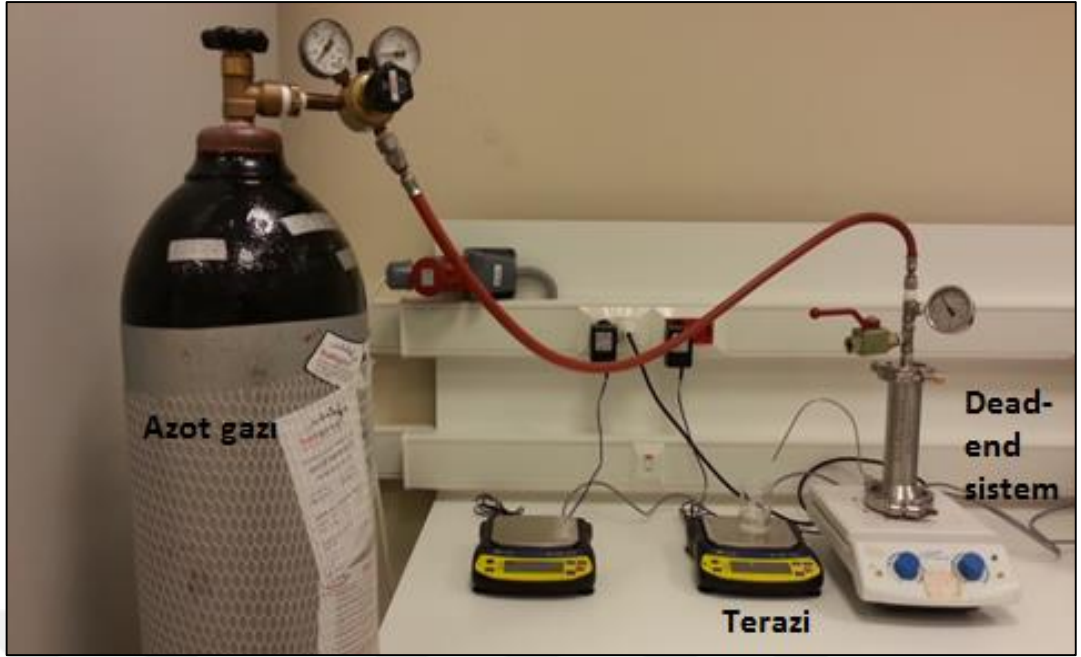
#### **5.4. *B. bacteriovorus*'un Biyofilm Oluşumunu Engelleme Etkisi**

Çamur beher içinde 5 dakika çökmesi beklenmiştir. Daha sonra üstteki supernatant alınmış ve 190µl supernatant, 40 µl *B.Bacteriovorus* hücre özütü birbirine karıştırılarak 96 kuyucuklu polisitren plakalara eklenmiştir. Deney 30°C ve 37°C 'de 3 saat inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir. 3 saat sonunda 2 kez çeşme suyuyla yıkanan plaklar kurutulduktan sonra plakalarda oluşan biyofilm %1'lik krsital violet ile 5 dakika boyanmıştır. 2 kez çeşme suyuyla yıkayıp fazla olan krsital violet ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Son olarak 70:30 etanol:aseton karışımı plakalara eklenip 30 dakika beklenmiştir. Spektrofotometrede OD<sub>570</sub> nm'de absorbans değerleri okunmuştur.

#### **5.5. *B. bacteriovorus* Hücre Öztünün Membran Kirlenmesini Giderme Etkisinin Dead End Sistemi Kullanılarak İncelenmesi**

Deneylerde Sterlitech Corporation dead-end membran sistem (model HP4750, USA) kullanılmıştır (Şekil 5.1). Tam karışimli hücrenin toplam hacmi 300 mL, kullanılabilen membran alanı ise 14,6 cm<sup>2</sup>'dir. Membran Dead-End hücrenin taş filtresi üzerine yerleştirilir. Hücreye basınç, regülatörlü hortumla bağlantı yapılarak sağlanır. Atıksuyu membrandan filtre etmek için kullanılan sürücü kuvvet 1.5 bar basınçtaki azot gazıdır.





Şekil 5.1: Sterlitech Dead-end sistem düzeneği.

Atık suyun homojenliğini Dead end hücresinde sağlayabilmek için hücre manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Filtrasyon süresince 500 rpm’de karıştırılmıştır. Filtrasyon sonunda süzüntü akısı aşağıda verilen denklem ile hesaplanmıştır.

$$J = V/A \times \Delta t \quad (5.2)$$

Burada V, belirli zaman periyodunda toplanan miktar (L);  $\Delta t$ , zaman (sa); A, kullanılan membran alanı ( $m^2$ ); J ise akı ( $L/m^2.sa$ ) değerlerini göstermektedir.

Dead-End hücresinde kullanılan membranın yüzeyinde oluşan kek tabakası sıyrılmıştır. Membran *B. bacteriovorus* hücre özütü ile oda sıcaklığında 100 rpm’de 3 saat boyunca inkübasyonda bırakılmıştır. Kontrol membranı olarak kullanılan ikinci membran ise aynı koşullarda saf suda inkübasyona bırakılmıştır.

Temizleme işlemi sonrasında membranlardan tekrar çamur filtrasyonu yapıp ve tekrar temizleme işlemi uygulanmıştır. Bu işlem toplam 3 filtrasyondan oluşmuştur.

## 5.6. Atıksu Beslenmesi

Atıksu arıtım tesisinden getirilen atık su atıksu özelliklerini stabil tutabilmek amacıyla çamur yaşı 10 gün olacak şekilde sentetik atık su ile her gün beslenmiştir. Sentetik atıksu; 650 mg/L glukoz, 50 mg/L pepton, 100 mg/L ure, 50 mg/L amonyum sulfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mg/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mg/L NaHCO<sub>3</sub>, 10 mg/L CaCl<sub>2</sub>, 50 mg/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 50 mg/L NaCl, 10 mg/L KCl, 0,1 mg/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 10 mg/L FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,25 mg/L ZnCl<sub>2</sub>, 0,45 mg/L CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 7 mg/L MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O içermektedir.

## 5.7. Atıksu Parametrelerinin Ölçümü

### 5.7.1. AKM Ölçümü

Uygun havalandırması yapılmış çamur homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Önceden desikatörde nemini almak için beklettiğimiz 0,45 po çapına sahip filtre kullanılarak 10 ml numune süzümüştür. Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ölçümü için süzüntü kullanılmıştır. Filtre kağıdı üzerinde kalan kalıntı 105 °C de 1 saat bekletilmiştir bu süre sonunda filtre kağıdı tartılmıştır. Tartım değerinden filtre kağıdının boş ağırlık değeri çıkartılarak AKM miktarı hesaplanmıştır. AKM hesabı eşitlik (5.3)'de gösterilmiştir.

$$\text{Hesaplama} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{son tartım} - \text{ilk tartım (mg)}}{\text{süzülen hacim (L)}} \quad (5.3)$$

### 5.7.2. KOİ Ölçümü

Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) tayini akm sonucu elde ettiğimiz süzüntü kullanılarak yapılmıştır. KOİ>400 olduğunu tahmin ettiğimiz numunelere muhakkak seyreltme yapılmıştır.

İki cam tüpe 2,5 mL numune (2x2,5mL), diğer ikisine 2,5 mL saf su (2x2.5mL) eklenmiştir. Tüplerin her birisine 1.5 mL parçalama çözeltisi (potasyum dikromat ), 3,5 mL sülfirik asit reaktifi eklenir ve kapakları sıkıca kapatılmıştır. Daha sonra tüpler 150 °C' de 2 saat termoreaktöre konulmuştur. İki saat sonra alınan numuneler oda

sıcaklığına soğutulmuştur. Tüpler titrasyonun kolay yapılması için cam beherlere boşaltılmıştır. İçerisine 0,10 mL (2 damla) ferroin indikatörü ilave edilmiştir. Standardize edilmiş 0.025 M demir amonyum sülfat (FAS) ile titre edilirken karıştırılmıştır. Mavi-yeşilden kırmızımsı kahveye döndüğü an eklenen FAS miktarı not edilir. KOİ hesaplaması eşitlik (5.4)'de gösterilmiştir.

$$\text{KOİ} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(A - B) \cdot M \cdot 8000}{\text{mL numune}} \quad (5.4)$$

Denklemden A, şahit için kullanılan FAS (mL); B, Numune için kullanılan FAS (mL); M, FAS' in molaritesi (0,025 M) ve 8000 ise oksijenin miliequivalent ağırlığı x 1000 mL/L olarak belirtilmiştir.

## **5.8. Çökeltide ve Süzüntüde Karbonhidrat ve Protein Tayini (EPS ve SMP Analizi)**

5 mL çamur numunesi alınmıştır, 4000 rpm'de 4 C°de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Üstte kalan sıvı ayrı bir tüpte SMP analizi için ayrılmıştır. Kalan çökelti saf suyla eski hacmine tamamlanıp ve vortex cihazı kullanılarak karıştırılmıştır ve üzerine % 37'lik formaldehit çözeltisi eklenmiştir. 1 saat 4 C°de bekletilir. 1 saatin sonunda 1N'lik 500 µL NaOH çözeltisi eklenmiştir ve 3 saat daha 4 C°de bekletilmiştir. 13200 rpm'de 4 C°de 20 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda üstte kalan sıvı EPS analizi için kullanılmıştır.

### **5.8.1. Protein Analizi**

UV cihazının sıfırlanması için 2 adet cam tüp içine 1'er mL saf su eklenmiştir ve sonraki adımlarda numunelere uygulanan bütün işlemler bu tüplere de uygulanmıştır. 2'şer adet cam tüpe 1'er mL SMP ve EPS numunelerinden konulmuştur. Her bir tüpe 1400 µL Lowry çözeltisi eklenmiştir. 20 dakika karanlıkta bekletilmiştir. 15. dakikada Folin karışımı hazırlanmaya başlanmıştır. 20. dakikanın sonunda her bir tüpe 200 µL Folin karışımından eklenmiştir. 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. 30 dakika sonunda UV cihazında 660 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Daha önce yapılmış olan

kalibrasyon grafiğindeki absorbans değerlerinden numunenin içinde bulunan protein miktarı tayin edilmiştir.

### **5.8.2. Karbonhidrat Analizi**

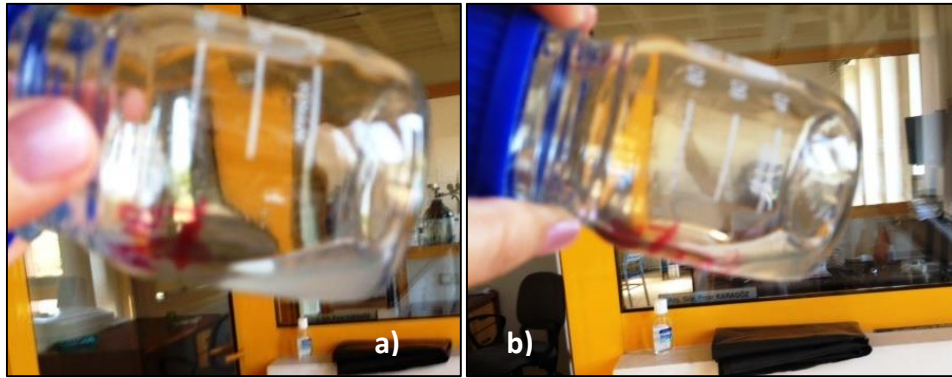
UV cihazının sıfırlanması için 2 adet cam tüp içine 1'er mL saf su eklenmiştir ve sonraki adımlarda numunelere uygulanan bütün işlemler bu tüplere de uygulanmıştır. 2'şer adet cam tüpe 1'er mL SMP ve EPS numunelerinden konulur. Her bir tüpe %80'lik Fenol zeltisi eklenmiştir. Daha sonra her bir tüpe derişik sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ) eklenir. 15 dakika bekletilmiştir. Son 5 dakikada soğuması için su dolu bir beherin içine konulmuştur. 15 dakika sonunda UV cihazında 490 nm'de absorbanları ölçülmüştür. Daha önce yapılmış olan kalibrasyon grafiğindeki absorbans değerlerinden numunenin içinde bulunan protein miktarı tayin edilmiştir.

## 6. BULGULAR VE TARTIŞMA

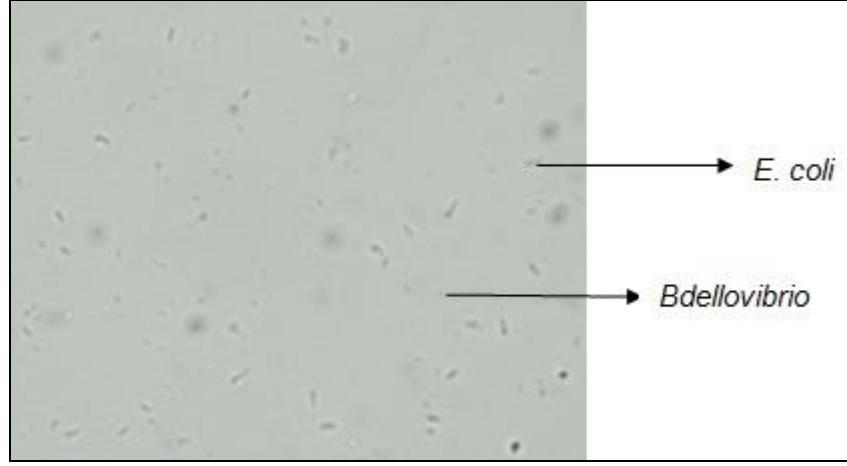
### 6.1. *B. bacteriovorus* Hücrelerinin Üretimi

*B. bacteriovorus* hücreleri *E. coli* S17 hücrelerinin bulunduğu besiyerine ekilerek 2-3 gün 29-30 °C'de 180 rpm çalkalama hızında inkübasyona bırakılmıştır. Öncelikle iki farklı besiyeri denenmiştir. İlki 1/10 seyreltilmiş nutrient broth (NB 0,8 g/L, pH:7.2, 0.002M CaCl<sub>2</sub>, 0.003M MgCl<sub>2</sub> ), ikincisi ise HM (10mM 0,1mM MgCl<sub>2</sub> , 1mM CaCl<sub>2</sub>) tamponudur. Kontrol (*B.bacteriovorus* hücresi içermeyen) Şekil 6.1.a)' da ve ortamdaki *E.coli* hücrelerinin *B. bacteriovorus* tarafından parçalanması sonucu kültürde oluşan şeffaflaşma Şekil 6.1.b)' de görülmektedir. Daha sonra bu kültür *B. bacteriovorus* içeren aşı kaynağı olarak kullanılmıştır. Işık mikroskopu ile yapılan incelemede *B. bacteriovorus* hücreleri boyut olarak *E.coli* hücrelerine kıyasla daha küçük, virgül şeklinde ve oldukça hareketli, hızlı yön değiştiren hücreler olarak gözlemlenmişlerdir (Şekil 6.2).

*B. bacteriovorus* aktivitesindeki artış membranların daha verimli temizlenmesini sağlayacağı için aktivite optimizasyonuna önem verilmiştir. Bu yüzden öncelikle *B. bacteriovorus* aktivitesinin optimizasyonu için sıcaklık, pH, aşı yaşı ve mineral konsantrasyonları gibi bazı parametrelerin etkisi incelenmiştir.



Şekil 6.1: *B. bacteriovorus*'un *E. coli* hücrelerini parçalaması a) *B. bacteriovorus* içermeyen (kontrol), b) *B. bacteriovorus* içeren *E. coli* kültürü.

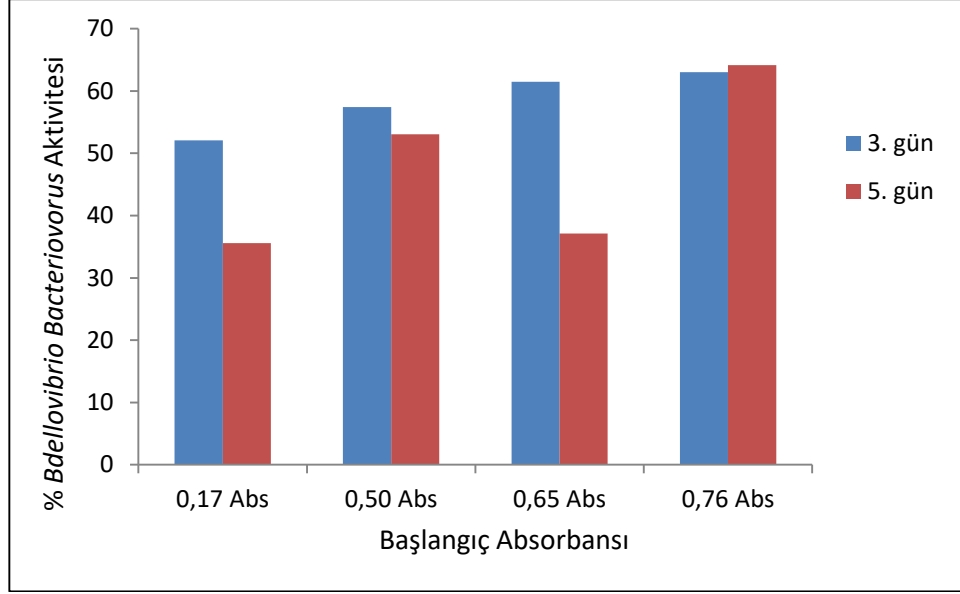


Şekil 6.2: *B. bacteriovorus* hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görünümü.

## 6.2. Besiyeri Ve Ortam Koşullarının *B. Bacteriovorus* Aktivitesine Etkisi

### 6.2.1. Av hücre (*E.coli*) Konsantrasyonu Etkisi

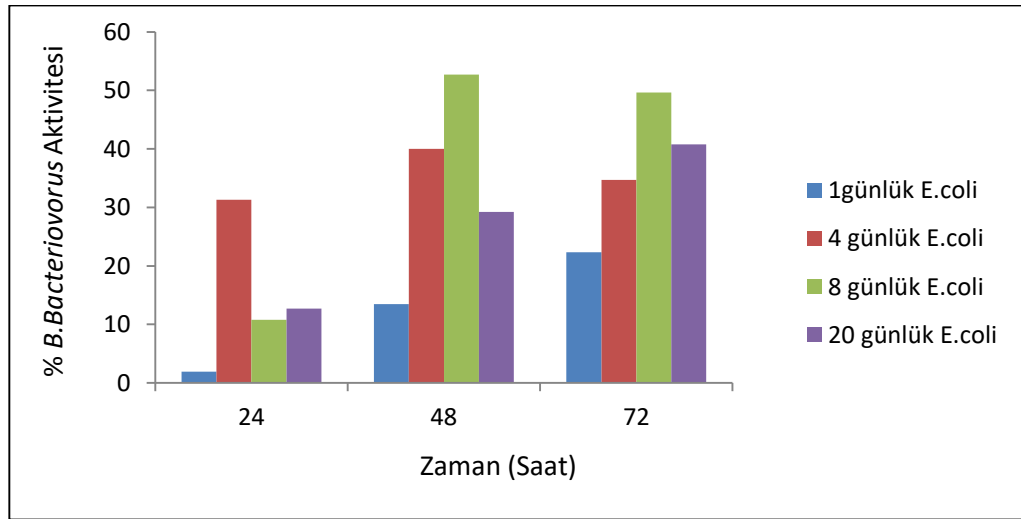
Başlangıçta eklenen *E. coli* hücre konsantrasyonunun *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisini görmek amacıyla 5 farklı türbiditeye sahip *E. coli* kültürü hazırlanmış ve *B. bacteriovorus* ekimi yapılmıştır (Şekil 6.3). *E. coli* yoğunluğu arttıkça *B. bacteriovorus* hücrelerinin *E. coli* hücrelerini parçalama aktivitesi de artmıştır. Her *E. coli* hücrelerini belirli sayıda *B. bacteriovorus* infekte edebildiği için bu sonuç beklenen bir sonuçtur. Ancak *B. bacteriovorus* aktivitesinin bir belirteçi olan şeffaflaşma çok yoğun *E. coli* kültürlerinde gözle anlaşılabilir değildir. Bu nedenle bundan sonraki deneylerde aşılama için 0.3-0.4 absorbans değerlerinde *E. coli* içeren HM tamponu kullanılmıştır.



Şekil 6.3: Av hücresi (*E.coli*) konsantrasyonunun *B.Bacteriovorus* aktivitesine etkisi.

### 6.2.2. Av Hücre (*E.coli*) Yaşı Etkisi

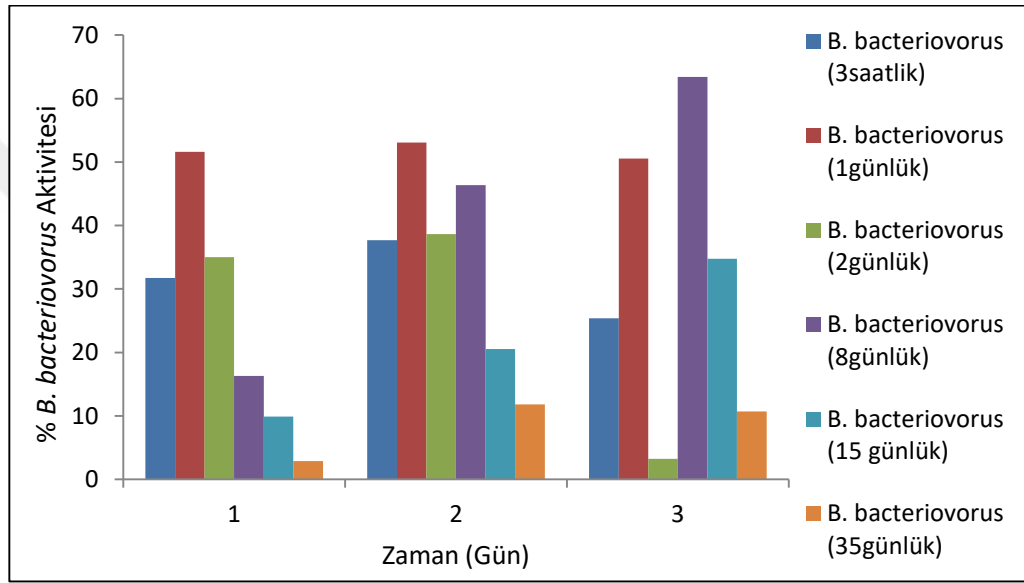
1, 4, 8 ve 20 gün önceden üretilmiş *E. coli* hücreleri *B. bacteriovorus* kültürüne av olarak eklenmiştir. *E. coli* hücrelerinin çok taze ve çok yaşlı olmasının aktiviteyi düşürdüğü, bir haftalık *E.coli* agar kültürünün (ekildikten sonra bir hafta oda sıcaklığında bekletilmiş *E. coli* agar kültürü) *B. bacteriovorus* tarafından daha kolay parçalanabildiği görülmüştür (Şekil 6.4). Yaşlı hücrelerin besin değerinin düşük olması çok genç hücrelerin ise yüzeylerindeki ekzopolisakkarit tabakanın daha aktif olması *B. bacteriovorus*'un bu hücreler üzerindeki aktivitesinin düşük olmasının nedeni olabilir.



Şekil 6.4: Av hücre(*E.coli*) yaşının *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisi.

### 6.2.3. *B. bacteriovorus* Aşı Yaşının Etkisi

*B. bacteriovorus* aşı yaşının çok yaşlı olmadığı sürece önemli olmadığı söylenebilir. Ancak 35 günlük kültürden yapılan aşılama da aktivite düşüktür. Kısa sürede yüksek aktivite elde etmek için 1-2 günlük *B. bacteriovorus* kültüründen ekim yapılması uygun görünmektedir. İnkübasyonun 3. gününde 8 günlük *B. bacteriovorus*'un aşı olarak kullanıldığı kültürde aktivite diğer aşı yaşlarına kıyasla daha yüksektir (Şekil 6.5).



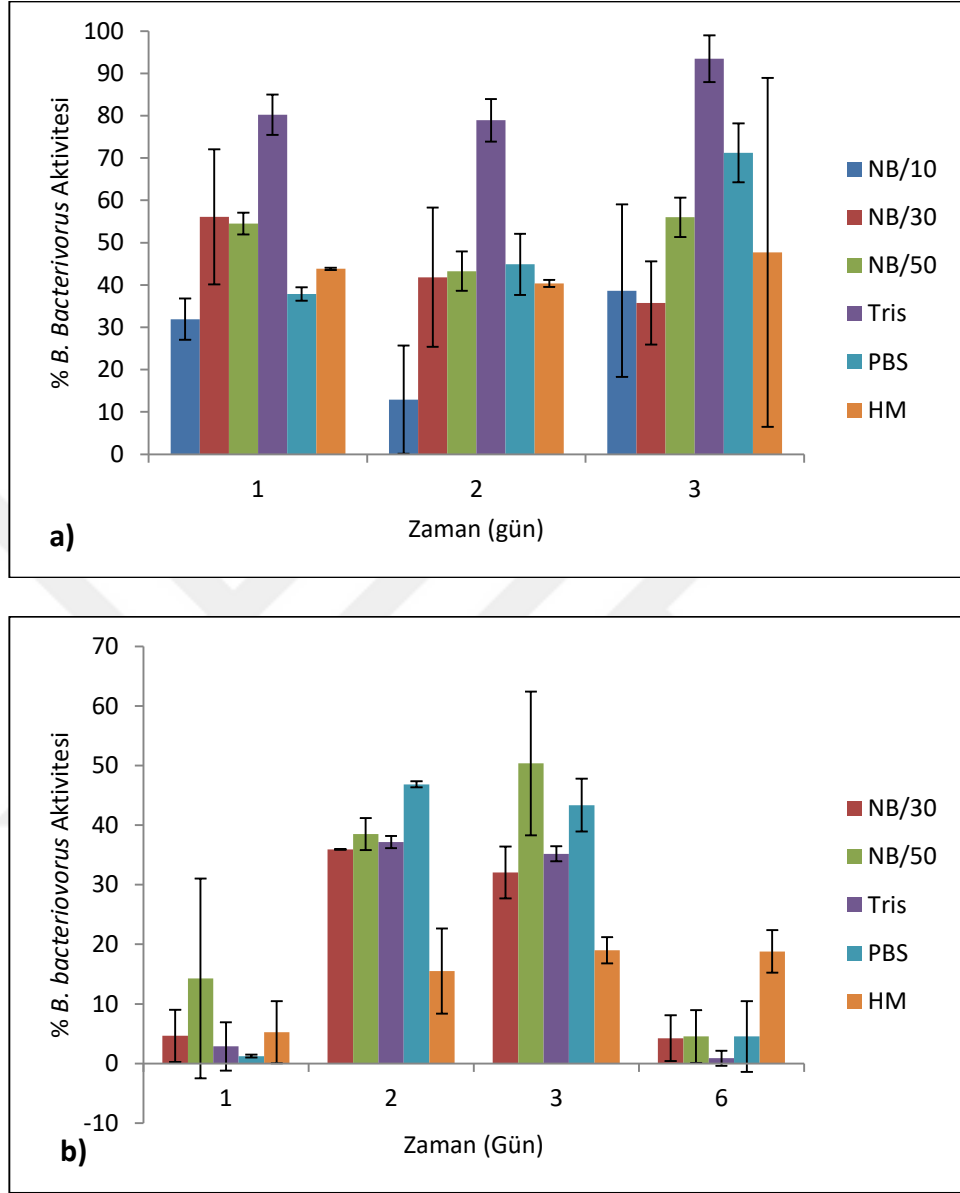
Şekil 6.5: *B. bacteriovorus* aşı yaşının *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisi.

### 6.2.4. Farklı Besiyeri Tamponlarının *B. bacteriovorus* Aktivitesine Etkisi

Farklı besiyeri tamponlarının aktivitesi kıyaslandığında ise Tris ve PBS tamponlarının inkübasyonun ilk üç gününde normalde kullanılan HM tamponundan daha elverişli olduğu görülmüştür. Bu deney dört kez (iki farklı deney ile) tekrarlanmıştır. İlk denemede Tris tamponunun çok iyi sonuçlar verdiğini tespit edilmiştir (Şekil 6.6.a) İkinci denemede ise PBS ve 1/50 NB ortamlarının da tris kadar elverişli olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak 6. günde HM tamponu hariç tüm besiyerlerinde aktivite düşmüştür (Şekil 6.6.b). Aktivitede görülen azalmanın nedeni avcı bakteri içermeyen kontrol besiyerinde de hücrelerin parçalanmaya başlaması ve bulanıklığın azalmasıdır (% aktivite hesapları her deneyin kontrolü referans alınarak



yapılmaktadır). Buna göre uzun inkübasyon sürelerinde *B. bacteriovorus* aktivitesinin belirlenebilmesi için HM tamponu daha elverişli bir ortam olduğu söylenebilir.

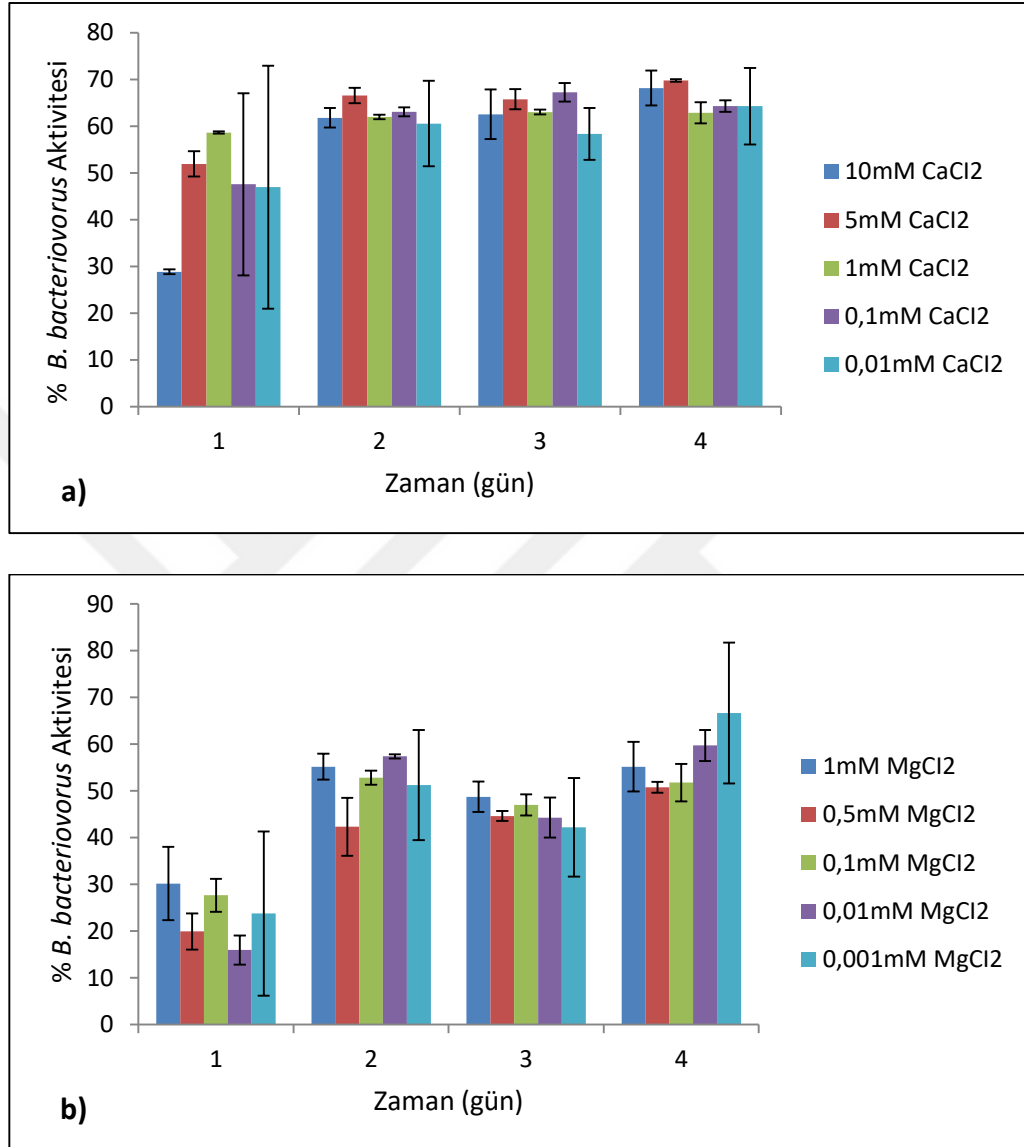


Şekil 6.6: Farklı tamponların *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisi a) 1-3 gün inkübasyon, b) 1-6 gün inkübasyon.

### 6.2.5. Mineral Konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus* Aktivitesine Etkisi

$\text{CaCl}_2$  ve  $\text{MgCl}_2$ 'nin HM tamponunda kullanılan konsantrasyonları sırasıyla 1 mM ve 0,1 mM'dir. Şekil 6.7.a)'da  $\text{MgCl}_2$ 'nin konsantrasyonu sabit tutularak farklı konsantrasyonlarda  $\text{CaCl}_2$  çözeltisi kullanılmıştır. Şekil 6.7.b)'de  $\text{CaCl}_2$ 'nin konsantrasyonu sabit tutularak farklı konsantrasyonlarda  $\text{MgCl}_2$  çözeltisi

kullanılmıştır. 5 mM CaCl<sub>2</sub>'nin aktivite için optimum olduğu, MgCl<sub>2</sub>'nin ise inkübasyonun ilk iki gününde yüksek konsantrasyonlarının daha etkili olduğu 4 günlük inkübasyonda ise 0,001 mM MgCl<sub>2</sub>'nin daha verimli aktivite sağladığı tespit edilmiştir.

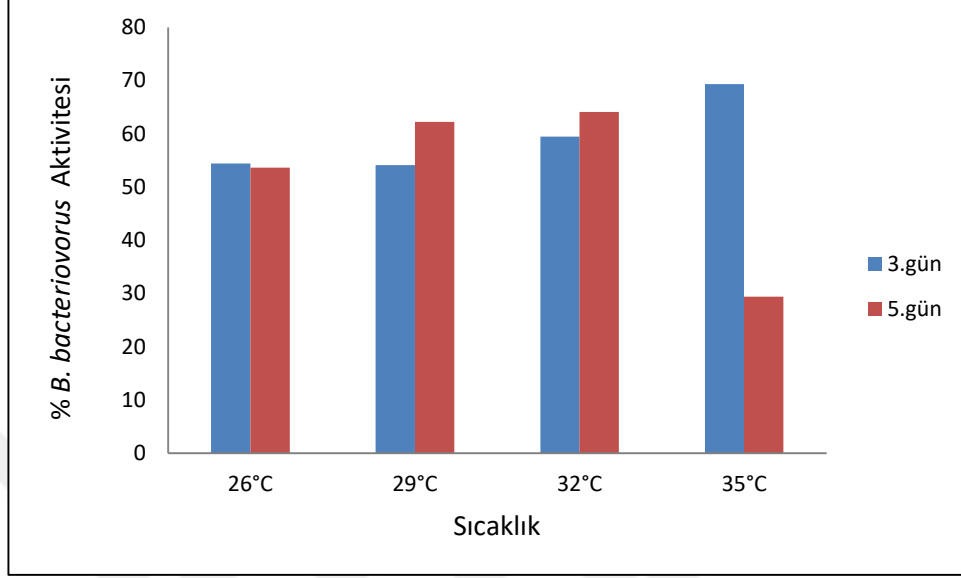


Şekil 6.7: HM tamponunda farklı CaCl<sub>2</sub> ve MgCl<sub>2</sub>'nin konsantrasyonlarının *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisi a) MgCl<sub>2</sub> (0,1mM) CaCl<sub>2</sub>'nin farklı konsantrasyonları, b) CaCl<sub>2</sub> (1mM) MgCl<sub>2</sub> farklı konsantrasyonları.

### 6.2.6. Sıcaklığın Etkisi

Farklı sıcaklıklarda üretilen *B. bacteriovorus* kültürlerinde 35°C de yapılan inkübasyonda diğer sıcaklıklara kıyasla az da olsa daha yüksek aktivite elde edilmiştir. Ancak inkübasyon süresi uzatıldığında yüksek sıcaklıkta *B. bacteriovorus* içermeyen *E.*

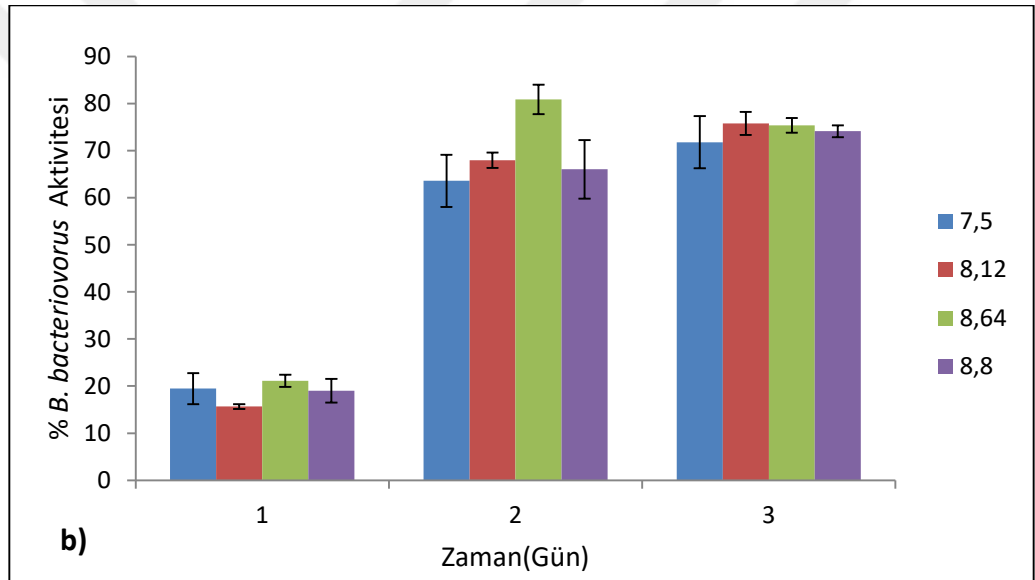
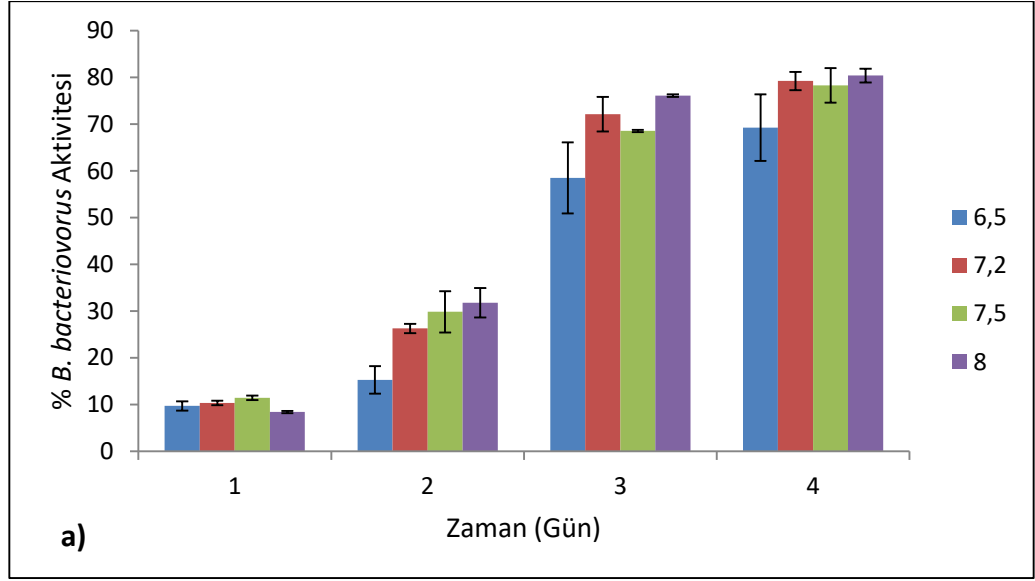
*coli* kültüründeki hücreler de parçalanmıştır ve bu absorbansın düşmesine neden olmuştur. Kontrole kıyasla hesaplanan % aktivitelere bakıldığında 35°C'de 5. gün aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 6.8).



Şekil 6.8: Sıcaklığın *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisi.

### 6.2.7. pH'ın Etkisi

pH 6,5-8,6 arasında farklı pHlara sahip kültürlerde *B. bacteriovorus'* un 8 üzerindeki pH değerinde daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 6.9.a), Şekil 6.9.b) 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 civarındır. Ancak *B. bacteriovorus'* un pH 8 civarında daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

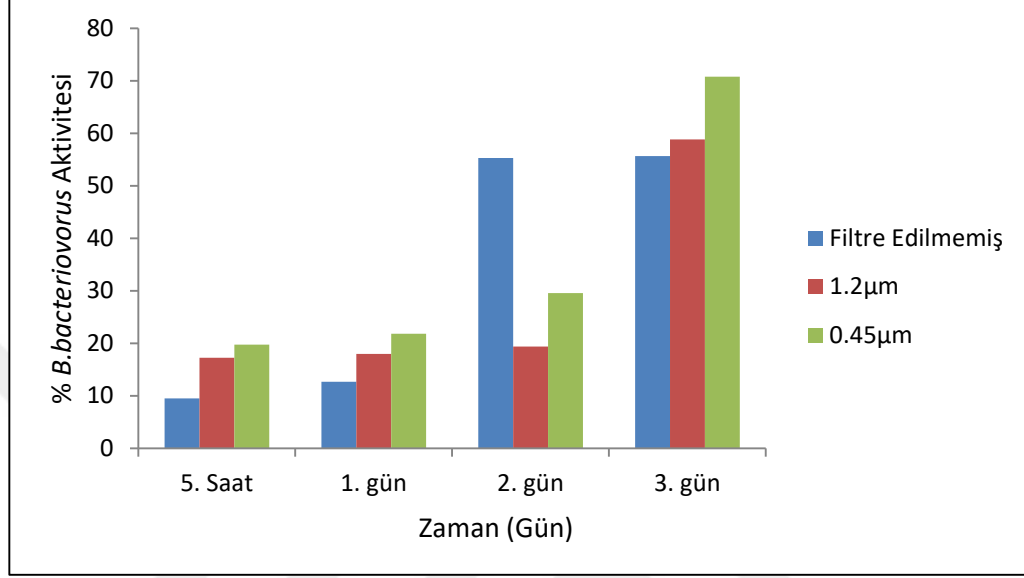


Şekil 6.9: pH'in *B. bacteriovorus* 'un aktivitesine etkisi a) 6,5-8 pH aralığı, b) 7,5-8,8 pH aralığı.

### 6.2.8. *B. bacteriovorus* Kültürünün Filtrasyonunun Etkisi

*B. bacteriovorus* kültüründe bulunan av bakteri kalıntıları aşı kalitesini düşürmekte ve aktivite hesaplanmasında yanlış sonuçlar alınmasına neden olabilmektedir. Kültür filtre edilerek kalan av hücrelerden temizlenmiş ve proseslerde bu şekilde kullanılmıştır. *B. bacteriovorus* kültürünün farklı por büyüklüğüne sahip filtrelerden geçirilmesi inkübasyon süresine bağlı olarak farklı sonuçlar doğurmaktadır. En yüksek aktiviteyi inkübasyonun üçüncü gününde 0.45 µm por büyüklüğüne sahip filtreden süzülen kültür göstermiştir (Şekil 6.10). Grafikte

gösterilen 0. 45  $\mu\text{m}$ , 1.2  $\mu\text{m}$  filtreden geçirilmiş *B. bacteriovorus* kültürü ve filtre edilmemiş *B. bacteriovorus* kültürünü ifade etmektedir). *B. bacteriovorus* aşısının süzülmesi *E. coli* hücre kalıntılarını ve kontaminasyonları elimine ettiği için daha yüksek aktivite göstermesine neden olmuş olabilir.



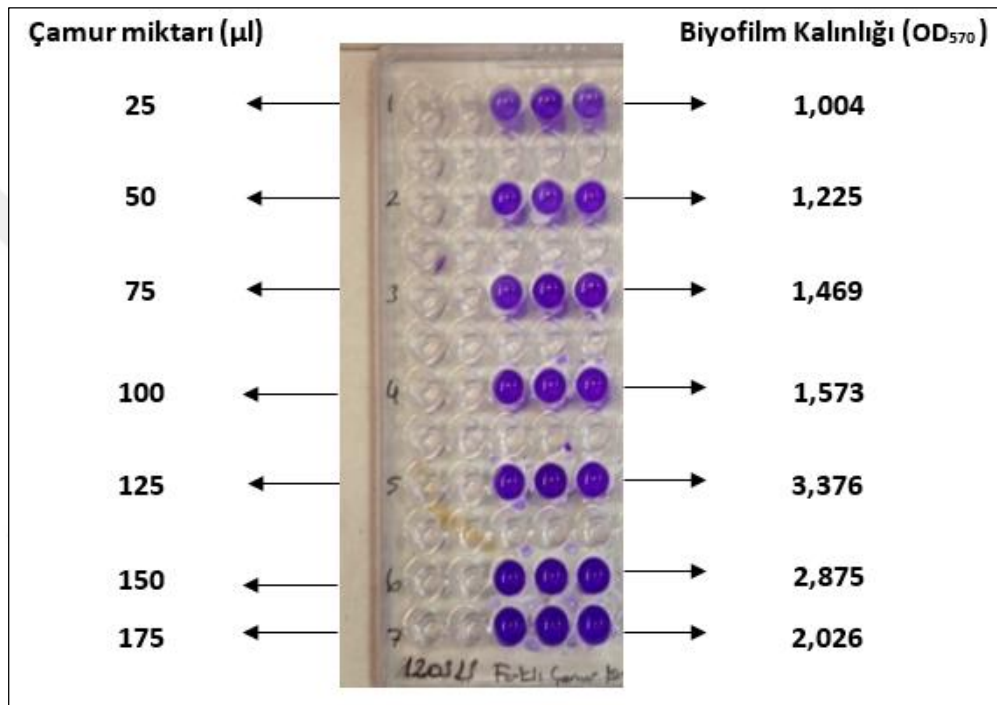
Şekil 6.10: *B. bacteriovorus* kültürünün filtrasyonunun *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisi.

### 6.3. *B. bacteriovorus* Hücrelerinin Biyofilm Giderimine Etkisi

*B. bacteriovorus*'un membran yüzeyinde etki gösterebilmesi için yüzeydeki biyofilm tabakayı temizleyebilmesi gerekmektedir. MBR çalışmalarına geçmeden önce *B. bacteriovorus* hücrelerinin bu aktiviteleri öncelikle cam lamlar veya polivinil plakalar kullanılarak gözlemlenmeye çalışılmıştır. Cam lamlarda biyofilm miktarı sağlıklı bir şekilde ölçülemez. Aynı anda birçok parametrenin etkisine bakılabilmesi ve aynı zamanda biyofilm kalınlığının sağlıklı belirlenebilmesi açısından 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. İlk biyofilm çalışmalarında polivinil plakalar kullanılmış ancak bu materyal ile alınan sonuçlarda tutarsızlıklar gözlemlenmiştir. Son olarak deneyler polistiren plakalar kullanılarak tekrar edilmiştir. Deneyler 30 °C' de gerçekleştirilmiştir. Bazı deneylerde kuyucuklara *B. bacteriovorus* ve çamur aynı anda eklenerek birkaç gün sonunda biyofilm oluşumuna bakılmış bazı deneylerde ise önce biyofilm oluşturulmuş daha sonra kuyucuklar yıkanarak *B. bacteriovorus* eklenmiş ve oluşan biyofilm tabakanın *B. bacteriovorus* tarafından giderimi ölçülmüştür. *B.*

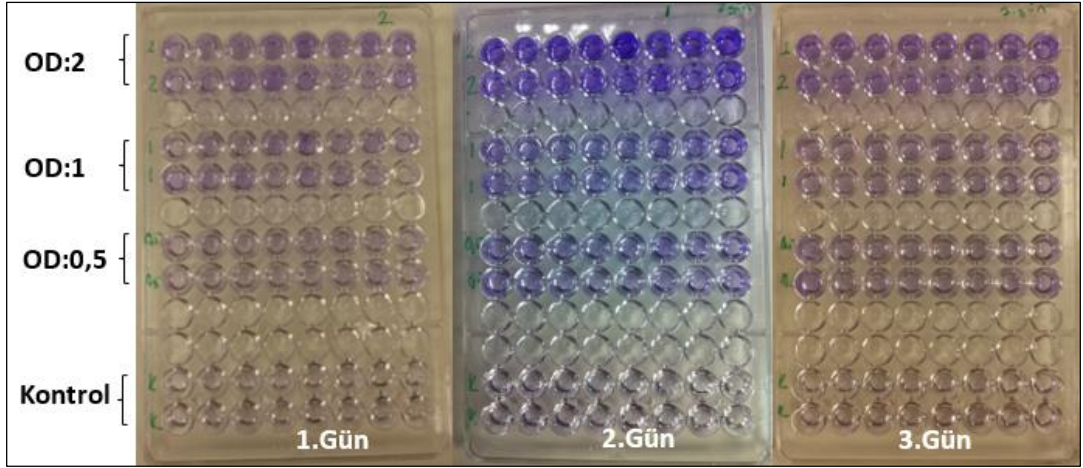
*bacteriovorus* kültürünün *E. coli* içerip içermemesi, süzülen *B. bacteriovorus* kültüründeki *B. bacteriovorus* hücre miktarı gibi parametreler kuyucuklarda oluşan biyofilm tabakanın kalınlığını etkilemektedir.

Öncelikle çamur miktarının biyofilm oluşumuna etkisine bakılmıştır. Kuyucuğa eklenen çamur yoğunluğu arttıkça oluşan biyofilmin kalınlığının da arttığı ve buna bağlı olarak da OD<sub>570</sub> nm’de okunan kristal violet renginin koyulaştığı görülmektedir. Şekil 6.11 ’da kuyucuklardaki renk farkı görülmektedir.



Şekil 6.11: Aktif çamur miktarının biyofilm oluşumuna etkisi.

*B. bacteriovorus*'un biyofilm çözme etkisi öncelikle *E. coli* kültürü kullanılarak test edilmiştir. Bu deneyde öncelikle *E. coli* sıvı besiyerinde üretilmiş ve hücreler yıkandıktan sonra HM tamponunda çözülmüş ve kuyucuklara eklenmiştir. Farklı sürelerde ve farklı *E. coli* yoğunlukları ile oluşan biyofilm miktarı Şekil 6.12’de görülmektedir. Bu deney sonuçları bize kullanılan plakalar ile sağlıklı biyofilm ölçümleri alınabileceğini göstermektedir.



Şekil 6.12: *E. coli*'nin yoğunluk ve inkübasyon süresinin biyofilm kalınlığına etkisi.

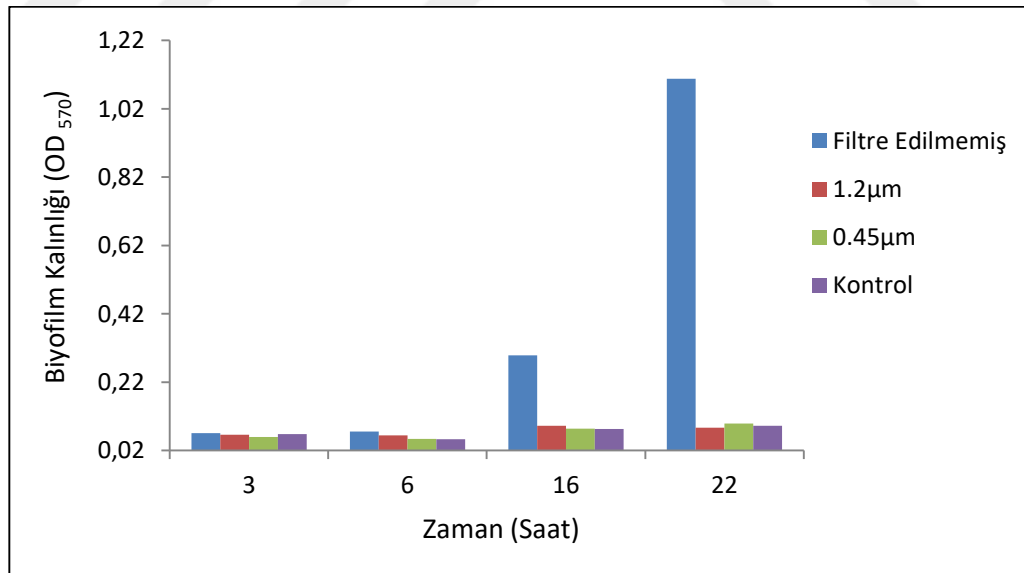
Tablo 6.1'de *E.coli* yoğunluğunun ve inkübasyon süresinin biyofilm kalınlığına olan etkisi spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri ile verilmiştir.

Tablo 6.1: *E.coli*'nin yoğunluk ve inkübasyon süresinin biyofilm kalınlığına etkisi.

Zaman (Gün)	<i>E.coli</i> (OD <sub>600</sub> :2) Biyofilm kalınlığı (OD <sub>570</sub> absorbans)	<i>E. coli</i> (OD <sub>600</sub> :1) Biyofilm kalınlığı (OD <sub>570</sub> absorbans)	<i>E. coli</i> (OD <sub>600</sub> :0.5) Biyofilm kalınlığı (OD <sub>570</sub> absorbans)	Kontrol Biyofilm kalınlığı (OD <sub>570</sub> absorbans)
1	0,245 ±0,006	0,189 ±0,0005	0,139 ±0,004	0,080 ±0,002
2	0,377 ±0,081	0,172 ± 0,001	0,148 ±0,0002	0,070 ±0,002
3	0,363±0,046	0,190 ±0,010	0,186 ±0,022	0,096 ±0,019

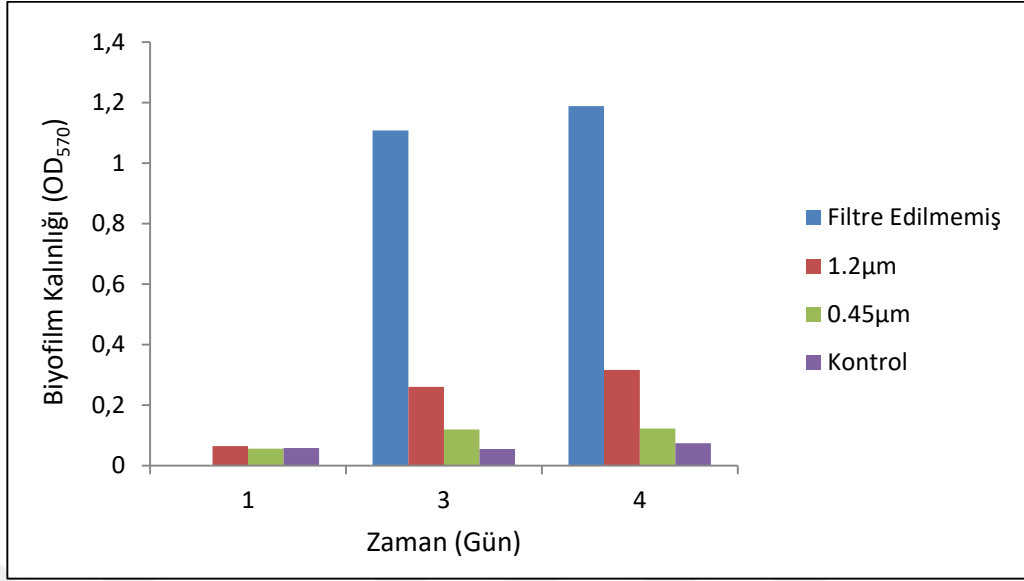
*B. bacteriovorus* varlığının biyofilm oluşumuna etkisini incelemek amacıyla farklı hacimlerde *B. bacteriovorus* kültürü ve aktif çamura karıştırılmış ve kuyucuklara eklenmiştir ve 5 gün sonunda oluşan biyofilm tabakanın yoğunluğu ölçülmüştür. Bu deney sonucunda *B. bacteriovorus*'un aktif çamura eklenmesinin biyofilm oluşumuna karşı bir etkisinin olmadığı görülmüştür. 5 gün inkübasyon süresinin biyofilm oluşumu için fazla olabileceği ve biyofilm tabaka kalınlaştığında *B. bacteriovorus* hücrelerinin etkisinin görülemiyor olabileceği düşünülerek sonraki deneylerde biyofilm oluşumu için 1 gün veya 3 saatlik inkübasyonlar yapılmıştır. Yapılan ön çalışmalarda ayrıca *B. bacteriovorus* kültürünün filtre edilmemesinin daha tutarlı sonuçlar alınması

açısından gerekli olduğu görülmüştür. Kültürde bulunan *E. coli* kalıntıları *B. bacteriovorus*' un aktivitesini maskeleyerek hatta kültür süzülmediğinde daha kalın bir biyofilm ile karşı karşıya kalınmaktadır. Bu çıkarımlara ilişkin deneyler 96 kuyucuklu plakalarda yapılan biyofilm deneylerinden elde edilmiştir. *B. bacteriovorus* hücrelerinin biyofilm oluşturup oluşturmadıkları 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak test edilmiştir. Aşağıdaki sonuçlara göre (Şekil 6.13 ve Şekil 6.14'de sunulan deneyler ayrı zamanlarda başlatıldığı için ayrı grafikler halinde verilmiştir.) *B. bacteriovorus* kültürü hiç filtre edilmeden kullanıldığında 16. saat ve 22. saat sonunda kalın bir biyofilm oluşturabilmektedir. 6. saatte bile kontrole kıyasla bir miktar biyofilm oluşumu gözlenmiştir. *B. bacteriovorus* kültüründe parçalanmış *E. coli* kalıntıları da olduğu için biyofilm oluşumu hızlı olmaktadır. Bu nedenle *B. bacteriovorus* kültürü filtre edilmeden membran temizlemek amacı için kullanılmamalıdır. 1.2 µm ve 0.45 µm por büyüklüğüne sahip filtrelerden süzülen kültür 16 ve 22. saatlerde kaydedeğer bir biyofilm oluşturmamıştır, ancak 2. ve 3. günlerde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Bu durumda membranların filtre edilmiş *B. bacteriovorus* kültüründe bile çok uzun süreler bekletilmemesi gerekmektedir.



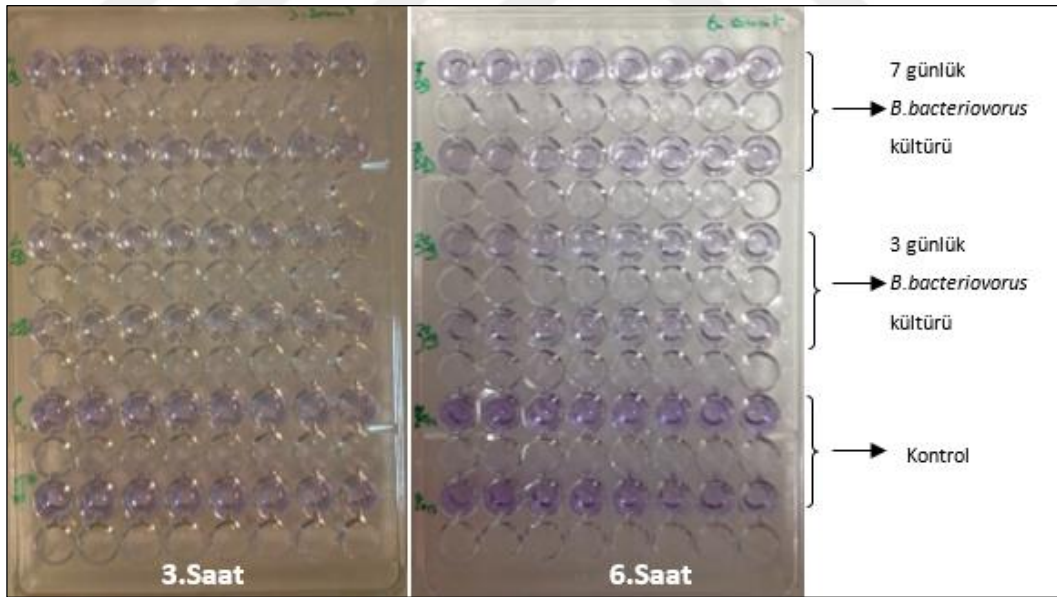
Şekil 6.13: *B. bacteriovorus*' un biyofilm oluşturma kapasitesi (3-22 saat).





Şekil 6.14: *B. bacteriovorus*' un biyofilm oluşturma kapasitesi (1-4 gün).

Şekil 6.15'da *E. coli* tarafından oluşturulan biyofilmin *B. bacteriovorus* ile ne derece giderildiği görülmektedir.



Şekil 6.15: *B. bacteriovorus* ile *E. coli* biyofilminin giderimi.

Bu deneyde *E. coli* OD<sub>600</sub>=0.5 yoğunlukta kullanılmış ve sadece 1 gün biyofilm oluşturulmuştur. Kuyucuklar yıkandıktan sonra kalan biyofilm tabakanın üzerine *B. bacteriovorus* eklenmiş ve 3 ve 6 saat beklendikten sonra biyofilm yoğunluğu ölçülmüştür. Şekilden de görüldüğü gibi son iki sıra (kontrol: tampon eklenmiş

kuyucuklar) daha koyu renk olmasına karşın *B. bacteriovorus* eklenmiş kuyucukların rengi daha açıktır ( $OD_{570}= 0,25$  civarı) . Özellikle 3. günlük yani daha taze *B. bacteriovorus* kullanıldığında sonuç daha başarılıdır;  $OD_{570}= 0,0695$  (Tablo 6.2).

Tablo 6.2: *B. bacteriovorus* ile *E. coli* biyofilminin giderimi.

İnkübasyon Süresi (Saat)	Biyofilm Miktarı ( $OD_{570}$ ) Kontrol	Biyofilm Miktarı ( $OD_{570}$ ) <i>B. b.</i> (3 günlük)	Biyofilm Miktarı ( $OD_{570}$ ) <i>B. b.</i> (7günlük)	% Biyofilm Miktarı <i>B. b.</i> (3günlük)	% Biyofilm Miktarı <i>B. b.</i> (7günlük)
3	0,254±0,210	0,0835±0,005	0,156±0,183	67.12	38.58
5	0,238±0,180	0,0695±0,008	0,081±0,141	70.80	65.60

*B. bacteriovorus*'un *E. coli* ve bazı patojenik bakterilerin oluşturduğu biyofilmi giderdiğine ilişkin literatürde bilgiler mevcuttur [Dashiff et al., 2011]. *B. bacteriovorus*'un atıksu arıtımında kullanılan aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm üzerindeki aktivitesi ilk kez bu tez çalışması kapsamında incelenmiştir. Avcı bakteri *B. bacteriovorus*'un çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm üzerinde de etkili olduğu 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak gösterilmiştir. Bu deneyde çamurdaki büyük partiküller 5 dakika beç üzerinde bekletilerek çöktürüldükten sonra çökmemiş mikroorganizmaları içeren sıvı kısım plakanın kuyucuklarına eklenmiştir. 1 gün inkübasyondan sonra kuyucuklarda oluşan biyofilm üzerine *B. bacteriovorus* solüsyonu eklenmiş ve 3 saat bekletilmiştir. Aşağıdaki tabloda (Tablo 6.3) *B. bacteriovorus* solüsyonunda bekleyen biyofilmin yoğunluğunun azaldığı görülmektedir, kontrol biyofilimde absorbands 0,742 iken *B. bacteriovorus* ile temizlenen biyofilimde yoğunluk daha düşüktür (0,577).

Tablo 6.3: *B. bacteriovorus*'un atıksu bakterileri tarafından oluşturulan biyofilmi giderme etkisi.

	Biyofilm Miktarı (OD <sub>570</sub> )	<i>B. bacteriovorus</i> tarafından biyofilm giderimi (%)
Kontrol	0,742	22.2
<i>B. bacteriovorus</i>	0,577	

Kuyucukların fotoğrafı Şekil 6.16 'da gösterilmiştir. *B. bacteriovorus*'un aktif çamur mikroorganizmaları tarafından oluşturulan biyofilm üzerindeki etkisi *E. coli* biyofilmi üzerindeki etkisine kıyasla daha düşüktür. Aktif çamurun kompleks yapısı, aktif çamurda bulunan mikroorganizmaların çeşitliliği ve salgıladıkları yapışkan maddeler ve çamur partikülleri biyofilmin yapısını etkilemektedir.



Şekil 6.16: *B. bacteriovorus*'un atıksu bakterileri tarafından oluşturulan biyofilmi giderme etkisi.

Atıksu yoğunluğunun, atıksudaki protein ve karbonhidrat miktarının biyofilm oluşumuna ve *B. bacteriovorus* aktivitesine etkisi aşağıdaki tablolarda görülmektedir. Tablo 6.4'te farklı tarihlerde reaktörden alınan atıksu numunelerinin özellikleri listelenmiştir. Atıksulardan birinin diğerine göre protein ve karbonhidrat EPS (ekstrahüresel polimerik maddeler) miktarının daha yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 6.4: Biyofilm oluşumunda kullanılan atıksuyun kimyasal özellikleri.

Atıksu EPS Yoğunluğu	AKM (mg/L)	KOİ (mg/L)	PROTEİN(mg/L)		K.HİDRAT(mg/L)	
			SMP	EPS	SMP	EPS
Yüksek	4590	60,4	4,5	168.6	4,12	178,65
Düşük	3960	97,6	13,26	82,18	7,3	136,9

Bu atıksular kullanılarak oluşturulan biyofilmlerin *B. bacteriovorus* ile giderimleri ise Tablo 6.5 ve Tablo 6.6'da verilmiştir.

Tablo 6.5: Yüksek EPS'ye sahip atıksu biyofilminin *B. bacteriovorus* ile giderimi.

Atıksu Bakterilerinin Yoğunluğu (OD <sub>600</sub> : 1)	Biyofilm Miktarı (OD <sub>570</sub> ) 30°C	Biyofilm Miktarı (OD <sub>570</sub> ) 37°C	<i>B. bacteriovorus</i> Aktivitesi (%) 30 °C	<i>B. bacteriovorus</i> Aktivitesi (%) 37 °C
1/10 seyreltilmiş	0,207	0,136	-0,48	24,02
1/10 Kontrol	0,206	0,179		
Seyreltilmemiş	1,321	1,101	8,9	8,4
Seyreltilmemiş Kontrol	1,450	1,202		

EPS miktarı yüksek olan atıksuyun daha fazla biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir (Tablo 6.5 ve Tablo 6.6). Bu atıksuyu 1/10 oranında seyreltilmesiyle oluşturulan biyofilmin *B. bacteriovorus* ile giderim veriminin ise 37 °C'de %24 olduğu görülmüştür (Tablo 6.5). EPS miktarı daha düşük ancak SMP (çözünür mikrobiyel maddeler) miktarı daha yüksek olan atıksu ile yapılan deneyde 30 °C'de *B. bacteriovorus*'nun seyreltilmemiş arık oluşturulan biyofilmi daha etkili temizlediği gözlemlenmiştir, aktivite %11 olarak hesaplanmıştır. Atıksu bakterileri tarafından oluşturulan biyofilm deneyleri 30 °C'de bir kaç kez tekrar edilmiş ve her deney sonucunda seyreltilmemiş atıksu bakterileri ile oluşturulan biyofilmin *B. bacteriovorus* tarafından daha başarılı şekilde temizlendiği görülmüştür. Atıksu seyreltilerek biyofilm oluşturulduğunda *B. bacteriovorus* aktivitesinin görülememesinin nedeni inkübasyon sırasında *B. bacteriovorus* tarafından da bir miktar biyofilm oluşması ve bu oluşan biyofilm tabakanın *B. bacteriovorus* biyofilm giderme kapasitesini maskeleyebilebilir.

Tablo 6.6: Düşük EPS'ye sahip atıksu biyofilminin *B. bacteriovorus* ile giderimi.

Aktif Çamur Bakterileri Yoğunluğu (OD <sub>600</sub> : 1)	Biyofilm Miktarı (OD <sub>570</sub> ) 30° C	Biyofilm Miktarı (OD <sub>570</sub> ) 37° C	<i>B. bacteriovorus</i> Aktivitesi (%) 30 °C	<i>B. bacteriovorus</i> Aktivitesi (%) 37 °C
1/40 seyreltilmiş	0,218	0,159	-0,13	-3,25
1/40 Kontrol	0,192	0,154		
1/20 seyreltilmiş	0,250	0,249	4,58	-5,50
1/20 Kontrol	0,262	0,236		
Seyreltilmemiş	0,841	0,819	11,75	0,72
Seyreltilmemiş Kontrol	0,953	0,825		

*B. bacteriovorus* hücrelerinin atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilm tabakayı giderme etkisine ilişkin deney tekrar edilmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 6.7). *B. bacteriovorus* 30° C'de daha yüksek aktivite göstermiştir ve seyreltilmemiş atıksu ile oluşturulan biyofilmi %18,24 oranında azaltmıştır.

Tablo 6.7: *B. bacteriovorus* tarafından atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilminin giderimi.

Atıksu Bakterilerinin Yoğunluğu (OD <sub>600</sub> : 1)	Biyofilm Miktarı (OD <sub>570</sub> ) 30° C	Biyofilm Miktarı (OD <sub>570</sub> ) 37° C	<i>B. bacteriovorus</i> Aktivitesi (%) 30 °C	<i>B. bacteriovorus</i> Aktivitesi (%) 37 °C
Seyreltilmemiş	0,807±0,03	0,885±0,01	18,24	6,45
Seyreltilmemiş Kontrol	0,987±0,04	0,946±0,02		
1/10 seyreltilmiş	0,227±0,02	0,233±0,01	8,47	10,73
1/10 seyreltilmiş Kontrol	0,248±0,02	0,261±0,03		
1/20 seyreltilmiş	0,189±0,03	0,224±0,01	9,13	-5,16
1/20 seyreltilmiş Kontrol	0,208±0,01	0,213±0,01		

Yapılan deneyler sonucunda *B. bacteriovorus*'un atıksu arıtımında oluşan biyofilm tabakayı temizleme potansiyelinin olduğu ancak bu aktivitesinin atıksuyun EPS miktarına bağlı olduğu görülmüştür.

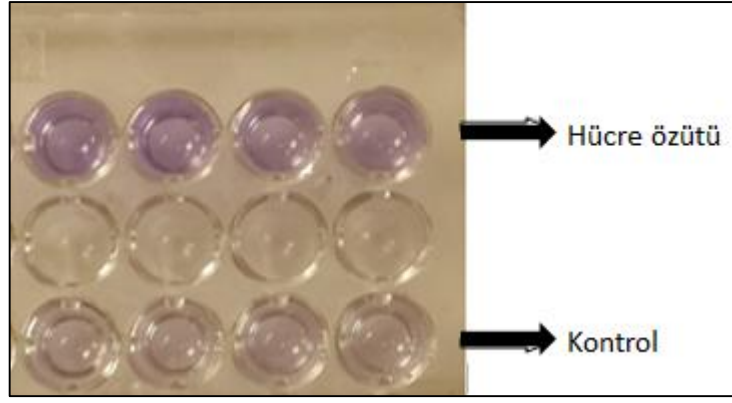
#### 6.4. *B. bacteriovorus* Hücre Özütünün Biyofilm Giderimine Etkisi

Hücre özütleri materyal ve metod kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Hücre özütü litik enzimler içerdiği için biyofilm gideriminde ve membran temizliğinde kullanılabileceği düşünülmüştür. Deney öncelikle 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiştir. Absorbansı 0.5 olan *E. coli* kültürü ile 1 gün boyunca biyofilm oluşturulmuş ve daha sonra kuyucuklara *B. bacteriovorus* hücre özütü eklenmiştir. 18 saat ve 24 saat süreli inkübasyondan sonra biyofilm kalınlığı ölçülmüştür (Tablo 6.8).

Şekil 6.17'de de görüldüğü gibi enzim ile temizlenmeye çalışılan kuyucuklarda oldukça kalın bir biyofilm tabaka oluştuğu görülmüştür. Bu deney sonucundan özütte bulunan proteinlerin biyofilm oluşumuna katkı yaptığı anlaşılmaktadır. Inkübasyon sürelerinin 3 ve 6 saate indirilmesi hücre özütünün oluşturduğu biyofilm tabakanın kalınlığını azaltmasına karşın biyofilm giderimi gözlenmemiştir.

Tablo 6.8: *B. bacteriovorus* hücre özütünün atıksu bakterileri tarafından oluşturulan biyofilm giderimine etkisi.

İnkübasyon süresi	Biyofilm Miktarı (OD <sub>570</sub> )	<i>B. bacteriovorus</i> Aktivitesi (%)
Hücre özütü (18 saat)	0,345	-205
Kontrol (18 saat)	0,113	
Hücre özütü (24 saat)	0,392	-168
Kontrol (24 saat)	0,146	



Şekil 6.17: *B. bacteriovorus* hücre özütünün aktif çamur bakterilerinin oluşturduğu biyofilm giderimine etkisi.

Oluşan biyofilmin hücre özütleri ile temizlenememesi üzerine hücre özütü biyofilm oluşumu sırasında ortama eklenmesinin etkisi araştırılmıştır. *E. coli* hücreleri biyofilm oluşturmak amacıyla kuyucuklara eklenirken *B. bacteriovorus* hücre özütleri de eklenmiştir. Farklı yaşlardaki *B. bacteriovorus* kültür özütü ile yapılan deneyde taze *B. bacteriovorus* kültüründen elde edilen enzimlerin daha yüksek aktivite gösterdiği görülmüştür.

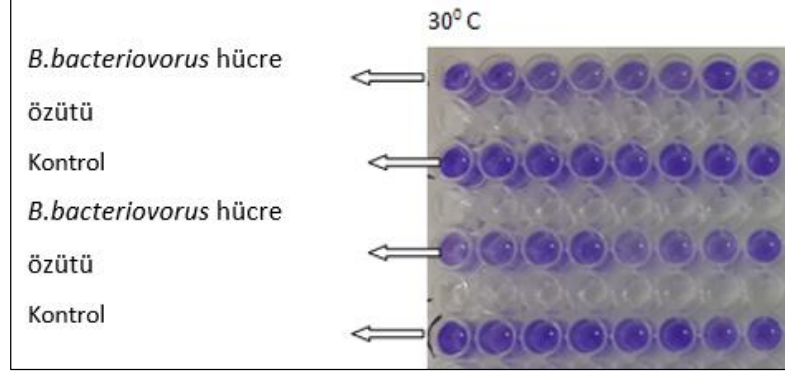
Tablo 6.9 ve Şekil 6.18'de *B. bacteriovorus* hücre özütünün 96 kuyucuklu plakalarda aktif çamur biyofilminin oluşumunu inhibe etme etkisi gösterilmiştir.

Tablo 6.9: *B. bacteriovorus* hücre özütünün atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilm oluşumunu engelleme etkisi.

	Biyofilm Miktarı (OD <sub>570</sub> ) 30°C	Biyofilm Miktarı (OD <sub>570</sub> ) 37°C	Inhibisyon etkisi (%) 30°C	Inhibisyon etkisi (%) 37°C
Seyreltilmemiş (190µl atıksu, 40µl <i>B.b.</i> hücre özütü)	0,894±0,130	0,853±0,121	39,34	32,36
Kontrol	1,474±0,065	1,261±0,078		

*B. bacteriovorus* hücre özütü litik enzimler de dahil olmak üzere farklı proteinler içermektedir. Bu enzim ve proteinler hücrelerin plakanın duvarlarına tutunmasına

engel olarak veya hücreleri parçalayarak biyofilm oluşumunu engelliyor olabilir. Ancak Tablo 6.8’de elde edilen sonuçlara bakıldığında hücre özütünün oluşmuş olan biyofilmin gideriminde etki göstermemiştir.

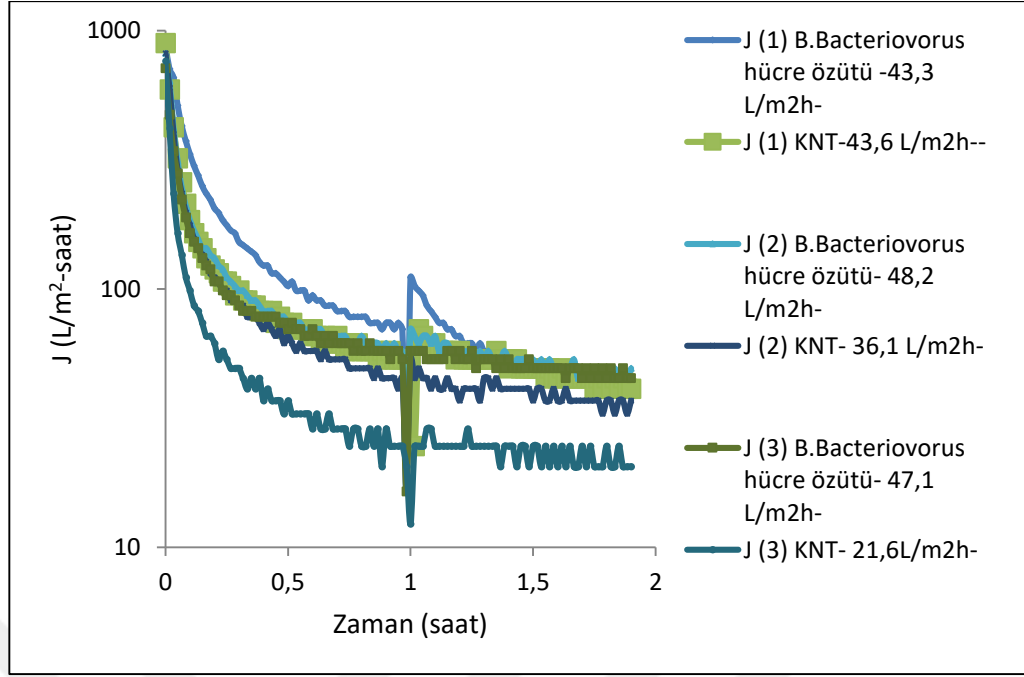


Şekil 6.18: *B. bacteriovorus* hücre özütünün atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilm oluşumunu engelleme etkisi.

## 6.5. *B. bacteriovorus* Hücre Özütünün Membran Filtrasyonu Üzerindeki Etkisi

Şekil 6.19’da MP005 membranı ile yapılan filtrasyon deneylerine ait akı değerleri görülmektedir. Tüm filtrasyonlarda *B. bacteriovorus* hücre özütü ile yıkanan membranda alınan kararlı akı değerlerinin kontrol membranından daha yüksek olduğu görülmektedir. Avcı bakteri *B. bacteriovorus* hücre özütü ile yapılan temizleme işlemi sonucunda membran yüzeyindeki bakteri tabakasında azalma sağlanmış ve bu da filtrasyonun verimini artırmıştır. Tampon ile 3 saat yıkanan kontrol membranında ortalama sabit akı  $33.76 \text{ L/m}^2.\text{h}$  olarak ölçülürken *B. bacteriovorus* hücre özütü ile temizlenen membranın ortalama sabit akısı ise  $46.2 \text{ L/m}^2.\text{h}$  olarak ölçülmüştür.





Şekil 6.19: *B. bacteriovorus* hücre özütünün membran filtrasyonuna etkisi.

*B. bacteriovorus* hücre özütünün biyofilm giderme etkisi bu tez çalışması kapsamında membran yüzeyinde de denemiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. 96 kuyucuklu plakalarda biyofilmin giderilememesine rağmen membran yüzeyinde hücre özütünün etki göstermesi biyofilmin kalınlığı, temizlenen yüzeyin genişliği veya plaka ve membranın kimyasal yapısının farklılığı ile açıklanabilir.

## 7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çeşitli yüzeylerde bakterilerin oluşturduğu biyofilm çoğu zaman problemlere 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 halen gelişme aşamasında sayılabilir. Bakteriyel biyofilm tabakanın temizlenmesinde QS mekanizmasının engellenmesi, çeşitli litik enzimlerin kullanımı yoğunlukla çalışılan konular arasındadır.

Bu tez çalışmasında Gram negatif bakterileri besin olarak kulalnan avcı bir bakteri türü olan *B. bacteriovorus*'un atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilm tabakayı temizleme potansiyeli araştırılmıştır. Avcı bir bakteri türü olan *B.bacteriovorus* Gram (-) bakteriler ile beslenerek hayatını sürdürür. Bakteriyel popülasyonu dengede tuttuğundan çevre açısından önemli bir bakteridir. *B.bacteriovorus*'un parçalama aktivitesinin patojenik gram (-) bakteriler üzerinde etkili olduğu yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur [Dashiff et al., 2011]. Bu tez kapsamında ilk önce *B.bacteriovorus*'un çoğalması için gerekli optimum koşullar araştırılmıştır. *B.bacteriovorus* üretimi için kullanılan besiyerleri genellikle Nunez ve arkadaşlarının 2003 yılında yapmış olduğu çalışmada tespit edildiği şekilde uygulanmaktadır [Núñez et al., 2003]. Bu tez çalışmasında, sıcaklık, pH, mineral konsantrasyonu, farklı tamponların etkisi test edilmiş ve 35° C'nin, 8 -8.5 arası pH değerinin yüksek aktivite sağladığı görülmüştür. *B. bacteriovorus*'un *E.coli*'nin oluşturduğu biyofilmi giderimi incelenmiştir. Biyofilm giderimi % 67 olarak bulunmuştur. 2010 yılında yapmış olduğu tezinde Phuong Binh Vo *B.bacteriovorus*' un biyofilm oluşumuna etkisini iki farklı hücre ile denemiştir. *B.bacteriovorus*' un *E. coli* hücrelerinin biyofilm oluşturmasını engellediğini, *M. luteus* (gram pozitif) hücrelerinin ise biyofilme tutunmalarına engel olduğunu gözlemlemiştir. Atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilmin *B. bacteriovorus* tarafından giderimine ilişkin deneyler bu tez çalışmasının özgün yönü olarak görülebilecek deneylerdir. 96 kuyucuklu plakalarda atık su kullanılarak oluşturulan biyofilm giderimine bakıldığında *B. bacteriovorus* kültürünün biyofilmi %22 oranında giderdiği gözlemlenmiştir. *B. bacteriovorus* hücre özütü ise atıksu bakteri kültürüne karıştırıldığında biyofilm

oluşumunu % 39 oranında engellemiştir. *B. bacteriovorus*' un dişlerde periodontitis hastalığına neden olan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*'ı parçaladığı ve oluşturduğu biyofilm tabakayı bozduğu daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [Van Essche et al., 2009]. *Alcaligenes*, *Campylobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Shigella* türleri ve *Helicobacter pylori* bakterisinin *Bdellovibrio* tarafından parçalandığı Markelova (2010) tarafından gösterilmiştir. Bu konuda birçok çalışması bulunan Markelova bu bakterinin biyokontrol ajanı olarak kullanım potansiyeli üzerinde durmuştur [Markelova, 2010].

MBR sistemleri bakteri floklarını ve askıda kalan maddeleri fiziksel olarak tümüyle tuttuğundan konvansiyonel arıtıma göre daha avantajlıdır. Ancak MBR kirlenmesi (membrane fouling) bu sistemin ticarileşmesine bir engel teşkil etmektedir. 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. Günümüzde mikrobiyel yapışmanın ve kirlenmenin engellenmesi amacıyla çeşitli biyolojik yöntemler de geliştirilmektedir. Bu yöntemler QS mekanizmasının inhibisyonu, nitrik oksit kullanımı, EPS'nin (ekstaselül polimerik maddeler) enzimatik bozulması, bakteri hücre duvarının enzimatik olarak parçalanması ve bakterileri parçalayan bazı virüslerin kullanılmasına dayalı yöntemler şeklinde sıralanabilir [Xiong and Liu, 2010]. Bu çalışmada da MBR sisteminde oluşan kirlenme problemini biyolojik bir yöntemle gidermek için *B.bacteriovorus* kullanılmıştır.

Literatür araştırıldığında membran yüzeyinde tıkanmalara sebep olan biyofilmi *B. bacteriovorus* ile giderilebilme potansiyeli ile ilgili tek bir çalışma göze 2013 yılında Kim ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada membrandan sadece *E. coli* hücre solusyonu geçirilmiş ve *B. bactreriovorus* ihtiva eden *E. coli* soluyonunun membrandan daha yüksek hızla membrandan geçtiğini gözlemlemiştir. MBR sistemlerinde membran performansını arttırmak için *B. bacteriovorus*'un kullanılabilirliğini rapor etmişlerdir [Kim et al., 2013]. Bu tez de yapılmış olan çalışmalara benzer diğer bir çalışma ise Goldman ve arkadaşları tarafından bakteriyofajlar kullanılarak yapılmıştır. Yapılan çalışmada steril edilmiş atıksuya

aşılmiş *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter johnsonii* ve *Bacillus subtilis* üzerinde bakteriyofajların parçalayıcı etkisi araştırılmıştır. Bakteriyofaj varlığında akıda %40 oranında bir performans artışı gözlemlenmiştir [Goldman et al., 2009]. *B. bacteriovorus* yaygın bir konakçı listesine sahip olması nedeniyle bakteriyofaj kullanımına göre kıyasla daha avantajlı sayılabilir. 2015 yılında Şengezer Ç. tarafından yapılan çalışmada *B. bacteriovorus* ile temizlenen MP005 ve UO150 mikro ve ultrafiltrasyon membranlarının akısında kontrol membranına kıyasla sırasıyla 3,2 L/m<sup>2</sup>.h (LMH) ve 6,5 LMH'lık bir iyileşme olduğu görülmüştür. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen Şengezer'e ait tez çalışması kapsamında Goldman ve arkadaşlarının yapmış olduğu %40'lık performansa erişilememiştir. Bu beklenen bir sonuçtur çünkü birkaç bakteri türü değil çok sayıda mikroorganizma içeren gerçek atıksu kullanılmıştır. Filtre edilen atıksuyun membran yüzeyinde oluşturduğu biyofilm daha sıkışık ve çok sayıda farklı tür tarafından oluşturulmuştur [Şengezer, 2015].

Bu tez kapsamında atıksu arıtımı sırasında MP005 membran yüzeyinde oluşan biyofilm tabaka *B.bacteriovorus* hücre özütü kullanılarak temizlenmiş ve %36.8 akıda iyileşme görülmüştür.

Yapılan bu çalışmalarda alınan sonuçlar *B.bacteriovorus*'un atıksu bakterilerinin oluşturduğu biyofilmi giderme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan *B.bacteriovorus*'un konsantrasyonu 10<sup>5</sup> pfu/ml'dir *B.bacteriovorus* hücre konsantrasyonunun artırılması biyofilm giderimi aktivitesini de arttıracakı düşünülmektedir. *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 bakterinin etkisi her geçen gün azalan antibiyotiklerin yerine kullanılabilecek doğal bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

Abram D., e Melo J. C., Chou D., (1974), "Penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into host cells", *Journal of Bacteriology*, 118 (2), 663-680.

Allison D. G., (2003), "The biofilm matrix", *Biofouling*, 19 (2), 139-150.

Armstrong M. W., Gallego S., Chesters S. P., (2009), "Cleaning clay from fouled membranes", *Desalination and Water Treatment*, 10 (1-3), 108-114.

Borucki M. K., Peppin J. D., White D., Loge F., Call D. R., (2003), "Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*", *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12), 7336-7342.

Burnham J. C., Hashimoto T., Conti S., (1968), "Electron microscopic observations on the penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into gram-negative bacterial hosts", *Journal of Bacteriology*, 96 (4), 1366-1381.

Chae M. S., Schraft H., (2000), "Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains", *International Journal of Food Microbiology*, 62 (1), 103-111.

Chang I.-S., Kim S.-N., (2005), "Wastewater treatment using membrane filtration—effect of biosolids concentration on cake resistance", *Process Biochemistry*, 40 (3), 1307-1314.

Cheng G., Xue H., Zhang Z., Chen S., Jiang S., (2008), "A switchable biocompatible polymer surface with self-sterilizing and nonfouling capabilities", *Angewandte Chemie International Edition*, 47 (46), 8831-8834.

Christensen B. E., (1989), "The role of extracellular polysaccharides in biofilms", *Journal of Biotechnology*, 10 (3), 181-202.

Costerton J., Stewart P. S., (2001), "Battling biofilms", *Scientific American*, 285 (1), 74.

Cotter T., Thomashow M., (1992), "Identification of a *Bdellovibrio bacteriovorus* genetic locus, hit, associated with the host-independent phenotype", *Journal of Bacteriology*, 174 (19), 6018-6024.

Dashiff A., Junka R. A., Libera M., Kadouri D. E., (2011), "Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*", *Journal of Applied Microbiology*, 110 (2), 431-444.

Donlan R. M., (2002), "Biofilms: microbial life on surfaces", *Emerg Infect Dis*, 8 (9),  
Doolittle M., Cooney J., Caldwell D., (1995), "Lytic infection of *Escherichia coli* biofilms by bacteriophage T4", *Canadian Journal of Microbiology*, 41 (1), 12-18.

Douglas L. J., (2003), "Candida biofilms and their role in infection", Trends In Microbiology, 11 (1), 30-36.

Elhariry H. M., (2008), "Biofilm formation by endospore-forming bacilli on plastic surface under some food-related and environmental stress conditions", Global J Biotechnol Biochem, 3 69-78.

Ferreira C., Pereira A., Melo L., Simoes M., (2010), "Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology". In: A. Mendez-Vilas, Editor, "Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology", Formatex Research Center.

Goldman G., Starosvetsky J., Armon R., (2009), "Inhibition of biofilm formation on UF membrane by use of specific bacteriophages", Journal of Membrane Science, 342 (1-2), 145-152.

Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P., (2004), "Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases", Nature Reviews Microbiology, 2 (2), 95-108.

Hentzer M., Wu H., Andersen J. B., Riedel K., Rasmussen T. B., Bagge N., Kumar N., Schembri M. A., Song Z., Kristoffersen P., (2003), "Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors", The EMBO journal, 22 (15), 3803-3815.

Hirani Z. M., Bukhari Z., Oppenheimer J., Jjemba P., LeChevallier M. W., Jacangelo J. G., (2014), "Impact of MBR cleaning and breaching on passage of selected microorganisms and subsequent inactivation by free chlorine", Water Research, 57 313-324.

Hughes K. A., Sutherland I. W., Jones M. V., (1998), "Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase", Microbiology, 144 (11), 3039-3047.

Johansen C., Falholt P., Gram L., (1997), "Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms", Applied and Environmental Microbiology, 63 (9), 3724-3728.

Kim E.-H., Dwidar M., Mitchell R. J., Kwon Y.-N., (2013), "Assessing The Effects of Bacterial Predation on Membrane Biofouling", Water Research, 47 (16), 6024-6032.

Labbate M., Queck S. Y., Koh K. S., Rice S. A., Givskov M., Kjelleberg S., (2004), "Quorum sensing-controlled biofilm development in Serratia liquefaciens MG1", Journal of Bacteriology, 186 (3), 692-698.

Lambert C., Evans K. J., Till R., Hobley L., Capeness M., Rendulic S., Schuster S. C., Aizawa S. I., Sockett R. E., (2006), "Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*", *Molecular Microbiology*, 60 (2), 274-286.

Lazazzera B. A., Grossman A. D., (1998), "The ins and outs of peptide signaling", *Trends in Microbiology*, 6 (7), 288-294.

Le-Clech P., Chen V., Fane T. A. G., (2006), "Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment", *Journal of Membrane Science*, 284 (1-2), 17-53.

Lee C.-h., Yeon K.-M., (2011), "Magnetic carrier and membrane bioreactor comprising enzyme for inhibiting biofilm formation", US patent US7867392B2.

Lu T. K., Collins J. J., (2007), "Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (27), 11197-11202.

Mafirad S., Mehrnia M. R., Azami H., Sarrafzadeh M. H., (2011), "Effects of biofilm formation on membrane performance in submerged membrane bioreactors", *Biofouling*, 27 (5), 477-485.

Malaeb L., Le-Clech P., Vrouwenvelder J. S., Ayoub G. M., Saikaly P. E., (2013), "Do biological-based strategies hold promise to biofouling control in MBRs?", *Water Research*, 47 (15), 5447-5463.

Markelova N. Y., (2010), "Predacious bacteria, *Bdellovibrio* with potential for biocontrol", *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213 (6), 428-431.

Mayer C., Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J., Flemming H. C., (1999), "The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms", *International Journal of Biological Macromolecules*, 26 (1), 3-16.

Monroe D., (2007), "Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms", *Plos Biology*, 5 (11), e307.

Morikawa M., (2006), "Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101 (1), 1-8.

Nunez M. E., Martin M. O., Chan P. H., Spain E. M., (2005), "Predation, death, and survival in a biofilm: *Bdellovibrio* investigated by atomic force microscopy", *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 42 (3-4), 263-271.

Núñez M. E., Martin M. O., Duong L. K., Ly E., Spain E. M., (2003), "Investigations into the life cycle of the bacterial predator *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J at an interface by atomic force microscopy", *Biophysical Journal*, 84 (5), 3379-3388.

Ophir T., Gutnick D. L., (1994), "A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation", *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (2), 740-745.

Padera R. F., (2006), "Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm", *Cardiovascular Pathology*, 15 (5), 264-270.

Pritchard M., Langley D., Rittenberg S., (1975), "Effects of methotrexate on intraperiplasmic and axenic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*", *Journal of Bacteriology*, 121 (3), 1131-1136.

Rittenberg S. C., Hespell R., (1975), "Energy efficiency of intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*", *Journal of Bacteriology*, 121 (3), 1158-1165.

Rittenberg S. C., Langley D., (1975), "Utilization of nucleoside monophosphates per Se for intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*", *Journal of Bacteriology*, 121 (3), 1137-1144.

Romeo T., (2006), "When the party is over: a signal for dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms", *Journal of Bacteriology*, 188 (21), 7325-7327.

Ruby E. G., (1992), "The genus *Bdellovibrio*". In: A. Balows, M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, H. G. Schlegel, Editors, "The Prokaryotes", 2nd Edition, Springer.

Saier M., (1994), "Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution", *Microbiological Reviews*, 58 (1), 71-93.

Schachter B., (2003), "Slimy business—the biotechnology of biofilms", *Nature Biotechnology*, 21 (4), 361-365.

Scherff R., DeVay J., Carroll T. W., (1966), "Ultrastructure of host-parasite relationships involving reproduction of *Bdellovibrio bacteriovorus* in host bacteria", *Phytopathology*, 56 (6), 627-632.

Schlag S., Nerz C., Birkenstock T. A., Altenberend F., Götz F., (2007), "Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite", *Journal of Bacteriology*, 189 (21), 7911-7919.

Shilo M., (1969), "Morphological and physiological aspects of the interaction of *Bdellovibrio* with host bacteria". In: W. Arber, W. Braun, F. Cramer, R. Haas, W. Henle, P. H. Hofschneider, N. K. Jerne, P. Koldovský, H. Koprowski, O. Maaløe, R. Rott, H. G. Schweiger, M. Sela, L. Syruček, P. K. Vogt, E. Wecker, Editors, "Current topics in Microbiology and Immunology" Springer.

Simões M., Simões L. C., Vieira M. J., (2010), "A review of current and emergent biofilm control strategies", *LWT-Food Science and Technology*, 43 (4), 573-583.



Sockett L., (2008), "An inside job: Bdellovibrio bacteriovorus", *Microbiol Today*, 35 184-187.

Starr M. P., Baigent N. L., (1966), "Parasitic interaction of Bdellovibrio bacteriovorus with other bacteria", *Journal of Bacteriology*, 91 (5), 2006-2017.

Stolp H., (1973), "The bdellovibrios: bacterial parasites of bacteria", *Annual Review of Phytopathology*, 11 (1), 53-76.

Sutherland I. W., (2001), "Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework", *Microbiology*, 147, 3-9.

Şengezer Ç., (2015), "Avcı Bakteri Bdellovibrio Bacteriovorus'un Atıksu Arıtımında Kullanılan Membranların Temizlenmesinde Biyolojik Yöntem Olarak Kullanımı", Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi.

Thomashow M. F., Rittenberg S., (1978), "Intraperiplasmic growth of Bdellovibrio bacteriovorus 109J: solubilization of Escherichia coli peptidoglycan", *Journal of Bacteriology*, 135 (3), 998-1007.

Topare N. S., Attar S., Manfe M. M., (2011), "Sewage/Wastewater Treatment Technologies: A Review", *Scientific Reviews & Chemical Communications*, 1 (1), 18-24.

Tudor J. J., McCann M., Acrich I., (1990), "A new model for the penetration of prey cells by bdellovibrios", *Journal of Bacteriology*, 172 (5), 2421-2426.

Van der Veen S., Abee T., (2011), "Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid", *International Journal of Food Microbiology*, 144 (3), 421-431.

Van Essche M., Quirynen M., Sliepen I., Van Eldere J., Teughels W., (2009), "Bdellovibrio bacteriovorus attacks *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*", *Journal of Dental Research*, 88 (2), 182-186.

Van Loosdrecht M., Lyklema J., Norde W., Zehnder A., (1990), "Influence of interfaces on microbial activity", *Microbiological Reviews*, 54 (1), 75-87.

Varon M., Shilo M., (1968), "Interaction of Bdellovibrio bacteriovorus and host bacteria I. Kinetic studies of attachment and invasion of *Escherichia coli* B by Bdellovibrio bacteriovorus", *Journal of Bacteriology*, 95 (3), 744-753.

Vo P. B., (2010), "*Bdellovibrio Bacteriovorus* Predation In Dual-Species Biofilms Of *E. Coli* Prey And *M. Luteus* Decoys", Bachelor Thesis, Mount Holyoke College.

Vu B., Chen M., Crawford R. J., Ivanova E. P., (2009), "Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation", *Molecules*, 14 (7), 2535-2554.

Waters C. M., Bassler B. L., (2005), "Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 319-346.

Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C., Mattick J. S., (2002), "Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation", *Science*, 295 (5559), 1487.

Xiong Y. H., Liu Y., (2010), "Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (3), 825-837.

Zhang K., Choi H., Dionysiou D. D., Oerther D. B., (2008), "Application of Membrane Bioreactors in the Preliminary Treatment of Early Planetary Base Wastewater for Long-Duration Space Missions", *Water Environment Research*, 80 (12), 2209-2218.



## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Kocaeli’nde doğdu. İzmit Gazi Lisesi’nde lise eğitimini gördü. 2006 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Kimya bölümünde lisans eğitimine başladı. 2010 yılında mezun oldu. 2012 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.



## EKLER

### EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Yılmaz H., Özkan M., (2016) “Aktif Çamur Bakterilerinin Oluşturduğu Biyofilmin Avcı Bakteri *Bdellovibrio Bacteriovorus* Kullanılarak Giderimi”, GTÜ Fen Bilimleri Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu ve Tanıtım Günleri, 47, Kocaeli, 17-18 Mayıs.

Özkan M., Çelik A. M., Karagoz P., Yılmaz H., Şengezer Ç., (2014) “Activity Of *Bdellovibrio* On Sludge Bacteria and Its Potential Use For Cleaning Membrane Bioreactors”, 16. European Congress on Biotechnology, 133, Edinburgh, Scotland, 16-18 August.

Yılmaz H., Çelik A. M., Şengezer Ç., Özkan M., (2014) “Use of *Bdellovibrio bacteriovorus* as Biological Cleaning Method for MBR Systems”, 2<sup>nd</sup> International conference on Emerging Trends in Engineering and Technology, 192-195, London, UK, 30-31 May.

Şengezer Ç., Çelik A. M, Yılmaz H., Özkan M., (2014) “Mitigation Of Fouling Caused By Biofilm Formation In Membrane Bioreactors By Using Predator Bacterium, *Bdellovibrio*”, 4th European Conference on Sludge Management (ECSM) , İzmir, 26-27 Mayıs.