



Escherichia coli'nin Gümüş ve Bakır Yüzeylerde Tutunumunun İncelenmesi

Investigation of *Escherichia coli* Adsorption on Silver and Copper Surfaces

Mehmet Çağrı Soylu¹, Zülal Kesmen², Fatma Betül Köşker¹, Esra Özbekar², Fatma Ersoy¹, Rukiye Şimşek¹

¹Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye

{mcsoylu, fbkosker, 1031010193, 1031010191}@erciyes.edu.tr

²Gıda Mühendisliği Bölümü, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, Türkiye

zkesmen@erciyes.edu.tr, esraozbekar@hotmail.com

Özetçe—Bu çalışmada bakır ve gümüş yüzey üzerine kültüre edilmiş patojenik olmayan *Escherichia coli* (*E.coli*) ATCC 11230 bakterisinin tutunumunun incelenmesi amaçlanmıştır. Bakır ve gümüş yüzeylerine bakteri tutunabilme özellikleri yüzey farklılıklarına bağlı olarak incelenmiştir. Gümüş elektrot, pürüzsüz bakır levha ve ince kıvrılmış pürüzlü yapıda olan bakır tel üzerine *E.coli* bakterisi ekilmiştir. Yüzey tutunumunun incelenmesi ikili elektrot yapısı (Çalışma elektrodu ve referans elektrodu) ile sağlanmıştır. Elektrotlardan elde edilen sinyaller Enstrumantasyon Kuvvetlendiricisi ile kuvvetlendirilmiştir. Deneysel sonucunda, gümüş yüzeylere bakteri tutunumu görülmezken, bakır yüzeylere tutunum gerçekleşmiş ve en fazla tutunum bakır telde gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile mevcut bakteri varlığının tespit edildiği yöntemlere alternatif daha basit bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler — *Escherichia coli*; ATCC 11230; tutunum; elektrot.

Abstract— In this study, investigation of non-pathogenic *Escherichia coli* (*E.coli*) ATCC 11230 bacteria adsorption on copper and silver surfaces was aimed. Characteristics of bacteria adsorption on copper and silver surfaces were investigated based on surface morphologies. *E.coli* bacteria were cultured on silver electrode, smooth copper plate and folded rough copper wire. Investigation of surface adsorption was obtained by double electrode topology (working electrode and reference electrode). Signals from electrodes were amplified by Instrumentation Amplifier. As a results of experiments, it was found that bacteria were not attached to silver electrode. However, bacteria were attached to copper surfaces and maximum attachment was observed on copper wire. With this study, it was tried to develop an alternative and easier method with respect to available bacteria detection systems.

Keywords — *Escherichia coli*; ATCC 11230; adsorption; electrode.

I. GİRİŞ

Escherichia coli ilk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından çocuk dışkılarından izole edilip tanımlanan ve üzerinde en çok çalışılan ve genetik yapısı en iyi bilinen mikroorganizmadır. *E. coli* Enterobacteriaceae ailesinin *Escherichia* cinsine ait katalaz pozitif, oksidaz negatif, fermentatif özelliğe sahip sporsuz, kısa, çubuk şeklinde gram-negatif koliform bakterilerdir. İnsanların ve sıcakkanlı hayvanların normal bağırsak florasının bir üyesidirler. Alınan bir örnekte *E. coli*'ye ve/veya fekal koliform bakterilere rastlanması oraya doğrudan ya da dolaylı olarak dışkı bulaştığının ve yine bağırsak kökenli diğer patojenlerin de olabileceğinin bir göstergesidir. Bu nedenle hiçbir gıda maddesinde, içme ve kullanma sularında, denizlerde ve göllerde *E. coli* ve fekal koliform bulunmasına izin verilmemektedir [2, 3].

E. coli, fekal kontaminasyonun bir göstergesi olması yanında genetik yapısı en iyi bilinen canlı olma özelliğine de sahiptir [4, 5]. Suşlarının birçoğu zararsız olan bu bakterinin bazı patojenik tipleri (ETEC, EPEC gibi), insan ve hayvanlarda sonucu ölüme kadar giden ishaller, yara enfeksiyonlarına, menenjit, septisemi, arteriosklerosis, hemolitik üremik sendrom (HUS), trombotik trombositopenik purpura (TTP), hemorajik kolitis ve çeşitli immünolojik hastalıklar vb. gibi hastalıklara ve salgınlara sebep olabilmektedir [6].

Patojenik ve patojenik olmayan *E.coli* türlerinin tanısında kullanılan yöntemler üç başlık altında toplanabilir [7] :

i. **Doğrudan bakteri tespiti:** Vücuttan alınan örneklerden kültür yapılarak izole edilen serotiplerin belirli hedeflere gösterdikleri tepkiler biyokimyasal olarak incelenmektedir. Bir başka yöntem olarak immuno-manyetik ayırma ise ön zenginleştirme işleminin ardından antikor kaplı manyetik boncuklarla inkübasyon ve sonrasında manyetik ayırma şeklinde gerçekleştirilmektedir. Kullanılan yöntemlerin süresi,

Biyomalzeme 1

2. Gün / 28 Ekim 2016, Cuma

inkübasyon ve kültür süresine bağlı olup, bir günü aşabilmektedir.

ii. Vücuttan alınan örneklerde antijen tespiti: Poliklonal anti-serotip antikorları kullanılarak yapılan direkt immunofloresan boyama yönteminde sonuç iki saat içerisinde elde edilebilmektedir. Enzim immunolojik testlerden biri olan ELISA ile bir saat içerisinde sonuca ulaşılabilmektedir. Belirli serotipe özgü olmaları ve maliyetli olmaları dezavantajları arasındadır.

iii. Virülans faktörlerinin saptanması: Moleküler yöntemler kullanılarak genetik tespit, immunolojik yöntemler kullanılarak toksijenik tespit yapılabilmektedir. Hücre kültürü sitotoksitesite yöntemi bir dönem 'altın standart' olarak kullanılmasına rağmen rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanmasının zor olması ve iki-üç günlük süresi ile yerini daha pratik yöntemlere bırakmıştır. ELISA testleri, aglütinasyon yöntemleri ve PCR da kullanılabilirlerdir. Bu yöntemler tespit için belirli serolojik türe özgü olması, zaman alıcı ve uzman personel gerektirmesinden dolayı rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılamamaktadır.

Bu çalışmada bakır ve gümüş yüzey üzerine patojenik olmayan *Escherichia coli* (*E.coli*) ATCC 11230 bakterisinin tutunumunun incelenmesi amaçlanmıştır. Bakır ve gümüş yüzeylerine bakteri tutunabilme özellikleri yüzey farklılıklarına bağlı olarak incelenmiştir. Gümüş elektrot, pürüzsüz bakır levha ve ince kıvrılmış pürüzlü yapıda olan bakır tel üzerine *E.coli* bakterisi ekilmiştir. Yüzey tutunumunun incelenmesi ikili elektrot yapısı (Çalışma elektrodu ve referans elektrodu) ile sağlanmıştır. Elektrotlardan elde edilen sinyaller Enstrumantasyon devresi ile kuvvetlendirilmiştir. Deneyler sonucunda, gümüş ve bakırın antimikrobiyal özellikte olmasına rağmen bakterinin gümüş elektroda tutunmadığı gözlemlenirken bakır yüzeylere tutunum gerçekleşmiş ve en fazla tutunum bakır telde gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile *E. coli*'nin farklı yüzeylerdeki tutunumu ikili elektrot yapısıyla incelenmiş olup, mevcut bakteri varlığının tespit edildiği yöntemlere alternatif daha basit bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Patojenik olmayan tür ile yapılan çalışmalardan elde edilen anlamlı sonuçlara binaen çalışmalar patojenik ve toksijenik türler ile devam edecektir.

II. MATERYAL VE METOD

A. Besiyerlerinin hazırlanması

LB Agar *E.coli*'nin geliştirilmesinde kullanılmıştır. 14.8 g LB agar tartılmış ve deiyonize su ile 400 mL'ye tamamlanmıştır. Karıştırılarak homojen duruma getirildikten sonra otoklavda 121°C'de bir saat steril edilmiştir. Hazırlanan besi yeri petri kaplarına dökülerek

katılaşmaya bırakılmış ve kullanılmaya kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir.

B. *E. coli* çözeltilisinin hazırlanması:

Saf *E. coli* kültürü, 50 µL *E. coli*'nin LB Broth besi yeri içerisinde çözüldükten sonra 37°C'de 18 saat geliştirilmiştir. Bu çözeltiden 1 mL ependorf tüpüne alınarak 7 dakika boyunca 11000 devirde oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra *E. coli* Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate buffered saline -PBS) tampon çözeltisinde yıkayıp tekrar PBS tampon çözeltisinde çözülmüştür.

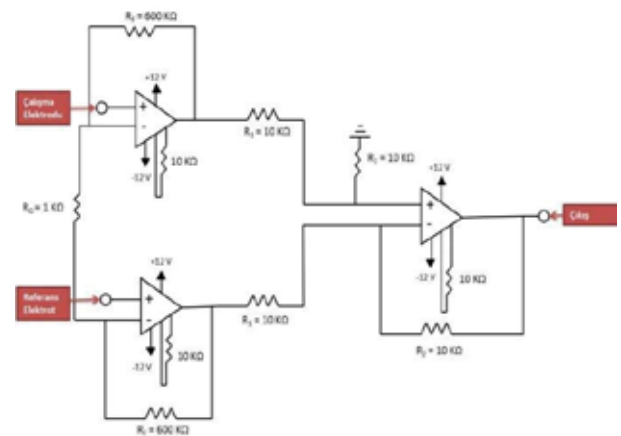
C. Gümüş ve bakır plakalara ekim işlemi:

Farklı morfolojiye sahip yüzeylerin de *E.coli* bakterisi K11230 suşuna duyarlılığını incelemek için gümüş elektrot ve iki bakır yüzey besi yerinin içerisine gömülerek üzerlerine ekim yapılmıştır. Bakır yüzeyler, pürüzsüz ince levha ve diğeri ise ince teldir. Bakır levhanın yüzey alanı ~ 6 cm² iken bakır telin uzunluğu ise ~ 30 cm'dir. Bakır tel, yüzey alanını genişletmek ve girinti ve çıkıntılar oluşturmak için dairesel olarak kıvrılarak kullanılmıştır.

D. Enstrumantasyon devresi tasarımı:

Enstrumantasyon kuvvetlendiricileri küçük fark gerilimlerinin ölçümlerinde, ortak işaret bastırma oranı (CMMR) yüksek olan bir elemandır. Bu yüzden elektrotlarda oluşan fark gerilimini yükseltmek için 500 kat kuvvetlendiren enstrumantasyon kuvvetlendiricisi kullanılmıştır. Enstrumantasyon kuvvetlendiricisi devresi Şekil 1'de, kuvvetlendirme katsayısı ise (1) ile verilmiştir.

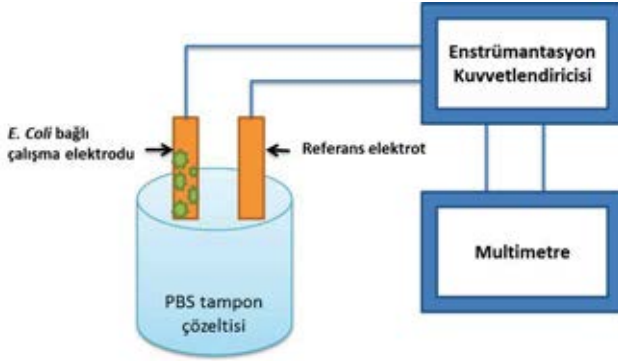
$$A_V = \frac{R_2}{R_1} \left(1 + \frac{2R_F}{R_G} \right) \quad (1)$$



Şekil 1. Enstrumantasyon Kuvvetlendiricisi

Biyomalzeme 1

2. Gün / 28 Ekim 2016, Cuma

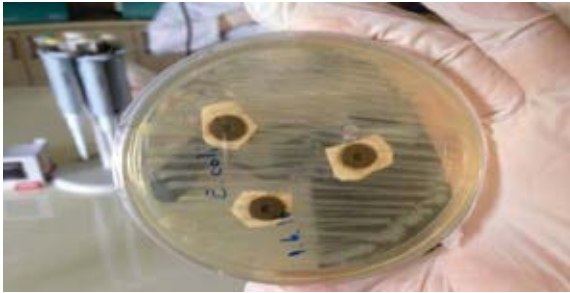


Şekil 2. Deneysel çalışmanın genel şeması

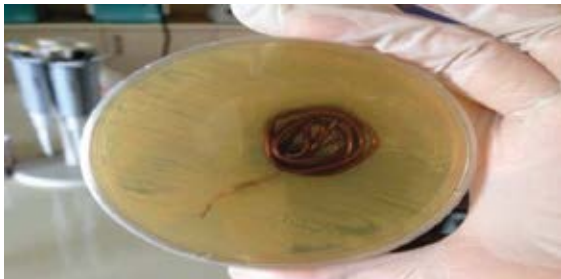
Ölçümler, 0.067 M PBS tampon çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmanın şematik gösterimi Şekil 2 'de verilmiştir.

III. BULGULAR VE SONUÇLAR

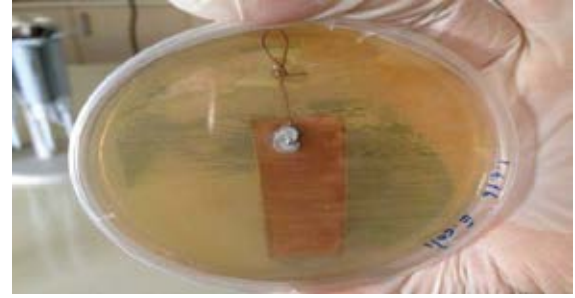
Ekim işlemi sonucunda besi yeri içerisinde bulunan gümüş elektrot ve bakır yüzeylerde gelişen *E.coli* Şekil 3-5'de görülmektedir. Bakteri hücreleri genç evrede iken ölçüm yapılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir. Hücre metabolizma faaliyetlerinin tespiti etkisini gözlemlemek için aynı ölçüm 15 dakika sonra tekrarlanmıştır. Deneylere ait sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Besi yerinden çıkarılan yüzeyler üzerinde bulunan bakterilerin metabolizma faaliyetleri azalmasına bağlı olarak elde edilen ölçümlerde %80-90 oranında azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 3. Gümüş elektrotlara yapılan ekimin gelişme sonrası



Şekil 4. Bakır tel üzerine yapılan ekimin gelişme sonrası



Şekil 5. Bakır plaka üzerine yapılan ekimin gelişme sonrası

Tablo 1. İlk ölçüm ve 15 dakika sonra alınan ölçüm sonuçları

Sensör Yüzeyi	Ölçüm Sonuçları	
	İlk Ölçüm	15 dk Sonra Alınan Ölçüm
Sensör yüzeyi boş iken	-27.8 V	-27.8 V
Gümüş yüzey	-5.4 V	-12.4 V
Bakır Levha	34.8 V	4.39 V
Bakır Tel	39.7 V	7.4 V

IV. TARTIŞMA

Yapılan çalışmada, gümüş yüzeyin ve farklı morfolojide olan bakır yüzeylere *E.coli* bakterisi K11230 suşunun tutunumu incelenmiştir.

Gümüşün antimikrobiyal özelliğinden dolayı gümüş üzerinde fazla gelişme göstermediği, bakırın gümüşe göre daha düşük antimikrobiyal özelliği olmakla birlikte bakır yüzeylerde bakteri çoğalması gözlemlenmiştir. Farklı morfolojide olan bakır yüzeylerinde ise tutunma oranları değişiklik göstermiştir. Ölçüm sonuçlarından en fazla bakteri tutunumunun ince kıvrılmış bakır telde olduğu görülmüştür. Bunun sebebi, yüzey inceliği azaldıkça; girinti, çıkıntı ve yüzey pürüzlülüğü arttıkça bakterilerin yüzeylere tutunumunda da artış olması ile birlikte koloni oluşturarak yüzey filmi oluşturma kapasitesinin artmasındandır [8-10].

Sonuç olarak, mevcut bakteri varlığının tespit edildiği yöntemlere alternatif olarak daha basit bir yöntem geliştirilmeye çalışılmıştır. Gelecek çalışmalarda daha fazla sayıda gümüş ve bakır yüzeyi kullanılarak elde edilen sonuçlara göre farklı gruplar arasında anlamlı farklılık oluşturup oluşturmadığına göre istatistiksel olarak değerlendirilecektir.



KAYNAKÇA

- [1] Perna, N. T., G. Plunkett, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, and H. A. Kirkpatrick, "Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7", *Nature*, 409(6819): p. 529-533, 2001.
- [2] Edberg, S., E. Rice, R. Karlin, and M. Allen, "Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection", *J. Appl. Microbiol.*, 88(S1), 2000.
- [3] Griffin, P. M. and R. V. Tauxe, "The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157: H7, other enterohemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome", *Epidemiol. Rev.*, 13(1): p. 60-98, 1991.
- [4] Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao, "The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12", *Science*, 277(5331): p. 1453-1462, 1997.
- [5] Lee, H., E. Popodi, H. Tang, and P. L. Foster, "Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium Escherichia coli as determined by whole-genome sequencing", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41): p. E2774-E2783, 2012.
- [6] Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley, "Pathogenic escherichia coli", *Nature Reviews Microbiology*, 2(2): p. 123-140, 2004.
- [7] Valderrama, W. B., E. G. Dudley, S. Doores, and C. N. Cutter, "Commercially Available Rapid Methods for Detection of Selected Foodborne Pathogens", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*: p. 00-00, 2015.
- [8] An, Y. H. and R. J. Friedman, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces", *J. Biomed. Mater. Res.*, 43(3): p. 338-348, 1998.
- [9] Hori, K. and S. Matsumoto, "Bacterial adhesion: From mechanism to control", *Biochem. Eng. J.*, 48(3): p. 424-434, 2010.
- [10] Palmer, J., S. Flint, and J. Brooks, "Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34(9): p. 577-588, 2007.