

BİYOMALZEMELERDEN İZOLE EDİLEN STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS SUŞLARININ YÜZEY ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

INVESTIGATION OF THE SURFACE PROPERTIES OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS STRAINS ISOLATED FROM BIOMATERIALS

Mert SUDAĞIDAN¹, İlker ERDEM², Cengiz ÇAVUŞOĞLU³, Muhsin ÇİFTÇİOĞLU²

¹ İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Merkezi Araştırma Laboratuvarı, İzmir.
(msudagidan@yahoo.com.tr)

² İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Bölümü, İzmir.

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

ÖZET

Bakterilerin yüzey özellikleri, biyomalzeme yüzeylerine tutunma aşamasında büyük rol oynamaktadır. Bu çalışmada, klinikte sıklıkla kullanılan polimerik biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen *Staphylococcus epidermidis* suşlarının yüzey özellikleri zeta potansiyel, hidrofobisite ve yüzey topografisi yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesinde yatan hastalarda kullanılan branül (n= 5), endotrakeal tüp (n= 3) ve santral kateter (n= 2) yüzeylerinden izole edilen toplam 10 *S.epidermidis* suşu dahil edilmiştir. Bu izolatların 7'si biyofilm yapan ve biyofilm yapımından sorumlu genleri içeren; 2'si biyofilm yapmayan ancak biyofilm genlerini içeren ve 1'i biyofilm yapmayan ve biyofilm genlerini içermeyen *S.epidermidis* suşlarıdır. Zeta potansiyel analizi; vücut içerisinde kullanılan biyomalzemelerin buldukları ortamların simülasyonu amacıyla farklı pH değerlerinde (pH 4.1-8.2) ve değişik tampon çözeltileri [fosfatlı tampon (PBS), 1 mM potasyum klorid ve 1 mM potasyum fosfat tamponu] içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hidrofobisite ölçümleri, "bacterial adhesion to hydrocarbon (BATH)" yöntemi kullanılarak; biyofilm ve slime tabakalarının yüzey topografisi ise atomik kuvvet mikroskopisi (atomic force microscopy; AFM) ve taramalı elektron mikroskopisi (scanning electron microscopy; SEM) yardımıyla belirlenmiştir. Suşların tamamının tüm pH değerlerinde ve tampon çözeltileri içerisinde negatif zeta potansiyel değeri (yüzey yükü) taşıdığı bulunmuştur. Hidrofobisite testlerinde; en yüksek hidrofobisite değerini (%86) biyofilm yapmayan ve endotrakeal tüp yüzeyinden izole edilen *S.epidermidis* YT-169b suşunun, en düşük değeri (%2.5) ise biyofilm yapan ve santral kateterden izole edilen *S.epidermidis* YT-212 suşunun gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda, suşların biyomalzeme yüzeylerinde oluşturdukları biyofilm ve slime tabakaları AFM ve SEM analizleri ile µm düzeyinde görüntülenmiştir. SEM incelemesinde, özellikle biyomalzeme yüzeyindeki pürüzlü kısımlara daha çok bakterinin tutunduğu ve üretilen slime tabakasının bakteri yüzeylerini kapladığı izlenmiştir. Sonuç olarak, fırsatçı patojenlerin yüzey özelliklerinin aydınlatılmasının, bu bakterilerin tutunamayacağı malzemelerin ve antimikrobiyal yüzeylerin üretilmesine önemli katkılar sağlayacağı düşünülmüş ve ayrıca, biyomalzeme yü-

zeyinin negatif yüklü olacak şekilde ve olabildiğince pürüzsüz olarak tasarlanmasının vücut ortamında biyofilm oluşumunu güçleştirebileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Biyofilm, Staphylococcus epidermidis, zeta potansiyel, hidrofobisite, atomik kuvvet mikroskopisi, taramalı elektron mikroskopisi.*

ABSTRACT

The surface properties of bacteria play an important role on adhesion to the biomaterial surface. In this study, the surface properties of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from clinically used polymeric biomaterial surfaces were investigated on the basis of zeta potential, hydrophobicity and surface topography. A total of 10 *S.epidermidis* strains isolated from intravenous catheters (n= 5), endotracheal tubes (n= 3) and central venous catheters (n= 2) which were used in the patients of pulmonary Intensive Care Unit, Ege University Medical Faculty Hospital, were included to the study. Seven of those isolates were biofilm producers, inhabiting biofilm genes, 2 were non-biofilm producers, however, inhabiting biofilm genes, and 1 was non-biofilm producer, inhabiting no biofilm genes. Zeta potential analysis have been performed in 3 different buffers (phosphate-buffered saline, 1 mM potassium chloride and 1 mM potassium phosphate buffer) and at different pH values (pH 4.1-8.2), in order to simulate in vivo environment of the biomaterials. Hydrophobicities of the strains were examined by bacterial adhesion to hydrocarbon (BATH) test and the surface topography of biofilms and slime layers were visualized by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM) methods. It was found that all strains have negative zeta potential values (surface charge) in all buffers and pH values. In hydrophobicity analysis, the highest value (86%) was determined for non-biofilm forming *S.epidermidis* strain YT-169b (endotracheal tube isolate) and the lowest hydrophobicity (2.5%) was determined for biofilm forming *S.epidermidis* strain YT-212 (central venous catheter isolate). Biofilm and slime layers of the strains were imaged by AFM and SEM analysis in μm scale. SEM analysis showed that bacteria highly adhered to rough surfaces on biomaterial surfaces and the produced slime layers covered the surface of bacteria. In conclusion, elucidating the surface properties of opportunistic pathogens in different physiologic buffers will give important clues for the production of non-adhesive materials and antibacterial surfaces for those bacteria. It was also estimated that designing the surface of the biomaterial to have negative surface charge in the body and to be as smooth as possible will hamper biofilm formation.

Key words: *Biofilm, Staphylococcus epidermidis, zeta potential, hydrophobicity, atomic force microscopy, scanning electron microscopy.*

GİRİŞ

Biyofilm, değişik mikrobiyal türlerin kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları mikro-ekosistem olarak tanımlanabilir¹. Biyomalzeme yüzeyleri, bakterilerin tutunması ve kolonize olması için elverişli olup, oluşan bakteriyel biyofilm tabakası zamanla vücut içinde bir enfeksiyon kaynağına dönüşebilir². İstatistiklere göre Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde nozokomiyal enfeksiyonların %65'inde biyofilm yapan bakteriler rol oynamakta ve bu durum yılda 1 milyar doların bu enfeksiyonların tedavisi için harcanmasına neden olmaktadır³.

Staphylococcus epidermidis, normal deri florasının ve mukus membranların bir parçası olması ile birlikte biyomalzeme takılırken veya operasyon sırasında vücut içerisine girebilmektedir⁴. Geçtiğimiz 20 yılda, tıbbi malzemelerin (intravasküler kateter, santral kateter, Hickman kateteri, vasküler greftler, sütür, ortopedik araçlar gibi) kullanımının artma-

sıyla *S.epidermidis*, nozokomiyal ve biyomalzeme-kaynaklı enfeksiyonlarda en sık izole edilen bakteri durumuna gelmiştir⁵. Bu enfeksiyonların en önemli aşaması, bakterinin biyomalzeme yüzeylerine tutunması yani adezyondur. Bakteriyel adezyon iki aşamalı bir işlemdir; ilk aşama, çift yönlü (reversible) olup, genelde itici ve çekici fiziksel kuvvetlerin rol oynadığı tutunma aşamasıdır. Sıvı içerisinde serbest olarak Brownian hareketleri ile yer değiştiren planktonik bakteriler, van der Waals kuvvetleri, yüzey elektrostatik yükleri, hidrofobik, iyonik, dipol etkileşim ve hidrojen bağları ile biyomalzeme yüzeyine yaklaşmakta ve yüzeye bu kuvvetli olmayan bağlarla bağlanabilmektedir⁶. İkinci aşama ise zamana bağlı olup hücrelerin birbiri ile etkileşimi sonucu kuvvetli bağlardan oluşan çok katmanlı tabakaların oluşturulduğu biyofilmdir⁶. Oluşan biyofilm tabakası, antibiyotiklere ve bağışıklık sistemi hücrelerine karşı koruyucu bir kalkan görevi görmekte ve bu tabaka kolaylıkla vücut içerisinden temizlenememektedir⁷. Çoğu zaman enfeksiyon kaynağı durumuna gelen biyofilm içeren biyomalzemeler, ancak vücuttan çıkarıldığı zaman tedavi başarılabilir. Bu durum ise hastayı hem maddi hem de tıbbi açıdan olumsuz etkilemektedir.

Bakterilerin yüzeylerinde bulunan karboksil ve fosforil grupları, buldukları ortamın pH değerine bağlı olarak iyonize olur ve iyonize olan bu gruplar, bakterinin negatif ya da pozitif yüzey yükü (zeta potansiyel) kazanmasına yol açar⁸. Elektriksel alanda bakteri, yüzey yüküne bağlı olarak zıt yüklü kutba doğru hareketlenmektedir. Bu hareketin (elektroforez) hızı, yüzey yükünün fazlalığıyla doğru orantılıdır ve bakterinin yüzey yükünün nicel olarak belirlenmesine imkan verir⁸.

Hidrofobisite de yüzey yükü gibi bakterilerin yüzeylere tutunmasında önemli rol oynamaktadır. Hidrofobisitenin belirlenmesinde, su temas açılarının (water contact angle) ölçümü⁹ veya bakterilerin organik çözücü içerisinde geçişine dayalı yöntemler kullanılmaktadır^{10,11}.

Bakterilerin ve biyomalzemelerin yüzey özellikleri ve topografik yapılarının nano boyutta belirlenmesinde atomik kuvvet mikroskopisi (atomic force microscopy; AFM) ve taramalı elektron mikroskopisi (scanning electron microscopy; SEM) gibi ileri teknolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. AFM, bakterilerin yüzeyle olan etkileşimlerinin belirlenmesinde ve yüzeyde tutunan bakterilerin görüntülenmesinde kullanılan bir yöntemdir^{12,13}.

Bu çalışmada, klinikte sıklıkla kullanılan, polimer yapıda biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen, biyofilm yapan ve yapmayan *S.epidermidis* suşlarının yüzey özellikleri incelenmiştir. Bu kapsamda, suşların vücut içerisinde buldukları ortama yakın pH değerlerinde ve değişik tampon çözeltileri içerisinde zeta potansiyel ve hidrofobisite değerleri, ayrıca AFM ve SEM kullanılarak yüzey topografik özellikleri araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakterilerin Özellikleri

Çalışmada kullanılan stafilokok suşları Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesinde yatan hastalarda kullanılan polimer biyomalzeme yüzeylerinden daha önceki çalışmamızda belirtildiği şekilde izole edildi¹⁴. Stafilokok suşları ID32

Staph testi (bioMérieux, Fransa) ve 16S-ITS rRNA polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) "restriction fragment length polymorphism (RFLP)" yöntemi kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı¹⁵. *S.epidermidis* suşlarının biyofilm yapma özellikleri mikropalak testi ile belirlendi¹⁴. Biyofilm yapımında rol oynayan ekzopolisakkarit sentezinden sorumlu *icaADBC* genlerinin varlığı ise daha önce yapılan çalışmada PCR ile belirlendi¹⁶. Biyofilm yapmayan *S.epidermidis* YT-169b suşu ise negatif kontrol olarak kullanıldı.

Zeta Potansiyel Ölçümleri

S.epidermidis suşları, 10 ml triptik soy buyyon (TSB) içerisinde 37°C'de 16 saat inkübe edilerek üretildi. Üretilen bakteriler, santrifüj (3500 x g, 5 dakika, 4°C) ile çöktürüldü ve 2 ml steril deiyonize su ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüj edildi. İkinci santrifüj işleminin ardından, bakteriler değişik pH değerlerine sahip (pH 4.1-8.2) tampon çözeltiler içerisinde süspansiyon edildi. Bu amaçla, fosfatlı tampon (PBS) (8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l Na₂HPO₄ ve 0.24 g/l KH₂PO₄), 1 mM potasyum klorür ve 1 mM potasyum fosfat olmak üzere 3 farklı tampon çözeltisi kullanıldı. Bakteri yoğunluğunun tüm bakterilerde eşit olması amacıyla tampon çözeltileri kullanılarak bakteri yoğunluğu spektrofotometrede (Varian, Cary 100) 635 nm dalga boyunda 0.08-0.10 değerine (McFarland 0.5) ayarlandı. Bakterilerin farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltileri içerisindeki zeta potansiyel değerleri Zetasizer 3000HSA (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılarak belirlendi. Ölçümler cihazda ulaşılabilen en düşük standart sapma değeri olan ± 1.6 mV değerine ulaşılan kadar sürdürüldü.

Hidrofobisite Testleri

Biyofilm yapan ve yapmayan *S.epidermidis* suşlarının yüzey hidrofobisite değerleri "bacterial adhesion to hydrocarbon (BATH)" testi kullanılarak belirlendi¹¹. Bu yöntemde, 16 saat TSB içerisinde üretilen bakteriler santrifüj ile çöktürüldü ve steril deiyonize su ile yıkandı. Bakteri yoğunlukları 1 mM KCl (pH 7.4) çözeltisi kullanılarak spektrofotometre ile 600 nm'de 0.4-0.6'ya ayarlandı (A₀). 200 µl toluen (Merck) ile 4 ml bakteri süspansiyonu 1 dakika vorteks ile karıştırıldı. Toluen ekstraksiyonunun ardından absorbans değerleri (A) 10 dakika içerisinde 600 nm'de ölçüldü. Her bir bakteri için test en az 3 kez tekrar edildi. Yüzde hidrofobisite değeri $(1-(A/A_0)) \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı.

Bakteri yüzeylerinin, hidrofobik veya hidrofilik olmaları oranında sırasıyla organik madde veya su içerisinde bulunmayı tercih etmeleri temeline dayanan bu yöntemde, hidrofobik organik faz olarak toluen kullanıldı¹¹. Absorbans değerinden hesaplanan hidrofobisite değeri, bakterilerin organik fazda bulunma eğiliminin bir göstergesi, diğer bir deyişle yüzey hidrofobisite gösteren bir değerdir.

Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)

Biyofilm oluşturan *S.epidermidis* suşları, 100 ml TSB içerisinde steril cam lam ile birlikte 16 saat 37°C'de 100 rpm hızındaki çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda lamlar PBS (pH 7.0) ile yıkandı ve silika jel üzerinde bir gece oda sıcaklığında kurutuldu.

Biyofilm yapan bakterilerin lam üzerindeki yüzey topografik özellikleri atomik kuvvet mikroskopunda (Digital Instruments Nanoscope-IV, ABD) silikon prob kullanılarak görüntüledi.

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Biyofilm oluşturan bakterilerin cam lam ve branül yüzeyindeki görünümünün belirlenmesi için örnekler AFM ile aynı yöntemle hazırlandı. Altın-paladyum ile kaplanan örneklerin yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu (Philips FEG XL) kullanılarak incelendi.

BULGULAR

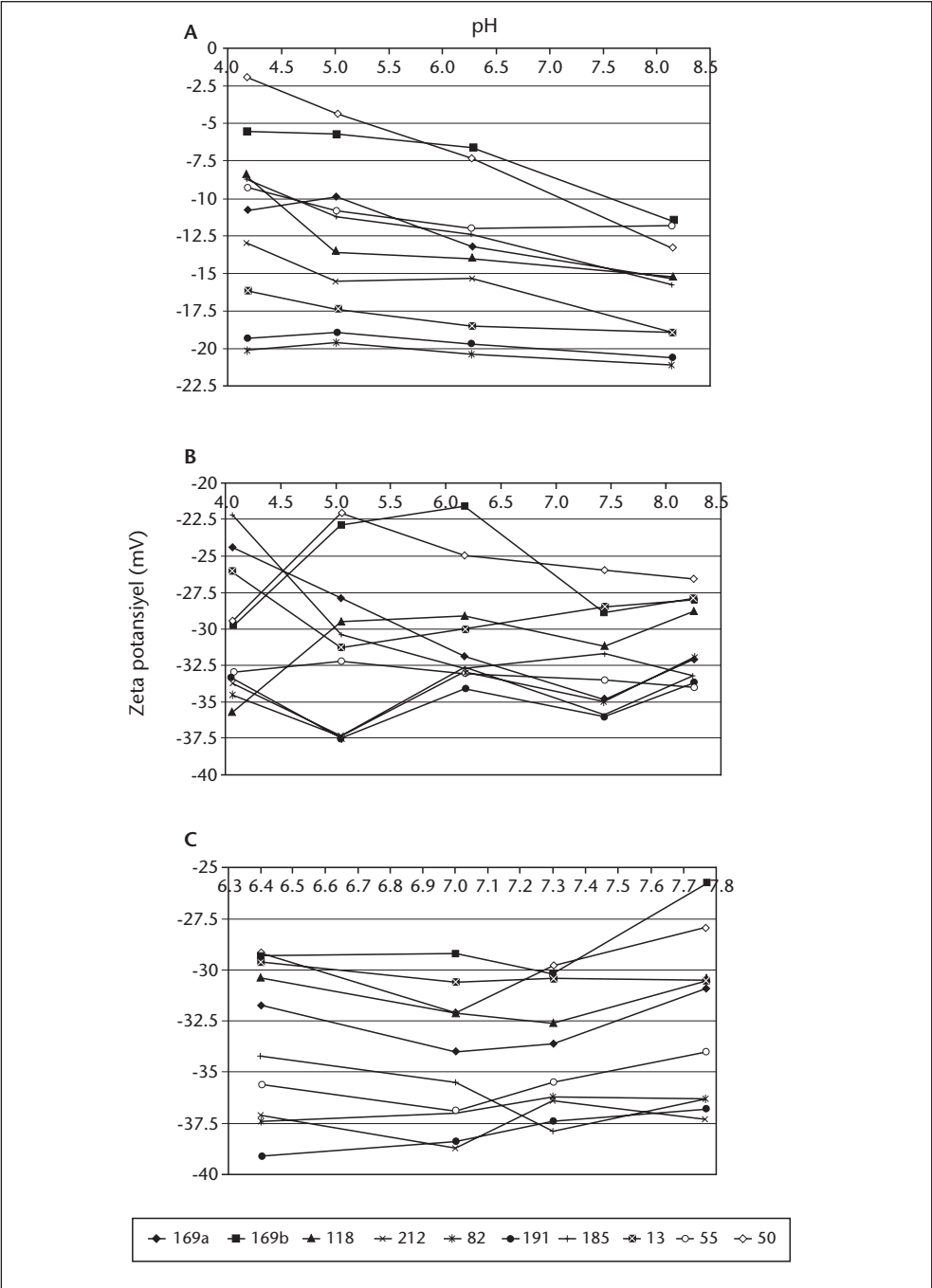
Bu çalışmada, biyokimyasal testler ve 16S-ITS rRNA PCR-RFLP yöntemleri ile *S.epidermidis* olarak tanımlanan 10 suş incelenmiştir. Suşların, izole edildikleri biyomalzemeler, biyofilm oluşturabilme ve slime üretebilme yetenekleri ve biyofilm oluşumu ile ilişkili genleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Biyofilm oluşturan ve oluşturmayan *S.epidermidis* suşlarının tüm pH değerlerinde ve tampon çözeltileri içerisinde negatif zeta potansiyel değerlerine ve negatif yüzey yüküne sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 1). PBS içerisinde süspansiyon edilen bakterilerin zeta potansiyel değerlerinin (0 mV ile -20 mV arası), diğer tampon çözeltileri içerisinde süspansiyon edilenlere (0 mV ile -40 mV arası) göre daha düşük olduğu saptanmıştır.

Farklı biyomalzemelerden (branül, endotrakeal tüp, santral kateter) izole edilen *S.epidermidis* suşlarına ait hidrofobisite değerleri Tablo 1'de görülmektedir. Biyofilm yapan bakteriler arasında en yüksek (%73) hidrofobisite değeri branülden izole edilen YT-13 suşunda ölçülmüş; buna karşın tüm suşlar arasındaki en yüksek hidrofobisite değeri (%86), biyofilm yapmayan ve negatif kontrol olarak kullanılan YT-169b suşunda tespit edilmiştir.

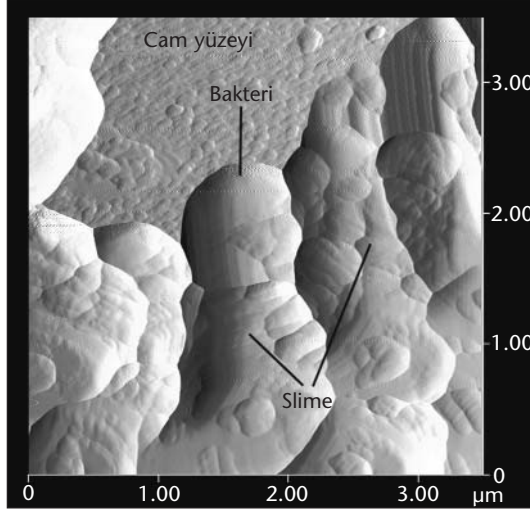
Tablo 1. Çalışmada Kullanılan *Staphylococcus epidermidis* Suşları ve Özellikleri (n= 10)

Suşlar	İzole edildiği biyomalzeme	Biyofilm (mikroplak testi)	icaADBC gen lokusu	Hidrofobisite değeri (%)
YT-13	Branül	+	+	73
YT-50	Branül	+	+	60
YT-55	Santral kateter	+	+	61
YT-169a	Endotrakeal tüp	+	+	31
YT-185	Branül	+	+	62
YT-191	Branül	+	+	27
YT-212	Santral kateter	+	+	2.5
YT-82	Endotrakeal tüp	-	+	11
YT-118	Branül	-	+	62
YT-169b	Endotrakeal tüp	-	-	86

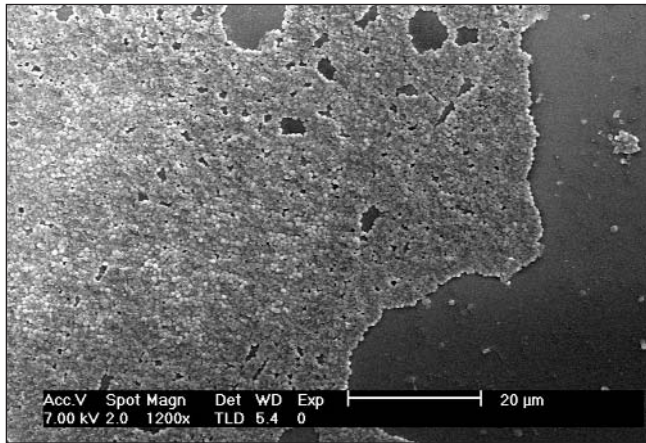


Şekil 1. Değişik tampon çözeltileri içerisinde ve pH değerlerinde *Staphylococcus epidermidis* suşlarının zeta potansiyel değerleri. A. PBS, B. 1 mM potasyum klorür, C. 1 mM fosfat tampon çözeltisi.

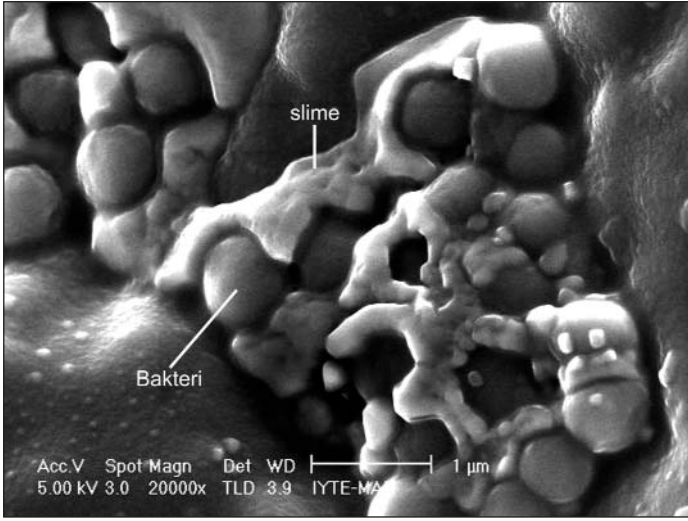
Cam yüzeyine tutunan ve biyofilm yapan bakterilerin yüzey topografik özellikleri ile ürettikleri slime tabakaları AFM ve SEM görüntüleri ile belirlenmiştir. Resim 1'de, *S.epidermidis* YT-55 suşunun ürettiği slime tabakası; Resim 2 ve 3'te ise cam ve branül yüzeyinde biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeylerini kaplayan slime tabakaları görülmektedir.



Resim 1. *Staphylococcus epidermidis* YT-55 suşunun cam yüzeyinde oluşturduğu biyofilm ve slime tabakalarının AFM ile elde edilen görüntüsü.



Resim 2. *Staphylococcus epidermidis* YT-50 suşunun cam yüzeyinde oluşturduğu biyofilm tabakasının SEM görüntüsü.



Resim 3. *Staphylococcus epidermidis* YT-50 suşunun branül yüzeyinde biyofilm oluşturmaları ve slime tabakalarının SEM görüntüsü.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, klinikte sıklıkla kullanılan biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen *S.epidermidis* suşlarının fizikokimyasal yüzey özellikleri (yüzey yükü ve hidrofobisite) ile yüzey topografik özellikleri araştırılmıştır. Daha önce gerçekleştirdiğimiz bir çalışmada, değişik polimerik biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen 10 *S.epidermidis* suşundan 7'sinin biyofilm yaptığı, slime ürettiği ve biyofilm yapımından sorumlu genleri taşıdığı bulunmuş; buna karşın iki suşun (YT-82 ve YT-118) biyofilm yapma ve slime üretme yeteneği olmasına rağmen, *icaADBC* genlerini taşıdığı tespit edilmiştir¹⁶. Bu tespitten ardından, hem biyofilm yapan hem de biyofilm yapmamasına rağmen ilgili genleri taşıyan suşların biyofilm yapımının ilk aşamasında önemli rol oynayan fizikokimyasal yüzey özelliklerinin araştırılması planlanmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri, vücut içerisinde kullanılan biyomalzemelerin buldukları ortamların simülasyonu amacıyla farklı ortam pH değerlerinde (4.1-8.2) ve değişik tampon çözeltileri içerisinde gerçekleştirilmiştir. Branül ve santral kateterlerin, vücut içerisinde kan damarları ile temas ettiğinde çevresel pH değeri 7.15-7.35'tir¹⁷. Ancak endotrakeal tüpün takıldığı anatomik ortam, bol miktarda tükürük içermesi nedeniyle diğerlerinden farklıdır. Ortam atmosferinin %5 CO₂ ve %95 O₂ içermesi ve yüksek tükürük içeriği, polimerik biyomalzeme yüzeyinde biyofilm tabakası oluşumuna neden olmaktadır¹⁸. Tükürük, izoelektrik noktaları hem asidik hem de alkali olan proteinleri içermektedir¹⁹. PVC (Polyvinlyl Chloride) yapıdaki endotrakeal tüp yüzeyinde oluşan bu fizyolojik ortam, solunum yoluyla alınan bakterilerin tüp yüzeyine tutunmasını ve burada biyofilm oluşturmalarını kolaylaştırmaktadır²⁰.

Hücre yüzeyinin elektriksel yük özellikleri, elektroforetik hareket veya zeta potansiyel ölçümleri ile hücreyi parçalamadan ve yüzey kompozisyonunu değiştirmeden belirlene-

bilmektedir²¹. Çalışmamızda, *S.epidermidis* suşlarının değişik tamponlarda değişik özellikler gösterdiği (Şekil 1) ve zeta potansiyel ölçümlerinin gerçekleştirildiği farklı tampon çözeltilerinde ve farklı pH değerlerinde tüm suşların negatif yüzey yüküne sahip oldukları bulunmuştur. Sonuçlarımız, farklı *S.epidermidis* suşları ile gerçekleştirilen daha önceki çalışmaların verileri ile uyum göstermektedir^{22,23}.

Vücuttaki farklı ortam ve pH değerleri dikkate alınarak hazırlanan çözeltilerde bakteri yüzeyinde ölçülen negatif yüzey yükü değerleri, bu suşların izole edildiği biyomalzemelerin vücut ortamındaki yüzey yüklerinin pozitif olması durumunda, bakterilerin ilk tutunmalarının daha kolay ve kuvvetli olacağını vurgulamaktadır. Biyomalzeme yüzeyinde biyofilm oluşumunun başlangıcında önemli parametrelerden biri olan bakteri yüzey yükünde farklı ortamlarda gözlenen değişimler, biyomalzemenin kullanılacağı ortamdaki iyon konsantrasyonunun ve gücünün biyofilm oluşumu açısından ne kadar etkin olabileceğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, bakterilerin yüzeylere bağlanmasında yük transferinin etkili olduğu ve bakterilerden yüzeye aktarılan yükün fazla olması durumunda daha güçlü bir adezyonun meydana gelebileceği belirlenmiştir²⁴. Diğer bir deyişle, bakteri yüzeyi ile zıt yüklü biyomalzeme yüzeyi arasında ilk tutunma daha kolay ve kuvvetli olmaktadır. Dolayısıyla biyomalzeme yüzeylerinin, bakteri ile aynı yüke sahip olacak şekilde hazırlanması veya yüzey özelliklerinin bu yönde değiştirilmesi, bakterinin tutunmasını zorlaştırıcı bir etki yapabilir.

Bakterilerin yüzey hidrofobik özelliklerinin belirlenmesinde, çalışmada test edilen pH değerlerinde alifatik hidrokarbonlara göre daha düşük negatif yüke sahip aromatik bir çözücü olan toluen tercih edilmiştir^{10,11}. Böylece, yüzey yükü negatif olan bakterilerin, su ortamından hidrokarbon ortamına geçişi sırasında daha az bir dirençle karşılaşması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, *S.epidermidis* suşlarının hidrofobisite değerlerinin %2.5-86 aralığında değiştiği gözlenmiştir (Tablo I). Biyofilm oluşturan ve oluşturmayan suşların gerek kendi içlerinde gerekse gruplar arasında hidrofobisite değerleri bir ilişki göstermemiştir. Örneğin; biyofilm oluşturmayan YT-169b (%86) suşu en yüksek hidrofobisite değerine sahipken, en düşük değer (%2.5) santral kateterden izole edilen ve biyofilm oluşturan YT-212 suşunda tespit edilmiştir. Suşlar alt gruplara ayrıldığında yüzey yükleri ile hidrofobisite değerleri arasında ters orantı olduğu düşünülse de, tüm suşlar dikkate alındığında böyle bir genelleme söz konusu değildir. Bu sonuçlar, hidrofobisite ve yüzey yükü arasında ters orantılı bir değişimin olmadığını ve suşların yalnızca hidrofobisiteyi ölçülerek biyofilm oluşturma eğilimlerinin belirlenemeyeceğini göstermektedir. Bununla birlikte, hedef biyomalzeme yüzeyinin hidrofobisitesine benzer hidrofobisiteye sahip bir bakterinin biyomalzemeye ilk tutunmasının daha kolay olacağı öngörülebilir.

Çalışmamızda, biyofilm oluşturan *S.epidermidis* suşlarının cam yüzeye tutunması ve oluşturduğu slime tabakalarının görüntülenmesinde, çok güçlü bir yüzey karakterizasyon tekniği olan AFM kullanılmıştır (Resim 1). Bu yöntemle yüzeylerin üç boyutlu morfolojik ve topografik görüntüleri alınabilmekte; ayrıca biyofilm yapıları içerisindeki hücreler arasındaki intermoleküler kuvvetler de belirlenebilmektedir^{25,26}. Çalışmamızda kullanılan SEM yöntemi ile de, *S.epidermidis* suşlarının oluşturduğu biyofilm tabakasının yıkama ile

giderilemeyecek şekilde yüzeylere kuvvetle bağlandığı (Resim 2) ve bakterinin branül yüzeyinde özellikle pürüzlü kısımların arasına girerek biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir (Resim 3).

Sonuç olarak çalışmamızda, farklı tamponlarda ve farklı pH değerlerinde farklı sonuçlar vermiş olsalar da, tüm *S.epidermidis* suşlarının negatif yüzey yüklerine sahip oldukları görülmüş ve hidrofobisite değerlerinin geniş bir aralıkta dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında, *S.epidermidis* suşlarının biyomalzeme yüzeyine tutunmasının önlenmesinde, biyomalzeme yüzeylerinin negatif yüzey yüküne sahip olacak şekilde modifiye edilmesinin ve pürüzsüz düzgün bir yüzeyin sağlanmasının yararlı olabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezin doğrulanmasında daha fazla sayıda ve farklı bakteri izolatları ile yapılacak ileri çalışmalara gerek vardır.

TEŞEKKÜR

Atomik kuvvet mikroskopisi ve taramalı elektron mikroskopisi çalışmalarının gerçekleştirildiği İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezi uzmanlarına katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. *Methods Enzymol* 1999; 310: 37-9.
2. Donlan RM. Biofilms and device associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 277-81.
3. Archibald LK, Gaynes RP. Hospital-acquired infections in the United States. The importance of interhospital comparisons. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11: 245-55.
4. von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 677-85.
5. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.
6. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 1998; 43: 338-48.
7. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358: 135-8.
8. Wilson WW, Wade MM, Holman SC, Champlin FR. Status of methods for assessing cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J Microbiol Methods* 2001; 43: 153-64.
9. Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AWJ, de Jong HP, Arends J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48: 980-3.
10. Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* 1999; 23: 179-230.
11. Ahimou F, Paquot M, Jacques P, Thonart P, Rouxhet PG. Influence of electrical properties of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *J Microbiol Methods* 2001; 45: 119-26.
12. Razatos A, Ong Y-L, Sharma MM, Georgiou G. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11059-64.
13. Mendez-Vilas A, Gallardo-Moreno AM, Gonzalez-Martin ML, et al. Surface characterization of two strains of *Staphylococcus epidermidis* with different slime-production by AFM. *Appl Surf Sci* 2004; 238: 18-23.
14. Sudağidan M, Çavuşoğlu C, Bacakoğlu F. Biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında virulans genlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42: 29-39.

15. Sudagidan M, Yenidunya AF, Gunes H. Identification of staphylococci by 16S internal transcribed spacer rRNA gene restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* 2005; 54: 823-6.
16. Sudagidan M, Cavusoglu C. Characteristics of biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from polymeric biomaterial surfaces, 12th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections, Maastricht, The Netherlands. September 3-6, 2006. Abstract Book, p. 256.
17. Black J. Introduction to biological environment, pp. 18 In: Black J (ed), *Biological Performance of Materials, Fundamentals of Biocompatibility*. 1999, Marcel Dekker, New York.
18. McGovern JG, Jones DS, Woolfsen AD, Gorman SP. Influence of physiological conditions on the adherence of respiratory isolates to endotracheal tubes. *J Pharm Pharmacol* 1995; 47(12B): 1063.
19. Ellison SA. The identification of salivary components, pp: 13-20. In: Kleinberg I, Ellison SA, Mandel ID (eds), *Saliva and Dental Caries*. 1979, Information Retrieval, Inc, New York.
20. Jones DS, McGovern JG, Woolfson D, Gorman SP. Role of physiological conditions in the oropharynx on the adherence of respiratory bacterial isolates to endotracheal tube poly (vinyl chloride). *Biomaterials* 1997; 18: 503-10.
21. Hayashi H, Tsuneda S, Hirata A, Sasaki H. Soft particle analysis of bacterial cells and its interpretation of cell adhesion behaviors in terms of DLVO theory. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2001; 22: 149-57.
22. Busscher HJ, Geertsema-Doornbusch GI, van der Mei HC. Adhesion to silicone rubber yeasts and bacteria isolated from voice prostheses: influence of salivary conditioning films. *J Biomed Mater Res* 1997; 34: 201-10.
23. van der Mei HC, van de Belt-Gritter B, Reid G, Bialkowska-Hobranzka H, Busscher HJ. Adhesion of coagulase-negative staphylococci grouped according to physico-chemical surface properties. *Microbiology* 1997; 143: 3861-70.
24. Poortinga AT, Bos R, Busscher HJ. Charge transfer during staphylococcal adhesion to TiNOX[®] coatings with different specific resistivity. *Biophys Chem* 2001; 91: 273-9.
25. Lal R, John SA. Biological application of atomic force microscopy. *Am J Physiol* 1994; 266: C1-C21.
26. Chaw KC, Manimaran M, Tay FEH. Role of silver ions in destabilization of intermolecular adhesion forces measured by atomic force microscopy in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4853-9.