

## Biofilm Formation, Bacterial Cell Count and Cell Density of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in Domestic Waste Frying Oil Medium

Cennet Canan KARADERİ\* , Hüseyin KAHRAMAN 

İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Malatya 44280, Türkiye

### Keywords:

Waste frying oil,  
*E. coli*,  
*S. aureus*,  
Biofilm

### Abstract

Waste materials, when released into the environment, cause harm to the environment by interacting with organic compounds, mineral substances or organisms in their environment. Frying oils, one of the domestic liquid wastes, also cause great environmental problems due to their unconscious use in the environment we live in. However, these wastes have alternative usage areas (Biotechnology, microbiology, biochemistry, etc.). With this study, domestic waste frying oil will be evaluated and used as an economically cost-effective nutrient medium and will have less negative impact on the environment. Biofilms are recognized as the dominant form of growth in the environmental life cycle of bacteria. Most bacteria usually live in a biofilm in their natural environment. In this study, biofilm formation using different bacterial species (*E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC BAA-1026)) in domestic waste frying oil environment, at different ventilation conditions (0, 100, 200 rpm) and 37 °C, bacterial cell count [log kob / ml] and cell density (OD<sub>600</sub>) were examined. The highest biofilm formation at 100 rpm was observed in *E. coli* (0.737) in the domestic waste oil environment. The highest cell difference in bacterial cell count was found in *E. coli* ( $2.23 \times 10^8$  log kob/ml) at 100 rpm. However, the highest cell density difference in the domestic waste oil environment was detected in *S. aureus* (0.183) at 200 rpm. According to the results of this study, it is thought that domestic waste frying oil may be a suitable nutrient medium for some bacteria and affect biofilm formation and cell density.

## *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*' un Evsel Atık Kızartma Yağ Ortamında Biyofilm Oluşumu, Bakteri Hücre Sayımı ve Hücre Yoğunluğu

### Anahtar Kelimeler:

Atık Yağ,  
*E. coli*,  
*S. aureus*,  
Biyofilm

### Özet

Atık maddeler, çevreye bırakıldıklarında buldukları ortamdaki organik bileşiklerle, mineral maddelerle veya organizmalarla etkileşime girerek çevreye zarar vermektedir. Evsel sıvı atıklardan biri olan kızartma yağları da yaşadığımız çevrede bilinçsiz bir şekilde kullanılmasından dolayı büyük bir çevresel problemlere neden olmaktadır. Bununla birlikte bu atıkların alternatif kullanım alanları (Biyoteknoloji, mikrobiyoloji, biyokimya vb.) bulunmaktadır. Bu çalışma ile evsel atık kızartma yağı ekonomik olarak uygun maliyetli bir besin ortamı olarak kullanılacak ve çevreye daha az olumsuz etkisi olacaktır. Biyofilmler, bakterilerin çevresel yaşam döngüsünde büyümenin baskın formu olarak tanınmaktadır. Bakterilerin çoğu genellikle doğal ortamlarında bir biyofilm içinde yaşamaktadır. Bu çalışmada farklı bakteri türleri (*E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC BAA-1026)) kullanılarak evsel atık kızartma yağ ortamında, farklı havalandırma koşullarında (0, 100, 200 rpm) ve 37 °C' de biyofilm oluşumu, bakteri hücre sayımı [log kob/ml] ve hücre yoğunluğu (OD<sub>600</sub>) incelenmiştir. Evsel atık yağ ortamında 100 rpm' de en yüksek biyofilm oluşumu *E. coli*' de (0,737) gözlenmiştir. Bakteri hücre sayımında en yüksek hücre farkı 100 rpm' de *E. coli*' de ( $2,23 \times 10^8$  log kob/ml) bulunmuştur. Bununla birlikte evsel atık yağ ortamında en yüksek hücre yoğunluk farkı 200 rpm' de *S. aureus*' da (0,183) tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre evsel atık kızartma yağının bazı bakteriler için uygun bir besi ortamı olabileceği, biyofilm oluşumunu ve hücre yoğunluğunu etkileyebileceği düşünülmektedir.

## 1 GİRİŞ

Dünyada yaklaşık olarak yılda 20 milyon ton yağ, kızartma amaçlı kullanılmaktadır. Bu yağların yönetimi suyu ve toprağı kirletmesi ve kanalizasyon sistemlerini tıkaması gibi problemler yüzünden sorun olmaktadır. Ayrıca her ülkede oluşan yemeklik atık kızartma yağının miktarı bitkisel yağ kullanımına bağlı olarak değişmektedir [1]. Türkiye’de yılda yaklaşık 1.5 milyon ton sıvı yağ tüketilirken bunun ancak yaklaşık 350 bin tonu atık haline dönüşmektedir. Bu rakamlar dikkate alındığında 175 milyon dolarlık atık yağ pazarının olduğu düşünülmektedir [2]. Atık kızartma yağları (WFO), düşük maliyetleri ve yüksek bulunabilir olması nedeniyle biyodizel üretiminde de önemli bir alternatif olarak kabul edilmektedir [3]. Bu yağlar yüksek enerji kaynakları ve biyolojik yüzey aktif maddeler olarak mikrobiyal büyümede kullanılabilir ve böylece bu atıklar geri dönüştürülebilmektedir [4]. Atık yağlar, yüzey aktif maddeler olarak işlev gören, ısı ve kütle transfer hızlarını değiştiren uçucu ve uçucu olmayan ürünlerin oluşumu ile sonuçlanan, ısıya, oksijene ve suya maruz bırakma yoluyla bozunmaktadır [5]. Kızartma sırasında yağların ısıtılması; peroksit dahil olmak üzere pek çok toksik kimyasalların oluşumuna neden olmaktadır. Aynı zamanda yiyeceklerin bileşimi, miktarı ve yağ tipi, ısıl dayanıklılığı gibi birçok etmen yağ kalitesini etkilemektedir. Bu nedenle, geleneksel ve fast-food restoranlarında tüketilen yemeklik yağların kalitesinin kontrol edilmesi esastır [6]. Mikroorganizmalar doğada, bağımsız formlardan ziyade biyofilm formları şeklinde bulunmaktadır. Biyofilm; mikroorganizmaların, genellikle çevresel stres koşullarına karşı oluşturduğu koloni topluluğudur. Stres faktörleri; hücrelerin immün yanıtlarını, ortamda var olan antimikrobiyal bileşikler, sıcaklık, pH, tuz konsantrasyonu, organik ve inorganik besinler olmak üzere birçok biyotik ve abiyotik faktörlerden meydana gelir [7]. Mikrobiyal biyofilmler kalıcı tıbbi cihazlarda kolayca oluşmakta ve etkili bir tedavi yöntemi bulunmadığında kontrolü zor olan hastalıklara neden olmaktadır [8]. Mikroorganizmalar uygun koşullar oluştuğunda, canlı hücreler veya cansız yapılar üzerine yapışarak kendi ürettikleri EPS (ekzopolisakkarit) içinde bölünüp çoğalarak biyofilm oluşturabilmektedir. Biyofilm içinde büyüyen bakteriyel patojenler, birçok antibiyotiğe ve bağışıklık sistemine dirençlidir. Biyofilm oluşumu, konak canlıda antimikrobiyal maddelere olan direnci artırmasıyla birlikte iltihabi reaksiyonları tetikleyerek kronik inflamasyona bağlı olarak kalıcı enfeksiyonlara neden olabilmektedir [9]. *E. coli* hem insanlar hem de hayvanlarda sık görülen bakteriyel gastro-intestinal enfeksiyonlara neden olan bir bakteridir. Bu bakteriler, spesifik virülans faktörlerinin varlığına göre enterotoksijenik, enteropatojenik, gibi spesifik patotiplere sınıflandırılmaktadır [10]. *E. coli*, çubuk şeklinde, fakültatif anaerobik, Gram (-) bir bakteridir. Zararsız olan suşlar bağırsakların normal florasının bir parçasıdır ve konakçılara K vitamini üreterek ve bağırsakta patojenik bakteri oluşumunu önleyerek yarar sağlamaktadır [11]. *S. aureus*, 1-2 µm çapına sahip, kok şeklinde, Gram (+), klinik öneme sahip olan önemli bir patojen bakteridir. Bazı suşlardan özellikle oksasiline dirençli suşlar nedeniyle hem insanlar hem de hayvanlar için küresel bir tehdit oluşturmaktadır [7]. Ayrıca *S. aureus*, stafilokok toksini ile kontamine olmuş gıda tüketilmesinin bir sonucu olarak dünya genelinde sıklıkla hastalıklara neden olan gıda kaynaklı patojenlerin başında gelmektedir. *S. aureus*, enterotoksinleri üretebilme özelliğine sahiptir [12].

## 2 MATERYAL ve METOD

### 2.1. Çalışmada kullanılan bakteriler

*E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC BAA-1026)

### 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

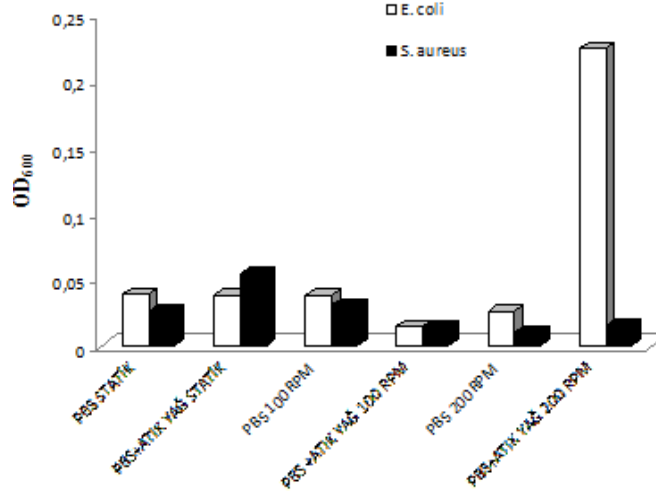
Nutrient Broth, Nutrient Agar (Lab M), KCl (Carlo Erba), Kristal viyole, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), Ethanol (Riedel de Haen), Asetik asit (Sigma Aldrich).

### 2.3. Metot

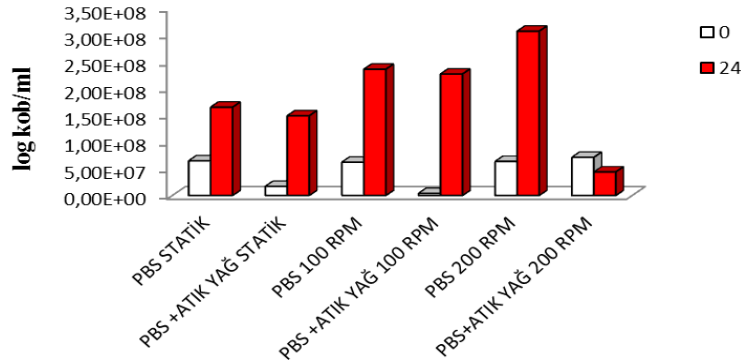
Bakteriler (*E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC BAA-1026)) NB besiyerinde, 37 °C’ de, gece boyu 0, 100 ve 200 rpm çalkalamalı koşullarda üretildiler. Kültürlerden 50 µl alınarak 5 ml örnek PBS (Phosphate Buffer Saline) +% 10 Evsel atık yağ olan tüplere eklenmiştir. Tüp dilüsyon yöntemi ile besi ortamına bakteri ekimi yapılarak 0. ve 24. saatlerdeki hücre yoğunluğu (OD<sub>600</sub>), bakteri hücre sayımı [log kob/ml] ve biyofilm oluşum aktivitesi araştırılmıştır. Biyofilm yöntemi Adamus-Bialek ve ark. 2015’te yaptığı çalışma modifiye edilerek uygulanmıştır [13]. Bulunan değerler OD<sub>570</sub> nm’ de okunarak hesaplanmıştır [14-17]. Evsel atık kızartma yağı, partikülleri filtrelendikten sonra otoklav edilerek kullanılmıştır.

### 3 BULGULAR

Bu çalışma kapsamında kontrol grubu olarak Phosphate buffer saline (PBS) kullanılmıştır. 24 saat sonunda bakteri hücre yoğunluğunda en yüksek değer PBS statik ortamda 0,038 (*E. coli*); PBS + atık yağ ortamında 0,224 (*E. coli*, 200rpm) olarak bulunmuştur (Şekil 1). 24 saat sonunda en yüksek bakteri hücre sayımı PBS ortamında  $3,07 \times 10^8$  log kob/ml (*E. coli*, 200 rpm); PBS+ atık yağ ortamında  $2,27 \times 10^8$  log kob/ml (*E. coli*, 100 rpm) bulunmuştur (Şekil 2). *S. aureus*' ta ise en yüksek PBS statik ortamında  $4,66 \times 10^8$  log kob/ml; PBS + atık yağ ortamında (100 rpm)  $2,14 \times 10^8$  log kob/ml olarak bulunmuştur (Şekil 3). Biyofilm oluşumunda PBS statikte en yüksek değer 0,147 (*E. coli*); atık yağ ortamında 0,109 (*S. aureus*) bulunmuştur. 100 rpm' de *E. coli*' de en yüksek değer PBS ortamında 0,131; PBS +atık yağ ortamında 0,737 bulunmuştur. 200 rpm' de *S. aureus*' da en yüksek değer PBS ortamında 0,145; atık yağ ortamında ise 0,320 bulunmuştur (Şekil 4).

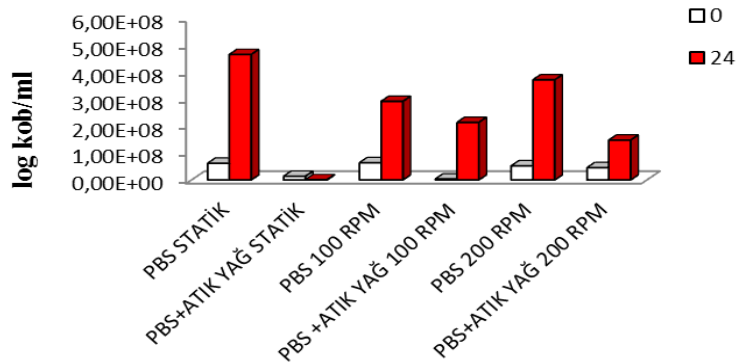


Şekil 1. Bakterilerde PBS ve PBS + atık yağ ortamında 24. saatteki hücre yoğunluğu.



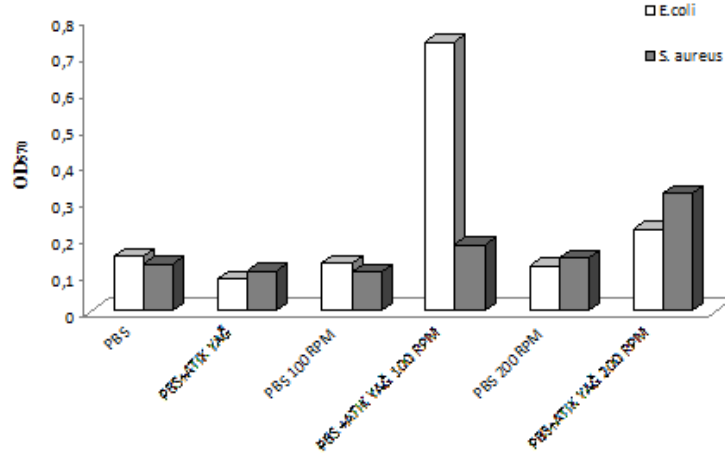
*E. coli*

Şekil 2. *E. coli*' nin PBS ve PBS + atık yağ ortamında bakteri hücre sayımı [log kob/ml].



*S. aureus*

Şekil 3. *S. aureus*' un PBS ve PBS + atık yağ ortamında bakteri hücre sayımı [log kob/ml].



Şekil 4. *E. coli* ve *S. aureus*' un PBS ve PBS+ atık yağ ortamında biyofilm oluşumu.

#### 4 SONUÇLAR

Biyofilmler, mikroorganizmalar (ör; *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. aureus*, *E. faecalis*, vb.) için koruyucu bir kalkandır. Stres koşullarına adapte olabilmek, hücreler arası iletişimi sağlamak, adezyon ve kolonizasyon meydana getirmek amacıyla biyofilm oluşturmaktadırlar. Bu çalışma ile kimyasallara bağlı besi ortamı kullanmak yerine ekonomik yönden daha uygun evsel atık yağı gibi organik atıkları tercih ederek biyokimyasal çalışmalara devam edilebileceği ve bu doğal atıklar ile birlikte biyofilm oluşumuna etkisinin detaylı olarak araştırılabileceği düşünülmektedir. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında büyük çoğunlukla biyodizel üretimine ağırlık verilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmaya benzer çalışmalara literatürde rastlanmadığından karşılaştırmalı olarak tartışmak mümkün olmamıştır. Budan dolayı çalışmamız tamamen orjinaldir ve gelecekteki çalışmalar için yol gösterici olacağına inanıyoruz.

#### Kaynakça

- [1] İ. Rahmanlar, “Kızartma Yağlarının Mikrodalga Yöntemle Alkolizi”, Yıldız Teknik Üniversitesi,2010.
- [2] E. Aksoy, “Malatya Kredi ve Yurtlar Kurumu Bölge Müdürlüğüne bağlı illerdeki yurtlarda kızartmalık yağ denetimi, çalışan ve öğrencilerin atık yağlarla ilgili bilgi düzeyleri”, İnönü Üniversitesi, 2014.
- [3] J.M. Fonseca, J.G. Teleken, V. De Cinque Almeida, C. and Da Silva, “Biodiesel from waste frying oils: Methods of production and Purification”, *Energy Convers. Manag.*, vol. 184, pp. 205-218, Marc. 2019.
- [4] H. Kahraman, and C.C. Karaderi, “Biofilm Effect and Growth of Waste Frying Oil (WFO) on Bacteria”, *Int. J. Biochem. Physiol.*, vol. 3, no. 4, pp.1-7, Aug. 2018.
- [5] S.N. Sahasrabudhea, J.A. Statonb, and B.E. Farkasa, “Effect of frying oil degradation on surface tension and wettability”, *LWT-Food Sci. Technol.*, vol. 99, pp. 519-524, Oct. 2019.
- [6] E. Ahmadi, M. Mosaferi, L. Nikniaz, J.S. Tabrizi, M.A. Jafarabadi, G. Safari, and M. Bargar, “Frying oils quality control: necessity for new approach of supervision”, *Brit. Food J.*, vol. 120, no. 2, pp. 490-498, Jan. 2017.
- [7] N. Akçelik, and M. Akçelik, “Bakteriyel biyofilmler ve konakçı savunma sistemi ile etkileşimleri”, *Erciyes Univer. J. Nat. Appl. Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 15-28, Apr. 2017.
- [8] E.O. Omwengaa, A. Hensel, A. Shitandi, and F.M. Goycoolea, “Chitosan nanoencapsulation of flavonoids enhances their quorum sensing and biofilm formation inhibitory activities against an *E.coli* Top 10 biosensor”, *Coll. Surf. B: Biointer.*, vol. 164, pp. 125-133, Apr.2018.
- [9] D.H. Aydemir, “Bakteriyel biyofilmlerin biyolojik önemi ve etkili kontrol stratejileri”, *Turk. J. Life Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 218-230, 2018.
- [10] F. Al-Kandari, and M.J. Woodward, “Genotypic and phenotypic diversity differences of presumptive commensal and a vian pathogenic *E. coli*”, *Br. Poultry Sci.*, vol. 60, no. 1, pp. 79-86, Feb. 2019.
- [11] M.T. Al-Mohanna. “*Escherichia coli* and *Klebsiella*”, *Modul. Microbiol*, pp. 216-226, Apr. 2011.

- [12] S.N. Al-Bahry, I.Y. Mahmoud, S.K. Al-Musharafi, and N. Sivakumar, “*Staphylococcus aureus* contamination during food preparation, processing and handling”, *Int. J. Chem. Eng. Appl.*, vol. 5, no. 5, pp. 388-392. Apr. 2014.
- [13] Adamus-Bialek, W., Kubiak, A. and Czerwonka, G. “Analysis of uropathogenic *Escherichia coli* biofilm formation under different growth conditions”, *ACTA Biochim. Pol.*, vol.62, no. 4, pp.765-771, Dec. 2015.
- [14] H. Kim, and H.D. Park, “Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14”, *Plos One*, vol. 8, no. 9, pp. 1-16. Sept. 2013.
- [15] C. Wu, Y. Cheng, H. Yin, X. Song, W. Li, X. Zhou, L. Zhao, L. Tian, J. Han, and H. Yu, “Oxygen promotes biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* CN32 through a diguanylate cyclase and an adhesin”, *Nature Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1945, pp. 1-7, Jun. 2013.
- [16] A. Crespo, L. Pedraz, J. Astola, and E. Torrents, “*Pseudomonas aeruginosa* exhibits deficient biofilm formation in the absence of class II and III ribonucleotide reductases due to hindered anaerobic growth”, *Frontiers Microbiol.*, vol. 7, no. 688, pp. 1-14, May. 2016.
- [17] S. Goncalves Mdos, C. Delattre, D. Balestrino, N. Charbonnel, R. Elboutachfai, A. Anne Wadouachi, S. Badel, T. Bernardi, P. Michaud, and C. Forestier, “Antibiofilm activity: a function of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide”, *Plos One*, vol. 9, no. 6, pp. e99995, Jun. 2014.