

BIYOFİLMLER

Savaş durumunda, düşmanın iç iletişimini engellemek, yakıt depolarını ya da fabrikalarını bombalayıp yok etmekten daha etkili olabiliyor. Benzer şekilde, zararlı bakterilere karşı verilen savaşta da, aynı strateji üzerinde duruluyor. Amaçlardan biri sivillere zarar vermemek olunca, zararsız ya da yararlı bakterilerin ölümüne neden olmamak için, bu organizmaları zehirlerle yenmeye çalışmaktansa, zarar veren faaliyetlerinin önünü tıkayan akılcı yöntemler geliştirilmeye çalışılıyor.

Bakterilerin hareketsiz, nemli bir yüzeye tutunmasıyla doğal olarak gelişen biyofilm tabakaları bir kez oluştu mu, bilinen antibiyotikler ve dezenfektanlar pek işe yaramıyor. Biyofilmler, endüstride ve tıpta, bakterileri kontrol altında tutmak için kullanılan, bağımsız dolaşan hücreleri çok çabuk yok edebilecek kimyasal işlemleri atlatıp hayatta kalabiliyorlar. Bağışıklık sisteminin salıverdiği molekül ve hücrelerden de kolayca kurtulduklarından, neden oldukları enfeksiyonlar oldukça inatçı oluyor. Bu yüzden de en akılcı çözüm oluşumlarını en baştan engellemek. Bunu başarmak için ilk yapılması gereken şeyse, nasıl geliştiklerini ve yayıldıklarını, aralarında nasıl iletişim kurduklarını anlamak.

Geçtiğimiz yıllarda yapılan tıbbi araştırmalarda, biyofilmlerdeki mikroorganizmaların, birbirleriyle haberleşme yetileri sayesinde ayakta kalabildikleri ortaya çıkmıştı. Bu iletişimi engel-

leyen ilaçlar, mikropların enfeksiyonlara neden olmasını engelleyebilir ya da yapılarına zarar verebilirler. Bu tür ilaçlar, zatiirreeden, düşük şiddetli enfeksiyonlara kadar pek çok hastalıkla savaşabilirler. Bu amaçla, hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, sinyal kırıcı bileşimler değerlendiriliyor. Ancak, düşmanın nasıl biri olduğunu anlamak, mikrobiyologların çok fazla zamanını aldığı için, bu gelişmeler bir hayli gecikmiş. Bu yüzden de, onu yok etmek için gerekli silah, tıp cephaneliğine yeni yeni giriyor.

Son yıllarda, en bilinen hastalık yapıcı mikroplar hakkında toplanan bilgiler, bu organizmaların çoğunun, ayrı bireyler olarak çok fazla zaman kay-

betmediklerini ortaya çıkarıyor. Aksine, organize olmuş koloniler halinde çeşitli nemli yüzeylere yapışarak, farklı topluluklar oluşturuyorlar. Geçmişe baktığımızda, araştırmacıların bu mikrobik yaşam biçimini bu kadar uzun zaman boyunca farketmemiş olmaları şaşırtıcı geliyor; çünkü, bakteriyel biyofilmler, her yerde karşımıza çıkabiliyorlar: pek çoğumuzun her gün yüzüze geldiği diş plakları, su kenarlarındaki kayaların üzerinde bulunan kaygan tabakalar, çiçek koyduğumuz vazolar-daki suyun yüzeyinde iki, üç gün içinde oluşan tabakalar, iyi bilinen ve gözle görülebilen örneklerden yalnızca birkaçı.

Keşif Yapılıyor

Biyofilmlerde yaşayan bakterileri izlemek için mikroskoplardan yararlanılmaya uzun süre önce başlanmış; ama yalnızca bazı bakteriler görülebilmiş. Canlı tabakaların derinlerinden açık görüntüler elde edilemediğinden, hücrelerin çoğunun ölü olduğu ve gelişigüzel yığımlar halinde durdukları yönünde bir sonuca varılmışı. Bu görüş, yaklaşık 10 yıl öncesine kadar değişmeden kaldı. Yani bakteriyologlar, lazer taramalı konfokal mikroskopları kullanmaya başlayana kadar. Bu mikroskop teknolojisinin yardımıyla, elektronik görüntüleme yöntemleri kullanılarak, belli bölgelere odaklanılabiliyor. Farklı derinliklerden alınan



Sondalarda oluşan biyofilmler, enfeksiyonların başlıca nedenlerinden. Özellikle kullanım sürelerinin aşımında risk oldukça artıyor.

görüntüler, bir bilgisayarda depolanıyormuş ve daha sonra hücrelerin ya da dokuların üç boyutlu görüntüleri elde edilebiliyor.

1991 yılında, biyofilmlerin yapısını incelemek için bu yöntemle yapılan çalışmalarda, bakterilerin mikrokoloniler halinde geliştikleri kanıtlandı. Bakteriler genelde, bu kolonilerin içinde üçte birden daha az bir alan kaplıyor. Gerisi, suyu emen ve küçük parçacıkları yakalayan yapışkan bir madde. Bakterilerin kendi salgısı olan bu yapışkan madde ya da çok hücreli matris, her bir mikrokoloninin bir arada durmasını sağlıyor. Bir biyofilm, bu türden sayısız grubun bir araya gelmesiyle oluşuyor ve gruplar açık su kanalları ağıyla birbirlerinden ayrılıyorlar. Bu ince kanallardan akan sıvı, her bir mikrop topluluğunun suya olan gereksinimini karşılayarak, erimiş besin ve artıkların taşınmasını sağlıyor. Mikrokoloninin dış kısımlarında yer alan hücreler, bu sistemden çok iyi yararlanırken, iç kısımlardaki hücreler neredeyse hiç yararlanamıyorlar. Bunları saran hücrelerin yoğun bir şekilde toplanması ve bakterilerin birbirine yapışmasını sağlayan organik maddenin varlığı, su akışını önüyor. Bu yüzden, koloninin iç kısmındaki hücreler kendilerine doğru yayılan besinlerle yetinmek zorundalar. Yine de, miktar yetersiz değil çünkü, yapıştırıcının yoğunluğunu su oluşturuyor ve bazı istisnalarla da olsa, küçük moleküller bu yolla rahatça taşınabiliyorlar. Ancak, bir maddenin, mikrokoloninin merkezine doğru yayılması, yol boyunca karşılaştığı matris maddesi ve hücrelerle tepkimeye girmesi durumunda zorlaşabiliyor.

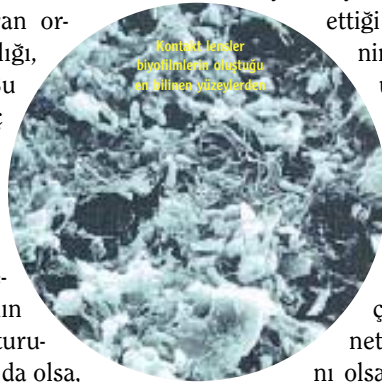
Bu tür kimyasal tepkimeler, biyofilmde küçük çaplı çevresel değişikliklere neden oluyor. 1985 yılında, bakteriyolog Zbigniew Lewandowski, biyofilmlerdeki kimyasal koşulların doğrudan ölçümlerini yapmaya başlamış. Bunu, uçları bir milimetrenin beşyüzde biri incelikte olan, iğne şeklinde mikroelektrotlar kullanarak başarmış ve oksijen yoğunluğunun, birbirlerine milimetrenin beşyüzde biri kadar yakın olan bölgelerde bile değiştiğini far-



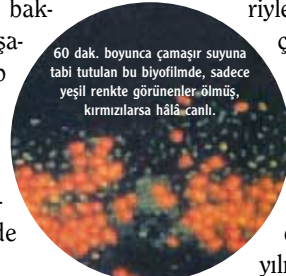
İçme suyunun güvenliği de, klorlamaya karşı dağıtım borularının içinde oluşan biyofilmler yüzünden tehlikeye giriyor.

ketmiş. Bilimadamları genelde bir bakteri topluluğundaki oksijenin miktarına bakarlar; çünkü bu, hücrelerin fizyolojik durumunu yansıtır. Örneğin, *Pseudomonas aeruginosa*'nın (sistik fibrozis'e yol açan bakteri) oluşturduğu biyofilmde, hücresel etkinlik ve büyüme yalnızca oksijenin nüfuz ettiği bölgelerde (her koloninin dıştaki iki ya da üçyüzde birlik dış kısmı) oluyor. Daha derinlerde hücreler, canlı olmakla birlikte uyku halindedir.

Tek bir biyofilmin barındırdığı kimyasal çevre farklılıkları, genetik olarak tümüyle aynı olsalar bile, yan yana duran iki hücrenin birbirlerinden çok farklı görünebileceği ve hareket edebileceği anlamına geliyor. Benzer şekilde, bölgesel koşullar da, biyofilmdeki mikrobik hücrelerin, toksin ve diğer hastalık yapıcı maddeleri üretmelerini kontrol ediyor. Bu nedenle, bazı hücreler ev sahibine çok az zarar verirken, bazıları öldürücü olabilir. Koşullar, aynı zamanda bazı bakteri türlerinin yan yana yaşamalarına ve çok iyi gelişip büyümelerine olanak sağlayabiliyor. Bazen, bazı türler diğer bir türün metabolik atıklarıyla beslenebiliyor. Bu, her iki türün de yararına.



Kontrollü bakter biyofilmleri oluşturulmuş bölgelerde



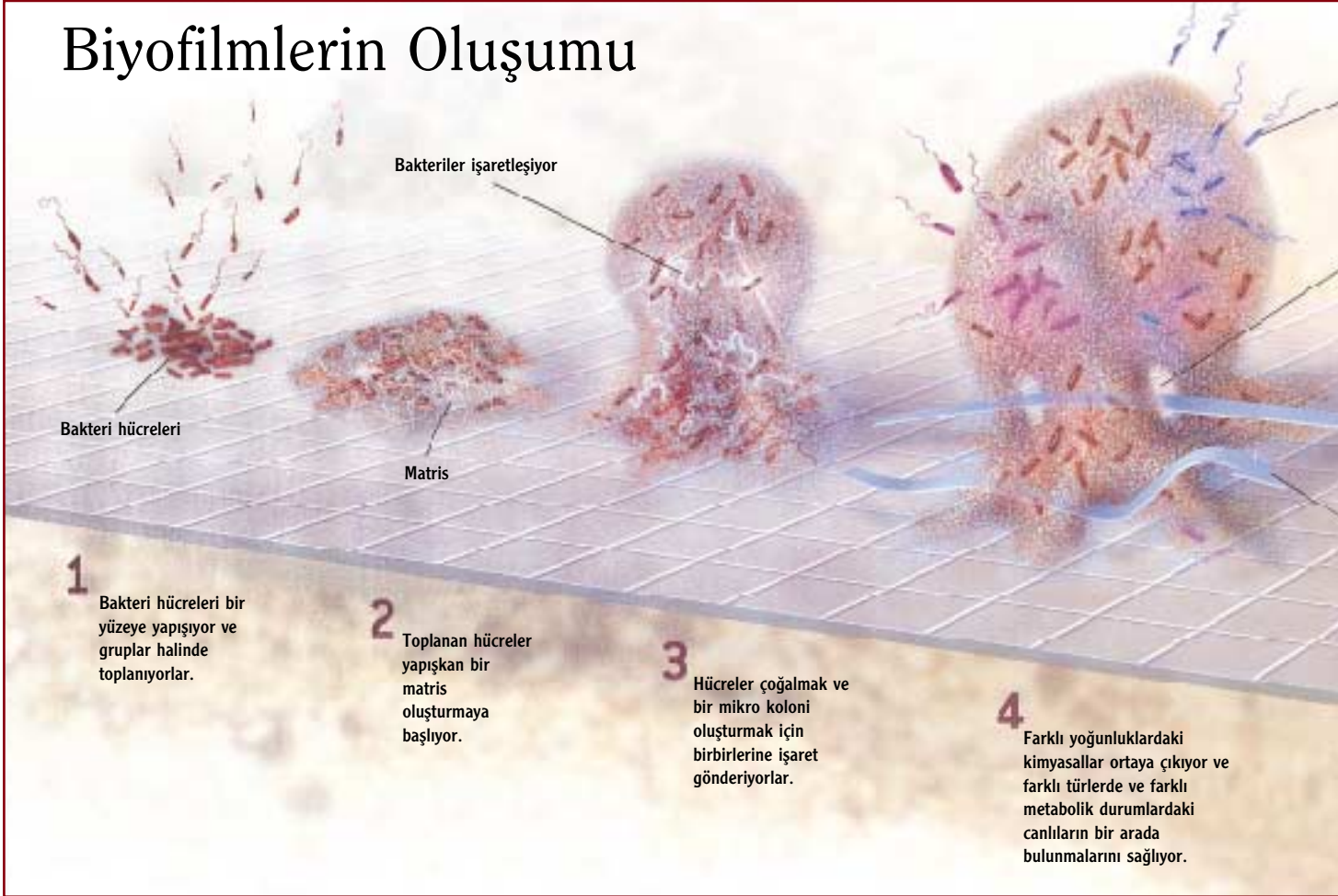
60 dak. boyunca çamaşır suyuna tabi tutulan bu biyofilmde, sadece yeşil renkte görünenler ölmüş, kırmızılarsa hâlâ canlı.

Dayanıklı Mikroplar

Antibiyotik ve mikrop arındırıcılar, biyofilmlerin içine işlemekte başarısız kalabiliyorlar. Örneğin, penisilinli antibiyotikler, beta-laktamaz olarak bilinen enzimleri üreten hücreleri barındıran biyofilmleri etkilemede zorlananlardan. Bu enzimler, antibiyotiği o kadar hızla etkisiz hale getiriyorlar ki, antibiyotik biyofilmin iç tabakalarına ulaşamıyor bile. Evlerin ve endüstrinin favorisi çamaşır suyu da, biyofilmleri yok etmede zorlanıyor. Bu oksidan er geç kendi yolunu yakıyor, ama biyofilmin nötrleştirici özelliğine de karşı koyması gerekiyor. Sonuçta işlem sanıldığından çok daha fazla zaman ve çamaşır suyu gerektiriyor. Antimikrobik maddelerin biyofilmlerin içine kolayca sızabildiği durumlarda bile, bağımsız hücreler kolayca yok olurken, bir araya gelmiş mikroorganizmalar hayatta kalmayı başarabiliyor. Biyofilmlerin bu kadar dayanıklı olmaları, biyologları uzunca bir süre hayrete düşürmüştü; ancak artık biliniyor ki, bir biyofilmdeki koşulların ve bakteri türlerinin çeşitliliği, antibakteriyel maddelere karşı koruma sağlıyor. Örneğin, bir biyofilmde, bir temel gıda maddesinin eksikliğini çeken bölgeler varsa bile, bu bölgedeki canlı fakat çoğalmayan hücreler penisiline maruz kaldıklarında hayatta kalabiliyorlar. Çünkü, biyofilmlerde faal ve hareketsiz mikroplar birbirlerine çok yakın duruyorlar ve hayatta kalan bakteriler ölenleri besin olarak kullanabiliyorlar. Antibiyotik tedavisi bittikten sonra sağlam kalan birkaç hücrenin, biyofilmi onararak tekrar eski haline getirmesiyle yalnızca birkaç saat alıyor.

Biyofilmlerin bu tür yetenekleri, laboratuvarlarda üretilen hücreler üzerinde etkili olan antimikrobiyel maddelerin neden biyofilmlerle savaşan insanlar için yararlı sonuçlar vermediğini açıklıyor. Bu insanların yoğunluğunu doktor ve hastalar oluşturuyor. Ancak, biyofilmlerin endüstrideki yıkıcı etkileriyle uğraşmak zorunda kalan çok sayıda mühendis de var. Çünkü bakteriler makine aksamalarını kirletiyor ve metal boruların paslanma ve aşınma hızlarını artırıyorlar. Her iki gruba da yardımcı olmak amacıyla 1990 yılında Montana Eyalet Üniver-

Biyofilmlerin Oluşumu



sitesi'nde kurulan Biyofilm Mühendisliği Merkezi'nde yapılan araştırmalar, bakterilerin bir yüzeye yapışarak bir biyofilm oluşturduklarında, serbest gezen hücrelerde bulunmayan yüzlerce protein ürettiklerini göstermiş. Bu proteinlerden bazıları, bakteri bir yüzeye yerleştikten hemen sonra, daha konumunu sabitlemeden üretilmeye başlıyor. Sıkça rastlanan iltihaplı enfeksiyonlara neden olan *staphylococcus epidermidis*'i kullanan bazı araştırmacılar, bir biyofilmin gelişmesinde ikinci adım olan hücreli matrisin oluşturulmasını düzenleyen genleri tanımladılar. Bakteriler, bu genlerin etkisiz hale getirilmesiyle, test tüplerinde ve laboratuvar hayvanlarının dokularında biyofilm oluşturma yeteneklerini yitirmişler.

Son zamanlarda yapılan deneyler de, diğer türlerdeki benzer genetik kontrol merkezlerinin varlığını gösterdi. Örneğin, *P. aeruginosa*, bir yüzeye tutunduktan sonra 15 dakika içinde, biyofilm oluşturmak amacıyla harekete geçen birkaç gen taşıyor. Bu genlerden biri olan *algC*, hücreli matrisin büyük çoğunluğunu oluşturan jelatinli poli-

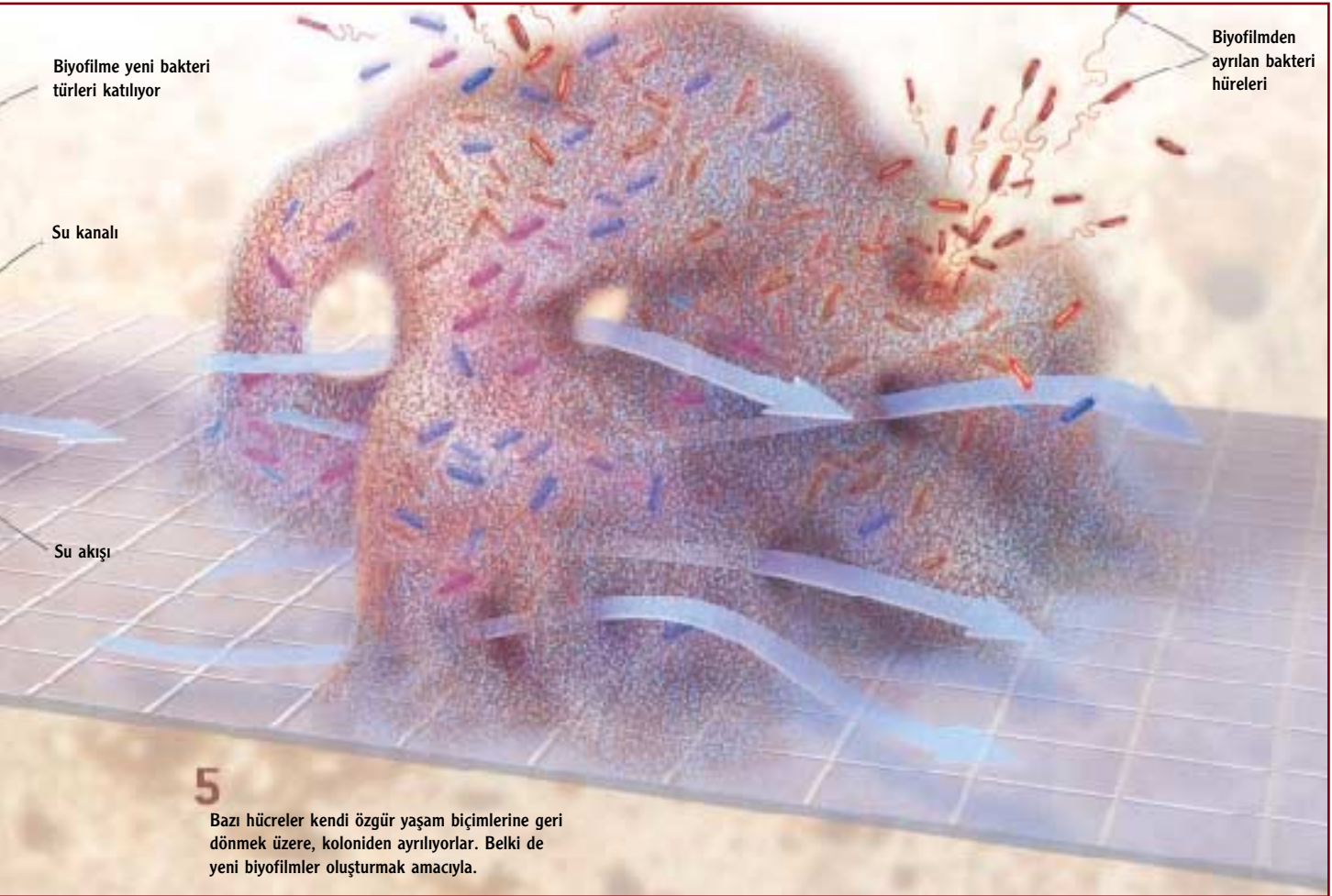
mer alginatın üretimi için gerekli.

Peki, bir biyofilm oluşturmak üzere bir araya gelen hücreler nasıl oluyor da bazı genleri ilk sırada harekete geçireceklerini bilebiliyorlar? İşin sırrı, otonom mikropların düzenli olarak birbirleriyle haberleşmelerinde yatıyor. *P. aeruginosa* ve benzer bakteri türlerinin büyük çoğunluğu, her bir hücrenin düşük düzeylerde ürettiği, kısaca AHL denilen (Acyated Homoserine Lactones) küçük işaret moleküllerini kullanarak bu haberleşmeyi gerçekleştiriyorlar. Yeterli sayıda hücre toplandığında, bu bileşimlerin derişimi artıyor ve bu da, düzinelerce genin hareketlerinde değişikliğe neden oluyor. Bu yetersayıya ulaşma mekanizması, biyofilmlerin gelişmesinde dönüm noktası. (*P. aeruginosa*'nın, AHL'ler için gerekli olan genden yoksun olan laboratuvar soyları da, normal bir biyofilm oluşturamamaya, düzensiz yığınlar halinde birikmişler.)

Araştırmacılar, idrar sondaları üzerinde oluşan biyofilmlerde kullanılan işaret moleküllerini tanımlamayı da başarmışlar. Bu ve kalıcı tıbbi implan-

tasyonlar üzerinde gelişen filmler, en kaygı verici biyofilm enfeksiyonlarına neden oluyorlar. Gelişmeleri oldukça yavaş olmasına rağmen, bu tür enfeksiyonların tekrarlama olasılığı yüksek ve kökünden yok edilmeleri oldukça zor. Biyofilmler ayrıca, diş hastalıkları, prostat enfeksiyonları, böbrek taşları, tüberküloz ve bazı orta kulak iltihaplanmalarının sorumlularından.

Bakteriyel biyofilmlerin nasıl oluştuğu artık bilindiği için ilaçlarla kontrol altına alınmaları mümkün. Örneğin, hücrelerin yüzeyindeki yapışkan uzantıları, onlara bağlanan bir molekülle "boğmak", ilk baştan hücrelerin yüzeylere tutunma ve dolayısıyla biyofilm oluşturma yeteneğini azaltıyor. Başka bir seçenek, hücreli matrisin sentezini engellemek. Bu, tıbbi implantasyonları, matrisin yapımından sorumlu olan genleri kapatacak şekilde, bir kimyasalla kaplamakla başarılabilir. Başka bir çözüm yoluysa, biyofilm bakterilerinin haberleşmek için kullandıkları molekülleri hedefleyerek, biyofilm oluşumunu önlemek ya da toksin üretimini durdurmak.



5

Bazı hücreler kendi özgür yaşam biçimlerine geri dönmek üzere, koloniden ayrılıyorlar. Belki de yeni biyofilmler oluşturmak amacıyla.

Taktik Savaşı

1995 yılında, Avustralya'daki New South Wales Üniversitesi'nden Stefan Kjelleberg ve Peter Steinberg, Botany Körfezi'nde yetişen bir kırmızı alg türü olan *Delisea pulchra*'nın çok nadir olarak biyofilmlerle kaplandığını gözlemlemişler. Çünkü bu algler, bu sularda yaşayan binlerce bakteri türünün oluşturabileceği biyofilmlerden korunmak için, "furanon" adı verilen bazı kimyasallar kullanıyorlar. Bu maddeler, iki tür bakteriyel moleküle çok benziyor: biyofilm yapan pek çok bakterinin yetersayıya ulaşmak için kullandığı AHL ve neredeyse tüm bakterilerin, farklı bakteri türleriyle de işaretleşmek için yararlandıkları, yeni tanımlanan bir molekül çeşidi. *D.pulchra* tarafından kullanılan bu kimyasallar, bakteri hücrelerinin normalde diğer işaretleri de algılayan bölgelerine bağlanıyorlar. Bö-

lece işaret moleküllerinin haberleşmeleri, dolayısıyla biyofilmin oluşması önleniyor.

Bulgular, *D.pulchra*'nın kullandığı bu kimyasalların hem biyofilmin oluşmasını engelleyebildiği, hem de oluşan filmlerin bozulup dağılmasına yardımcı olabileceği yönünde. Bu kimyasallar zehirsiz ve vücutta görece kararlı olduklarından, tıpta kullanıma da oldukça uygun görünüyorlar. Üstelik, furanonlar okyanuslarda milyonlarca yıldır var oldukları halde bakteriler bunca süredir bu maddeye karşı dirençli hale gelememişler. Bu da, tıbbi aletlerde ve insan dokularında kolonileşen bakterilerin, bu maddeye karşı direnç oluşturamayacağı yönünde umut veriyor. Bu araştırmaların ışığında, gemilerin dış kısımlarında ya da suyla temas eden donanımda kullanılmak üzere koruyucu kaplamalar üretmek amacıyla, araştırmacılar tarafından bir şirket de kurulmuş.



Tıpkı döllenmiş yumurtanın, ceninin gelişimi sırasında değişik hücre tipleri oluşturması gibi, bakteriler de bir yüzeye tutunduktan sonra farklılaşıyorlar. Mikrokolonilerin yapımını koordine etmek için, böceklerin ve hayvanların hormon ve feromonlarını andıran iletişim molekülleri yapıyorlar. Koloninin tasarımı, daha büyük organizmaların dolaşım sistemiyle kıyaslanabilecek şekilde, besin maddelerinin içeriye doğru, atıklarınsa dışarıya doğru akmasına olanak sağlıyor. Bazı biyofilmlerde pek çok bakteri türü, tek başlarına tümüyle kullanamayacakları besinleri sindirmek için işbirliği yapıyorlar. Bu gözlemler, pek çok biyoloğun uzun zamanlar fazla önemsemediği bazı bakterilerin, aslında yaşamın düzeninde tahmin edilenden çok daha fazla önemli ve büyük bir yer tuttuğu düşüncesini de gündeme getiriyor.

Meltem Yenil Coşkun

Kaynaklar:

- J. W. Costerton, P. S. Stewart, "Battling Biofilms", Scientific American, Temmuz 2001
 J. W. Costerton, P. S. Stewart, E.P. Greenberg, "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections", Science, 21 Mayıs 1999