



**T.C.**  
**HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİMER KAPLI PASLANMAZ ÇELİK YÜZEYE ENZİM  
İMMOBİLİZASYONUNUN DENİZEL BİYOFİLM TABAKASI  
OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Handan ÜSTÜKARCI**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**HATAY**  
**OCAK - 2023**



T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİMER KAPLI PASLANMAZ ÇELİK YÜZEYE ENZİM  
İMMOBİLİZASYONUNUN DENİZEL BİYOFİLM TABAKASI  
OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Handan ÜSTÜKARCI**  
ORCID:0000-0002-8392-9039

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ**  
ORCID: 0000-0002-2373-6219

**HATAY**  
**OCAK - 2023**

T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİMER KAPLI PASLANMAZ ÇELİK YÜZEYE ENZİM  
İMMOBİLİZASYONUNUN DENİZEL BİYOFİLM TABAKASI OLUŞUMU  
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

HANDAN ÜSTÜKARCI

KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ danışmanlığında hazırlanan bu tez 05/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ  
Başkan

Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ  
Üye

Prof. Dr. Ali KILINÇ  
Üye

Prof. Dr. Birgül ÖZCAN  
Üye

Prof. Dr. Deniz YILDIRIM  
Üye

**Kod No:**

**Doç. Dr. Cengiz KARACA**  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.  
Proje No: 19.D.003

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

05/01/2023

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

İmza

**Handan ÜSTÜKARCI**

## ÖZET

### POLİMER KAPLI PASLANMAZ ÇELİK YÜZEYE ENZİM İMMOBİLİZASYONUNUN DENİZEL BİYOFİLM TABAKASI OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Katı- sıvı etkileşiminin olduğu yüzeylerde mikroorganizmalar zamanla biyofilm oluşturmaktadır. Biyofilm oluşumunun neden olduğu ekonomik kaybı önlemek amacıyla tarih boyunca çeşitli boyalar ve kaplamalar kullanılmıştır. Ancak kullanılan tekniklerin çoğu, biyosit etkilerini ağır metallerin çevreye salınımıyla sağlamakta ve çevre kirliliğine sebep olmakla kalmayıp ekosistemi tehdit etmektedir. Bu nedenle çevre dostu, düşük maliyetli, uzun süreli kullanıma uygun yeni tekniklerin üretilmesi önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, metal üzerinde deniz kaynaklı biyofilm oluşumunun engellenmesine odaklanılmıştır. Bu amaçla, antibiyofilm etkileri bilinen anilin ve o-anisidin monomerleri kullanılarak ilk aşamada 304 paslanmaz çelik üzerine sodyum okzalit, sodyum salisilat, sodyum molibdat, sodyum p-toluen sülfonat ve amonyum okzalit ortamlarında, dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak polimer film sentezleri gerçekleştirilmiştir. Mersin Balıkçı Barınağı'nda 12 gün boyunca denize bırakılan 304 paslanmaz çelik kuponların üzerindeki kaplamaların antibiyofilm etkileri kristal viyole ile boyama yöntemiyle spektrofotometrik olarak karşılaştırılmıştır. Amonyum okzalit ve sodyum salisilat ortamlarında sentezlenen polianilin (PANİ) ve poli(o-anisidin) (POA) filmlerin antibiyofilm performanslarının diğer elektrolit ortamda sentezlenen kaplamalara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Denizel ortamda gelişen biyofilmlerin ağırlıklı olarak protein, karbohidrat, lipid ve nükleik asit içerdikleri gözönünde bulundurularak, PANİ ve POA sentez ortamlarına  $\alpha$ -amilaz, DNaz, glukoz oksidaz,  $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimleri ayrı ayrı ve farklı kombinasyonlarda eklenerek kaplama matriksine enzimlerin tekli ve çoklu immobilizasyonları sağlanmıştır. Enzim ile modifiye edilmiş polimer kaplı yüzeylerin özellikleri antibiyofilm performansları, kristal viyole boyama, floresans mikroskopu, taramalı elektron mikroskopu (SEM), enerji dağıtıcı x-ışını spektroskopisi (EDX) ile karakterize edilmiştir. Beklenilenin aksine, tek bir enzim immobilize edilmiş kaplamalar, ko-immobilize enzim içeren kaplamalara göre daha yüksek antibiyofilm etki göstermiştir. Her aşamada en yüksek antibiyofilm özellik gösteren enzimsiz, tek enzimli ve ko-immobilize enzimli kuponlar denizde bekletildikten sonra yüzeylerindeki biyofilmin karbohidrat, protein ve bakteri miktarları belirlenmiş; yüzeye tutunan bakteri türleri MALDI-TOF MS analizi ile araştırılmıştır.

2023, 112 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyofilm, dönüşümlü voltametri, polianilin, polianisidin, enzim immobilizasyonu

## ABSTRACT

### INVESTIGATION of the EFFECT of ENZYME IMMOBILISATION on POLYMER COATED STAINLESS STEEL SURFACE on MARINE BIOFILM LAYER FORMATION

On surfaces where solid-liquid interactions occur, microorganisms form a biofilm over time. Various paints and coatings have been used throughout history to prevent economic loss caused by biofilm formation. However, most of the techniques which have been used provide their biocide effects with the release of heavy metals to the environment and by this they do not only cause environmental pollution, but also threaten the ecosystem. For this reason, it is important to develop new ideas that are environmentally friendly, low-cost and suitable for long-term use. In this study, we focused on marine biofilm formation on metal. For this purpose, aniline and *o*-anisidine monomers with known antibiofilm effects were used. In the first stage, these polymers were synthesized separately on 304 stainless steel in sodium oxalate, sodium salicylate, sodium molybdate, sodium *p*-toluene sulfonate and ammonium oxalate electrolytes using cyclic voltammetry technique. Antibiofilm effects of the coatings were quantitatively compared with crystal violet (CV) staining method after immersed in the sea for 12 days in Mersin Fisherman's Shelter. The subsequent studies were carried out with ammonium oxalate and sodium salicylate medium, which showed higher antibiofilm activity compared to the other electrolytes. Considering that the biofilms formed in the marine environment mainly contain protein, carbohydrates, lipids and nucleic acids,  $\alpha$ -amylase, DNase, glucose oxidase,  $\alpha$ -chymotrypsin, lipase and pectinase enzymes are added separately and in different combinations to the PANi and POA synthesis media, and the enzymes are added to the coating matrix as single and multiple immobilizations were performed. The properties of enzyme-modified polymer-coated surfaces were characterized by their antibiofilm performance, crystal violet staining, fluorescence microscopy, scanning electron microscope (SEM), energy dispersive x-ray spectroscopy (EDX). Contrary to expectations, coatings with a single enzyme immobilized showed higher antibiofilm activity than coatings with co-immobilized enzyme. After the enzyme-free, single-enzyme and co-immobilized crush coupons with the highest antibiofilm properties at each stage were kept in the sea, the carbohydrate, protein and bacterial amounts of the biofilm on their surfaces were investigated, and MALDI-TOF MS analysis was performed to determine the bacterial species attached to the surface.

2023, 112 pages

**Key Words:** Antibiofilm cyclic voltammetry, polyaniline, polyanisidine, enzyme immobilisation

## TEŞEKKÜR

Öncelikle; bilgisi ve kişiliği ile benim için idol olmuş; tüm doktora süreci boyunca bana yol gösteren, ilerlememi sağlayan, tez konusunda benimle aynı heyecanı paylaşmış, bilgisi ile bana ışık olmuş ve bilginin paylaştıkça güzel olduğunu bana hissettirmiş olan; öğrencisi olmaktan mutluluk ve gurur duyduğum, kelimelere zor sığdıracağım sayın danışmanım Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezim ile ilgili her türlü sorumu rahatlıkla sorabildiğim; zaman ve mesafeden bağımsız olarak çalışmama yön vermiş, bana zaman ayırmış, fikirlerimi önemseyerek beni aydınlatmış; doktora çalışmalarımın gerçekleşmesinde büyük katkısı olan, bilgisine derin saygı ve hayranlık duyduğum sayın hocam Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ' a; bana laboratuvarını açan, fikir ve eleştirileriyle çalışmalarımı zenginleştiren Tez izleme Komitesi üyesi sayın hocam Prof. Dr. Ali KILINÇ' a ve sevgili hocam Prof. Dr. Birgül ÖZCAN'a çok teşekkür ederim.

Üzerine doktora tezimi gerçekleştirdiğim fikri ilk duyduğunda "boş işlerle uğraşmamam" gerektiğini söyleyerek bu konu üzerine çalışmayı istememe sebep olan; laboratuvar da geçirdiğim zamanlarda zorunlu bekarlık yaşadığı için şikayet eden ama yine de desteğini ve sevgisini her daim hissettiğim sevgili hayat arkadaşım Fadıl ÜSTÜKARCI'ya; mutfak işleri üzerinden tezde karşılaştığım sorunları anlattığımda bana çözüm bulmak için beyin jimnastiği yapan hamur işlerinde duayen sevgili annem Meryem ÖZTÜRK' e,

Tez çalışmalarım süresince, tüm laboratuvar çalışmalarında yapmış oldukları katkı ve yardımları nedeniyle İbrahim FİLAZİ, Cenk ERDOĞAN, Seda AĞÇAM ve Melina DÖNMEZ'e, örneklerin denize konmasındaki yardımları ve ilgileri için BALIKÇI ARİF teknesi sahibi, çalışanlarına,

Olumsuz sonuçlanan denemeler sonrasında "Olduramadım" şarkısıyla moral bulmamı sağlayan Özkan UĞUR'a,

Tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölüm Başkanlığı'na,

Eğitim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen, güvenen ve her daim yanımda olan canım aileme ve bu tezin gerçekleştirilmesinde, üzerinde emeği olan ancak ismini hatırlayamadığım veya zikredemediğim herkese sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET.....                                                                                    | I   |
| ABSTRACT .....                                                                               | II  |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                | III |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                            | IV  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                      | VI  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                         | VII |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                         | X   |
| 1. GİRİŞ.....                                                                                | 1   |
| 1.1. Biyofouling.....                                                                        | 1   |
| 1.1.1. Biyofouling Oluşum Süreci .....                                                       | 2   |
| 1.1.2. Biyofoulingin Neden Olduğu Zararlar .....                                             | 3   |
| 1.2. Antifouling Uygulamaları .....                                                          | 4   |
| 1.3. İletken Polimerler .....                                                                | 5   |
| 1.4. Enzimler .....                                                                          | 6   |
| 1.4.1. Oksidoredüktazlar.....                                                                | 7   |
| 1.4.2. Hidrolazlar .....                                                                     | 7   |
| 1.5. Enzim İmmobilizasyonu.....                                                              | 9   |
| 1.5.1. Çözünmez Formda Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri .....                                 | 10  |
| 1.5.1.1. Bağlama.....                                                                        | 10  |
| 1.5.1.2. Tutuklama .....                                                                     | 11  |
| 1.5.2. Çözünür Formda Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri .....                                  | 12  |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....                                                                    | 13  |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                                                   | 20  |
| 3.1. Materyal.....                                                                           | 20  |
| 3.1.1. Kullanılan Elektrotlar .....                                                          | 20  |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....                                                           | 20  |
| 3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....                                                              | 21  |
| 3.1.4. Çalışma Alanı .....                                                                   | 22  |
| 3.2. Yöntem .....                                                                            | 22  |
| 3.2.1. Çalışma Elektrotlarının Elektrokimyasal Polimer Sentezi için Hazırlanması .....       | 22  |
| 3.2.2. Polimerlerin Elektrokimyasal Sentezi .....                                            | 23  |
| 3.2.2.1. İletken Polimer Film Sentezi.....                                                   | 23  |
| 3.2.2.2. İletken Polimer Film Sentezi ile Enzim İmmobilizasyonu .....                        | 24  |
| 3.2.3. Çalışma Elektrotlarının Denizde İnkübasyonu.....                                      | 25  |
| 3.2.4. Floresans Mikroskobu ile Yüzey Görüntüleme.....                                       | 25  |
| 3.2.5. Çalışma Elektrotlarından Biyofilm Eldesi.....                                         | 26  |
| 3.2.6. Biyokimyasal Tayinler .....                                                           | 26  |
| 3.2.6.1. Kantitatif Biyofilm Tayini .....                                                    | 26  |
| 3.2.6.2. Toplam Karbohidrat Tayini .....                                                     | 27  |
| 3.2.6.3. Toplam Protein Tayini .....                                                         | 28  |
| 3.2.7. Mikrobiyal Tanımlama .....                                                            | 30  |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....                                                     | 32  |
| 4.1. Araştırma Bulguları .....                                                               | 32  |
| 4.1.1. Farklı Elektrolit Ortamlarda PANİ ve POA Filmlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu..... | 32  |

|                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.1.1. Elektropolimerizasyon .....                                                                                                                | 32  |
| 4.1.1.2. Kuponların Yüzey Fotoğraf Görüntüleri.....                                                                                                 | 34  |
| 4.1.1.3. SEM ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleri.....                                                                                                 | 36  |
| 4.1.1.4. EDX Analizleri.....                                                                                                                        | 39  |
| 4.1.1.5. Floresans Mikroskopu ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleri .....                                                                               | 41  |
| 4.1.1.6. PANİ ve POA Filmlerinin Antibiyofilm Etkilerinin Kristal Viyole<br>Boyama ile Bağlı Olarak Belirlenmesi .....                              | 43  |
| 4.1.2. PANİ ve POA Filmlerine Enzim İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu .....                                                                       | 44  |
| 4.1.2.1. Elektropolimerizasyon ile Enzim İmmobilizasyonu.....                                                                                       | 44  |
| 4.1.2.2. Enzim İmmobilize Edilmiş Kuponların Yüzey Fotoğraf Görüntüleri ..                                                                          | 48  |
| 4.1.2.3. SEM ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleri.....                                                                                                 | 52  |
| 4.1.2.4. EDX Analizleri.....                                                                                                                        | 59  |
| 4.1.2.5. Floresans Mikroskopu ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleme.....                                                                                | 63  |
| 4.1.2.6. Enzim İmmobilize Kuponların Antibiyofilm Etkilerinin Kristal Viyole<br>Boyama ile Bağlı Olarak Belirlenmesi .....                          | 70  |
| 4.1.3. PANİ ve POA Filmlerine Enzim Koimmobilizasyonu ve Karakterizasyonu                                                                           | 72  |
| 4.1.3.1. Elektropolimerizasyon ile Enzim Koimmobilizasyonu .....                                                                                    | 72  |
| 4.1.3.2. Enzim Koimmobilizasyonu Gerçekleştirilmiş Kuponların Yüzey<br>Fotoğraf Görüntüleri .....                                                   | 76  |
| 4.1.3.3. SEM ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleri.....                                                                                                 | 79  |
| 4.1.3.4. EDX Analizleri.....                                                                                                                        | 83  |
| 4.1.3.5. Floresans Mikroskopu ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleri .....                                                                               | 85  |
| 4.1.3.6. Enzim Koimmobilizasyonu Gerçekleştirilmiş Kuponların Antibiyofilm<br>Etkilerinin Kristal Viyole Boyama ile Bağlı Olarak Belirlenmesi ..... | 89  |
| 4.1.4. Farklı Şekillerde Elde Edilmiş Kupon Yüzeylerinin Biyokimyasal ve<br>Mikrobiyolojik Analizi.....                                             | 91  |
| 4.1.4.1. Toplam Karbohidrat Tayini .....                                                                                                            | 91  |
| 4.1.4.2. Toplam Protein Tayini .....                                                                                                                | 92  |
| 4.1.4.3. Mikrobiyolojik Tanılama .....                                                                                                              | 92  |
| 4.2. Tartışma.....                                                                                                                                  | 95  |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....                                                                                                                           | 102 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                                                     | 105 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                                                      | 110 |
| EKLER.....                                                                                                                                          | 111 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1. Kullanılan elektrotların bileşim ve özellikleri .....                                                                                                                                                      | 20 |
| Çizelge 3.2. Çalışma elektrodu olarak kullanılan SS304 elektrodunun elementel bileşimi (% w/w) (Özyılmaz ve ark., 2006) .....                                                                                           | 20 |
| Çizelge 3.3. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları .....                                                                                                                                                             | 21 |
| Çizelge 3.4. Anilin homopolimer sentezi için uygulanan potansiyel aralıklar .....                                                                                                                                       | 24 |
| Çizelge 3.5. <i>o</i> -Anisidin homopolimer sentezi için uygulanan potansiyel aralıklar .....                                                                                                                           | 24 |
| Çizelge 3.6. Anilin monomerini içeren ortam için potansiyel aralıklar .....                                                                                                                                             | 24 |
| Çizelge 3.7. <i>o</i> -anisidin monomerini içeren ortam için potansiyel aralıklar .....                                                                                                                                 | 24 |
| Çizelge 4.1. PANİ kuponlarına ait EDX analizleri (%) .....                                                                                                                                                              | 39 |
| Çizelge 4.2. POA kuponlarına ait EDX analizleri .....                                                                                                                                                                   | 40 |
| Çizelge 4.4. Amonyum okzalot ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri .....                                                                             | 60 |
| Çizelge 4.5. Sodyum salisilat ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri .....                                                                            | 61 |
| Çizelge 4.6. Amonyum okzalot ortamında <i>o</i> -anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri .....                                                                 | 62 |
| Çizelge 4.7. Sodyum salisilat ortamında <i>o</i> -anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri .....                                                                | 63 |
| Çizelge 4.8. Anilin ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri (A: $\alpha$ -amilaz, D: DNAz, GOD: Glukoz oksidaz, K: $\alpha$ -kimotripsin, L: lipaz ) .....            | 84 |
| Çizelge 4.9. <i>o</i> -Anisidin ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri(A: $\alpha$ -amilaz, D: DNAz, GOD: Glukoz oksidaz, K: $\alpha$ -kimotripsin, L: lipaz ) ..... | 85 |
| Çizelge 4.10. Seçilen kaplamalara ait biyofilm örneklerinin $10^{-4}$ seyrelme oranında elde edilen koloni sayıları ve mililitre başına hesaplanan koloni oluşturan birim .....                                         | 93 |
| Çizelge 4.11. 2016 yılına ait Mersin körfez bölgesi iz metal konsantrasyonları (Mersin Büyükşehir Belediyesi, 2016) .....                                                                                               | 98 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Biyofouling süreci.....                                                                                                                                                     | 2  |
| Şekil 1.2. Anilin ve o-anisidin monomerlerinin kimyasal yapıları .....                                                                                                                 | 6  |
| Şekil 1.3. Glukoz oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon .....                                                                                                                      | 7  |
| Şekil 1.4. Enzim immobilizasyon yöntemleri .....                                                                                                                                       | 10 |
| Şekil 3.1. Çalışma alanı.....                                                                                                                                                          | 22 |
| Şekil 3.2. Kuponların denizde inkübasyonu için kullanılan kafes sistemi.....                                                                                                           | 25 |
| Şekil 3.3. 4',6- diamino-2-fenilindol (DAPI) boyasının kimyasal yapısı.....                                                                                                            | 26 |
| Şekil 3.4. Kristal viyole boyasının kimyasal yapısı .....                                                                                                                              | 27 |
| Şekil 3.5. Fenol- sülfürik asit standart eğrisi .....                                                                                                                                  | 28 |
| Şekil 3.6. Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kimyasal yapısı .....                                                                                                              | 29 |
| Şekil 3.7. Bradford standart eğrisi .....                                                                                                                                              | 30 |
| Şekil 4.1. Farklı ortamlarda PANİ sentezine ait CV eğrisi .....                                                                                                                        | 33 |
| Şekil 4.2. Farklı ortamlarda POA sentezine ait CV eğrisi .....                                                                                                                         | 34 |
| Şekil 4.3. Farklı elektrolit ortamlarında sentezlenen PANİ filmlerin kupon görüntüleri.....                                                                                            | 35 |
| Şekil 4.4. Farklı elektrolit ortamlarında sentezlenen POA filmlerinin kupon görüntüleri.....                                                                                           | 36 |
| Şekil 4.5. Farklı PANİ kuponlarına ait SEM görüntüleri .....                                                                                                                           | 37 |
| Şekil 4.6. Farklı POA kuponlarına ait SEM görüntüleri.....                                                                                                                             | 38 |
| Şekil 4.7. Çıplak metal ve PANİ kuponlarına ait floresans mikroskobu görüntüleri .....                                                                                                 | 42 |
| Şekil 4.8. Çıplak metal ve POA kuponlarına ait floresans mikroskobu görüntüleri.....                                                                                                   | 43 |
| Şekil 4.9. Farklı elektrolit ortamlarında sentezlenen PANİ ve POA filmlerinin antibiyofilm etkinlikleri.....                                                                           | 44 |
| Şekil 4.10. Amonyum okzalot ortamında anilin monomeri ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarına ait CV eğrileri).....                                                            | 45 |
| Şekil 4.11. Sodyum salisilat ortamında anilin monomeri ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarına ait CV eğrileri.....                                                            | 46 |
| Şekil 4.12. Amonyum okzalot ortamında o-anisidin monomeri ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarına ait CV eğrileri.....                                                         | 47 |
| Şekil 4.13. Sodyum salisilat ortamında o-anisidin monomeri ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarına ait CV eğrileri.....                                                        | 48 |
| Şekil 4.14. Amonyum okzalot ortamında anilin monomeri ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponların görüntüleri .....                                                         | 49 |
| Şekil 4.15. Sodyum salisilat ortamında anilin monomeri ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponların görüntüleri .....                                                        | 50 |
| Şekil 4.16. Amonyum okzalot ortamında o-anisidin monomeri ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponların görüntüleri .....                                                     | 51 |
| Şekil 4.17. Sodyum salisilat ortamında o-anisidin monomeri ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponların görüntüleri .....                                                    | 52 |
| Şekil 4.18. Çıplak metal ve amonyum okzalot ortamında sentezlenmiş PANİ film kaplı kuponlara ait SEM görüntüleri.....                                                                  | 53 |
| Şekil 4.19. Amonyum okzalot ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş $\alpha$ -amilaz, DNaz ve glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri ..... | 53 |
| Şekil 4.20. Amonyum okzalot ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri ..... | 54 |

|                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.21. Şekil Çıplak metal ve sodyum salisilat ortamında sentezlenmiş PANİ film kaplı kuponlara ait SEM görüntüleri .....                                                                                      | 55 |
| Şekil 4.22. Sodyum salisilat ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş $\alpha$ -amilaz, DNAz ve glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri .....                            | 55 |
| Şekil 4.23. Sodyum salisilat ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri .....                            | 56 |
| Şekil 4.24. Çıplak metal ve amonyum okzalit ortamında sentezlenmiş POA film kaplı kuponlara ait SEM görüntüleri .....                                                                                              | 56 |
| Şekil 4.25. Amonyum okzalit ortamında o-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş $\alpha$ -amilaz, DNAz ve glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri .....                         | 57 |
| Şekil 4.26. Amonyum okzalit ortamında o-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri .....                         | 57 |
| Şekil 4.27. Çıplak metal ve sodyum salisilat ortamında sentezlenmiş POA film kaplı kuponlara ait SEM görüntüleri .....                                                                                             | 58 |
| Şekil 4.28. Sodyum salisilat ortamında o-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş $\alpha$ -amilaz, DNAz ve glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri .....                        | 58 |
| Şekil 4.29. Sodyum salisilat ortamında o-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri .....                        | 59 |
| Şekil 4.30. Çıplak metal ve amonyum okzalit ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri .....                                       | 64 |
| Şekil 4.31. Çıplak metal ve sodyum salisilat ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri .....                                      | 65 |
| Şekil 4.32. Çıplak metal ve amonyum okzalit ortamında o-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri .....                                   | 67 |
| Şekil 4.33. Çıplak metal ve sodyum salisilat ortamında o-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri .....                                  | 69 |
| Şekil 4.34. Farklı elektrolit ortamlarda anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran filmlerin çıplak kupona göre bağli antibiyofilm etkinlikleri, sodyum salisilat ve amonyum okzalit ..... | 70 |
| Şekil 4.35. Farklı elektrolit ortamlarda o- anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran filmlerin bağli antibiyofilm etkinlikleri, sodyum salisilat ve amonyum okzalit .....               | 71 |
| Şekil 4.36. Anilin monomeri ile enzimlerin koimmobilizasyonlarına ait CV eğrileri) ..                                                                                                                              | 73 |
| Şekil 4.37. o-Anisidin monomeri ile enzimlerin koimmobilizasyonlarına ait CV eğrileri .....                                                                                                                        | 75 |
| Şekil 4.38. Çıplak metal ve anilin monomeri varlığında amilaz ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş çeşitli enzimleri bulunduran kuponların görüntüleri .....                                                    | 76 |

|                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.39. Çıplak metal ve anilin monomeri ile enzim koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş çeşitli kuponların görüntüleri.....                                                                         | 77 |
| Şekil 4.40. Çıplak metal ve o-anisidin monomeri varlığında $\alpha$ -amilaz ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş çeşitli enzimleri bulunduran kuponların görüntüleri.....                          | 78 |
| Şekil 4.41. Çıplak metal ve o-anisidin monomeri ile enzim koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş çeşitli kuponların görüntüleri.....                                                                     | 79 |
| Şekil 4.42. Çıplak metal ve PANİ film içinde ko-immobilize $\alpha$ -amilaz-DNAz ve $\alpha$ -amilaz-glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri .....                        | 80 |
| Şekil 4.43. PANİ film içinde ko-immobilize $\alpha$ -amilaz- $\alpha$ -kimotripsin, $\alpha$ -amilaz-lipaz ve DNAaz- $\alpha$ -kimotripsin enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri ..... | 80 |
| Şekil 4.44. PANİ film içinde ko-immobilize DNAz- Lipaz, $\alpha$ -kimotripsin-lipaz ve $\alpha$ -amilaz-DNAz- $\alpha$ -kimotripsin-lipaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri .....  | 81 |
| Şekil 4.45. Çıplak metal ve POA film içinde ko-immobilize $\alpha$ -amilaz-DNAz ve $\alpha$ -amilaz-Glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri .....                         | 82 |
| Şekil 4.46. POA film içinde ko-immobilize $\alpha$ -amilaz- $\alpha$ -kimotripsin, $\alpha$ -amilaz-Lipaz ve DNAz- $\alpha$ -kimotripsin enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri .....   | 82 |
| Şekil 4.47. POA film içinde ko-immobilize DNAz-Lipaz, $\alpha$ -kimotripsin-Lipaz ve $\alpha$ -amilaz-DNAz- $\alpha$ -kimotripsin-Lipaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri.....     | 83 |
| Şekil 4.48. Çıplak metal kupona ait floresans mikroskobu görüntüsü.....                                                                                                                               | 86 |
| Şekil 4.49. Anilin ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri.....                                                                   | 87 |
| Şekil 4.50. o-Anisidin ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri.....                                                               | 88 |
| Şekil 4.51. Anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran filmlerin bağıl antibiyofilik etkinlikleri.....                                                                         | 89 |
| Şekil 4.52. o-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran filmlerin bağıl antibiyofilik etkinlikleri .....                                                                    | 90 |
| Şekil 4.53. Seçilen kaplamalara ait kuponlarda bulunan karbohidrat konsantrasyonları ( $\mu\text{g/ml}$ ).....                                                                                        | 91 |
| Şekil 4.54. Seçilen kaplamalara ait kuponlarda bulunan protein konsantrasyonları ( $\mu\text{g/ml}$ ).....                                                                                            | 92 |
| Şekil 4.55. Agar ortamında 25°C’de 14 gün geliştirilen biyofilm örnekleri 10.....                                                                                                                     | 94 |

## **SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

### **SİMGELER**

|     |                                                 |
|-----|-------------------------------------------------|
| °C  | : Derece Celsius                                |
| cm  | : santimetre                                    |
| dk. | : Dakika                                        |
| E   | : Potansiyel                                    |
| g   | : Gram                                          |
| I   | : Akım                                          |
| Kg  | : Kilogram                                      |
| L   | : Litre                                         |
| m   | : Metre                                         |
| M   | : Molar (mol / L)                               |
| mg  | : Miligram                                      |
| ml  | : Mililitre                                     |
| mm  | : Milimetre                                     |
| mM  | : Milimolar (mmol / L)                          |
| mV  | : Milivolt                                      |
| µg  | : Mikrogram                                     |
| µl  | : Mikrolitre                                    |
| nm  | : Nanometre                                     |
| rpm | : rotation per minute (dakikadaki dönme sayısı) |
| sn  | : saniye                                        |
| U   | : Enzim ünitesi (µmol / dk)                     |
| V   | : Volt                                          |

### **KISALTMALAR**

|                    |                                            |
|--------------------|--------------------------------------------|
| <sup>1</sup> H NMR | : Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi |
| 3D                 | : 3 boyutlu                                |
| Abs                | : Absorbans                                |
| AFM                | : Atomik kuvvet mikroskobu                 |
| Arg                | : Arginin                                  |
| BSA                | : Sığır serum albümin                      |
| CA                 | : Temas açısı ölçümü                       |
| CV                 | : Dönüşümlü voltametri                     |
| DAPI               | : 4' 6 - diamidino - 2 - fenilindol        |
| DNA                | : Deoksiribonükleik asit                   |
| DNAz               | : Deoksiribonükleaz I                      |

|                |                                                            |
|----------------|------------------------------------------------------------|
| EC             | : Enzim komisyon numarası                                  |
| <i>E. coli</i> | : <i>Escherichia coli</i>                                  |
| EDX            | : X-ray analizörlü enerji dağılımı spektroskopisi (EDS)    |
| EPS            | : Polimerik cıvıkk matriks                                 |
| FESEM          | : Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu                |
| FTIR           | : Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi              |
| GC- MS         | : Gaz kromatografisi- kütle spektroskopisi                 |
| GOD            | : Glukoz oksidaz                                           |
| IMO            | : Uluslararası Denizcilik Örgütü                           |
| kob (cfu)      | : Koloni oluşturan birim (colony forming unit)             |
| Lys            | : Lizin                                                    |
| MALDİ- TOF MS  | : Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon / iyonizasyon |
| MR- VIS        | : Manyetik rezonans görüntüleme                            |
| OECD           | : Ekonomik İşbirliği ve Gelişimi Örgütü                    |
|                | uçuş zamanı kütle spektrometresi                           |
| PANİ           | : Polianilin                                               |
| POA            | : Poli (o-anisidin)                                        |
| Pt             | : Platin                                                   |
| PVC            | : Polivinil klorür                                         |
| rRNA           | : ribozomal ribonükleik asit                               |
| SEM            | : Taramalı elektron mikroskobu                             |
| SPES           | : Sülfonlanmış polietersülfon                              |
| SS             | : Paslanmaz Çelik                                          |
| TGA            | : Termogravimetrik analiz                                  |
| TBT            | : Tribütiltin                                              |
| TLC            | : İnce tabaka kromatografisi                               |
| UV - VİS       | : Ultraviyole ve görünür bölge ışık spektrometrisi         |
| XPS            | : X-ışını fotoelektron spektroskopisi                      |

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Biyofouling

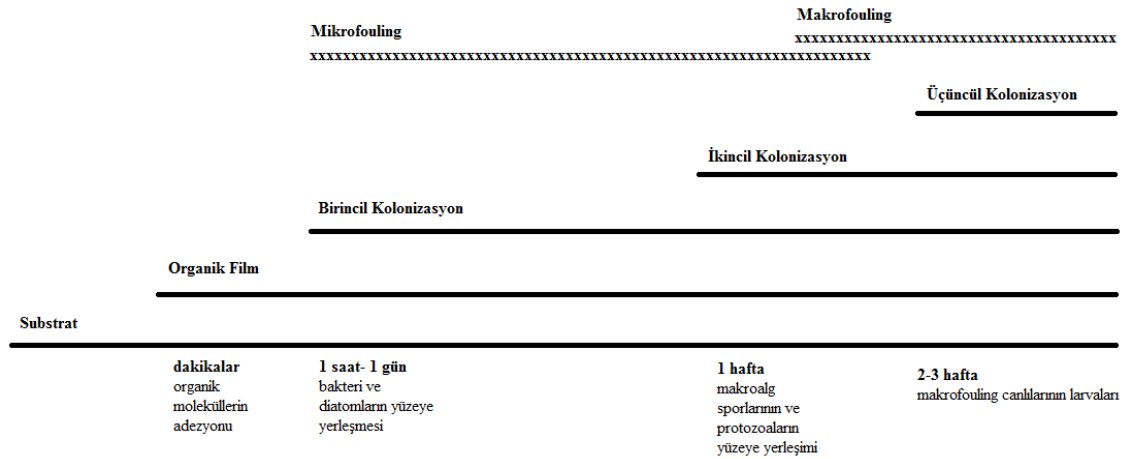
Mikroorganizmaların çoğu doğal çevrelerde, sıvı-katı ve sıvı-hava arayüzeylerini barındıran ortamlarda bulunur. Sulu ortamlarda, farklı amaçlar doğrultusunda kullanılan malzemelerin yüzeyleri, sıvı-katı ara yüzeyine sahiptir ve moleküller, proteinler, hücreler ile organizmaları adsorbe etme eğilimindedir (Banerjee ve ark., 2011). Bu yüzeylerde adsorbe edilebilen besin madde miktarı, sıvı ortamda bulunan miktardan daha fazladır (Madigan ve ark., 2003). Böylesi ortamlarda mikroorganizmalar tutunabilmek ve yaşamlarını devam ettirebilmek için bir maddeye ihtiyaç duyarlar. Mikroorganizmaların bu tür yüzeylere tutunduktan sonra yine kendileri tarafından hücre dışına salgılanan, ekstrasellüler polimerik cıvık bir matriks (EPS) vardır. Bu matriks, biyofilm olarak adlandırılır (Kaçar, 2009; Omuzbüken, 2016). Mikroorganizmalar tarafından üretilen bu yapı aynı zamanda mikroorganizmaların çeşitli çevresel streslere ve biyositlere karşı direnç göstermelerini sağlamaktadır (Chambers ve ark., 2006).

Bir genelleme yapıldığı takdirde, biyofilmin % 10-95 oranında polisakkarit, % 1-60 protein, % 1-10 arasında nükleik asit, % 1-40 yağ ve üronik asitler gibi çeşitli bileşenlerden oluştuğu görülür. Bu yapı kararlı olmakla birlikte, çevresel stresler ve değişimler doğrultusunda cevap oluşturma yeteneğine sahip dinamik bir sistemdir (Kaçar, 2009).

Özel bir durum olarak; deniz ortamındaki canlı veya cansız, doğal ya da insan yapımı yüzeyler üzerine tutunarak gelişim gösteren canlılara fouling organizmaları denilmektedir. Bu organizmaların gelişim süreci ise fouling olayı olarak adlandırılır (Geldiay ve Kocataş, 2002). Fouling kelime olarak, yüzey üzerinde gerçekleşen reaksiyonlar, korozyon veya kristalizasyon gibi durumları da ifade edebileceğinden organizmaların gerçekleştirdiği süreç biyofouling olarak adlandırılmaktadır (Railkin,2004).

### 1.1.1. Biyofouling Oluşum Süreci

Bir yüzey, su içine bırakıldığında, mevsim ve konumdan bağımsız olarak, Brownian hareketler, elektrostatik ilişkiler ve Van der Waals etkileşimleri sebebiyle bir kaç saniye içerisinde; polisakkarit, lipid ve protein gibi organik molekülleri adsorblayarak kaplanır. Özümlenebilir organik karbonun yüzey üzerinde birikimi mikrobiyal üremeyi teşvik eden maddelerin başında gelir. Bu tabaka oluşuktan sonraki 24 saat içerisinde biyofouling başlar. Bu adım birincil kolonizasyon olarak adlandırılır. Bu aşamada yüzeye, bakteri, diatom ve mayaların yerleşimi görülür. Daha sonra çevre koşullarının da elverişli olması durumunda; ikincil kolonizasyon başlar. Bu yaklaşık 1 hafta sonra gerçekleşir ve bu aşamada yüzeye; makroalg sporları, mantar ve protozoaların yerleştiği görülür. Biyofilm yapısında bulunan organik maddelerin yapışkan özellik göstermesi ve mikrobiyal kolonilerin biyofilmdeki düzensiz yerleşimi, ikincil kolonizasyon için daha fazla organizmanın yakalanmasına sebep olmaktadır. Yaklaşık olarak 2 ila 3. haftalardan itibaren üçüncül kolonizasyon gerçekleşir. Burada yüzeye omurgasız hayvanların larvalarının yerleşimi gözlenir (Callow ve Fletcher, 1994; Hellio ve Yebra 2009) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Biyofouling süreci

İlk aşamada gerçekleşen bakteriyel tutunma ve bunların oluşturdukları biyofilmin özellikleri üzerinde birçok faktör etkili olmaktadır. Bu faktörlerin başında yüzeyin özellikleri, elektriksel yükü, topografisi, suya karşı davranışı gibi yüzeyden kaynaklanan

etkenlerin yanında deniz suyunda bulunan yüklü iyonların negatif veya pozitif yüklü oluşu, deniz suyunun barındırdığı protein, şeker, yağ ve humik asitler gibi deniz suyundan kaynaklanan etkenler de bulunmaktadır. Yüzeye ve denize bağlı özelliklerin dışında hücreye bağlı özelliklerde tutunmayı ve biyofilmi etkilemektedir. Bu özellikler arasında, hücre yüzeyinin özellikleri, hücre uzantıları, hücre yüzeyinde bulunan uzun zincirli polimer yapıların varlığı sayılmaktadır. Foulinge sebep olan tür sayısının 4000'den fazla olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir. Ancak bu türlerin sadece küçük bir kısmı tanımlanabilmiştir (Yebra ve ark., 2006) . Ekonomik İşbirliği ve Gelişimi Organizasyonu (OECD), 1960 yıllarında Fransızlar tarafından oluşturulmuş ve o zamandan beri ekleme yapılan fouling türlerinin listesini yayınlamıştır (Almeida ve ark., 2007).

Fouling olayı, bölgesel olarak farklılık göstermektedir. Farklı coğrafik bölgelerin sunduğu; pH, tuzluluk, sıcaklık, çözünmüş madde miktarı ve çeşidi, çözünmüş oksijen miktarı gibi suya bağlı özellikler, yerel türler ve Güneş'ten gelen radyasyon miktarı, sentezlenen biyofilm üzerinde etkili olmaktadır. Bu özellikler arasında sayılan sıcaklık, biyofouling üzerinde en etkili olan parametredir. Sıcaklığın yüksek olduğu durumda, fouling daha yoğun iken düşük olduğu durumlarda baskılanır. En fazla biyofilm oluşumu, 20-40°C arasında gerçekleşirken bu aralığın dışında fouling olayının yavaşladığı, 10°C'nin altında ve 70°C'nin üzerinde durduğu tespit edilmiştir (Geldiay ve Kocataş, 2002). Buna bağlı olarak sıcaklık değişimlerinin az olduğu tropik iklim koşullarında foulinge neden olan tür sayısı hem daha fazladır ve fouling yıl boyunca devam etmektedir (Almeida ve ark., 2007).

### **1.1.2. Biyofoulingin Neden Olduğu Zararlar**

Fouling olayına, sorun olarak, kıyısız alanlarda daha çok rastlanmaktadır. Bu durumun başlıca sebebi, fouling organizmalarının kıyılarda daha çok bulunmasıdır. Ancak burada, gemi yüzeylerine yerleşen türler, gemilerle birlikte hareket etmektedir. Biyofoulingin neden olduğu zararlar arasında ekonomik kayıplar büyük bir bölüm oluşturmaktadır. Biyofouling gemilerde, yüzeyleri pürüzlendirdiği için artan oranda bir sürtünme direncine neden olur. Bu ise geminin hızını ve manevra kabiliyetini azaltır. Yapılan hesaplamalar göstermiştir ki, yüzeyde bulunan sadece ince bir film tabakası bile,

bu tabakanın neden olduğu s¼rt¼nme ve hız kaybının ¼zerinden gelinmesi i¼in, % 11 oranında güç gereksinimi artışına neden olmaktadır. Bu karşı, ağır biyofouling oluşumlarında bu değeri % 86'ya varabilmektedir (Shultz, 2007). G¼n¼m¼z k¼resel ticaretinin % 80'inden fazlasının deniz yoluyla ger¼ekleřtirildiđi göz ön¼ne alındığında, bu etkiler; işlemler i¼in artan yakıt maliyetlerine, daha uzun bağlama sürelerine, yoğun personel ve makine kullanımı nedeniyle mali kayıplara; havuz işlemlerinin sıklaşması dolayısıyla hem zaman kaybına ve toksik atık üretiminin artmasına neden olabilir (UNCTAD,2019).

Gemi pervanelerine yerleşen fouling organizmaları hem pervanenin manevra kabiliyetini etkilemekte hem de geminin ses izini değıştirerek aktif ve pasif sonar sistemlerinde sorunlara neden olabilmektedir (Chambers ve ark., 2006).

Biyofoulingin zararları arasında bir diğeri önemli kalem, çevre boyutudur. Biyofoulingin neden olduğu artan yakıt tüketimi, atmosferde artan CO<sub>2</sub>, SO<sub>x</sub> ve NO<sub>x</sub> emisyonlarına neden olur. Bu ise küresel ısınmaya katkı sağladığı gibi, asit yağmurlarının ve sağlık sorunlarının artmasına neden olmaktadır (Eyring ve ark, 2005). Çevre üzerine bir diğeri etkisi ise, istilacı türlerin gemilere yapışarak göçmesine neden olup biyolojik çeşitliliği riske sokmasıdır (Giraud, 2008).

## **1.2. Antifouling Uygulamaları**

Biyofoulingi azaltmaya veya önlemeye yönelik ger¼ekleřtirilen ¼alışmalara antifouling denilmektedir. Bu ¼alışmalar, insanlığın deniz ulaşımını keşfettiği zaman ile birlikte başlamıştır. Antifouling ¼alışmaları temelde ikiye ayrılır: organizmaların yüzeye tutunmasını engellemek ve yüzeye tutunmuş olan biyokirliliğın bozulmasını sağlamak. Antifouling ¼alışmaları tarih boyunca çeşitli aşamalardan geçmiştir. Antifouling uygulamalarının ilk zamanlarında; gemi yüzeyleri, balmumu, parafın, zift ve katran ile muamele edilmiştir (Almeida ve ark., 2007). M.Ö. 5.yy'da sülfür ve arsenik karışımı yağlar antifouling i¼in kullanılırken 13. ve 15.yy'lar arasında ağırlıklı olarak zift kullanımı gör¼lmektedir (Yebra ve ark., 2004). William Beale'ın almış olduğu, 1625 yılına ait patent, bakırın İngiltere'de antifouling amaçlı ilk kullanımını göstermektedir. 18. yy süresince de, bakır, birçok ¼lkede antifouling amaçlı olarak gemilerde kaplama olarak kullanılmıştır. Çeşitli yağların i¼erisinde dağılan bakır, cıva oksit veya arsenik gibi toksik

maddeleri barındıran antifouling boyaların kullanımı 19 yy. ortalarına denk gelmektedir. 1950 civarında ilk organometalik boyalar kullanılmaya başlanmıştır. Biyosit amaçlı kullanılan organometalik bileşikler arasında, RMeX genel formülasyonuna sahip bileşiklerde R organik radikal, Me metal, X halojen veya asit kalıntısını ifade etmektedir. Metalin cıva olması durumunda bileşik, organik cıva; arsenik olması durumunda organik arsenik; kurşun olması durumunda organik kurşun olarak adlandırılır. Tribütiltin (TBT); organik kalay içermektedir. 1970'li yıllarda kendi kendini temizleyen özelliği ile TBT kısa sürede tüm pazarın % 70'ine sahip olmuştur. Ancak TBT'in sadece biyokirlenmeye neden olan organizmalar üzerinde değil, diğer deniz organizmaları için de son derece zehirli olduğunun belirlenmesinin ardından 2001 yılında Uluslararası Denizcilik Örgütü'nün (International Maritime Organization, IMO) aldığı bir kararla, 1 Ocak 2003'ten itibaren üretimi; 1 Ocak 2008'den itibaren ise bu boyaların kullanımı tamamen yasaklanmıştır (Almeida ve ark., 2007). TBT'nin yasaklanmasıyla antifouling çalışmaları hız kazanmış ve çalışmalar genel olarak beş grupta sınıflanmıştır: 1. Kendi kendini temizleyen yüzeyler (biyomimik yaklaşım) 2. Kendiliğinden düzenlenen ince tabakalar 3. Polimer fırça yüzeyler 4. Mikro- nanoyapılı yüzeyler 5. Biyositler.

### 1.3. İletken Polimerler

İletken polimerler en genel anlamda, elektriği iletme yeteneğine sahip, organik polimerler olarak tanımlanabilir. Bunlar, metallerin sahip olduğu elektriksel iletkenliği, polimerlerin mekaniksel ve kimyasal özellikleriyle bütünleyerek, metallerle yarı iletkenler arasında bir iletkenlik gösteren polimerlerdir (Taş, 2007). elektronik ve optik özellikleri ile polimerlere benzeyen iletken polimerler, mekanik özellikleri ile metallere benzemektedir. Böylelikle üç farklı malzemenin özelliklerini bünyesinde toplamıştır. İletken polimerlerde konjuge çift bağ veya  $\pi$ -bağları bulunur. İletken polimerlerin iletkenliği, bu konjuge sistemler arasında elektronların delokalize hareketi sayesinde meydana gelir (Özyılmaz, 2004). Aynı zamanda bu konjuge çift bağlar sayesinde, bu polimerler ile yüzey kaplamaları gerçekleştirildiğinde hem yüzeyin elektrik iletkenliği devam etmekte hem de yüzeyler üzerinde bariyer oluşturarak yüzeyi korumaktadırlar (Yasmin, 2015).

Bu çalışmada anilin ve bir anilin türevi olan o-anisidin monomerleri (Şekil 1.2.)

kullanılarak homopolimerler oluşturulmuştur. Polianilin (PANİ), özellikle; düşük maliyetli oluşu, kolay hazırlanabilme özelliği, kararlılığı ve de elektrokimyasal olarak aktif olması sebebiyle çok çalışılan bir malzemedir (Waware ve ark., 2020). Bu özelliklerinin yanında, PANİ'nin; Gram (+), Gram (-) ve fungi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda; PANİ antimikrobiyal etkisini, polimer zincir üzerindeki asidik dopantların bakterilerle etkileşmesi ve bu etkileşimler sonucu gerçekleşen elektrostatik yapışmanın bakterinin ölümüne neden olmasıyla göstermektedir (Agarwala ve ark., 2014, Wang ve ark., 1999). *o*-anisidin ise diğer anilin türevlerine göre daha kolay polimerleşebilen bir monomerdur (Eğer, 2019).



Şekil 1.2. Anilin (a) ve *o*-anisidin (b) monomerlerinin kimyasal yapıları

#### 1.4. Enzimler

İlımlı koşullarda, en basit biyolojik reaksiyondan en karmaşığına kadar birçok biyolojik reaksiyonu katalizleyebilen, çoğı sadece protein yapısında olan biyokatalizörlere enzim denilmektedir. Enzimler, canlılar tarafından sentezlenir ve katalizinde görev aldıkları reaksiyondan değışmeden çıkarlar.

Enzimler gerekli şartların sağlanması durumunda *in vitro* koşullarda da aktivite gösterebilir. Bu durum, enzimlerin birçok endüstriyel alanda kullanımının artmasına yol açmıştır.

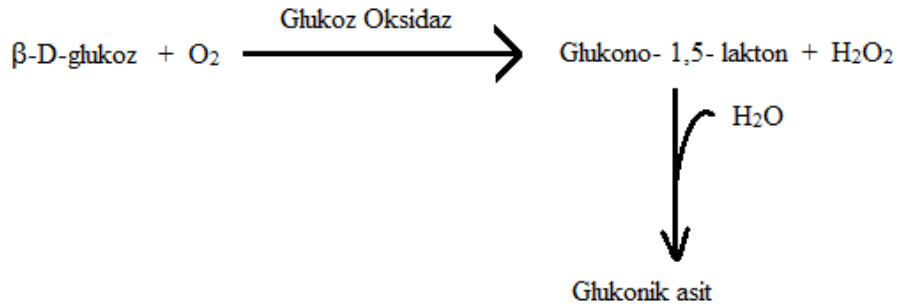
Enzimler çok geniş bir yelpazede etki gösterirler. Bu nedenle enzimlerin sınıflandırılması ihtiyacı doğmuştur. Enzimler sınıflandırılırken, her enzime, 4 sayıdan oluşan Enzim Komisyon numarası (EC numarası) denilen bir numara verilmiştir. İlk sayı enzimin sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara enzimin grubunu, dördüncü numara ise enzimin sıra numarasını belirtir. Enzimler altı sınıfa bölünmüştür. Bunlar; 1.

Oksidoredüktazlar, 2. Transferazlar, 3. Hidrolazlar, 4. Liyazlar, 5. İzomerazlar ve 6. Ligazlardır.

#### 1.4.1. Oksidoredüktazlar

Bu sınıfta bulunan enzimler, redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Bu ana sınıfta; dehidrogenazlar, oksidazlar, oksijenazlar, redüktazlar, trasnhidrogenazlar ve hidroksilazlar gibi alt sınıflar bulunur.

Bu grupta, glukoz oksidaz (GOD, EC 1.1.3.4) enzimi de bulunur. Bu enzim;  $\beta$ -D-glukoz: oksijen oksidoredüktaz olarak da bilir. *Aspergillus niger* kaynaklı olan GOD, 80 kDa ağırlığına sahip iki eş alt üniteden oluşur (Özyılmaz,2005). Bu enzim; glukozun moleküler oksijen ile yükseltgenip glukono- 1,5- lakton ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşturduğu reaksiyona etki etmektedir. Oluşan lakton sulu ortamda, enzimsiz olarak hidrolizlenerek glukonik aside dönüşür (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3.Glukoz oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon

Enzimin katalizlediği reaksiyon sonucunda açığa çıkan hidrojen peroksidin antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve antibiyotik olarak davrandığı belirlenmiştir (Keilin ve Hartree, 1948).

#### 1.4.2. Hidrolazlar

Hidrolaz sınıfında bulunan enzimler, suyun katıldığı parçalanma ve kondenzasyon reaksiyonlarını katalizler. Bu sınıfın altında; esterazlar, proteazlar, peptidazlar, nükleazlar ve fosfatazlar gibi alt sınıflar bulunur.  $\alpha$ -amilaz (EC 3.2.1.1), deoksiribonükleaz I (DNAz) (EC 3.1.21.1),  $\alpha$ -kimotripsin (EC 3.4.21.1), lipaz (EC 3.1.1.3) ve pektinaz (EC 3.2.1.x)

bu grupta bulunan enzimlerdendir.

$\alpha$ -amilazlar çokça çalışılmış olan ve iyi bilinen endoamilazlardır.  $\alpha$ -amilazlar kalsiyuma bağımlı metaloenzimlerdir. Bunlar kalsiyum yokluğunda işlev gösteremezler. Bunlar amiloz veya amilopektin zincirlerinin iç kısmında bulunan  $\alpha$ -1,4 glikozidik bağlar üzerine etkir.  $\alpha$ -amilazın substrat üzerine etkisiyle oluşan son ürünler, farklı sayısı alt birimden oluşan  $\alpha$ -konfigürasyonlu oligosakkaritler ve dallı oligosakkaritleri oluşturan  $\alpha$ -limit dekstrinlerdir. Reaksiyon sırasından nişasta zinciri üzerinde rastgele hareketlerde bulunup uzun zincirli karbohidratları parçalar. Bunun sonucunda; amilozdan maltotrioz ve maltoz oluştururken amilopektinden maltoz, glikoz ve  $\alpha$ -limit dekstrin oluşturur (Tiwari ve ark., 2015).

Deoksiribonükleazlar; DNA molekülünü spesifik olmayan noktalardan parçalayan enzim ailesinin genel adıdır. Kofaktör ihtiyacı ve aktif olduğu pH aralığı gibi parametrelere göre sınıflandırılır (Yang, 2011). Bu enzimlerin etkin olduğu optimum pH değerlerine göre deoksiribonükleazlar, nötral ve asidik DNaz'lar olarak ikiye ayrılır. Deoksiribonükleaz I (DNaz I), kofaktör ihtiyacı olan ve nötral DNaz'ları temsil eden, iyi bilinen bir enzimdir. pH 7-8 arasında aktivite gösterir ve aktivite göstermek için  $Mg^{+2}$  ile  $Ca^{+2}$  iyonlarına gereksinim duyar. Enzimin DNA molekülüne etkimesi sonucu 3'OH grubuyla biten ürünler oluşur (Zannoni ve ark.,2006).

$\alpha$ -kimotripsin, en iyi bilinen ve karakterize edilmiş olan proteinlerden biridir.  $\alpha$ -kimotripsin bir endopeptidazdır. Proteinlerin yanı sıra, peptid, ester, amid ve arilamidleri de hidrolizler. Aromatik amino asitlerin (triptofan, tirozin, fenilalanin) karboksil gruplarıyla dahil olduğu peptit bağlar için yüksek bir seçicilik sergiler (Appel, 1986).

Lipazlar, optimum pH aralığı 6-7,5 aralığında olan, ancak pH 4-8 arasında aktivite gösterebilen enzimlerdir. Genel olarak triaçilgliserolü, gliserol ve yağ asitlerine parçalayan bir enzim olarak tanımlanır. Ancak bu ester bağı hidrolizi dışında; susuz ortamda esterifikasyon olarak adlandırılan, bir yağ molekülü ile alkol molekülü arasında ester bağı oluşumunu da katalizler. Transesterifikasyon denilen; bir ester ile bir alkol arasında açıl radikalinin değişimini de katalizlediği gibi; interesterifikasyon denilen iki esterin yeni bir ester oluşturmada da etkindir (Rajakumara ve ark., 2008).

Pektinazlar; genel olarak polisakkaritleri parçalayan, zincir kırıcı enzimlerdir. Pektinazlar etki mekanizmalarına göre temelde pektinesterazlar ve depolimerazlar olarak iki ana sınıfa ayrılır. Depolimerazlar ise katalizledikleri reaksiyon mekanizmasına göre

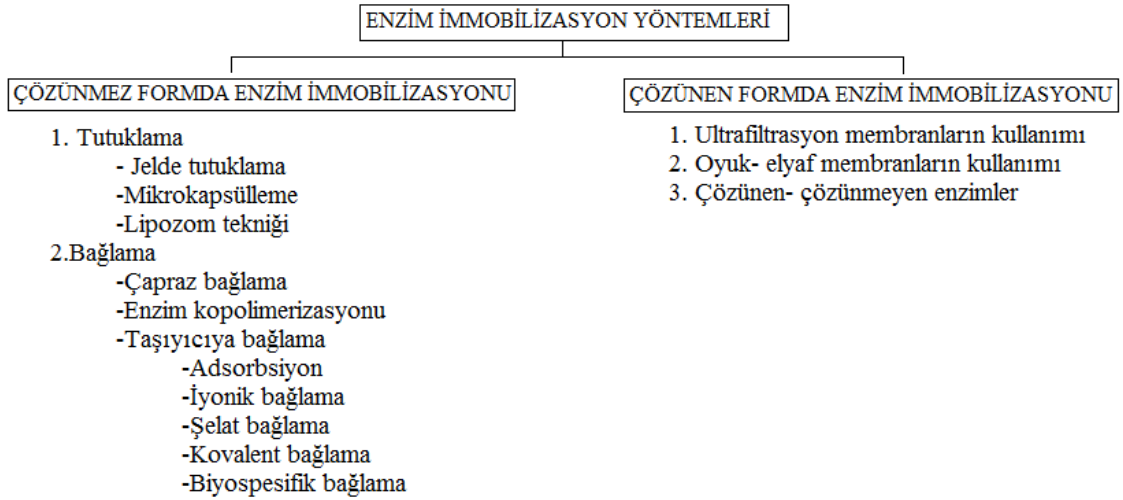
hidrolazlar (endopoligalakturonaz, ekzopoligalakturonaz) ve liyazlar (pektat-liyaz, pektin-liyaz) olarak ikiye ayrılır (Soares ve ark., 1999). Endopoligalakturonazlar; pektik asitlerin serbest karboksil ucuna yakın glikozidik bağları rastgele kırar. Ekzopoligalakturonazlar ise pektik asit zincirlerini sonundan parçalar. Bu hidrolizler sonucunda monomerler açığa çıkar. Pektin-esterazlar ise deesterifikasyonu katalizler. Serbest karboksil ucuna yakın esterli galakturonik asit artıklarına etki eder. Deesterifikasyon sonunda metanol ayrılır ve düşük esterli pektin veya pektik asitler oluşur (Yener, 2007).

### 1.5. Enzim İmmobilizasyonu

İmmobilizasyon; kelime olarak hareketsiz hale getirmek anlamına gelir. Serbest enzim kullanılması durumunda karşılaşılan sorunlardan bazıları enzim immobilizasyonu ile aşılabilmektedir. İmmobilize edilmiş enzimlerin serbest enzimlere karşı bazı üstünlükleri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Reaksiyon bitiminde ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilme
- Çevre koşullarına karşı yüksek dayanıklılık
- Uzun süre kullanım
- Sürekli proseslere uygunluk
- Ürün oluşumunun kontrolü
- Sıralı reaksiyonlar için kullanım kolaylığı
- Serbest enzimlere kıyasla daha yüksek aktivite
- Kendi kendini parçalama ihtimalinin azlığı

Şekil 1.4'te immobilizasyon yöntemleri verilmiştir.



Şekil 1.4. Enzim immobilizasyon yöntemleri

Temelde, çözünmez ve çözünen formda immobilizasyon olarak ikiye ayrılan immobilizasyon yöntemleri daha ayrıntılı incelenecek olursa; çözünmez formda immobilizasyonun tutuklama ve bağlama; çözünen formda ise ultrafiltrasyon veya oyuk-elyaf membranların kullanımı ya da çözünen-çözünmeyen enzim yöntemleri bulunmaktadır.

### 1.5.1. Çözünmez Formda Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

#### 1.5.1.1. Bağlama

Bağlama yönteminin altında üç grup bulunmaktadır: çapraz bağlama, enzim kopolimerizasyonu ve taşıyıcıya bağlama.

Çapraz bağlama yönteminde, suda çözünmeyen kompleksler oluşturulur. Bu kompleksler; en az 2 fonksiyonel gruba sahip reaktiflerin enzim birimlerinin arasında bağlar oluşturmasıyla meydana getirilir. Bu şekilde gerçekleştirilen immobilizasyonun derecesi; protein ve reaktif derişimine, enzimin özelliklerine ve pH değerine bağlıdır.

Enzim kopolimerizasyon yönteminde; enzimler, gerçekleştirilen kopolimerizasyon tepkimesinde monomerlerden biri gibi davranır ve matrikse bağlanır. Bu yöntem polimer matrikse tutuklanmaya benzer. Ancak enzim kaçışını önlemesi yönüyle bir üstünlüğü vardır.

Taşıyıcıya bağlama yöntemiyle immobilizasyonda beş farklı metod bulunmaktadır.

Temelde protein olan enzimin yapısından yararlanır. Bağlamada, enzim yüzeyindeki; iyonik gruplar, fonksiyonel gruplar ve hidrofobik bölgeler işlev görür. Enzim immobilizasyonunda çok çeşitli taşıyıcı membranlar kullanılabilir. Ancak taşıyıcı olarak kullanılacak materyalin; hidrofilik özelliğe sahip olması, gözenekli olması, partikül formunun uygun olması, termal ve kimyasal kararlılık göstermesi, ucuz olması, toksik olmaması gibi özelliklere sahip olması beklenir. Bunların yanında dikkat edilmesi gereken önemli bir başka özellik ise enzim ile taşıyıcı bağlanmasının enzimin aktivitesi için önemli olan gruplar üzerinden gerçekleşmemesi ve taşıyıcının enzim tarafından parçalanmamasıdır. Kullanılacak olan taşıyıcının reaktif olmaması durumunda bunun yardımcı bir reaktif ile aktive edilmesi gerekmektedir. Bu yöntem uygulanırken çok yumuşak koşullar (oda koşulları, nötral pH vb.) gerekmektedir.

#### **1.5.1.2. Tutuklama**

Tutuklama yönteminde, enzim molekülü herhangi bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmadan belirli bir mekanda durmaya zorlanır. Bu durum, tutuklama yöntemini kovalent ve çapraz bağlama ile immobilizasyon yöntemlerinde ayıran en önemli özelliktir. Bu yöntemde enzim mikrobiyal ataklara karşı korunabilir. Tutuklama ile immobilizasyon yöntemi üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme ve lipozom tekniğidir.

Polimer matrikse tutuklama yönteminde; bir enzim çözeltisi içerisinde yüksek derecede çapraz bağlı bir polimer oluşturulurken enzim molekülleri, çapraz bağlı ağlar arasında tutuklu kalmakta ve çözeltiye geçmesi engellenmektedir.

Mikrokapsülleme yönteminde, enzimler yarı geçirgen bir membran içerisinde tutuklanır. Dikkat edilmesi gereken, kullanılacak olan yarı geçirgen membranın gözenek boyutudur. Gözenekler, substrat ve ürünün giriş çıkışını engellemezken enzimin çıkışına izin vermeyecek boyutta olmalıdır. Yöntemin verimliliği, substrat moleküllerinin boyutu küçüldükçe artar.

Lipozom tekniğinin temeli sıvı- yüzey yapıcı membrana dayanır. Bu yöntemin en önemli avantajları arasında; süresiz oluşu, dönüşümlü oluşu ve tamamen fiziksel oluşu bulunmaktadır. Oldukça büyük bir temas yüzeyine sahip olan sıvı- yüzey yapıcı membran aynı zamanda tek adımda birden fazla enzimin immobilizasyonuna imkan tanır.

Yöntemin dezavantajları arasında ise; işlem sırasında enzimin inaktif oluşu, sıvı halde bulunan membrandan enzimin kaçma olasılığının yüksek oluşu ve substrat ile ürünün membrandan geçişinin bunların membranda çözünürlüğüne bağlı oluşu bulunmaktadır.

### **1.5.2. Çözünür Formda Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri**

Çözünür formda immobilizasyon yöntemi enzimin yarı geçirgen zarla çevrelenerek, enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı bir metottur. Burada enzim membranla herhangi bir fiziksel veya kimyasal etkileşime girmemektedir. Oyuk elyaf membranlar ve ultrafiltrasyon membranları substrat ve ürünlerin geçişine izin verirken enzim geçişini engellemektedir. Ayrıca bu membranlar enzimi mikropılardan korumaktadır. İmmobilize edilen enzimler desteğe fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmadığından enzimin geometrisi, esnekliği ve katalitik özellikleri etkilenmez. Bu yöntemin dezavantajı ise membranın substrat geçirgenliğidir. Substrat molekülünün boyutu ne kadar küçük ise membrandan geçiş o kadar kolaylaşacak dolayısıyla enzim etkinliği o kadar artacaktır.(Özyılmaz, 2005).

Bu çalışmanın amacı; büyük ekonomik kayıplara neden olan ve deniz biyoçeşitliliği üzerinde olumsuz etkileri olan denizel biyofilm oluşumunu, sürecin henüz ilk aşamalarında geciktirmeye yönelik, etkili bir enzim hapsedilmiş kaplama oluşturmaktır. Bu amaçla; paslanmaz çelik kuponlar üzerine, elektrokimyasal polimerizasyon yöntemi kullanılarak enzim immobilize edilen ve enzimsiz polimer kaplamalar sentezleyerek bunların gerçek deniz ortamında antifouling etkinliklerini test edilmiştir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Sha ve ark. (2022), eugenol temelli kendi kendini cilalayan bir polimer kaplama hazırlamışlardır. Suyu daldırma işlemiyle birlikte, fenolik esterlerin hidrolizi ile reçine segmenti; hidrofobik özellikten hidrofilik özelliğe dönüşüm gerçekleştirmektedir. Bu durum sayesinde dış ortama toksik olmayan doğal eugenol salınımı gerçekleşmektedir. Yapay deniz suyuyla gerçekleştirilen çalışmada, daldırmanın gerçekleştiği anda salınım miktarı en yüksek olup ( $0,48 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{gün}$ ) ardından sabitlenme eğilimi ( $0,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{gün}$ ) göstermiştir. Midye bağlama deneyleri gerçekleştirilmiş ve midyelerin yüzeyden kaçınma eğiliminde olduğu görülmüştür.

İbrahim ve ark. (2022), çalışmalarında bir grafen oksit- manganoksit nanohibrit sentezini gerçekleştirmişler ve bunu sülfonlanmış polietersülfon (SPES) ultrafiltrasyon membranlarına uygulamışlardır. Kompozit membranları, faz inversiyon yöntemiyle hazırlamışlar; membranları, SEM, yüzey zeta potansiyeli, su akışı, gözeneklilikleri belirleyerek karakterize etmişlerdir. Tekrar kullanılabilirliği, membranın anti-fouling özelliğine bakarak test etmişlerdir. Bu amaçla gerçekleştirilen denemede; membranlarla ağır metal filtrasyonu gerçekleştirmiş ve ardından membranlar metallerin desorbsiyonu için 30 dk boyunca  $0,50\text{M}$  HCl ile temizlendikten sonra distile su ile yıkamışlardır. Daha sonra distile su akışı ölçülerek anti-fouling özelliği araştırarak, nanokompozit uygulanmamış olan membranlarda temizleme sonrası  $\% 72,6 \pm 3,1$  başlangıç akışı geri kazanılırken kompozit membranlarda bu değer  $\% 90,5 \pm 2,9$  olarak hesaplamışlardır.

Cao ve ark. (2021), SS 304 yüzeyini dopaminle modifiye ettikten sonra, yüzeyi Turgencin BMox2 ile kaplayarak, kaplamanın antifouling ve antikorozyon etkilerini incelemişlerdir. Yüzeyin modifikasyon öncesi ve sonrasında fiziksel ve kimyasal özelliklerini; Fourier dönüşümü kızılötesi spektrometresi (FTIR), X-ışını fotoelektron spektrometresi (XPS); temas açısı ölçümü (CA), 3D optik profilometre, elipsometre ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterize etmişlerdir. Başarılı bir şekilde yüzeyi kaplayan antimikrobiyal peptidin laboratuvar koşullarında; *Vibrio natriegens* ve *Phaeodactylum tricornutum* ile gerçekleştirilen antifouling testlerinde kaplanmamış yüzeylere kıyasla, sırasıyla  $\% 99,85$  ve  $\% 67,93$  oranında azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Karlsen ve ark. (2021), gerçekleştirdikleri çalışmada altın model yüzeyine kovalent

olarak bağlanan antimikrobiyal peptidlerin anti-fouling özelliklerini incelemişlerdir. Altın yüzey, bir asetilen ile sonlanan, kendi kendine düzenlenmiş bir polietilen glikol tekli tabakası ile modifiye ederek peptidleri yüzeye, bakır katalizli azid- asetilen bağlanmasıyla kovalent olarak bağlamışlardır. Yüzeylerin anti-fouling etkinliklerini Certika çoğalma tayini ile tespit etmişler; bu amaçla bakteri olarak *S. epidermidis* kullanarak ve 5 saat gözlemlemişlerdir. Süre sonunda, kullanılan antimikrobiyal peptit örneklerinde, bakteriyel kolonizasyonda 6 log birime kadar bir azalma elde etmişlerdir.

Yao ve ark. (2020), femtosaniye lazer ışınlama ve florlama tekniğinin bir kombinasyonunu kullanarak, kendi kendini temizleyen paslanmaz çelik, 304SS, yüzeyler elde etmişlerdir. Yüzey serbest enerjisi ve bunun polar ile dağılmış bileşenleri, Owens-Wendt-Rabel-Kaelble yöntemini kullanılarak hesaplamışlardır. Yüzey morfolojisini analizlemek için XPS kullanmışlar; yüzeyin antifouling özelliğini yüksek hızlı kamera kullanarak kaydetmişlerdir. Florlama işlemiyle, su kayma açıları azaltılmış, bu sayede kendi kendini temizleme ve düşük yapışma özelliğine sahip süperhidrofobik yüzeyler elde etmişlerdir. Gerçekleştirilen çalışmada antifouling özellik yanında fouling ajanlarıyla su damlacıkları arasındaki etkileşim süreçlerini de incelemişler; florlanmış yüzeylerin, yüzey serbest enerjileri işlem görmemiş örneklerle kıyasla daha düşük antifouling özelliklerini daha yüksek bulmuşlardır.

Aykın ve ark. (2019), gerçekleştirdikleri çalışmada ticari olarak alınan;  $\alpha$ -amilaz, ksilanaz, glukanaaz, proteaz, pektinaz, lipaz, viscoyme kompleks ve lysing kompleks, ticari hidrolik enzimlerinin, biyofilm oluşturan *Pseudoalteromonas agarivorans* FJ040188, *Vibrio lentus* FJ200649 ve *Exiguobacterium homiense* FJ200653 deniz bakterilerine karşı gösterdikleri antibiyofilm etkilerini incelemişlerdir. Mikroplakada, steril deniz suyunda, 20°C'de, 24 saat süresince gerçekleştirilen inkübasyon sonucunda bakterilerin yapışması ve toplam biyofilm miktarının belirlenmesine yönelik iki çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bakteri yapışmasının önlenmesine yönelik olan çalışmada enzimler bakterilerden bir saat önce mikroplakalara alınmış, toplam biyofilm miktarının belirlenmesine yönelik çalışma için ise enzimleri bakterilerden bir saat sonra ortama eklemişlerdir. Süre sonunda DAPI boyama tekniği ile epifloresans mikroskobu aracılığıyla yapılan incelemede; lysing kompleksin her iki testte de en başarılı sonuçları verirken sadece glukanaazın beklenildiği yönde sonuç göstermediğini tespit etmişlerdir.

Aykin ve ark. (2018), ticari olarak alınan proteaz,  $\alpha$ -amilaz, lipaz, ksilanaz, pektinaz, glukanaaz, viscozyme ve lysing kompleksi; İzmir Körfezi'nden izole edilen *P.porphyræ* ve *P.elyakovii* üzerinde 3 ile 24 saat inkübe edilerek antifouling etkilerini araştırmışlardır. Antifouling özellik tayinini, DAPI kullanılarak, total biyofilm biyokütle kantifikasyonu ile gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak; *P.porphyræ* ve *P.elyakovii* proteaz ile 24 saat inkübasyonla; *P.elyakovii* 3 saatlik inkübasyonla etkilenmiş; lysing kompleksi, viscozyme, ksilanaz, pektinaz ve  $\alpha$ -amilaz farklı konsantrasyonlarda 24 saat inkübasyonlarla biyofilm bakterilerine etki etmiştir. Lipaz ise sadece *P.porphyræ* üzerine 3 ve 24 saatlerde etkili olmuştur.

Balasubramanian ve ark. (2018), çalışmalarında, nadir deniz biyofilm bakterisi *Kocuria rosea*'dan tanımlanan lanosterol, vinil reçine boyaya dahil edilerek deniz koşullarında antifouling etkisini incelemişlerdir. İlk aşamada PVC (poli vinil klorür) plakaları, Hindistan'ın Tamil Nadu kıyısında, 10 farklı istasyondan derinliği 2 m'yi geçmeyecek seviyelerde daldırıp, 30 dk, 1, 2, 4, 5 ve 6 saat süreler sonunda çıkararak biyofilmleri toplamış, bakteri izolasyonları gerçekleştirmiş ve fenotipik metod ile 16S rRNA gen sekans metodu ile NCBI veritabanında bulunan bakteriyel sekanslarla BLAST kullanarak karşılaştırmış ve bakterilerin tanımlanmasını gerçekleştirmişlerdir. İzole edilen *K. rosea*'dan biyoaktif sekonder metabolitleri ekstrakte edip FTIR ve GC-MS ile karakterize ettikten sonra, ilk olarak in vitro koşullarda 24 saat süre sonunda 595 nm'de UV-vis absorpsiyon spektrumunu alarak antifouling özelliklerini test etmişlerdir. Son aşamada vinil reçineyi bağlayıcı, poliamidi sertleştirici olarak kullanarak kaplama çözeltisinin içerisine test edilecek olan lanosterolü 10, 100 ve 1000  $\mu\text{g}$  ekleyerek, plakalara 75  $\mu\text{m}$  kalınlığında uygulamışlardır. 1 haftalık kuruma sürecinin ardından plakaları Tamil Nadu kıyısından, yaklaşık olarak 2m derinliğe bırakmışlardır. Kuponların denize bırakıldığı bir yılsonunda boyaya eklenen lanosterol konsantrasyonuna bağlı olarak görülen fouling miktarı farklılık göstermiştir. 10  $\mu\text{g}$  lanosterol uygulanan kuponlarda ortalama 0,16  $\text{kg}/\text{m}^2$ , 100  $\mu\text{g}$  uygulandığında 0,095  $\text{kg}/\text{m}^2$  ve 1000  $\mu\text{g}$  uygulandığında 0,02  $\text{kg}/\text{m}^2$  fouling görülmüş; lanosterol uygulanan alanlarda herhangi bir makro fouling organizmasına rastlamamışlardır.

Cao ve ark. (2018), çalışmalarında dopamin ile modifiye edilmiş SS 304 yüzeyini, zayıf alkali ortamda gümüş nanopartiküllerle kaplamışlardır. Kaplı yüzeyin, yüzey morfolojisi ve kimyasal bileşimi; alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM),

AFM ve XPS ile analizlemişlerdir. Yapay deniz suyuyla gerçekleştirilen antifouling testlerinde 24 saat inkübasyon sonunda, kaplamanın *Escherichia coli* (% 99,9) ve *Staphylococcus aureus* (% 99,5) bakterilerinin ve *Chlorella pyrenoidosa* (% 98,5), *Phaeodactylum tricornutum* (% 98,2) ve *Naviculaceae spp* (% 98,7) deniz yosunlarının yüzeye bağlanmasını azalttığını rapor etmişlerdir.

Feng ve ark. (2018), X65 çelik boruları elektrodpozisyon tekniği ile çinko nano kaplamalar ile kaplamışlardır. Su temas açısını çevresel gonyometre ile ölçmüş; yüzey morfolojisi ve bileşimini SEM ve EDX ile karakterize etmişlerdir. FTIR ile hazırlanan kaplamaların yapısını ve fonksiyonel gruplarını incelemiş; hazırlanan nano kaplamaların antifouling özelliğini, kaplanmış olan çelik yüzeylerin bir çamur sıvısına ve toprak altına daldırarak test etmişlerdir. Süperhidrofobik yüzeylerin antifouling yeteneğinden yola çıkılarak gerçekleştirdikleri denemelerde yüzeyleri 1 dk ve 1 saat boyunca çamur çözeltisine daldırış; 1 saat sonunda çinko kaplı yüzeyde bir birikim görülmezken çıplak metalde kahverengi çamur ve demir pası gözlemlenmiştir.

Rostam ve ark. (2018), gerçekleştirdikleri çalışmada, sülfonatlı polietersülfon/ polirodanin (SPES/ PRh) membranlar üretmişlerdir. Elde edilen membranların karakterizasyonunu FTIR, FESEM, temas açısı, <sup>1</sup>H NMR, TGA ve EDS analizleri ile yapmışlardır. SPES/ PRh membranının hidrofilikliğini geliştirdiğini ve sulu çözeltiler için daha iyi akış sağlandığını rapor etmişlerdir. SPES membranıyla karşılaştırıldığında akış 58,21 L/m<sup>2</sup>.sa değerinden SPES/ PRh membranı için 139,78 L/m<sup>2</sup>.sa değerine yükselmiştir. Gerçekleştirilen operasyonel performans, antibakteriyel ve antibiofouling testlerinden sonra SPES/ PRh membranının gelişmiş akış, daha yüksek birikim reddetme, antifouling etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Quan ve ark. (2018), polianilin, benzil süstitüye polianilin (BP) ve bromin-benzil disüstitüye polianilini (BBP) kimyasal oksidasyon yöntemiyle hazırlayarak, bunların karakterizasyonunu SEM, FTIR, AFM, UV-Vis absorpsiyon spektrumunu, ıslanabilirlik, termogravimetrik, antibakteriyel ve antifouling analizlerle karakterize etmişlerdir. Antifouling testi, laboratuvar koşullarında *E. coli* kullanılarak iki hafta süresince, 10<sup>9</sup> kob başlangıç birimi içeren ortamlara daldırılarak gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen denemeler sonrası, denemeler 30 gün süreyle durgun bir nehirde de gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda nehirde çıkarılan örneklerin üzerinde neredeyse hiç birikimin olmadığı görülmüştür.

Wu ve ark. (2016), glisidol ile 1,1,1- trimetilopropanı başlatıcı olarak kullanarak anyonik, halka açıcı polimerizasyon ile dentrik poligliserol sentezlemişlerdir. Dentrik poligliseroidroksil (dPG) grupları mesilasyon, nükleofilik süstitüsyon ve redüksiyon adımları kullanarak % 5 amin gruplarıyla modifiye etmişlerdir. Modifiye edilen dPG’i cam yüzey üzerine kovalent olarak bağlamışlardır. Cam yüzeylerin modifikasyonundan sonra, yüzeyleri zaman kaybetmeden peroksidaz, GOD, glukoz ve dPG varlığında hidrojel filmler ile kaplamışlardır. Bu kaplama, glukoz varlığında sürekli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> salmaktadır. Antibakteriyel tayin; 100 ml'lik flasklara, kaplanmış cam parçaları ile 25ml *Pseudomonas putida* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerinin OD<sub>540</sub>; 0,03; 0,10; 0,30 ve 1,0 süspansiyonları konarak, 24 saat boyunca 30°C'de, 60 rpm ile inkübasyonu sonrasında kolonilerin sayılması ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre; kaplamanın *Pseudomonas putida* bakterisine karşı % 100 antifouling etki gösterdiğini ancak bu etkinin *Staphylococcus aureus* için % 40 dolaylarında kaldığını rapor etmişlerdir.

Baldissera ve ark. (2015), gerçekleştirdikleri çalışmada ticari olarak satılan, bakır (I) oksit ile titanyum dioksit içeren boyaya PANİ'nin çeşitli şekillerden doplanmış hallerini katkı maddesi olarak eklemişlerdir. Bu boyayı, Brezilya'da bulunan Tramandai nehrine, çelik plakalara iki kat sürdükten sonra ve Akdeniz'de kıyısı olan Fransa, Toulon şehrinden PVC plakalara iki kat sürerek suya bırakmışlar ve farklı zaman aralıklarında çıkarıp incelemişlerdir. Toplam suda kalış süresi 53 hafta olarak belirlenmiştir. Yüzey analizlerini FTIR spektroskopisi, termogravimetrik analiz, elektriksel iletkenlik ve SEM ile; korozyon testlerini ise tuz pürkürtme, erozyon ve sızdırma testleri ile gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak, PANİ katkı maddesi içeren boyaların, içermeyen boyalara göre daha yüksek antifouling etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Rane ve ark. (2015), çalışmalarında gram pozitif bakterilerin ürettiği biyofilm üzerine antifouling etkinlik gösteren, deniz kaynaklı bromopirrol alkaloidlerden türetilen 17 farklı sentetik organik bileşik sentezlemişlerdir. Antibiyofilm tayini için; Meticiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), Meticilin dirençli *S. aureus* (MRSA), *Streptococcus epidermidis* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerini kullanmışlardır. 96 kuyucuklu mikropalakalar içerisinde 37°C'de 6 saat inoküle edilen bakterilere farklı konsantrasyonlarda bileşikler ilave ettikten sonra mikropalakaları 37°C'de 24 saat inkübe etmişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin çoğu, MSSA ve MRSA bakteri suşlarının biyofilm oluşumuna karşı antifouling özellik göstermiştir. 2-(4,5-Dibromo-1-metil-1H-pirol-2-yl)-

5-(2,4-diklorofenil)- 1,3,4-okzadiazol bileşiği, MSSA suşuna karşı standart referans olarak kullanılan Vancomisin'e kıyasla 4 kat daha yüksek antifouling özellik gösterirken, aynı suşa karşı 4-(5-(4,5-Dibromo-1-metil-1H-pirol-2-yl)-1,3,4-okzadiazol-2-yl) anilin, 2-(4-Klorofenil)-5-(4,5-dibromo-1-metil-1H-pirol-2-yl)-1,3,4-okzadiazol, 2-(4,5-Dibromo-1-metil-1H-pirol-2-yl)-5-(4-metoksifenil)-1,3,4-okzadiazol, 2-(4,5-Dibromo-1-metil-1H-pirol-2-yl)-5-(4-nitrofenil)-1,3,4-okzadiazol ve 2,5-bis(4,5-dibromo-1-metil-1H-pirol-2-yl)-1,3,4-okzadiazol bileşikleri 3 kat daha yüksek antifouling özellik göstermiştir.

Polidietil siloksan (PDMS), biyofouling dışındaki fouling çeşitlerine karşı etkili olmakla birlikte bakteri ve diatomlar gibi organizmaların neden olduğu mikrobiyal kirlenmeye eğilimlidir. Sankar ve ark. (2015), gerçekleştirdikleri çalışmada, yüksek fouling özelliklerine sahip kompozitler oluşturmak için PDMS matrisine metal oksit nanoparçacıkları dahil etmişlerdir. Bu amaçla; CuO ve ZnO (ağırlıkça % 0,1 oranında) kullanmış; antibiyofilm özellikleri *B. Flexus* bakterisi ve *Navicula sp.* diatomuna karşı laboratuvar koşullarında test edildikten sonra kaplanan paslanmaz çelik yüzeyler, açık denizde 1 metre derinliğinde 45 gün inkübe ederek araştırmışlardır. Laboratuvar koşullarında, 24 saat sonunda, bakteri canlılığı Live/ Dead BacLight, bakteriyel yaşam kiti kullanarak kantitatif olarak belirlemişlerdir. Klorofil analizini spektrofotometrik olarak gerçekleştirmiş; denize daldırılan yüzeyleri belirli periyotlarda denizden çıkarak fotoğraflamışlardır. Denizde 45 gün inkübasyon sonrası tüm nanokompozitlerin, PDMS kontrol yüzeyine göre daha yüksek performans göstermiş olmakla birlikte en yüksek antifouling etkimliğini % 80 oranıyla PDMS içerisine ZnO nanopartiküllerinin eklendiği kaplamanın gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Majik ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada; izole etmiş oldukları 9 fouling bakterisi üzerinde, Kirby- Bauer disk difüzyon metodunu kullanarak, 28°C'de 24 saat süresince, izatin ve sentezlenen 13 türevinin antifouling özelliğini incelemişlerdir. Sentezlenen türevleri; MR-VIS, FTIR, <sup>1</sup>H NMR; Accurate-Mass TOF LC/MS, TLC, kolon kromatografisi ile incelemiş; izatin türevlerini alkalilasyon, brominasyon ve Wiiting reaksiyonlarıyla elde etmişlerdir. Sentezlenmiş olan (E)- 3- (2-okzopropiliden) indolin-2- on bileşiğinin, türevlendiği izatin bileşiğinden daha yüksek antifouling etkinliğe sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Zanaroli ve ark. (2011), ticari olarak elde ettikleri;  $\alpha$ -kimotripsin, fisin,  $\alpha$ -amilaz,

selüloz ve lipaz enzimlerinin antifouling etkilerini yapay deniz suyunda, Trieste Körfezi'nden (İtalya) elde ettikleri mikroorganizma karışımının oluşturduğu biyofilm üzerinde denemişlerdir. 20°C'de, karanlık ortamda, 5 ile 10 gün inkübe edilen mikropalakalar üzerinde, biyofilm üretim miktarını % 0,005 kristal viyole boyama yöntemiyle araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, seçilen enzimlerin tek başlarına biyofilm üzerinde etkili olmadığını ancak  $\alpha$ -kimotripsin,  $\alpha$ -amilaz ve lipaz enzimlerinin bir karışımı kullanıldığında, katı yüzeye bakteri adezyonunun % 90 oranında azaldığını rapor etmişlerdir.

Kristensen ve ark. (2010), gerçekleştirdikleri çalışmada, enzimatik olarak hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) üreten, nişasta, glukoamilaz ve heksoz oksidaz enzimi içeren bir kaplamanın bir dizi laboratuvar ve gerçek deniz ortamında antifouling etkisini incelemişlerdir. Çözünmüş  $H_2O_2$ , mikropalakalarda test edilen dokuz deniz *Proteobacteria*'sinden sekizinde bakteriyel biyofilm oluşumunu engellediğini, ancak kaplamadan salınan  $H_2O_2$ 'in doğal deniz suyunda, bakteri kaynaklı biyofilm oluşumunu engelleyemediği rapor edilmiştir. Kuzey Denizi'nde 97 gün boyunca inkübe edilen kaplamaların bulunduğu denemede ise; enzimsiz kaplamada 35-40 kabuklu hayvan, % 10 oranında alan kaplayan diatom ve % 15 oranında alan kaplayan tunikatlar bulunurken; enzim içeren kaplamalarda yalnızca 6-12 kabuklu hayvan, % 10 oranında alan kaplayan diatom gözlenmiş ve tunikat tespiti yapılmamıştır. Bu sonuç,  $H_2O_2$  salınımı gerçekleştiren enzim içeren kaplamaların bakır içeren ticari kaplamalara benzer performansa sahip olduğunu göstermektedir.

Olsen ve ark. (2010), çalışmalarında hacimce % 30 nişasta ve glukoamilaz ile heksoz oksidaz enzimlerini içeren kaplama malzemesini püskürterek kurutma yöntemini kullanarak yüzeyleri kaplamışlardır. Burada ilk olarak glukoamilaz tarafından nişastanın glukozu parçalanması ardından heksoz oksidaz enzimi ile kontrollü  $H_2O_2$  salınımı amaçlanmıştır. Bu şekilde kaplanmış olan malzemeleri; gerçek deniz ortamına, Singapur (tropikal iklim) ve Barselona (Akdeniz iklimi) kıyı açıklarına 8 ve 14 hafta boyunca daldırmışlar, yapılan uygulamanın antifouling etkisinin ticari olarak satın alınan kaplamalara göre yetersiz kaldığını rapor etmişlerdir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Elektrotlar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan elektrotlar Çizelge 3.1'de sıralanmıştır.

Çizelge 3.1. Kullanılan elektrotların bileşim ve özellikleri

| Elektrot          | Bileşimi                | Özellikleri                                 |
|-------------------|-------------------------|---------------------------------------------|
| Referans elektrot | Ag/ AgCl                | 3M KCl, HACH 5240                           |
| Karşı elektrot    | Platin (%99,99)         | 3,64 cm <sup>2</sup> alanlı kare levha      |
| Çalışma Elektrodu | Paslanmaz çelik (SS304) | 4,5 cm <sup>2</sup> alanlı dikdörtgen levha |

Çalışma elektrodu olarak kullanılan SS304 paslanmaz çeliğin elementel bileşimi Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışma elektrodu olarak kullanılan SS304 elektrodunun elementel bileşimi (% w/w) (Özyılmaz ve ark., 2006)

| Elektrot | C     | Mn   | Si   | S    | P     | Ni   | Cr    | Mo   | Cu   | Co   |
|----------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|------|------|
| SS 304   | 0,038 | 1,31 | 0,36 | 0,01 | 0,036 | 8,16 | 18,10 | 0,32 | 0,25 | 0,05 |

##### 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Amonyum okzalit, disodyum okzalit, sodyum *p*-toluen sülfonat, sodyum salisilat, anilin,  $\alpha$ -kimotripsin (EC 3.4.21.1, 25 kDa, 350 U/mg , sığır pankreası), kristal viyole, glasiyel asetik asit, etanol (%100), glukoz, sodyum klorür Merck firmasından; sodyum molibdat dihidrat,  $\alpha$ -amilaz (EC 3.2.1.1, 50 kDa, 35,9 U/mg, *Aspergillus oryzae*), deoksiribonükleaz I (EC 3.1.21.1, 31 kDa, 2000 U/mg, sığır pankreası), glukoz oksidaz (EC 1.1.3.4, 160 kDa, 17300 U/g, *Aspergillus niger*), lipaz (EC 3.1.1.3, 48 kDa, 300 U/mg, domuz pankreası), pektinaz (EC 3.2.1.x, 42 kDa, 3800 U/ml, *Aspergillus aculeatus*), agar, maya ekstraktı, sığır serum albümini (BSA), 4',6-diamino-2-fenilindol(DAPI) ve Coomassie Brilliant Blue G-250 Sigma Aldrich firmasından; sülfürik

asit, formaldehit, fosforik asit ve fenol Tekkim firmasından; o-anisidin Fluka firmasından tedarik edilmiştir.

### 3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

| <b>Kullanılan Cihazlar</b>         | <b>Marka</b>                    | <b>Kullanım Amaçları</b>                                                                              |
|------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dijital hassas tartı               | Radwag AS 220/C/2               | Kimyasal maddelerin ağırlığının ölçümü                                                                |
| Manyetik karıştırıcı               | Velp Are / Velp AreD            | Çözeltilerin hazırlanması ve ısıtılması                                                               |
| Hassas otomatik pipet              | Eppendorf/100µL, 1000µL, 5000µL | Hassas miktarlarda sıvı kimyasal çekimi                                                               |
| Kesintisiz güç kaynağı             | Tunçmatik Newtech Pro II X9     | Elektrokimyasal çalışma istasyonu için                                                                |
| Elektrokimyasal çalışma istasyonu  | CH Instrumants 660B (SN.A1420)  | Elektrot kaplama işlemleri                                                                            |
| pHmetre                            | WTW pH538 MultiCal              | pH ölçümlerinin gerçekleştirilmesi                                                                    |
| pH elektrodu                       | WTW Sentix 41                   | pH ölçümlerinin gerçekleştirilmesi                                                                    |
| Fotoğraf makinesi                  | Canon /EOS-5D                   | Kupon yüzey fotoğraflarının çekilmesi                                                                 |
| Lens                               | Canon/EF 100mm Ultrasonic Macro | Kupon yüzey fotoğraflarının çekilmesi                                                                 |
| Flaş                               | Canon/SpeedLite430EX            | Kupon yüzey fotoğraflarının çekilmesi                                                                 |
| Spektrofotometre                   | Perkin Elmer UV/VIS Lambda 25   | Kaplama yüzeylerindeki biyofilm miktarlarının toplam karbohidrat ile toplam protein kantitatif tayini |
| Kondüktometre                      | Inolab/Cond 7110                | Deniz suyuna ait bazı parametrelerin tayini                                                           |
| Floresans mikroskop                | Nikon/Eclipse Ni                | Kaplamaların yüzey yapı morfolojilerinin eldesi                                                       |
| Taramalı elektron mikroskobu (SEM) | Carl Zeiss/Sigma 300 VP         | Kaplamaların yüzey yapı morfolojilerinin eldesi                                                       |
| Yüzey analizi dedektörü            | EDAX dedektör                   | EDX analizleri                                                                                        |
| Ultrasonik homojenizatör           | Bandelin /Mini 20               | Kuponlar üzerinde oluşan biyofilmlerin yüzeylerden toplanması                                         |
| Santrifüj                          | Hettich/ Universal 320R         | Kuponlar üzerinde oluşan biyofilmlerin yüzeylerden toplanması                                         |
| MALDI TOF MS                       | Bruker Daltonik MALDI Biotyper  | Mikrobiyolojik tanımlama                                                                              |

Çizelge 3.3’de sıralanmış olan cihazlara ek olarak, çalışmalar sırasında distilasyon

düzenegi, kafes ve buzdolabi; manyetik karıştırıcı çubukları, polistiren küvet, cam deney tüpleri, cam pipetler, beherler, balon jojeler, spatüller, mezürler, boncuklar, misina ve petriler kullanılmıştır.

#### 3.1.4. Çalışma Alanı

Çalışma; Mersin Yenişehir ilçesinde bulunan Balıkçı Barınağı'nda ( $36^{\circ}47'44''N$  -  $034^{\circ}37'52''E$ ) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.). Çalışma için balıkçı barınakları; durgun suya sahip olmaları, durgun sularda biyofilm oluşumunun daha hızlı gelişmesi, açık deniz fırtınalarından korunmuş olmaları dolayısı ile seçilmiştir. Biyofilm oluşum hızında ve miktarında; deniz suyu sıcaklığı, tuzluluk oranı, biyofilm oluşturan yerel mikroorganizma çeşitliliği gibi parametreler göz önünde bulundurularak farklı zaman aralıklarında çalışmanın gerçekleştirilmesi uygun bulunmuştur.



Şekil 3.1. Çalışma alanı (Google Earth)

### 3.2. Yöntem

Tüm çalışmalar boyunca kullanılan çözeltiler ultra saf su ile hazırlanmıştır.

#### 3.2.1. Çalışma Elektrotlarının Elektrokimyasal Polimer Sentezi için Hazırlanması

0,01 mm kalınlığında temin edilen SS304 paslanmaz çelik levha makas yardımıyla

0,90 cm genişliğinde ve 4,00 uzunluğunda kuponlar oluşturacak şekilde kesilmiştir. Kupon, uzun kenarın bir kenarından 0,50 cm uzaklıkta, genişliği ortalayacak şekilde zımba ile delinmiştir. Zımba ile delinmeyen kenarından her 0,50 cm'ye makasla, 5 kesi atılmıştır. Kesim işlemi biten kuponlar, eldiven kullanılarak, deterjan ile yıkanmış ardından bi-distile su ile yıkanıp kurumaya bırakılmıştır. Kesim işleminden sonra kuponlara bir daha el değdirilmemiştir. Hazırlanmış olan elektrotlar sentez ortamına batırılmadan önce teknik saflıkta 1:1 etanol: aseton karışımında bir süre bekletilmiş ardından distile sudan geçirilerek olası kirliliklerden arındırılmıştır.

### **3.2.2. Polimerlerin Elektrokimyasal Sentezi**

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen tüm elektrokimyasal polimerizasyon uygulamaları, oda koşullarında, elektrokimyasal çalışma istasyonunda, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği kullanılarak tek hücrede üç elektrot tekniği ile gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.2.1. İletken Polimer Film Sentezi**

Çalışma elektrotları üzerinde, iletken homopolimer film sentezi; ultra saf su ile hazırlanmış, 0,10 M anilin veya 0,075 M o-anisidin monomerlerinden birini içeren, derişimi 0,20 M olan amonyum okzalat, sodyum molibdat, sodyum okzalat, sodyum *p*-toluen sülfonat veya sodyum salisilat elektrolit çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. 50 mV/s tarama hızı ile 16 segment uygulanarak gerçekleştirilen denemelere ait uygulanan potansiyel aralıkları Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5.'te verilmiştir. Polimer film ile kaplanmış SS304 kuponları, sentez ortamından çıkarıldıklarında üzerlerindeki kalan artıkların temizlenmesi için bi-distile su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra da kuponlar hiçbir yüzeye temas ettirilmeden muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.4. Anilin homopolimer sentezi için uygulanan potansiyel aralıklar

| <b>Elektrolit</b>                | <b>Potansiyel Aralık (V)</b> |
|----------------------------------|------------------------------|
| Amonyum okzalit                  | - 0,30/1,50                  |
| Sodyum Molibdat                  | - 0,30/1,50                  |
| Sodyum Okzalit                   | - 0,30/1,50                  |
| Sodyum Salisilat                 | - 0,30/1,30                  |
| Sodyum <i>p</i> -toluen sülfonat | - 0,30/1,20                  |

Çizelge 3.5. *o*-Anisidin homopolimer sentezi için uygulanan potansiyel aralıklar

| <b>Elektrolit</b>                | <b>Potansiyel Aralık (V)</b> |
|----------------------------------|------------------------------|
| Amonyum okzalit                  | - 0,30/1,20                  |
| Sodyum Molibdat                  | - 0,30/1,50                  |
| Sodyum Okzalit                   | - 0,30/1,20                  |
| Sodyum Salisilat                 | - 0,30/1,50                  |
| Sodyum <i>p</i> -toluen sülfonat | - 0,30/1,50                  |

### 3.2.2.2. İletken Polimer Film Sentezi ile Enzim İmmobilizasyonu

Çalışmada enzim immobilizasyonu, hapsetme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sentezlerden hemen önce, anilin veya *o*-anisidin içeren elektrolit ortamlarına, son konsantrasyonları 50 U/ml olacak şekilde,  $\alpha$ -amilaz (A), deoksiribonükleaz I (DNAz) (D), glukoz oksidaz (G), lipaz (L),  $\alpha$ -kimotripsin (C) veya pektinaz (P) enzimlerinde biri veya toplam konsantrasyonu 50 U/ml olacak şekilde bu enzimlerin çeşitli kombinasyonları eklenip karıştırılmıştır. Sentez koşulları, 16 segment boyunca, 50 mV/s tarama hızıyla Çizelge 3.6. ve Çizelge 3.7'da belirtilen potansiyel aralıklarında uygulanmıştır.

Çizelge 3.6. Anilin monomerini içeren ortam için potansiyel aralıklar

| <b>Elektrolit</b> | <b>Potansiyel aralık (V)</b> |
|-------------------|------------------------------|
| Amonyum okzalit   | - 0,30/1,50                  |
| Sodyum salisilat  | - 0,30/1,30                  |

Çizelge 3.7. *o*-anisidin monomerini içeren ortam için potansiyel aralıklar

| <b>Elektrolit</b> | <b>Potansiyel aralık</b> |
|-------------------|--------------------------|
| Amonyum okzalit   | - 0,30/1,20              |
| Sodyum salisilat  | - 0,30/1,50              |

### 3.2.3. Çalışma Elektrotlarının Denizde İnkübasyonu

Laboratuvarda çıplak ve polimer film ile kaplanan SS304 kuponları, iki kupon birbirine değmeyecek şekilde aralarına boncuklar konarak misinalara dizilmiştir. Misinalar, SS304 kuponlarının birbiriyle temasına izin vermeyecek aralıklarla Şekil 3.2’de verildiği şekilde kafese bağlanmıştır. Kafes bir halat yardımıyla, Mersin Balıkçı Barınağı’nda sabit bulunan bir tekneden suya, 2 m derinliğe bırakılmıştır. Kafes 12 gün boyunca burada bağlı kalmıştır. Süre zarfında deniz suyu sıcaklığı <https://tr.seatemperature.net> ve <https://pirireis.mgm.gov.tr> internet sitelerinden takip edilmiştir. Süre sonunda denizden çıkarılan SS304 kuponları, içerisinde deniz suyu bulunan kapalı kaplarda laboratuvara getirilmiştir.

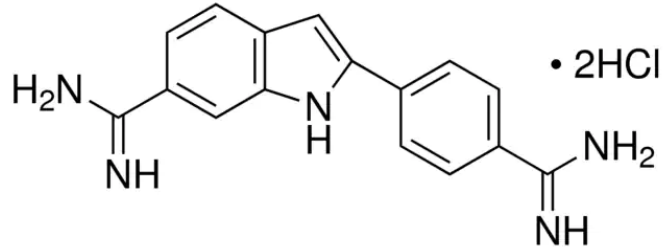


Şekil 3.2. Kuponların denizde inkübasyonu için kullanılan kafes sistemi

### 3.2.4. Floresans Mikroskobu ile Yüzey Görüntüleme

Kuponların deniz öncesi ve sonrası floresans görüntülerinin elde edilmesi için, örnekler ilk olarak saf su ile yıkanmıştır. Tüm kuponlardan 0,50 cm'lik birer çentik kesilmiştir. Her çentiğe %3,6 NaCl’de hazırlanmış %2,5 formaldehit çözeltisi eklenerek 90 dk. 4°C’de inkübe edilmiştir. Süre sonunda saf su ile yıkanan örneklerle 300 µl, 4 µg/ml 4',6- diamino- 2 -fenilindol (DAPI) eklendikten sonra 20 dk. karanlık ortamda inkübe edilmiştir. DAPI, çift sarmal DNA'nın Adenin (A)- Timin (T) 'ce zengin minör oluklarına bağlanan spesifik bir DNA boyasıdır (Şekil 3.3.) (Kapuscinski, 1995). Sonrasında saf su

ile yıkanan örnekler kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örneklerin, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan floresans mikroskopuyla, 450-490 nm aralığında, 10 kat büyütme ile görüntüleri alınmıştır.



Şekil 3.3. 4',6- diamino-2-fenilindol (DAPI) boyasının kimyasal yapısı

### 3.2.5. Çalışma Elektrotlarından Biyofilm Eldesi

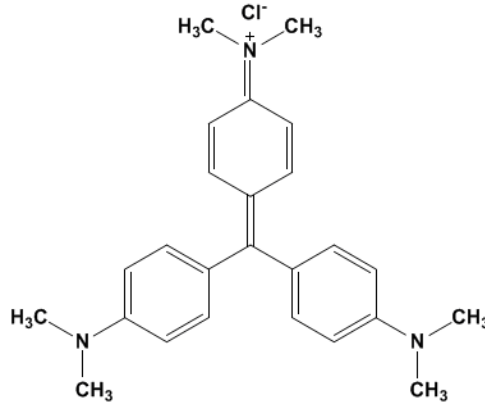
Denizden çıkan kuponlardan kesilen 0,50 cm'lik çentiklerin üzerinde bulunan biyofilm tabakalarının, ultrasonik homojenizatör ile her çentik için 4 defa 20 sn süreyle manuel olarak Am %90 seviyesinde uygulanarak kupon yüzeylerinden ayrılması sağlanmıştır. Bu işlem polistiren küvetler içerisinde gerçekleştirilmiştir. 3 ml distile su eklenen homojenat 1 dk vortekslendikten sonra 6000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst faz ayrı bir tüpe konulmuştur. Pelet üzerine %8,5 NaCl ile %0,22 formaldehit içeren çözelti eklenip 1 dk vortekslenmiştir. Ardından daha önce ayrı bir tüpe konmuş olan üst faz ile birleştirilip 12000 rpm'de 30 dk santrifüjlenmiştir. Elde edilen çözelti toplam karbohidrat ve toplam protein tayininde kullanılmıştır.

### 3.2.6. Biyokimyasal Tayinler

#### 3.2.6.1. Kantitatif Biyofilm Tayini

SS304 kuponların üzerinde oluşan biyofilm miktarının tayini için kristal viyole (Şekil 3.4.) ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu boya, negatif yüklü molekülleri bağlayarak hem biyofilmi oluşturan bakterileri hem de bunları çevreleyen biyofilm matriksini boyamaktadır (Ommen, 2017). Oluşan renk 590 nm dalga boyunda

spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.



Şekil 3.4. Kristal viyole boyasının kimyasal yapısı

Denizden çıkarılan örnekler, üzerlerine yapışık olmayan maddelerin ölçüm sonuçlarını etkilememesi için distile sudan geçirilmiştir. Ardından kuponlar, içerisinde 3 ml %0,50 kristal viyole boya çözeltisi bulunan polistiren küvetlere, kuponların hiçbir yüzü küvete değmeyecek şekilde konarak 30 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Küvetlerden çıkarılan kuponlar, bağlanmayan boyanın bertarafı için tekrar distile su ile yıkanmıştır. Sonrasında kuponlar, dik şekilde boş küvetlere hiçbir yüzeye değmeyecek şekilde yerleştirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örneklerde 0,50 cm boyutlarında parçalar kesilerek, el değmeden cam deney tüplerine yerleştirilmiştir. Her bir deney tüpüne 5 ml %20 glasiyel asetik asit ile %80 absolute etanol içeren çözelti eklenmiş ve 15 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda oluşan renk 590 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüştür. Antibiyofilm etki 3.1.'de gösterilen formül ile bağıl olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Biyofilm \% azalma} = \frac{\text{Çıplak Metale ait ortalama Abs} - \text{Kaplama ya ait ortalama Abs}}{\text{Çıplak metale ait ortalama Abs}} \times 100 \quad (3.1)$$

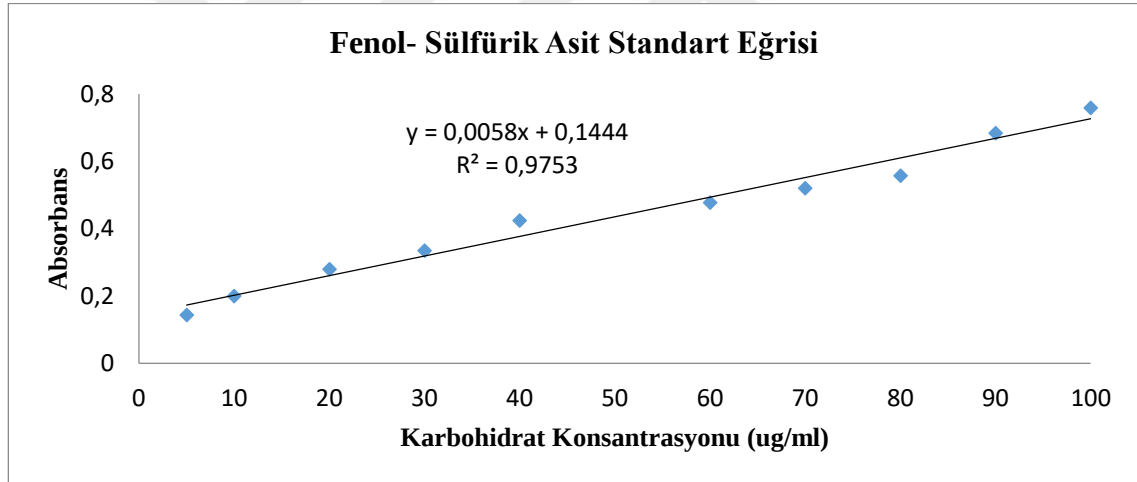
### 3.2.6.2. Toplam Karbohidrat Tayini

Karbohidrat tayini için fenol-sülfürik asit yöntemi kullanılmıştır. Sülfürik asit varlığında fenol; şekerlerin ve bunların metil türevlerinin, oligosakkaritlerin ve polisakkaritlerin kantitatif olarak kolorimetrik mikro tayinlerinde kullanılan hassas, güvenilir ve ucuz bir yöntemdir (Dubois, 1956). Yöntemin prensibi, karbohidratların

güçlü asit varlığında oluşan furfuraldehit veya bunun homologlarının aromatik fenoller ile polimerizasyonu sonucu oluşan renkli bileşiklerin 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümlerinin alınmasına dayanır (Kochert, 1978).

Gerçekleştirilen çalışmalarda 250 µl örnek üzerine ilk olarak 250 µl %5 fenol çözeltisi eklendikten sonra 750 µl %95 sülfürik asit eklenmiştir. Masuko ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları çalışmaya göre reaksiyon karışımını bu sıra ile hazırlamak en iyi renk sonucunu vermektedir. 10 dk. oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında 30 sn vortekslenen örnekler 30°C'de de 30 dk inkübe edildikten sonra 9 tekrarlı olarak spektrofotometrik ölçümler 490 nm dalga boyunda alınmıştır.

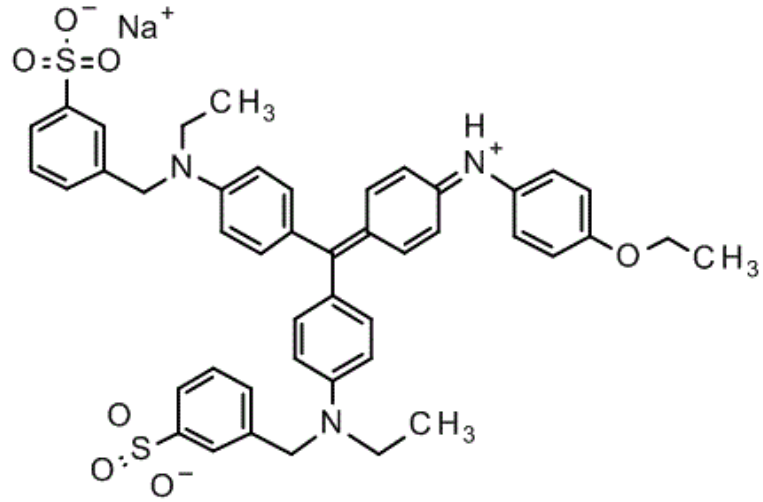
Karbohidrat standart eğrisinin (Şekil 3.5) oluşturulması için standart olarak glukoz kullanılmıştır. 250; 125; 62,5; 31; 7,8; 3,9 ve 0,97 µg/ml glukoz konsantrasyonlarına sahip 7 çözelti hazırlanmış ve yukarıda sıralanan aşamalardan sonra 490 nm'de ölçümleri alınmıştır.



Şekil 3.5. Fenol- sülfürik asit standart eğrisi

### 3.2.6.3. Toplam Protein Tayini

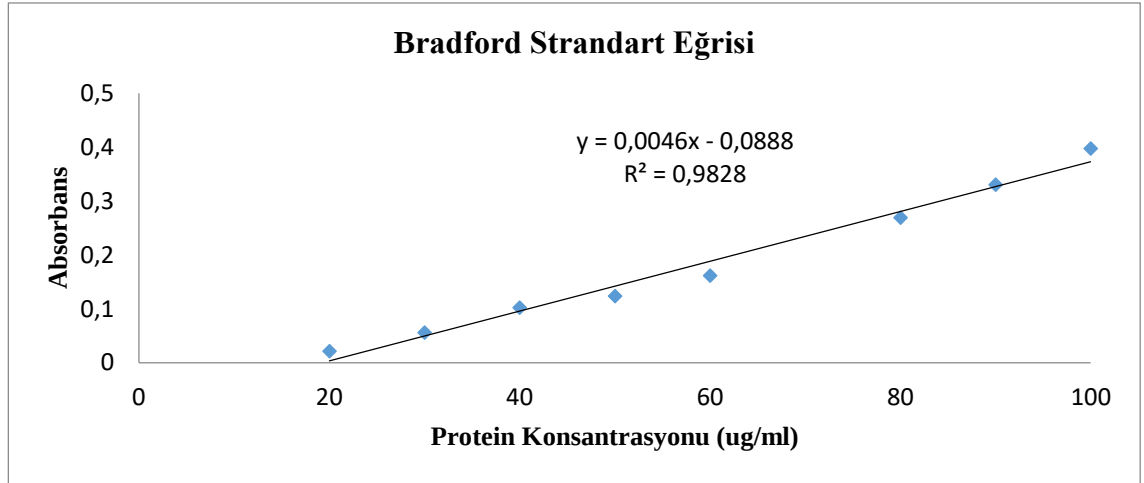
Toplam protein tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bradford yöntemi boya bağlama prensibine dayanmaktadır. Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının (Şekil 3.6.) asidik grupları, proteinlerde bulunan bazik gruplar (Lys, Arg) ile etkileşime girerek renk oluşturmaktadır. Oluşan renk 595 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (Bradford, 1976).



Şekil 3.6. Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kimyasal yapısı

Bu yöntemde Bradford reaktifi kullanılmaktadır. Bu reaktif; 40 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml % 95 (v/v) etanol, 55 ml % 85 (v/v) fosforik asidin karıştırılarak distile su ile 1L'ye tamamlanmasıyla elde edilmektedir. Hazırlanan reaktif koyu renkli bir şişe içerisinde saklanmaktadır.

Gerçekleştirilen protein tayininde 250 µl örnek, 1000 µl Bradford reaktifi ile etkileştirildikten sonra 13500 rpm'de 20 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası 595 nm'de spektrofotometrik ölçümler alınmıştır. Ölçümler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Protein konsantrasyonlarının hesaplanması, seyreltme faktörü dikkate alınarak standart eğri (Şekil 3.7.) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bradford standart eğrisinin hazırlanması için, standart protein olarak Sığır Serum Albümin'i (BSA) kullanılmıştır. Bu amaçla 20, 30, 40, 50, 60, 80 ve 90 µg/ml BSA içeren 7 çözelti hazırlanmış ve yukarıdaki deney aşamaları izlenerek ölçümleri alınmıştır.



Şekil 3.7. Bradford standart eğrisi

### 3.2.7. Mikrobiyal Tanımlama

Mikrobiyolojik tanımlamanın gerçekleştirilmesi amacıyla matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI- TOF MS) kullanılmıştır. Bu yöntemle, petrilere geliştirilen mikroorganizma kolonilerinden tanımlama yapılabilmektedir. MALDI-TOF MS ile mikroorganizmaların tanımlanma işlemi bozulmamış hücreler veya hücre ekstraktları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yöntemin prensibi; petrilere üretilen mikroorganizmalara ait proteinlerin, uygulanan lazer etkisiyle termal desorpsiyonu sonucu vakum tüpündeki hareketinin ölçülmesidir. Bu vakum tüpünde bulunan elektrik alan, ayrılan iyonların, kütlelerine ve elektrik yüklerine göre hızlanmasına neden olur. Tüpün uzunluğu, desorbe olmuş parçacıkların daha fazla ayrılmasını sağlar. Bu ise desorbe parçacıkların uçuş sürelerinde, belirgin ve ölçülebilir farklılıklara yol açarak, her canlı için parmak izi niteliğindeki polipeptidlerin kütlelerinin hassas olarak hesaplanmasını sağlar (Wieser ve ark., 2012).

Çalışmada; % 0,01 maya ekstraktı ve % 2 agar içeren steril deniz suyu kullanılarak hazırlanan besiyerinden her petriye 20 ml dökülmüştür. Denizde inkübasyon sonrası seçilen kuponlardan, 6 çentik (3cm) kesilerek içerisinde 5 ml %1,50 steril NaCl çözeltisi bulunan tüplere alınmış ve steril tek kullanımlık öze ile biyofilm tabakası kazınarak ardından vortekslenmiştir. Her bir kupondan elde edilen süspansiyondan steril % 0,90 NaCl kullanılarak 10 katlı seyreltme yapılmıştır ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ). Hazırlanan her bir seyreltmeden agar ortamlarına 100µl eklenerek yayma ekim yapılmıştır. Petriler 14 gün

süre ile 25°C'de inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası koloni sayımları yapılmıştır (3.2).

$$kob/ml = \frac{(Sayılan\ koloni\ sayısı)seyreltme\ faktörü}{örnek\ hacmi(ml)} \quad (3.2)$$

14 günlük inkübasyon sonrasında morfolojik yönden farklılık gösterdiği belirlenen kolonilerden tekrar agar ortamına çizgi ekim yapılarak 2 gün süreyle 25°C'de inkübe edilmiştir. Petri ortamında geliştirilen izolatların MALDİ-TOF/MS ile identifikasyonu Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.



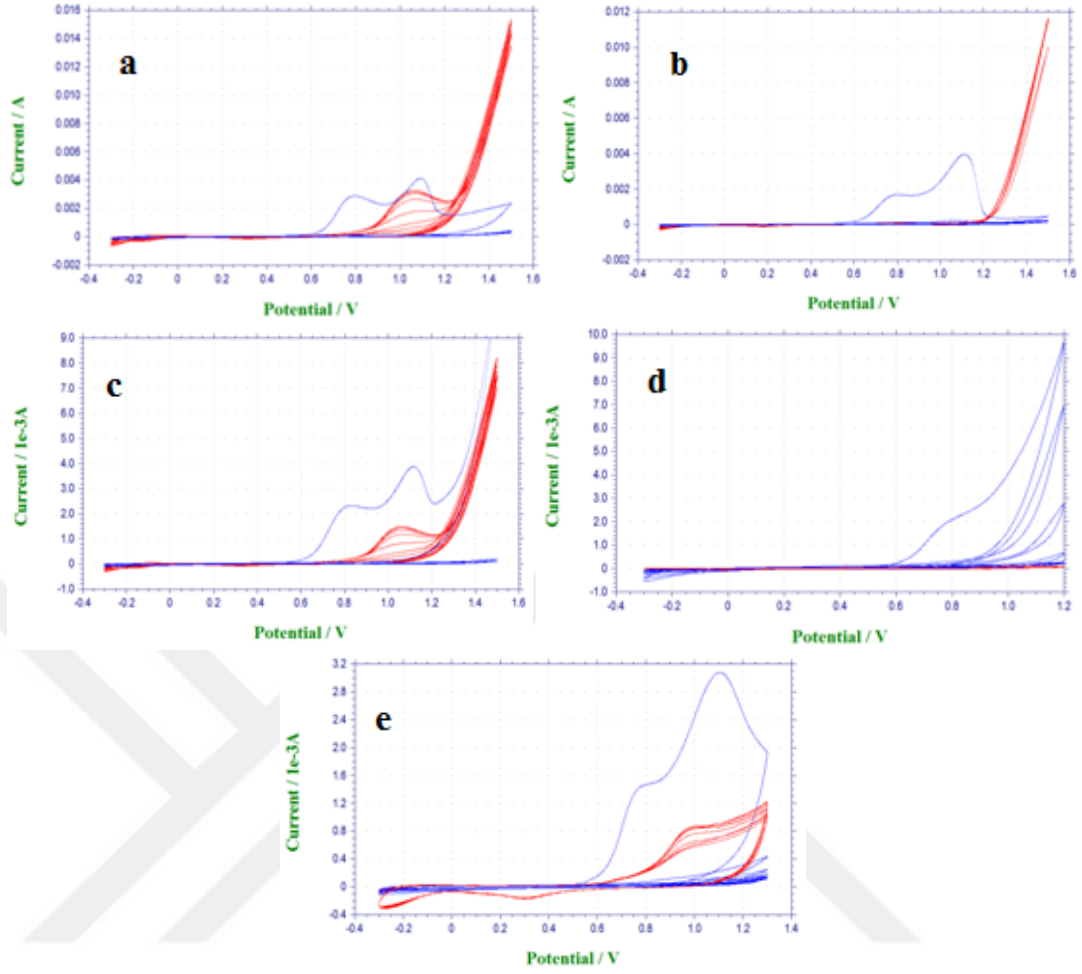
## **4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA**

### **4.1. Araştırma Bulguları**

#### **4.1.1. Farklı Elektrolit Ortamlarda PANİ ve POA Filmlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu**

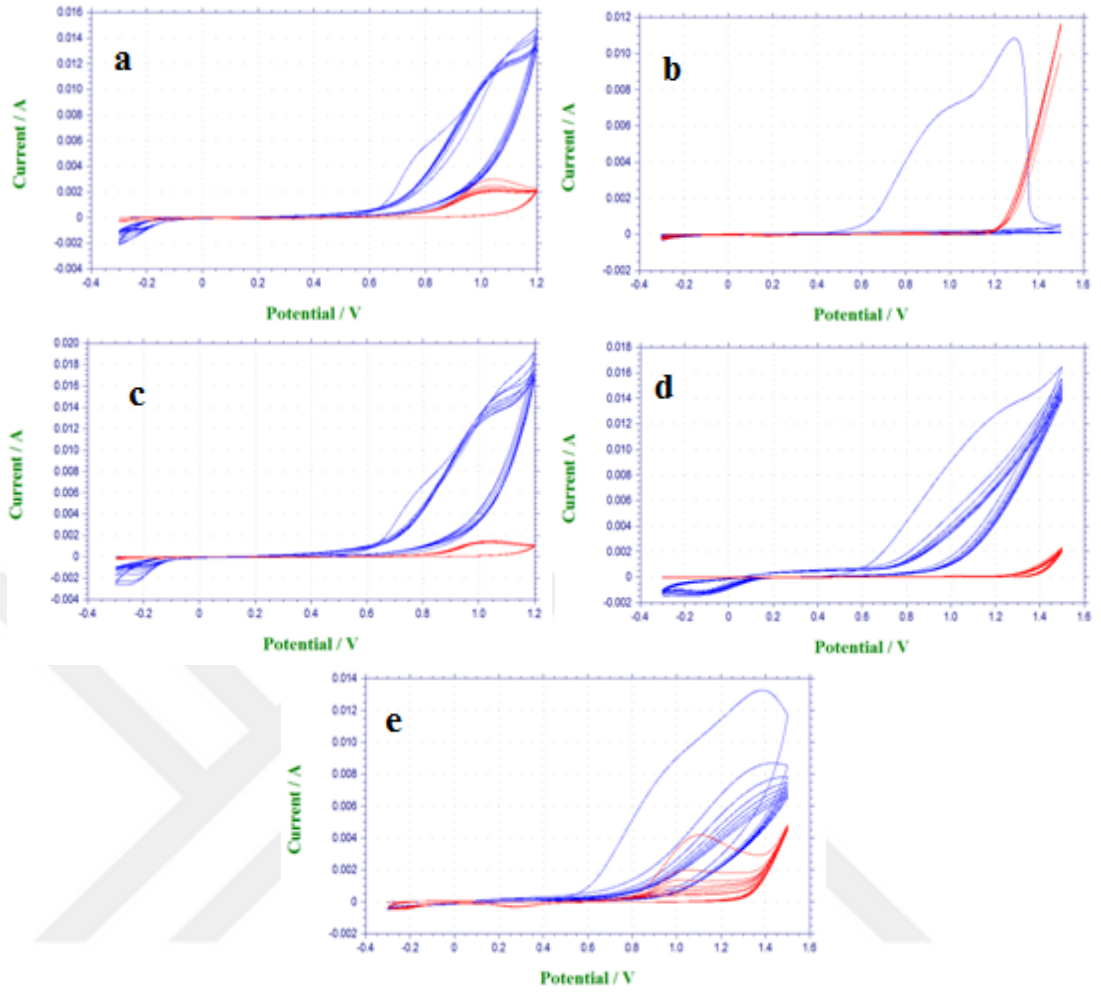
##### **4.1.1.1. Elektropolimerizasyon**

Elektrolit olarak amonyum okzalit, sodyum molibdat, sodyum okzalit, sodyum *p*-toluen sülfonat ve sodyum salisilat ortamlarında sentezlenen PANİ ve POA filmlerine ait sentez eğrileri sırasıyla Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir. Grafiklerde kırmızı ile gösterilen eğriler, monomerin bulunmadığı sadece elektrolit varlığında, mavi ile gösterilen eğriler ise söz konusu elektrolitte monomer varlığında elde edilmiş eğrilerdir. Şekil 4.1'de kırmızı ile verilen sadece elektrolitin bulunduğu ortamlarda yaklaşık 1,20 V dolaylarında görülen akım artışı paslanmaz çeliğin krom oksitlerinin çözünmesinden kaynaklanmaktadır. Bu potansiyelden sonraki hızlı akım artışı oksijen çıkışına karşılık gelmektedir. Mavi ile verilen elektrolit+monomer ortamlarında elde edilen sentez eğrilerinde ise iki farklı potansiyel değerinde gözlenen iki pik monomer oksidasyonuna karşılık gelmektedir. Monomer oksidasyonunun iki farklı potansiyel değerinde gözlenmesi, paslanmaz çelik yüzeyindeki demir oksit yanında kararlı krom ve nikel oksitlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Elektrolit ortamına eklenen anilin monomeri varlığında bütün ortamlar için monomer oksidasyona karşılık gelen akım değerlerinin birbirine benzer oldukları tespit edilmiştir. Diğer taraftan bütün ortamlar için monomer oksidasyona karşılık gelen akım değerlerinin birinci segmentten sonra düşmesi, paslanmaz çelik yüzeyinde sentezlenen polimer filmin iletkenliğinin çıplak paslanmaz çelik yüzeyine göre daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır (Özyılmaz, 2004).



Şekil 4.1. Farklı ortamlarda PANİ sentezine ait CV eğrisi (a) amonyum okzalat (b) sodyum molibdat (c) sodyum okzalat (d) sodyum *p*-toluen sülfonat (e) sodyum salisilat (Kırmızı: elektrolit, Mavi: elektrolit + monomer)

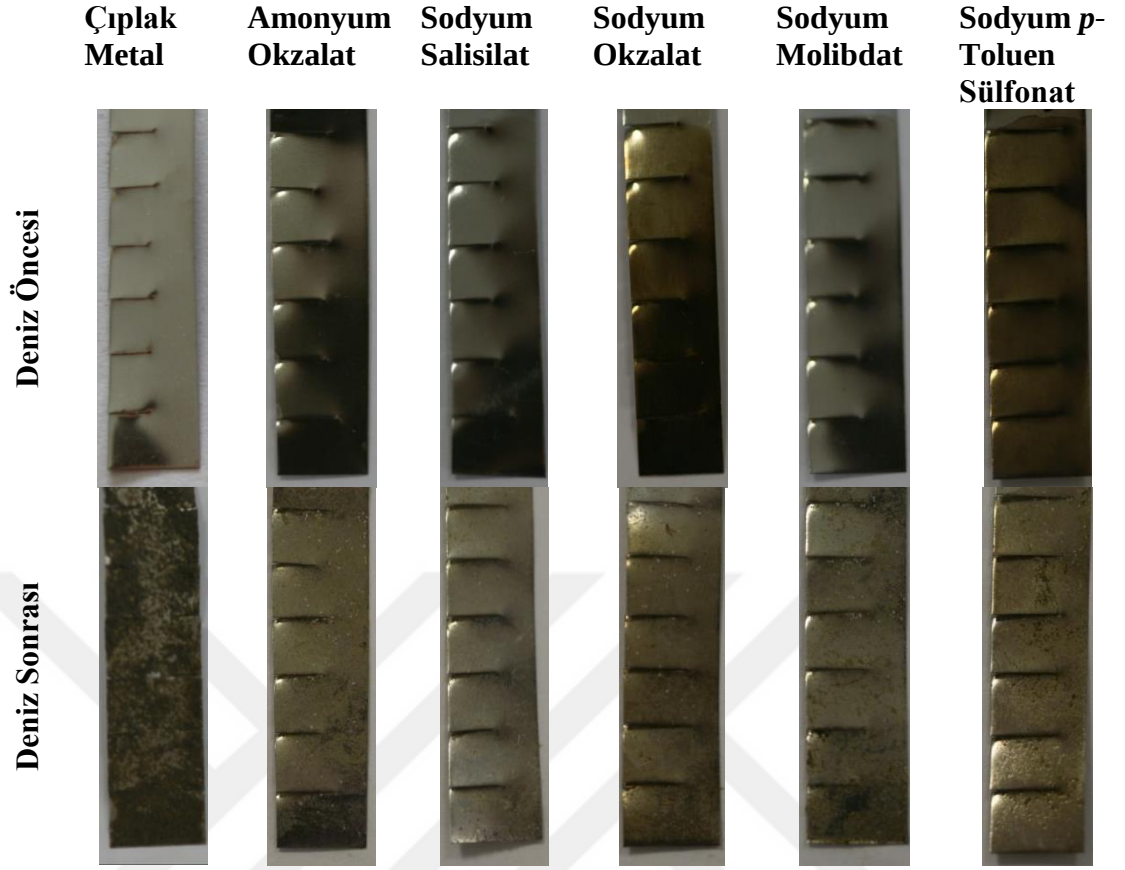
Elektrolit olarak amonyum okzalat, sodyum molibdat, sodyum okzalat, sodyum *p*-toluen sülfonat ve sodyum salisilat ortamlarında sentezlenen POA filmlerine ait sentez eğrileri Şekil 4.2.'de verilmiştir. Kırmızı ile verilen sadece elektrolit ortamların aksine o-anisidin monomerinin bulunduğu ve mavi renkte görülen sentez eğrilerinden elde edilen monomer oksidasyonuna karşılık gelen akım değerlerinin, anilinli ortamlara göre oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum o-anisidin yapısındaki metoksi ( $-OCH_3$ ) grubunun benzen halkasının etkinliğini artırması ile elektropolimerizasyon hızını artırmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.2. Farklı ortamlarda POA sentezine ait CV eğrisi (a) Amonyum okzalit (b) Sodyum molibdat (c) Sodyum okzalit (d) Sodyum *p*-toluen sülfonat (e) Sodyum salisilat (Kırmızı: elektrolit, Mavi: elektrolit + monomer)

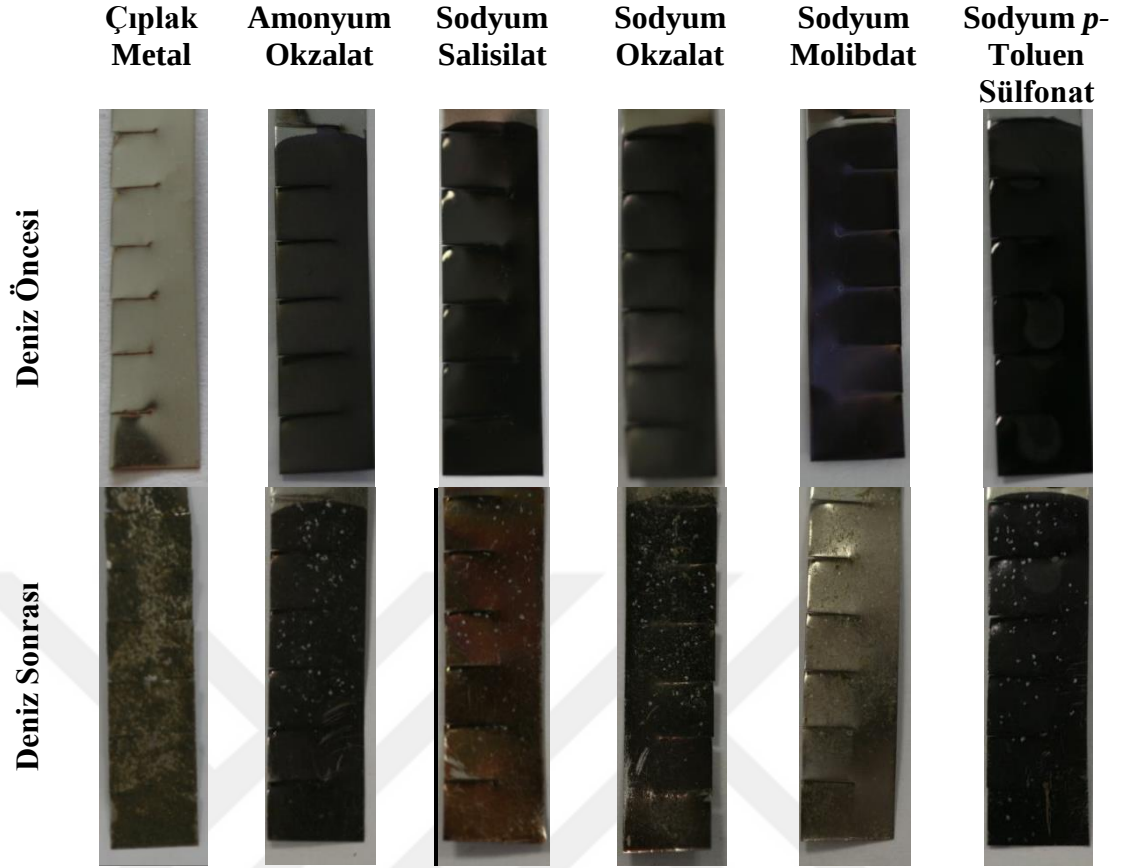
#### 4.1.1.2. Kuponların Yüzey Fotoğraf Görüntüleri

Çıplak SS304 kuponu ve polimer film kaplı SS304 kuponlarının deniz öncesi ve denizde inkübasyon sonrası yüzeyleri, fotoğraf makinesiyle görüntülenmiştir (Şekil 4.3). Şekil 4.3’de verilen deniz sonrası çekilen fotoğraflardan farklı elektrolit ortamlarında sentezlenen PANİ film kaplı kuponlar ile çıplak metal kupon karşılaştırıldığında, polimer film kaplı kuponlarda, çıplak metale göre daha az miktarda biyofilm oluşumu belirgin bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.3. Farklı elektrolit ortamlarında sentezlenen PANİ filmlerin kupon görüntüleri

Aynı şekilde farklı elektrolit ortamlarında sentezlenen POA film kaplı kuponlar ile çıplak metal kuponun deniz sonrası çekilen fotoğrafları (Şekil 4.4.) karşılaştırıldığında, polimer film kaplı kuponların üzerinde çıplak metale göre daha az miktarda biyofilm oluştuğu açıkça görülmektedir.

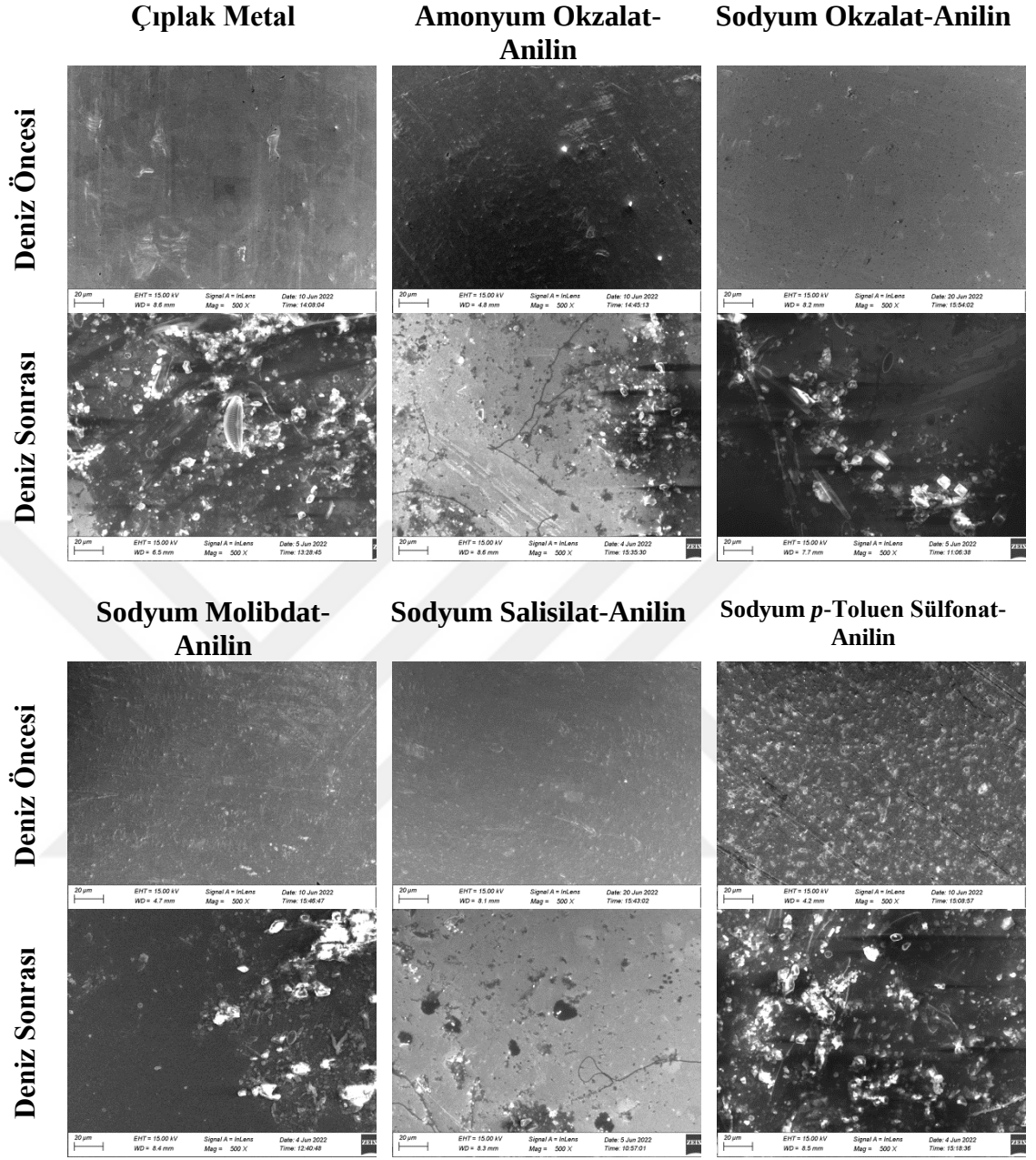


Şekil 4.4. Farklı elektrolit ortamlarda sentezlenen POA filmlerinin kupon görüntüleri

#### 4.1.1.3. SEM ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleri

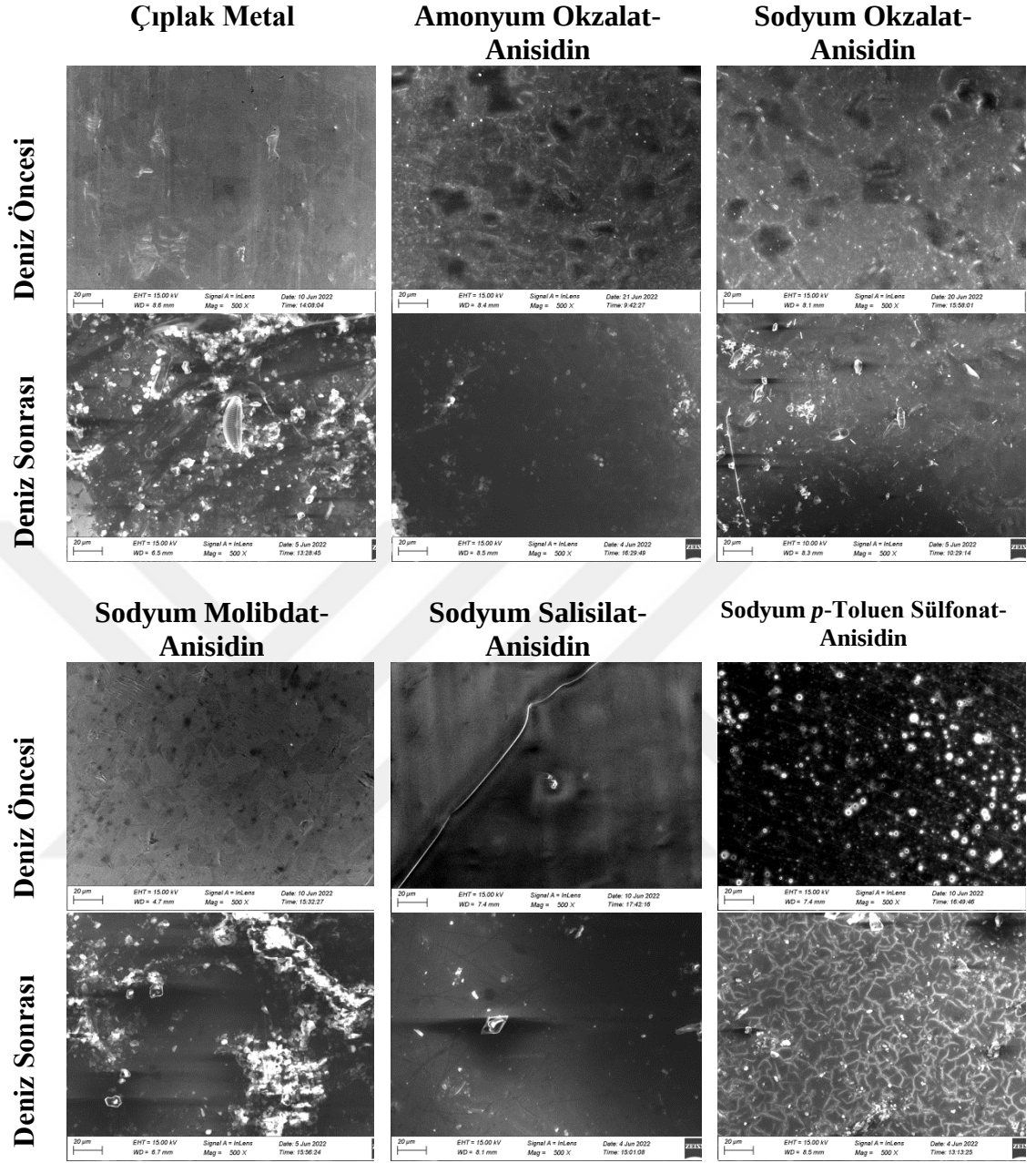
Deniz öncesi ve denizde inkübe edildikten sonra, kupon yüzey görüntüleri, taramalı elektron mikroskobu ile elde edilmiştir. Örnekler analiz yapıncaya kadar azot gazı geçirilmiş tüplerde muhafaza edilmiştir.

Şekil 4.5.'de farklı elektrolitlerde sentezlenmiş PANİ film kaplı kuponlar ile çıplak metal kuponuna ait 500 kat büyütülmüş SEM görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 4.5. Farklı PANİ kuponlarına ait SEM görüntüleri

Şekil 4.5. incelendiğinde denizde inkübe edildikten sonra yüzeylerde bir birikimin olduğu görülmektedir. Sodyum *p*-toluen sülfonat ortamında sentezi gerçekleştirilen PANİ filminin dışında kalan elektrolitlerde sentezlenmiş PANİ film kaplı kuponların yüzeylerinde biyofilm birikimi çıplak metal kupona kıyasla daha az olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6. Farklı POA kuponlarına ait SEM görüntüleri

Şekil 4.6.'da farklı elektrolitlerde sentezlenmiş POA film kaplı kuponlar ile çıplak metal kupona ait 500 kat büyütülmüş SEM görüntüleri bulunmaktadır. Şekil 4.6'dan da görüldüğü gibi denizde inkübasyon ile yüzeylerde bir birikimin olduğu görülmektedir. Çıplak metal kupona kıyasla amonyum okzalat ve sodyum salisilat elektrolitlerinde sentezlenen POA film kaplı kuponlarda birikimin belirgin bir şekilde daha az olduğu, diğer elektrolitlerde sentezlenen POA filmlerinin de biyofilm oluşumuna karşı etkinlik gösterdikleri görülmektedir.

#### 4.1.1.4. EDX Analizleri

Deniz öncesi ve sonrası çıplak ve polimer film kaplı kuponların 5000 kat büyütme ile görülen alandaki elementel yüzey analizi mikroskoba bağlı EDAX dedektörü ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1.'de farklı elektrolitlerde sentezlenmiş PANİ film kaplı kuponlara ait deniz öncesi ve sonrası verileri bulunmaktadır.

Çizelge 4.1. PANİ kuponlarına ait EDX analizleri (%)

| PANİ          |        |       |       |       |       |       |
|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Deniz Öncesi  |        |       |       |       |       |       |
| Element       | ÇIPLAK | AO    | SS    | SO    | SM    | STS   |
| C K           | 3,41   | 6,91  | 5,07  | 7,36  | 5,45  | 11,18 |
| N K           |        | 0,58  | 0,33  | 0,53  | 0,71  | 0,82  |
| O K           | 0,75   | 0,85  | 0,96  | 1,33  | 1,26  | 1,47  |
| Si K          | 0,99   | 0,84  | 1,02  | 0,92  | 1,02  | 0,86  |
| Cr K          | 17,20  | 17,06 | 17,03 | 16,21 | 17,41 | 16,24 |
| Fe K          | 68,81  | 65,60 | 67,50 | 65,27 | 66,93 | 61,51 |
| Ni K          | 8,84   | 8,16  | 8,09  | 8,38  | 7,21  | 7,92  |
| Deniz Sonrası |        |       |       |       |       |       |
| C K           | 0,02   | 6,91  | 4,41  | 5,31  | 8,43  | 15,39 |
| N K           |        | 0,62  | 0,63  | 0,74  |       | 1,23  |
| O K           | 28,44  | 2,19  | 1,79  | 7,06  | 12,06 | 8,43  |
| Na K          | 20,76  | 0,48  | 0,63  | 3,35  | 0,57  | 5,67  |
| Mg K          | 2,31   | 0,49  | 0,65  | 2,19  | 1,64  | 1,22  |
| Al K          | 1,39   |       | 0,65  | 1,25  | 1,91  | 0,66  |
| Si K          | 9,30   | 1,08  | 0,95  | 2,13  | 4,13  | 1,75  |
| Cl K          | 20,54  | 0,67  | 0,29  | 3,22  | 0,62  | 3,28  |
| K K           | 0,93   |       |       | 0,55  |       |       |
| Ca K          | 1,16   |       |       | 0,97  | 2,20  |       |
| Cr K          | 3,03   | 15,78 | 16,30 | 13,23 | 12,89 | 11,91 |
| Fe K          | 8,97   | 63,32 | 65,25 | 52,47 | 48,91 | 44,35 |
| Ni K          | 1,90   | 8,46  | 7,87  | 6,34  | 5,99  | 5,30  |
| Mo L          | 1,24   |       |       |       |       | 0,82  |
| S K           |        |       | 0,58  | 1,19  | 0,64  |       |

Çizelge 4.1 incelendiğinde çıplak metalde deniz öncesi durumunda yüzeyinde bulunmayan azot elementinin PANİ film sentezi sonrası metal yüzeyinde bulunması, kuponların azot elementi içeren anilin ile kaplandığını göstermektedir.

Her kupon için deniz öncesi ve sonrası verileri ayrı ayrı karşılaştırıldığında genel olarak krom, demir ve nikel elementlerinin azaldığı buna karşın oksijen elementinin arttığı görülür. Bunun yanında deniz öncesi durumda kupon yüzeylerinde bulunmayan özellikle sodyum, magnezyum ve klor elementlerinin yüzeylerde biriktiği gözlenmektedir. Amonyum okzalit ortamında sentezlenmiş olan PANİ film dışındaki yüzeylerde, denizde bekleme sonrası, alüminyum elementinin biriktiği de görülmektedir. Bu benzerlikler dışında deniz sonrası yüzeylerde; potasyum, kalsiyum, kükürt ve molibden varlığına da rastlanmıştır.

Farklı elektrolitlerde sentezlenmiş POA film kaplı kuponlara ait deniz öncesi ve sonrası verileri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde PANİ film kaplı kuponlarda da görüldüğü gibi, POA film kaplı deniz öncesi kupon yüzeylerinde azot elementinin varlığı görülmektedir. Her kupon için deniz öncesi ve sonrası veriler ayrı ayrı karşılaştırıldığında genel olarak yüzeylerindeki karbon ve azot miktarlarının düştüğü, buna karşın silisyum miktarının arttığı görülmektedir. Bunun yanında denizden çıkarılan kuponların yüzeyinde sodyum, magnezyum ve klor elementlerinin biriktiği görülmektedir. Bu benzerlikler dışında deniz sonrası yüzeylerde; potasyum, alüminyum, kalsiyum, kükürt ve molibden varlığı da görülmektedir.

Çizelge 4.2. POA kuponlarına ait EDX analizleri

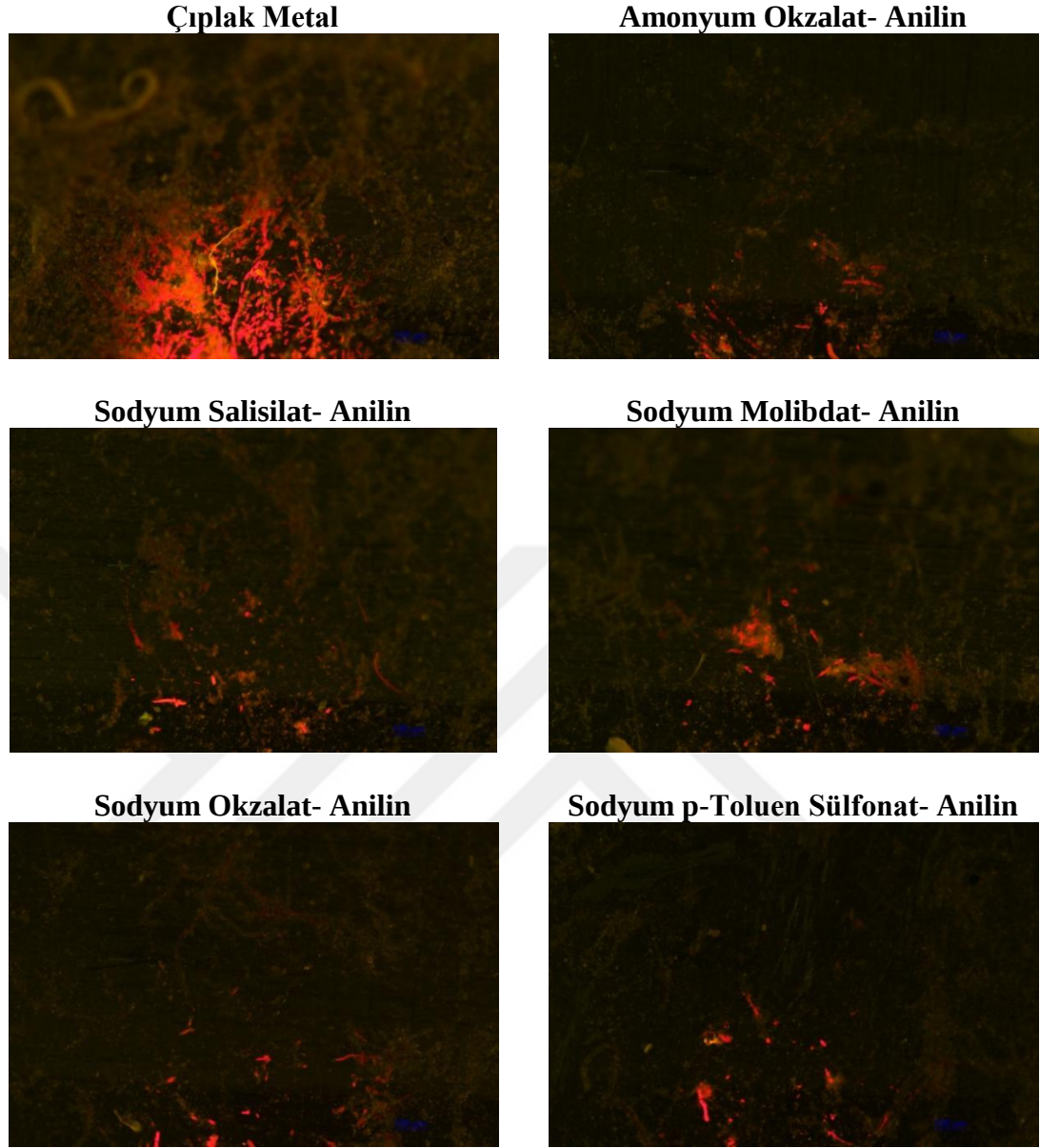
| POA          |        |       |       |       |       |       |
|--------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Deniz Öncesi |        |       |       |       |       |       |
| Element      | ÇIPLAK | AO    | SS    | SO    | SM    | STS   |
| C K          | 3,41   | 38,18 | 44,58 | 38,65 | 9,12  | 60,89 |
| N K          |        | 3,81  | 2,88  | 3,66  | 0,58  | 7,00  |
| O K          | 0,75   | 3,77  | 6,89  | 4,32  | 1,40  | 13,20 |
| Si K         | 0,99   | 0,47  | 0,69  | 0,50  | 0,86  | 0,36  |
| S K          |        |       |       |       |       | 3,04  |
| Cr K         | 17,20  | 10,36 | 8,78  | 10,13 | 16,75 | 3,67  |
| Fe K         | 68,81  | 38,78 | 32,53 | 38,23 | 63,95 | 10,05 |
| Ni K         | 8,84   | 4,63  | 3,66  | 4,52  | 7,33  | 1,80  |

Çizelge 4.2 (Devam) POA kuponlarına ait EDX analizleri

| <b>Deniz Sonrası</b> |       |       |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>C K</b>           | 0,02  | 28,24 | 20,03 | 28,01 | 7,90  | 35,95 |
| <b>N K</b>           |       | 2,53  | 1,61  | 2,95  |       | 3,64  |
| <b>O K</b>           | 28,44 | 3,54  | 4,34  | 4,39  | 12,83 | 8,51  |
| <b>Na K</b>          | 20,76 | 0,32  | 0,29  | 0,46  | 0,46  | 0,42  |
| <b>Mg K</b>          | 2,31  | 0,37  | 0,75  | 0,66  | 2,66  | 0,86  |
| <b>Al K</b>          | 1,39  |       | 0,50  |       | 1,75  |       |
| <b>Si K</b>          | 9,30  | 0,71  | 0,80  | 0,66  | 4,71  | 0,74  |
| <b>Cl K</b>          | 20,54 | 0,61  | 0,59  | 0,91  | 1,30  | 1,16  |
| <b>K K</b>           | 0,93  |       |       |       |       |       |
| <b>Ca K</b>          | 1,16  |       |       |       | 2,50  |       |
| <b>Cr K</b>          | 3,03  | 12,63 | 12,79 | 11,93 | 12,62 | 9,56  |
| <b>Fe K</b>          | 8,97  | 46,29 | 51,78 | 44,31 | 46,74 | 35,16 |
| <b>Ni K</b>          | 1,90  | 4,76  | 5,76  | 5,72  | 5,80  | 4,00  |
| <b>Mo L</b>          | 1,24  |       | 0,75  |       |       |       |
| <b>S K</b>           |       |       |       |       | 0,74  |       |

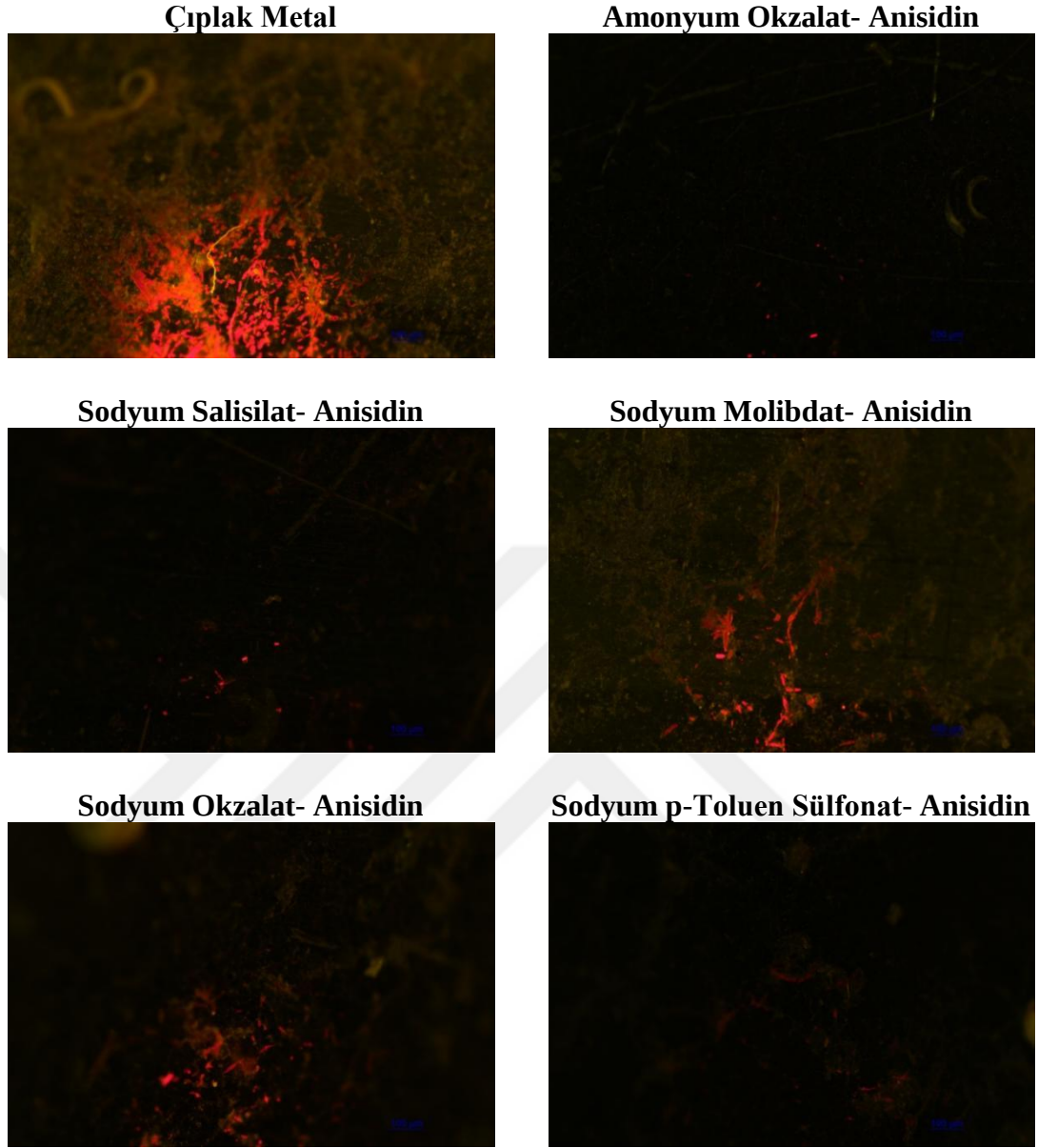
#### 4.1.1.5. Floresans Mikroskobu ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleri

Farklı elektrolitlerde sentezleri gerçekleştirilen PANİ filmlerin kuponlarına ait floresans görüntüleri Şekil 4.7.'de görülmektedir. Denizde inkübasyonları sonrası elde edilen görüntülerde çok belirgin görünmemekle birlikte çıplak metale kıyasla kuponların üzerinde daha az biyofilm oluşumunun gerçekleştiği gözlenmiştir.



Şekil 4.7. Çıplak metal ve PANİ kuponlarına ait floresans mikroskobu görüntüleri

Şekil 4.8'de POA filmlerin farklı elektrolitlerde kupon üzerine sentezlenip denizde inkübe edildikten sonra floresans görüntüleri yer almaktadır. Görüntüler incelendiğinde özellikle amonyum okzalal, sodyum salisilat ve sodyum *p*-toluen sülfonat ortamlarında sentezlenmiş olan POA filmlerin belirgin antibiyofilm etkinliği görülmektedir.

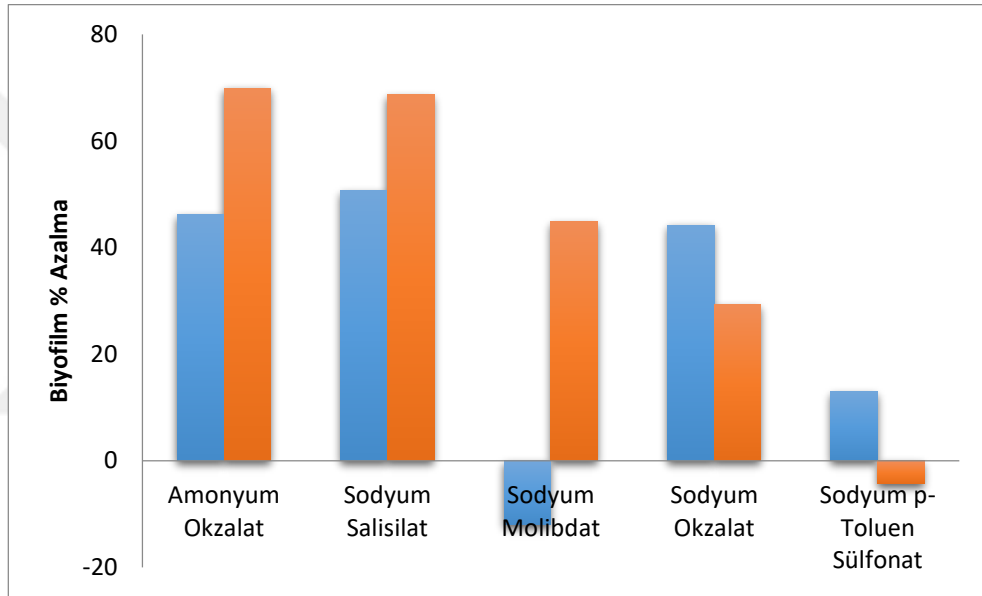


Şekil 4.8. Çıplak metal ve POA kuponlarına ait floresans mikroskobu görüntüleri

#### 4.1.1.6. PANİ ve POA Filmlerinin Antibiyofilm Etkilerinin Kristal Viyole Boyama ile Bağlı Olarak Belirlenmesi

Şekil 4.9.'da farklı elektrolit ortamlarda sentezlenmiş PANİ ve POA filmlerinin denizde inkübasyon sonrası, kristal viyole ile boyanarak çıplak metal kuponları ile kıyaslandığında göstermiş oldukları antibiyofilm etkinliklerinin yüzde olarak ifadesi yer almaktadır. Grafikte en yüksek antibiyofilm etkinliklerinin, her iki polimer film için amonyum okzalat ve sodyum salisilat ortamlarında gerçekleştiği açıkça görülmektedir.

Farklı elektrolit ortamlarında sentezlenen PANİ filmlerin, çıplak metale kıyasla gösterdiği antibiyofilm etki; sodyum salisilat % 50,64; amonyum okzalit % 46,19; sodyum okzalit % 44,17; sodyum *p*-toluen sülfonat % 12,98 ve sodyum molibdat -% 12,06 şeklindedir. Bu değerler POA filmler için; amonyum okzalit % 69,88; sodyum salisilat % 68,62; sodyum molibdat % 44,77; sodyum okzalit % 29,26; sodyum *p*-toluen sülfonat -% 4,35 oranında görülmüştür. Anilinin elektropolimerizasyonunun sodyum molibdat, *o*-anisidin monomerinin ise sodyum *p*-toluen sülfonat elektrolitlerinde gerçekleştirilmesi durumunda, çıplak metal kuponlarına kıyasla yüzeylerinde daha fazla biyofilm oluşumu gerçekleşmiştir.



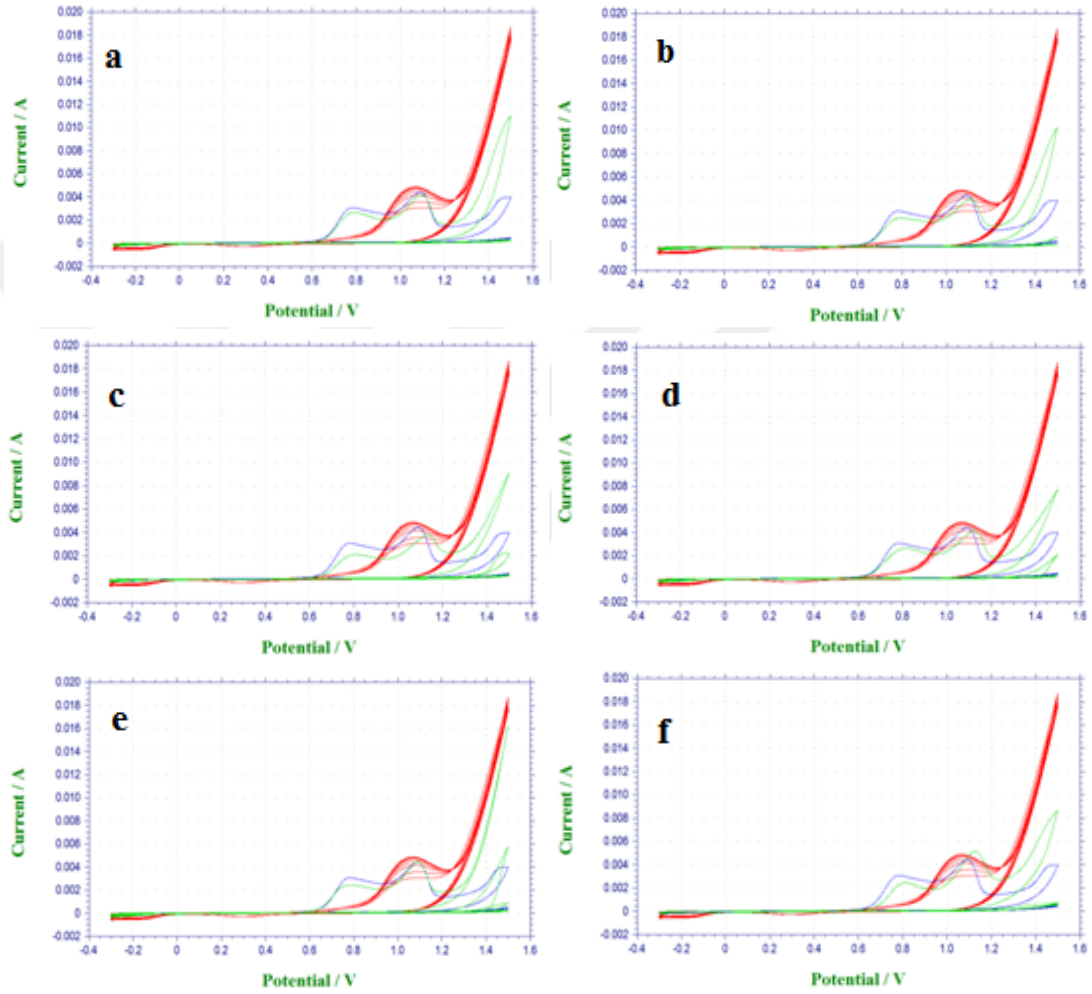
Şekil 4.9. Farklı elektrolit ortamlarda sentezlenen PANİ (■) ve POA (■) filmlerinin antibiyofilm etkinlikleri

#### 4.1.2. PANİ ve POA Filmlerine Enzim İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu

##### 4.1.2.1. Elektropolimerizasyon ile Enzim İmmobilizasyonu

Şekil 4.10.'da amonyum okzalit ortamında anilin monomeri ile gerçekleştirilen PANİ sentezinde, polimer filme enzimlerin immobilizasyonuna ait sentez eğrileri verilmiştir. Grafiklerde kırmızı ile gösterilen eğriler, monomerin bulunmadığı, sadece elektrolit varlığında elde edilmiş olan eğrilerdir. Mavi ile gösterilen eğriler, söz konusu elektrolitte monomer varlığında elde edilen polimerizasyon sentez eğrileridir. Yeşil renk

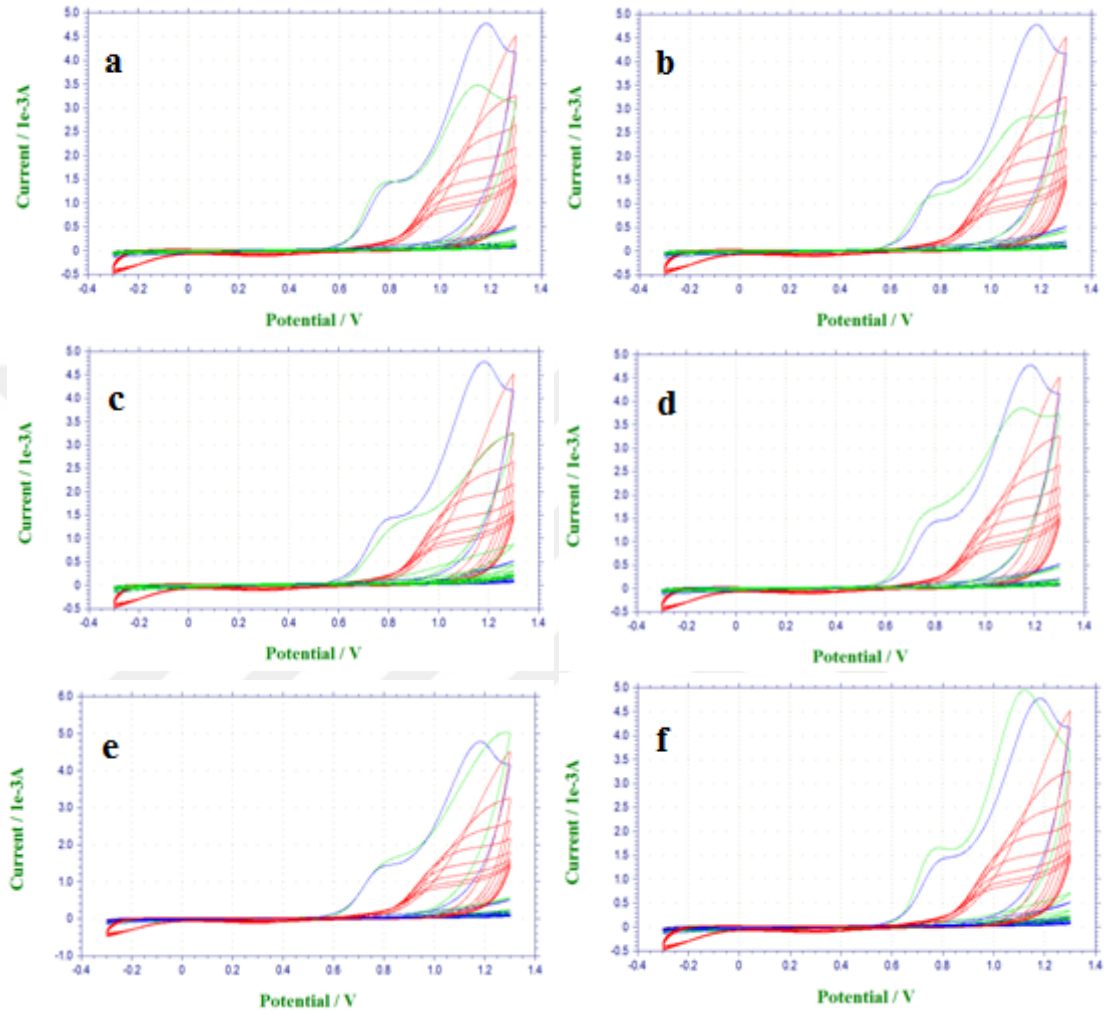
ile gösterilen eğriler ise enzim varlığında sentezlenen PANİ film eğrilerine aittir. Görüldüğü gibi enzim varlığında akım değerlerinde gözlenen düşüş, enzim varlığında elektrolitin iletkenliğinin düşmesine bağlı olarak elektropolimerleşme hızının azalması ile ve ayrıca proteinlerin polimer film yapısına katılması sonucu polimer filmlerin iletkenliklerinin azalması ile açıklanabilir.



Şekil 4.10. Amonyum okzalot ortamında anilin monomeri ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarına ait CV eğrileri (a)  $\alpha$ -amilaz (b) DNAz (c) glukoz oksidaz (d)  $\alpha$ -kimotripsin (e) lipaz (Kırmızı: elektrolit, Mavi: elektrolit + monomer, Yeşil: elektrolit + monomer + enzim)

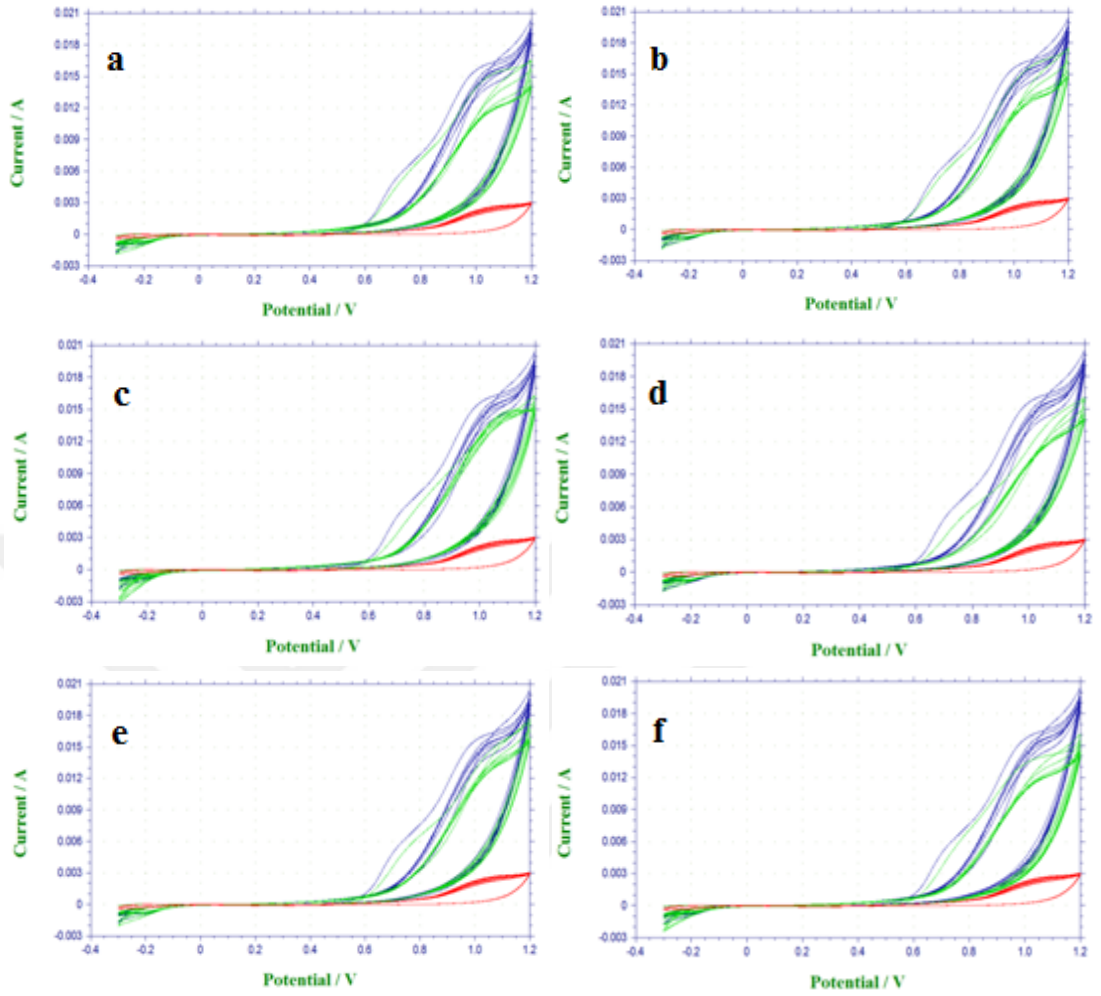
Şekil 4.11.'te sodyum salisilat ortamında anilin monomeri ile gerçekleştirilen PANİ sentezinde polimer filme enzimlerin immobilizasyonuna ait CV sentez eğrileri verilmiştir. Enzim katkılı ortamlarda monomer oksidasyon pikleri belirgin bir şekilde tespit edilmiş olup, lipaz ve pektinazlı ortamlar hariç akım değerlerinin enzimsiz

ortamlara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum lipaz veya pektinaz enzimlerinin bulunduğu elektrolit ortamlarında elektropolimerizasyon hızını artırdığı, diğer enzimlerin ise düşürdüğünü göstermektedir.



Şekil 4.11. Sodyum salisilat ortamında anilin monomeri ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarına ait CV eğrileri (a)  $\alpha$ -amilaz (b) DNAz (c) glukoz oksidaz (d)  $\alpha$ -kimotripsin (e) lipaz (f) pektinaz (Kırmızı: elektrolit, Mavi: elektrolit + monomer, Yeşil: elektrolit + monomer + enzim)

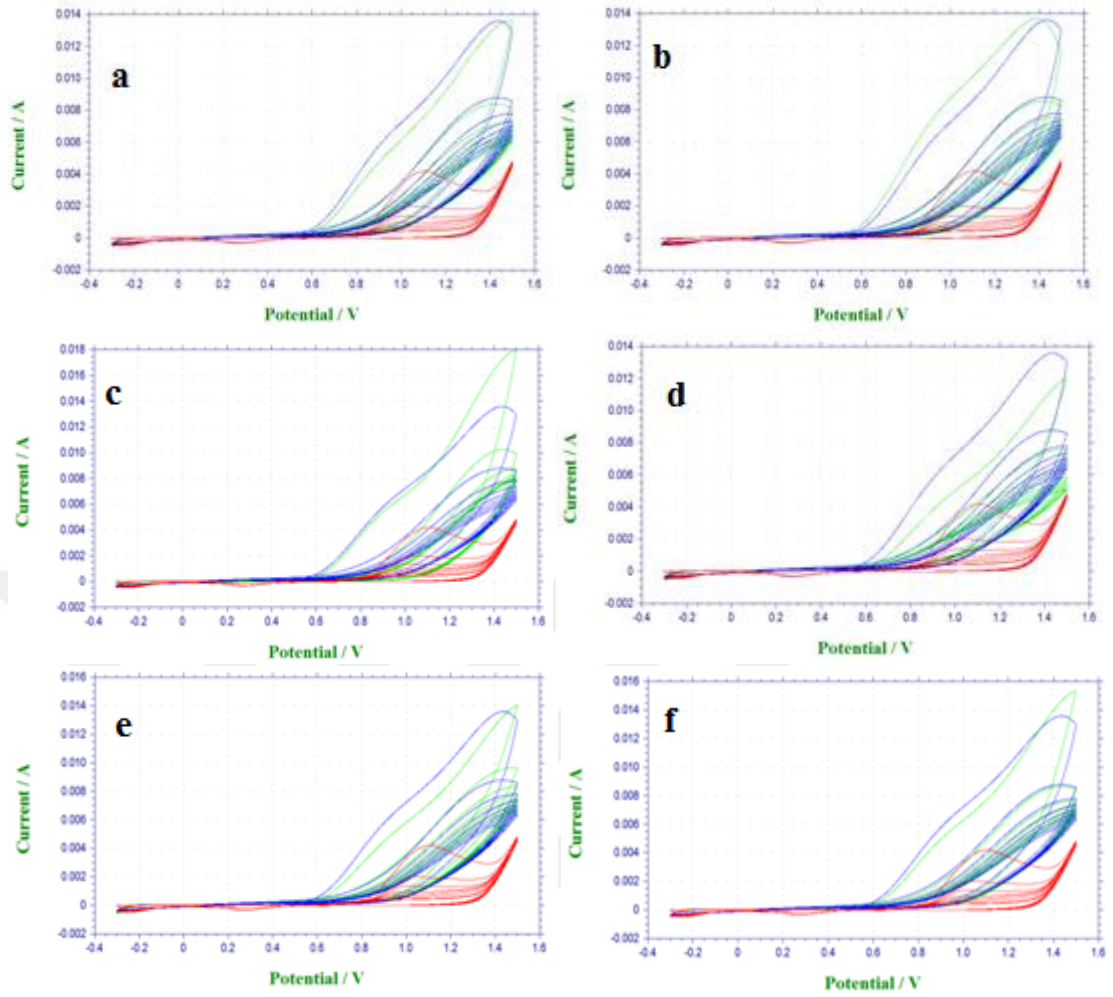
Şekil 4.12.'te amonyum okzalot ortamında o-anisidin monomeri ile gerçekleştirilen POA sentezinde polimer filme enzimlerin immobilizasyonuna ait sentez eğrileri görülmektedir. Amonyum okzalot ve o-anisidin varlığında elde edilen sentez eğrilerinde görülen monomer oksidasyon pik şiddetlerinin enzimli ortamlara göre daha yüksek olduğu görülürken, monomer oksidasyon potansiyel değerlerinin ise enzimsiz ortam ile hemen hemen aynı değerlerde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. Amonyum okzalat ortamında *o*-anisidin monomeri ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarına ait CV eğrileri (a)  $\alpha$ -amilaz (b) DNAz (c) glukoz oksidaz (d)  $\alpha$ -kimotripsin (e) lipaz (f) pektinaz (Kırmızı: elektrolit, Mavi: elektrolit + monomer, Yeşil: elektrolit + monomer + enzim)

Şekil 4.13.'te sodyum salisilat ortamında *o*-anisidin monomeri ile gerçekleştirilen POA sentezinde polimer filme enzimlerin immobilizasyonuna ait sentez eğrileri görülmektedir. Sodyum salisilat ortamında *o*-anisidin monomeri ile gerçekleştirilen elektropolimerizasyon akım değerlerinin, enzimli ortamlara göre genellikle düşük olduğu sentez eğrilerinden görülmektedir.

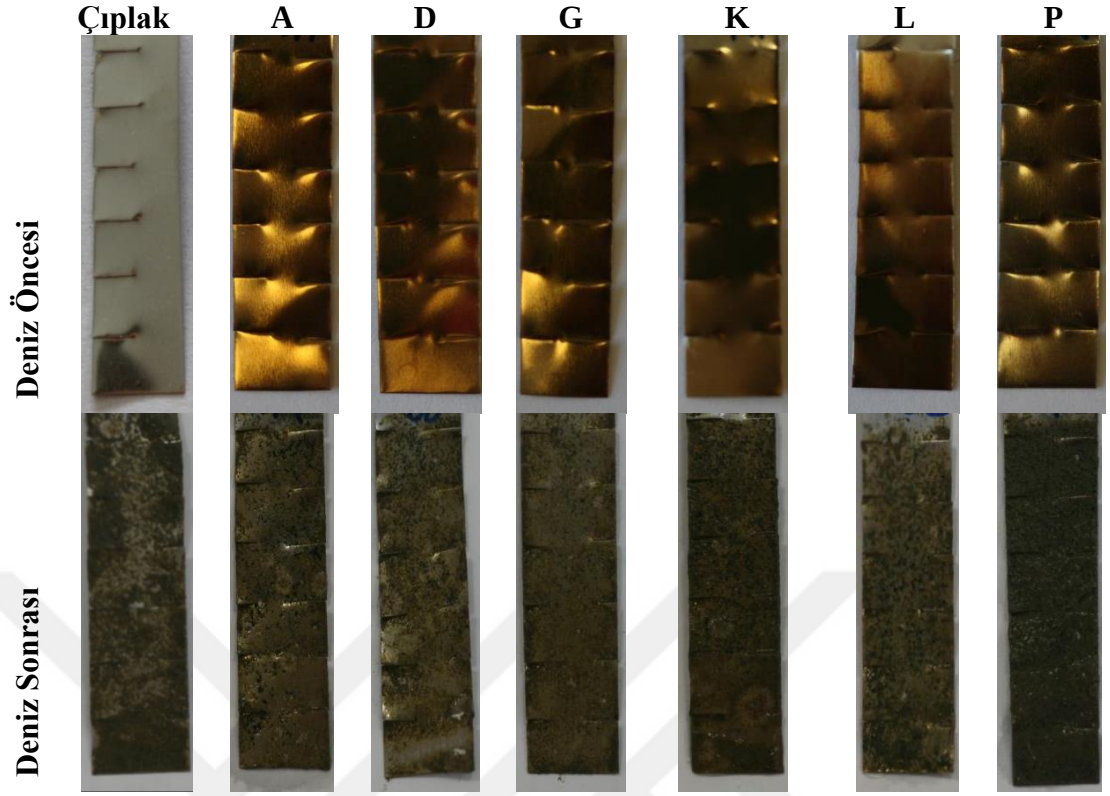
Her iki elektrolit ortamında hem anilin hem de *o*-anisidin elektropolimerizasyon sentez eğrilerinin enzimli ortamlara göre farklılık göstermesi, sentezlenen polianilin ve poli(*o*-anisidin) film yapılarında enzimlerin tutuklandığını göstermektedir.



Şekil 4.13. Sodyum salisilat ortamında *o*-anisidin monomeri ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarına ait CV eğrileri (a)  $\alpha$ -amilaz (b) DNAz (c) glukoz oksidaz (d)  $\alpha$ -kimotripsin (e) lipaz (f) pektinaz (Kırmızı: elektrolit, Mavi: elektrolit + monomer, Yeşil: elektrolit + monomer + enzim)

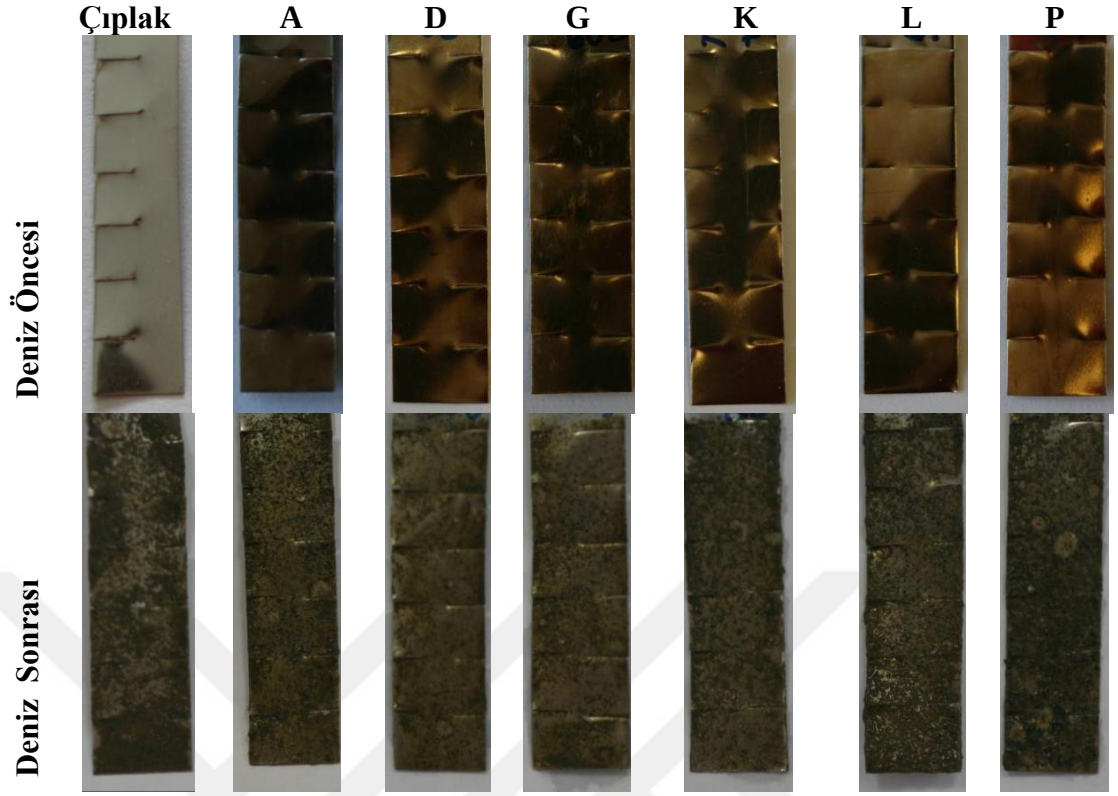
#### 4.1.2.2. Enzim İmmobilize Edilmiş Kuponların Yüzey Fotoğraf Görüntüleri

Çıplak SS304 kuponu ve tekli enzim (A:  $\alpha$ -amilaz, D: DNAz, G: GOD, K:  $\alpha$ -kimotripsin, L: lipaz, P: pektinaz) immobilizasyonu gerçekleştirilmiş polimer film kaplı SS304 kuponlarının yüzey fotoğrafları, deniz öncesi ve denizde inkübasyon sonrası fotoğraf makinesiyle çekilmiştir. Kuponların, deniz öncesi ve denizde inkübasyon sonrası fotoğrafları karşılaştırılarak oluşan biyofilm miktarları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.14).



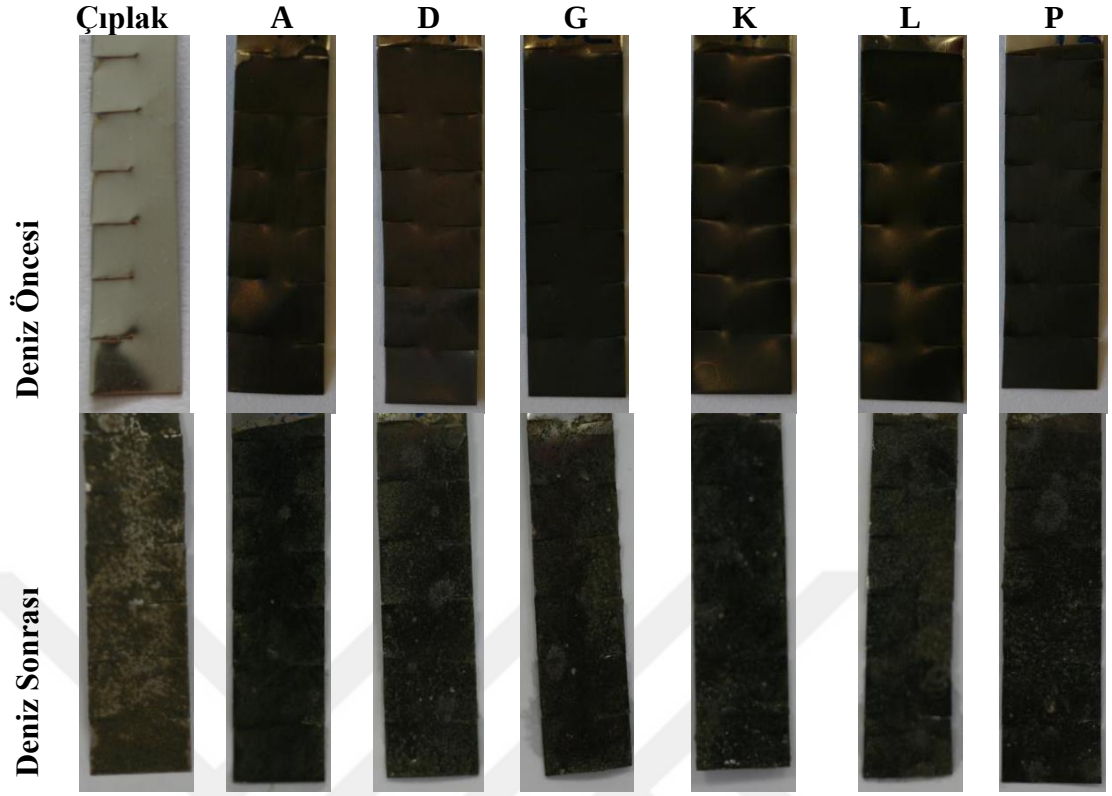
Şekil 4.14. Amonyum okzalot ortamında anilin monomeri ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponların görüntüleri

Deniz sonrası çekilen fotoğraflar arasında (Şekil 4.14.), amonyum okzalot ortamında PANİ ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş olan enzim barındıran kuponlar ile çıplak metal kuponu karşılaştırıldığında, enzim immobilize kuponlarda, çıplak metale göre daha az miktarda biyofilm oluşumunun gerçekleştiği görülmektedir. Sodyum salisilat ortamında PANİ ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş olan enzim barındıran kuponlar ile çıplak metal kuponunun deniz sonrası çekilen fotoğrafları (Şekil 4.15.), karşılaştırıldığında, enzim immobilize kuponların üzerinde, çıplak metale oranla daha az miktarda biyofilm oluşumunun olduğu görülmektedir.



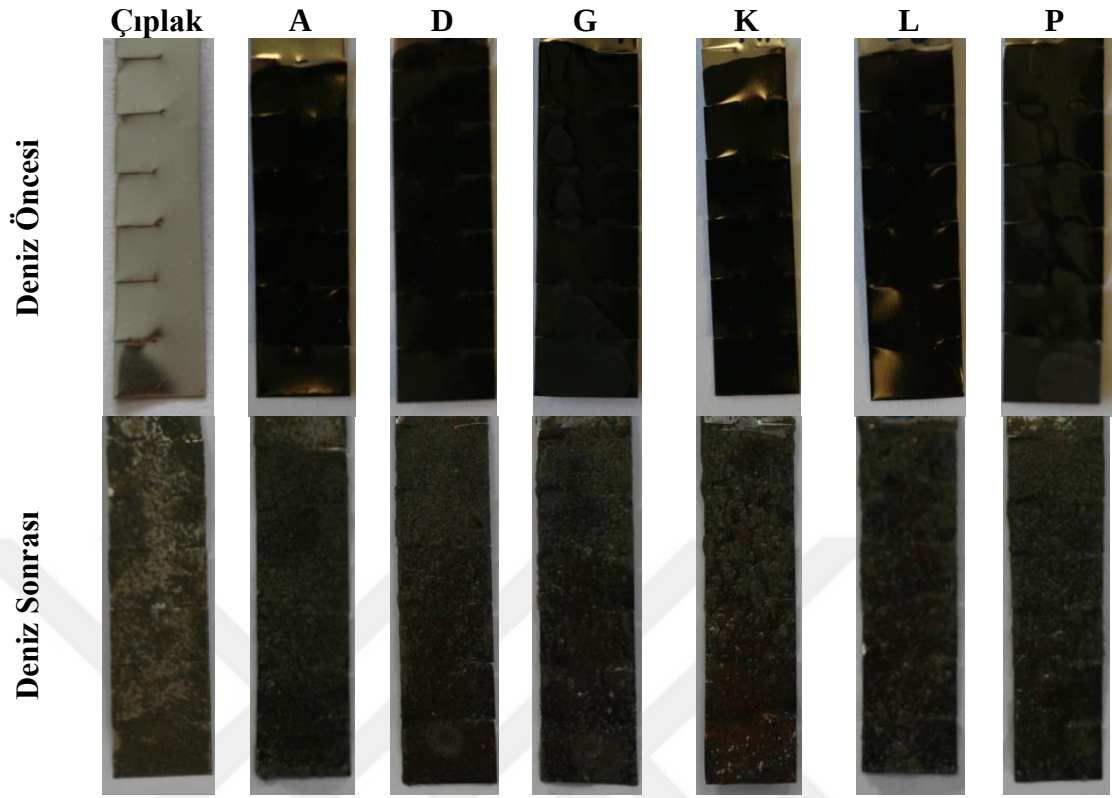
Şekil 4.15. Sodyum salisilat ortamında anilin monomeri ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponların görüntüleri

Enzim immobilizasyonu amonyum okzalat ortamında POA ile gerçekleştirilmiş olan kuponlar ile çıplak metal kuponunun deniz sonrası çekilen fotoğrafları (Şekil 4.16.) karşılaştırıldığında, kaplamaların siyah renkli olması dolayısıyla fotoğraflarda çok net görülmemesiyle birlikte, enzim immobilize kuponların üzerinde, çıplak metale oranla daha az miktarda biyofilm oluşumu görülebilmektedir.



Şekil 4.16. Amonyum okzalat ortamında *o*-anisidin monomeri ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponların görüntüleri

Sodyum salisilat ortamında POA ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş olan kuponlar ile çıplak metal kuponunun, deniz sonrası çekilen fotoğrafları (Şekil 4.17) karşılaştırıldığında, POA film tabakasının koyu renkli olması sebebiyle fotoğraflarda çok net görülmemekle birlikte, enzim immobilize kuponların, çıplak metale oranla daha az miktarda biyofilm taşıdığı görülebilmektedir.

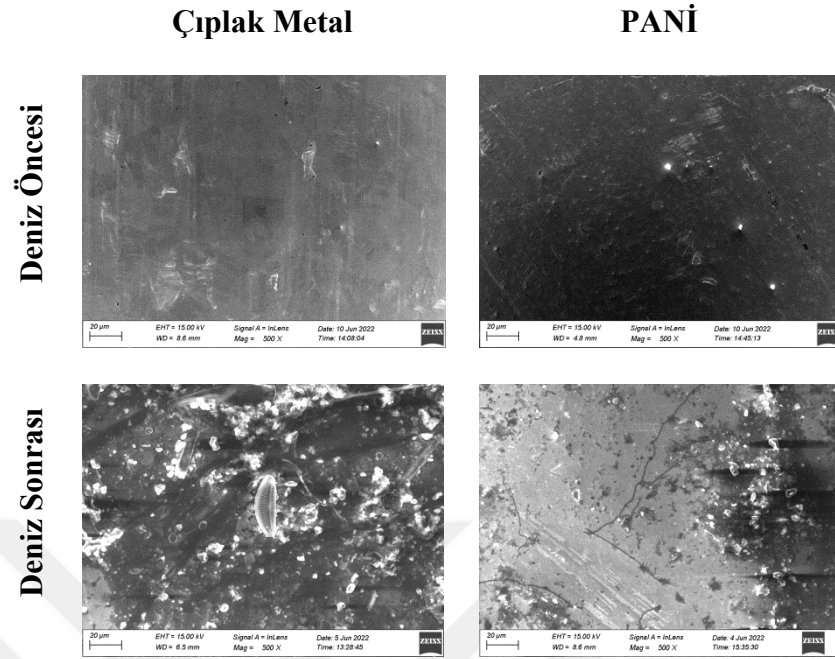


Şekil 4.17. Sodyum salisilat ortamında *o*-anisidin monomeri ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponların görüntüleri

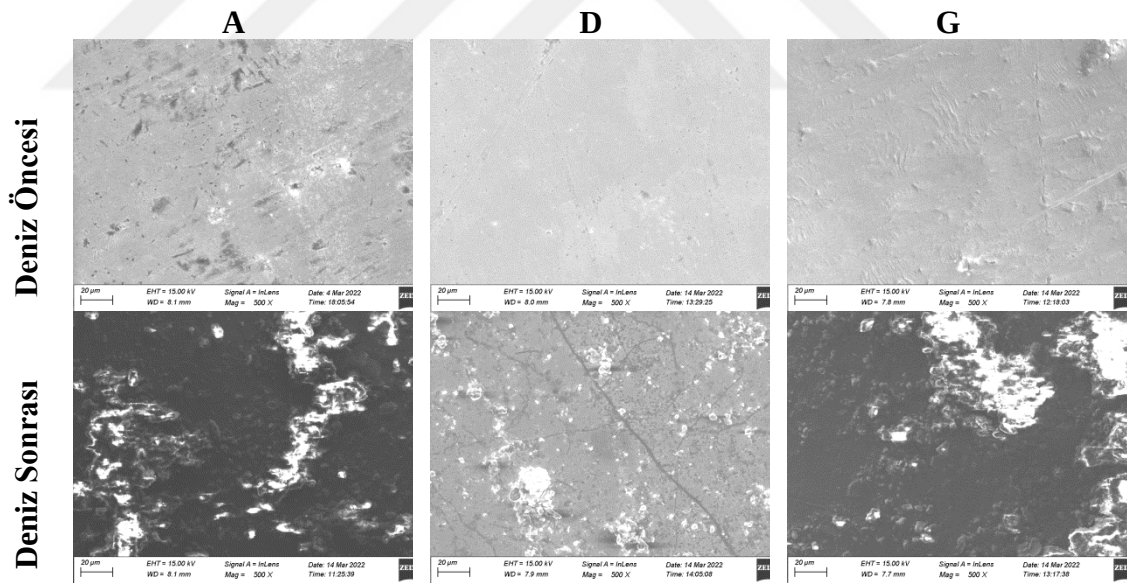
#### 4.1.2.3. SEM ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleri

Deniz öncesi ve denizde inkübe edildikten sonra, çıplak SS304 kuponu ile enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş polimer film kaplı SS304 kuponlarının SEM görüntüleri karşılaştırılmıştır. Örnekler gönderilmeden önce azot gazından geçirilmiştir.

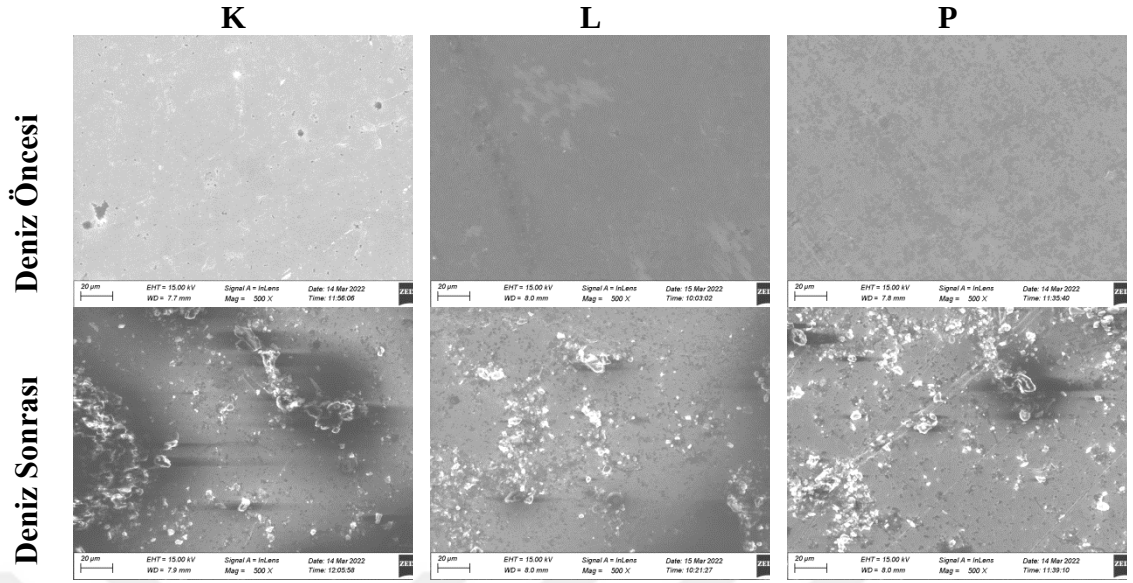
Şekil 4.18. 'de çıplak metal kuponuna ait 500 kat büyütülmüş SEM görüntüsü ile amonyum okzalat ortamında sentezlenmiş PANİ film kaplı kupona ait 500 kat büyütülmüş SEM görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4.18. Çıplak metal ve amonyum okzalot ortamında sentezlenmiş PANİ film kaplı kuponlara ait SEM görüntüleri



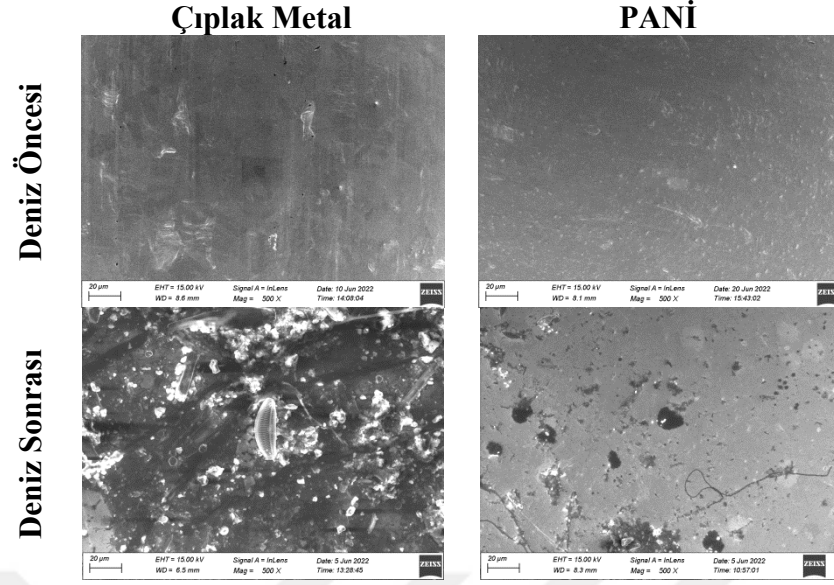
Şekil 4.19. Amonyum okzalot ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş  $\alpha$ -amilaz, DNaz ve glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri



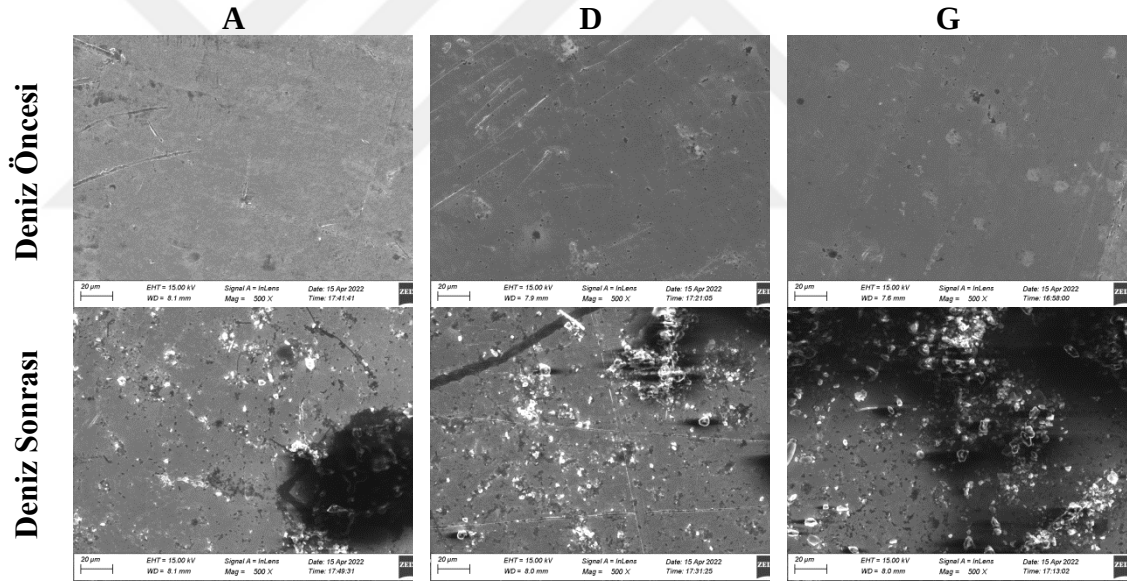
Şekil 4.20. Amonyum okzalot ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş  $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri

Şekil 4.19. ve Şekil 4.20. incelendiğinde enzim immobilize kuponlarda çıplak metal ile kıyaslandığında daha az miktarda biyolojik birikimin olduğu görülmektedir.

Sodyum salisilat ortamında sentezlenen PANİ ve bu ortamda enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponlara ait SEM görüntüleri verilmiştir. Deniz öncesi ile deniz sonrasına ait görüntülerin karşılaştırmalı olarak verildiği Şekil 4.21'te çıplak metal kupon ile sodyum salisilat ortamında sentezlenmiş PANİ film kaplı kupona ait görüntüler yer almaktadır.

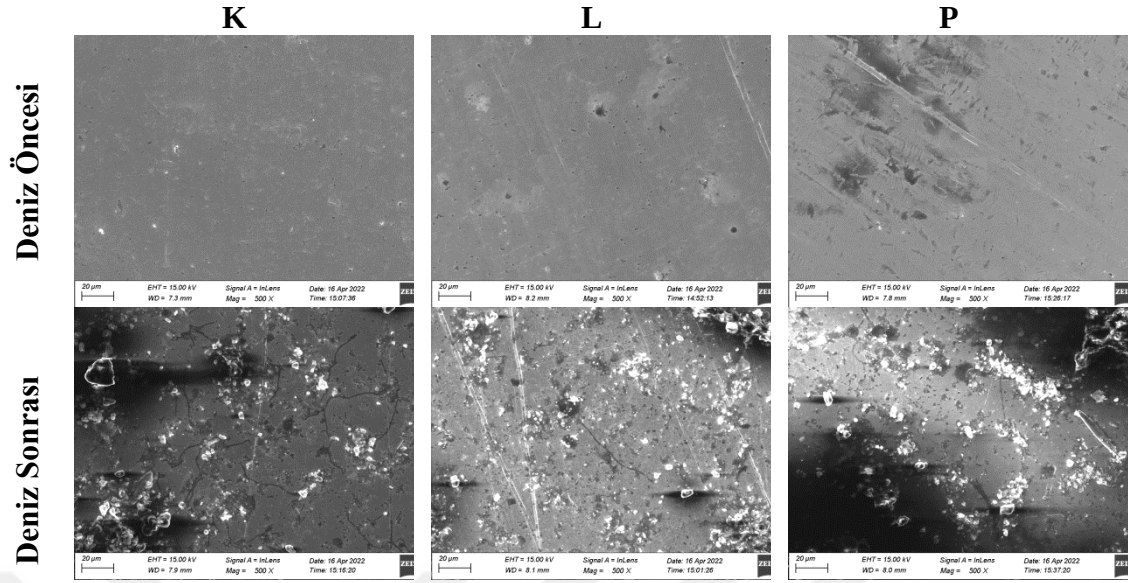


Şekil 4.21. Şekil Çıplak metal ve sodyum salisilat ortamında sentezlenmiş PANİ film kaplı kuponlara ait SEM görüntüleri



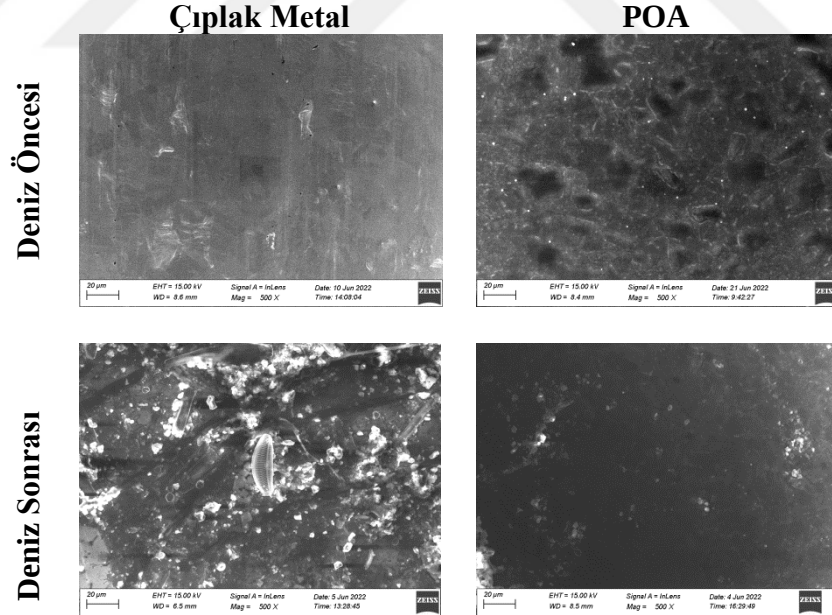
Şekil 4.22. Sodyum salisilat ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş  $\alpha$ -amilaz, DNaz ve glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri

Şekil 4.22 ile Şekil 4.23 sodyum salisilat ortamında sentezi gerçekleştirilen PANİ filmi ile enzim immobilizasyonu sağlanmış enzimleri barındıran kuponlara ait SEM görüntüleri yer almaktadır. Bu görüntülerde de görüldüğü gibi kuponlara enzim immobilizasyonunun gerçekleştirilmiş olması biyofilme oluşumuna karşı bir etkinlik sağlamıştır.

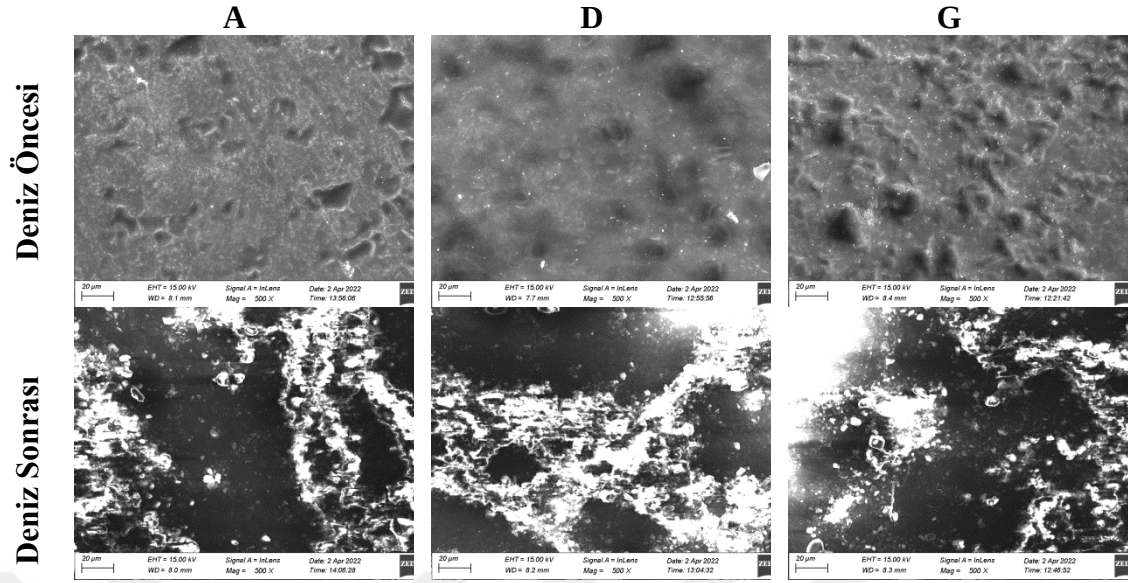


Şekil 4.23. Sodyum salisilat ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş  $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri

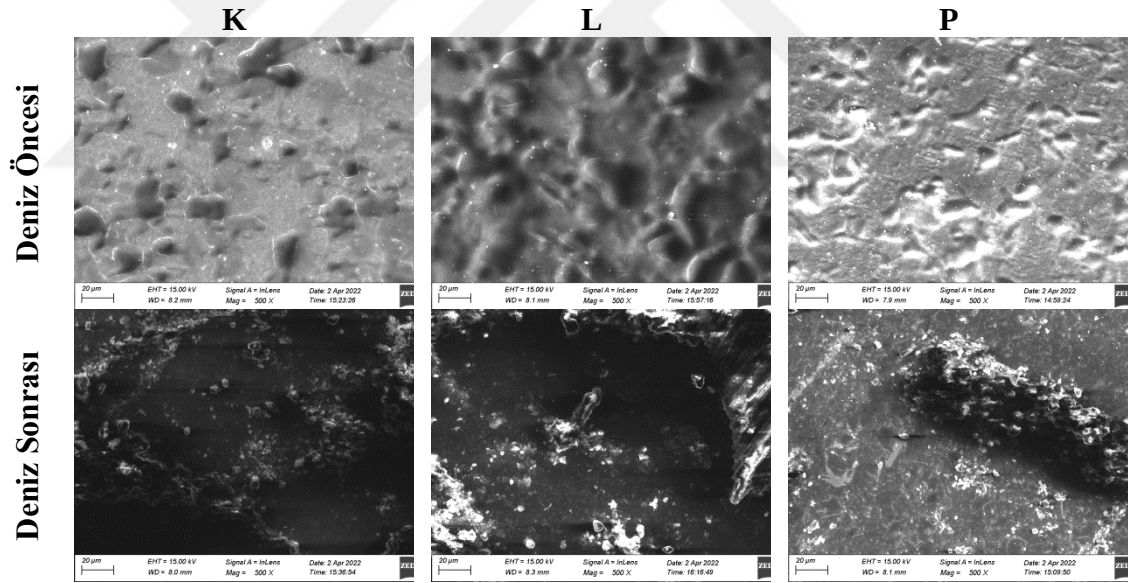
Şekil 4.24'de çıplak metal ile amonyum okzalot ortamında sentezlenen POA kaplı filme ait SEM görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 4.24. Çıplak metal ve amonyum okzalot ortamında sentezlenmiş POA film kaplı kuponlara ait SEM görüntüleri



Şekil 4.25. Amonyum okzalot ortamında *o*-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş  $\alpha$ -amilaz, DNaz ve glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri

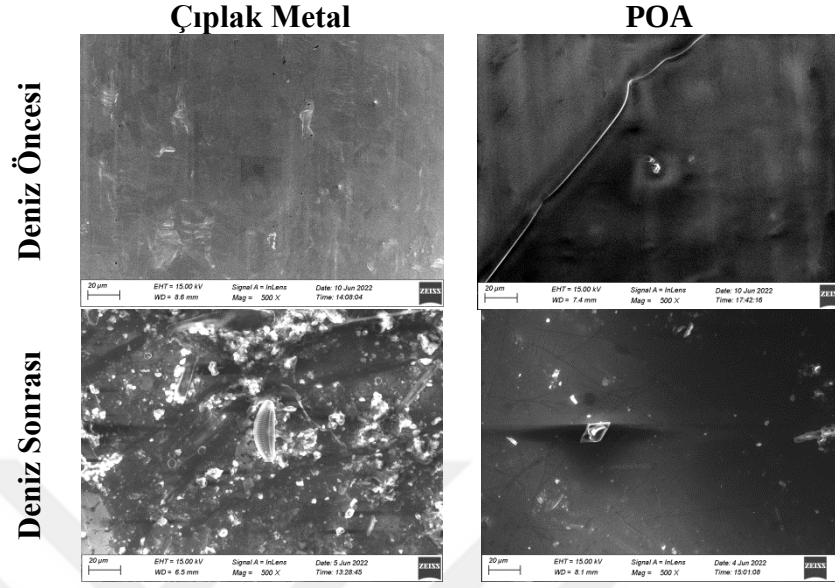


Şekil 4.26. Amonyum okzalot ortamında *o*-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş  $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri

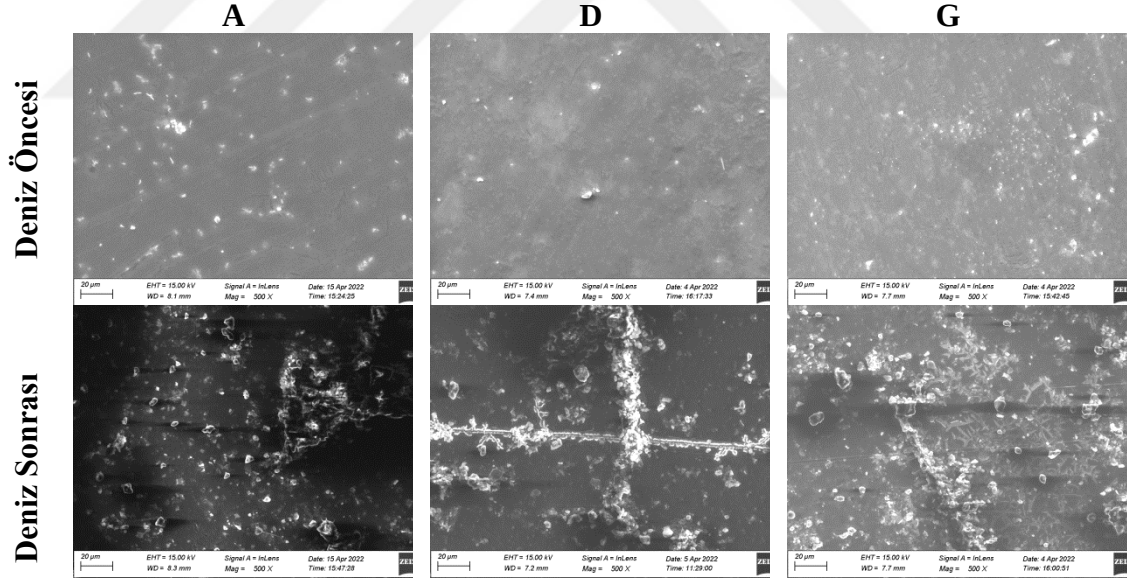
Şekil 4.25. ile Şekil 4.26. incelendiğinde çıplak metale kıyasla en yüksek antibiyofilm etkinin amonyum okzalot ortamında POA ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş olan  $\alpha$ -kimotripsin ile lipaza ait olduğu görülmektedir.

Çıplak metal kupon ile sodyum salisilat ortamında sentezlenmiş POA film kaplı

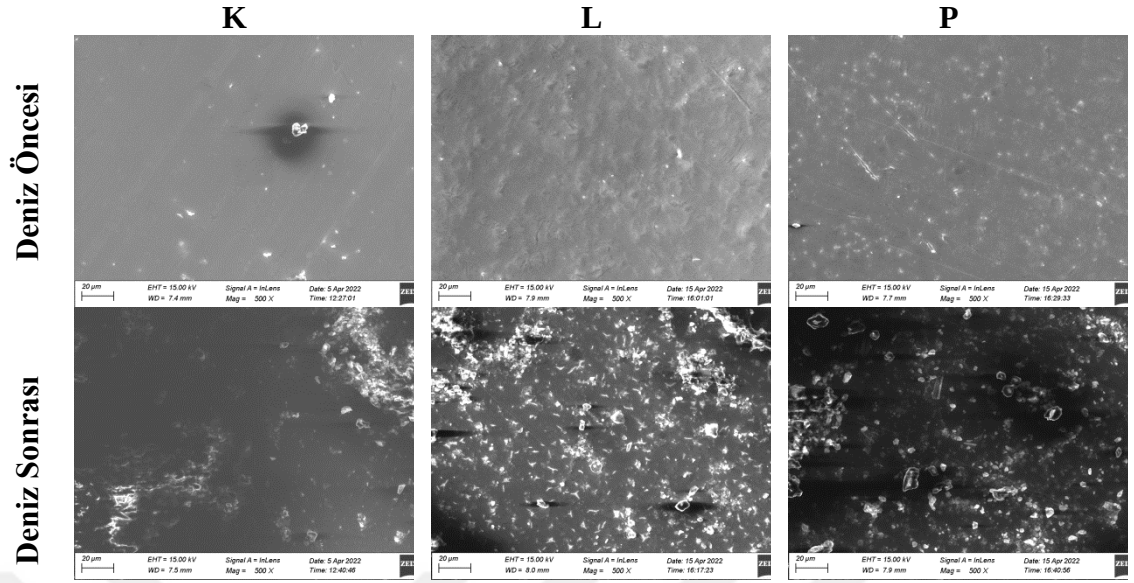
kupona ait SEM görüntüleri Şekil 4.27'de bulunmaktadır.



Şekil 4.27. Çıplak metal ve sodyum salisilat ortamında sentezlenmiş POA film kaplı kuponlara ait SEM görüntüleri



Şekil 4.28. Sodyum salisilat ortamında o-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş  $\alpha$ -amilaz, DNaz ve glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri



Şekil 4.29. Sodyum salisilat ortamında *o*-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş  $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri

Sodyum salisilat ortamında POA ile gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarına ait SEM görüntüleri Şekil 4.28. ile Şekil 4.29'da verilmiştir. Bu çizelgelerde de görüleceği gibi sodyum salisilat ortamında POA ile gerçekleştirilen  $\alpha$ -kimotripsin immobilizasyonu diğer enzim immobilizasyonlarına kıyasla daha yüksek antibiyofilm etkinliği göstermiştir.

#### 4.1.2.4. EDX Analizleri

Çizelge 4.4.'de amonyum okzalot ortamında anilin polimerizasyonu sırasında immobilizasyonları gerçekleştirilen  $\alpha$ -amilaz, DNaz, glukoz oksidaz,  $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini barındıran kuponlara ait deniz öncesi ve deniz sonrası EDX verileri bulunmaktadır.

Çizelge 4.3. Amonyum okzalot ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri

| <b>Deniz Öncesi</b>  |               |             |          |          |          |          |          |          |  |
|----------------------|---------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|--|
| <b>Element</b>       | <b>Çıplak</b> | <b>PANİ</b> | <b>A</b> | <b>D</b> | <b>G</b> | <b>K</b> | <b>L</b> | <b>P</b> |  |
| <b>C K</b>           | 3,41          | 6,91        | 8,76     | 11,22    | 11,86    | 11,78    | 10,68    | 15,77    |  |
| <b>N K</b>           |               | 0,58        |          |          |          |          | 0,99     |          |  |
| <b>O K</b>           | 0,75          | 0,85        |          |          |          |          |          |          |  |
| <b>Si K</b>          | 0,99          | 0,84        | 1,02     | 1,05     | 1,38     | 1,37     | 1,32     | 1,06     |  |
| <b>Cr K</b>          | 17,20         | 17,06       | 17,30    | 16,81    | 17,31    | 16,29    | 17,02    | 15,59    |  |
| <b>Fe K</b>          | 68,81         | 65,60       | 65,22    | 62,95    | 61,93    | 63,01    | 62,31    | 59,99    |  |
| <b>Ni K</b>          | 8,84          | 8,16        | 7,71     | 7,97     | 7,51     | 7,55     | 7,69     | 7,59     |  |
| <b>Deniz Sonrası</b> |               |             |          |          |          |          |          |          |  |
| <b>C K</b>           | 0,02          | 6,91        | 0,11     | 14,14    | 0,03     | 10,27    | 0,07     | 11,81    |  |
| <b>N K</b>           |               | 0,62        |          |          |          |          | 1,52     |          |  |
| <b>O K</b>           | 28,44         | 2,19        |          |          |          |          |          |          |  |
| <b>Na K</b>          | 20,76         | 0,48        |          |          |          |          | 0,81     |          |  |
| <b>Mg K</b>          | 2,31          | 0,49        | 7,69     | 1,42     | 3,83     | 1,74     | 3,41     | 1,64     |  |
| <b>Al K</b>          | 1,39          |             | 8,34     |          | 4,88     | 1,19     | 3,27     | 2,82     |  |
| <b>Si K</b>          | 9,30          | 1,08        | 18,16    | 2,13     | 9,67     | 2,12     | 5,99     | 4,35     |  |
| <b>Cl K</b>          | 20,54         | 0,67        | 4,11     | 0,93     | 1,66     | 1,14     | 1,60     |          |  |
| <b>K K</b>           | 0,93          |             | 2,21     |          | 1,58     |          | 1,01     |          |  |
| <b>Ca K</b>          | 1,16          |             | 6,98     |          | 6,06     |          | 1,70     | 1,62     |  |
| <b>Cr K</b>          | 3,03          | 15,78       | 9,77     | 16,20    | 14,46    | 16,51    | 15,09    | 15,95    |  |
| <b>Fe K</b>          | 8,97          | 63,32       | 36,02    | 57,88    | 50,85    | 59,43    | 56,64    | 54,63    |  |
| <b>Ni K</b>          | 1,90          | 8,46        | 4,83     | 7,30     | 6,97     | 7,60     | 7,42     | 7,18     |  |
| <b>Mo L</b>          | 1,24          |             | 1,77     |          |          |          | 1,48     |          |  |

Çizelge 4.4 incelendiğinde genel olarak tüm örneklerde deniz sonrasında kuponlar üzerinde silisyum miktarının arttığı buna karşın krom, demir ve nikel miktarlarının azaldığı, magnezyum ve klor elementlerinin ise biriktiği görülmektedir. Bunların dışında, deniz sonrasında kupon yüzeylerinde sodyum, alüminyum, potasyum, kalsiyum, molibdenin de biriktiği gözlenmektedir.

Çizelge 4.5.'te sodyum salisilat ortamında anilin içerisine hapsedilerek immobilizasyonları gerçekleştirilen  $\alpha$ -amilaz, DNaz, glukoz oksidaz,  $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini barındıran kuponların deniz öncesi ve deniz sonrası EDX verileri bulunmaktadır.

Çizelge 4.4. Sodyum salisilat ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri

| <b>Deniz Öncesi</b>  |               |             |          |          |          |          |          |          |
|----------------------|---------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Element</b>       | <b>Çıplak</b> | <b>PANİ</b> | <b>A</b> | <b>D</b> | <b>G</b> | <b>K</b> | <b>L</b> | <b>P</b> |
| <b>C K</b>           | 3,41          | 5,07        | 10,55    | 10,07    | 9,76     | 6,48     | 6,03     | 10,31    |
| <b>N K</b>           |               | 0,33        | 0,70     | 0,68     | 0,72     | 0,82     | 0,47     | 0,33     |
| <b>O K</b>           | 0,75          | 0,96        |          |          |          |          |          |          |
| <b>Si K</b>          | 0,99          | 1,02        | 1,51     | 1,35     | 1,36     | 1,15     | 1,13     | 1,21     |
| <b>Cr K</b>          | 17,20         | 17,03       | 17,97    | 17,37    | 17,33    | 17,57    | 17,17    | 17,43    |
| <b>Fe K</b>          | 68,81         | 67,50       | 62,26    | 63,38    | 63,55    | 66,00    | 66,99    | 63,46    |
| <b>Ni K</b>          | 8,84          | 8,09        | 7,00     | 7,15     | 7,28     | 7,98     | 8,21     | 7,27     |
| <b>Deniz Sonrası</b> |               |             |          |          |          |          |          |          |
| <b>C K</b>           | 0,02          | 4,41        | 10,16    | 11,64    | 0,07     | 9,37     | 10,18    | 11,14    |
| <b>N K</b>           |               | 0,63        | 0,89     | 1,09     | 0,83     | 1,03     | 1,07     | 0,60     |
| <b>O K</b>           | 28,44         | 1,79        | 7,91     |          | 34,43    | 5,72     | 3,29     |          |
| <b>Na K</b>          | 20,76         | 0,63        |          |          |          |          | 0,62     |          |
| <b>Mg K</b>          | 2,31          | 0,65        | 1,18     | 1,23     | 3,34     | 0,90     | 0,74     | 1,01     |
| <b>Al K</b>          | 1,39          | 0,65        | 1,56     | 1,41     | 5,21     | 1,02     | 0,63     | 1,12     |
| <b>Si K</b>          | 9,30          | 0,95        | 2,69     | 3,69     | 10,82    | 1,82     | 1,21     | 2,49     |
| <b>S K</b>           |               | 0,58        |          |          |          |          |          |          |
| <b>Cl K</b>          | 20,54         | 0,29        |          |          |          |          |          |          |
| <b>K K</b>           | 0,93          |             |          |          | 1,56     |          |          |          |
| <b>Ca K</b>          | 1,16          |             |          |          | 6,25     |          |          | 2,44     |
| <b>Cr K</b>          | 3,03          | 16,30       | 15,47    | 16,19    | 7,73     | 15,17    | 15,34    | 16,68    |
| <b>Fe K</b>          | 8,97          | 65,25       | 53,20    | 57,79    | 26,37    | 58,26    | 59,71    | 57,56    |
| <b>Ni K</b>          | 1,90          | 7,87        | 6,94     | 6,96     | 3,38     | 6,70     | 7,21     | 6,95     |
| <b>Mo L</b>          | 1,24          |             |          |          |          |          |          |          |

Veriler incelendiğinde genel bir eğilim olarak deniz sonrasında analizlenen kuponlarda azot ile silisyum miktarlarının arttığı; krom, demir ve nikel elementlerinin miktarlarının azaldığı ve yüzeylerde magnezyum ile alüminyum birikimi olduğu gözlenmektedir. Bunların yanında yüzeylerde, sodyum, klor, potasyum, kalsiyum, kükürt, molibden varlığına rastlanmaktadır.

Amonyum okzalot ortamında, POA içerisine hapsedilen enzimlere ait deniz öncesi ve sonrası EDX analiz sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelge 4.6 incelendiğinde genel bir eğilim olarak silisyum miktarının arttığı görülmektedir. Denizde inkübasyon sonrası kupon yüzeylerinde sodyum, magnezyum, klor, potasyum, kalsiyum ve molibden birikiminin olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.5. Amonyum okzalat ortamında *o*-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri

| <b>Deniz Öncesi</b>  |               |             |          |          |          |          |          |          |
|----------------------|---------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Element</b>       | <b>Çıplak</b> | <b>PANİ</b> | <b>A</b> | <b>D</b> | <b>G</b> | <b>K</b> | <b>L</b> | <b>P</b> |
| <b>C K</b>           | 3,41          | 38,18       | 37,90    | 48,38    | 46,83    | 46,34    | 64,85    | 50,33    |
| <b>N K</b>           |               | 3,81        | 4,27     | 6,13     | 6,42     | 6,31     | 9,79     | 7,84     |
| <b>O K</b>           | 0,75          | 3,77        |          |          |          |          |          |          |
| <b>Si K</b>          | 0,99          | 0,47        | 0,79     | 0,59     | 0,58     | 0,89     | 0,50     | 0,53     |
| <b>Cr K</b>          | 17,20         | 10,36       | 11,54    | 9,60     | 9,31     | 9,74     | 6,01     | 8,96     |
| <b>Fe K</b>          | 68,81         | 38,78       | 40,68    | 31,50    | 33,00    | 33,12    | 16,77    | 28,98    |
| <b>Ni K</b>          | 8,84          | 4,63        | 4,81     | 3,81     | 3,85     | 3,60     | 2,08     | 3,36     |
| <b>Deniz Sonrası</b> |               |             |          |          |          |          |          |          |
| <b>C K</b>           | 0,02          | 28,24       | 41,21    | 24,30    | 28,31    | 37,87    | 10,21    | 39,72    |
| <b>N K</b>           |               | 2,53        | 4,10     | 7,24     | 5,86     | 4,73     | 3,02     | 6,46     |
| <b>O K</b>           | 28,44         | 3,54        |          |          |          |          |          |          |
| <b>Na K</b>          | 20,76         | 0,32        |          |          |          | 0,63     |          | 1,73     |
| <b>Mg K</b>          | 2,31          | 0,37        | 1,21     | 6,17     | 3,00     | 2,18     | 3,27     | 1,52     |
| <b>Al K</b>          | 1,39          |             | 1,66     | 9,25     | 4,71     | 3,24     | 6,27     | 2,38     |
| <b>Si K</b>          | 9,30          | 0,71        | 3,36     | 23,13    | 10,86    | 7,04     | 11,31    | 4,88     |
| <b>Cl K</b>          | 20,54         | 0,61        |          |          |          | 1,69     | 1,09     | 1,53     |
| <b>K K</b>           | 0,93          |             |          |          |          |          | 2,23     |          |
| <b>Ca K</b>          | 1,16          |             |          | 10,43    | 3,13     | 3,65     | 4,66     | 2,17     |
| <b>Cr K</b>          | 3,03          | 12,63       | 9,56     | 3,37     | 9,41     | 8,31     | 11,88    | 8,03     |
| <b>Fe K</b>          | 8,97          | 46,29       | 35,13    | 13,60    | 30,72    | 27,18    | 40,27    | 27,47    |
| <b>Ni K</b>          | 1,90          | 4,76        | 3,77     | 2,50     | 3,99     | 3,47     | 4,93     | 4,10     |
| <b>Mo L</b>          | 1,24          |             |          |          |          |          |          |          |
| <b>S K</b>           |               |             |          |          |          |          | 0,86     |          |

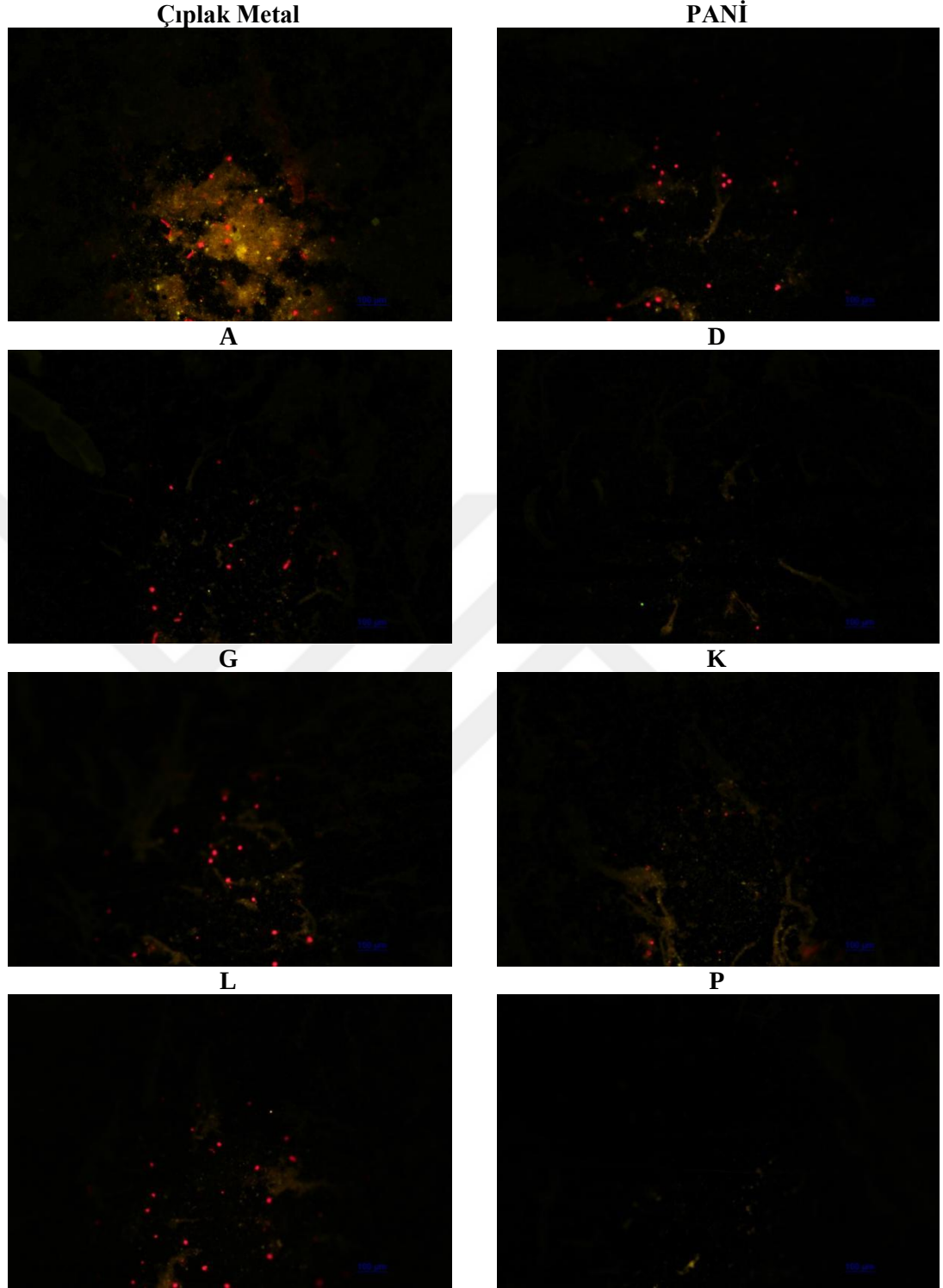
Çizelge 4.7'de POA filminin içerisine sodyum salisilat ortamında immobilizasyonu gerçekleştirilen enzimleri içeren kuponlara ait, deniz öncesi ve sonrası EDX analiz sonuçları bulunmaktadır. Veriler incelendiğinde genel olarak deniz sonrasında yüzeylerde karbon ve azot miktarının azaldığı, silisyum miktarının ise attığı görülmektedir. Denizde bekleme ile birlikte yüzeylerde; sodyum, magnezyum, alüminyum, klor, kalsiyum ve molibden birikimi gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.6. Sodyum salisilat ortamında o-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri

| <b>Deniz Öncesi</b>  |               |             |          |          |          |          |          |          |
|----------------------|---------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Element</b>       | <b>Çıplak</b> | <b>PANİ</b> | <b>A</b> | <b>D</b> | <b>G</b> | <b>K</b> | <b>L</b> | <b>P</b> |
| <b>C K</b>           | 3,41          | 44,58       | 37,44    | 43,42    | 37,79    | 40,84    | 40,77    | 38,47    |
| <b>N K</b>           |               | 2,88        | 4,86     | 5,05     | 4,72     | 5,98     | 6,05     | 5,11     |
| <b>O K</b>           | 0,75          | 6,89        |          | 5,89     | 5,27     | 6,65     |          |          |
| <b>Si K</b>          | 0,99          | 0,69        | 0,84     | 0,64     | 0,72     | 0,75     | 0,78     | 0,74     |
| <b>Cr K</b>          | 17,20         | 8,78        | 11,28    | 9,23     | 9,97     | 9,06     | 10,75    | 11,22    |
| <b>Fe K</b>          | 68,81         | 32,53       | 41,01    | 32,15    | 36,81    | 33,02    | 37,76    | 40,26    |
| <b>Ni K</b>          | 8,84          | 3,66        | 4,59     | 3,62     | 4,73     | 3,71     | 3,89     | 4,20     |
| <b>Deniz Sonrası</b> |               |             |          |          |          |          |          |          |
| <b>C K</b>           | 0,02          | 20,03       | 30,58    | 28,44    | 27,59    | 33,68    | 39,39    | 26,35    |
| <b>N K</b>           |               | 1,61        | 2,91     | 3,17     | 3,47     | 4,77     | 4,99     | 2,93     |
| <b>O K</b>           | 28,44         | 4,34        | 14,36    | 10,67    | 9,43     | 9,63     |          | 10,46    |
| <b>Na K</b>          | 20,76         | 0,29        |          | 10,62    |          |          |          | 0,70     |
| <b>Mg K</b>          | 2,31          | 0,75        | 0,63     | 0,63     | 0,79     | 0,61     |          | 0,84     |
| <b>Al K</b>          | 1,39          | 0,50        | 0,83     | 0,78     | 0,75     | 0,81     | 0,92     | 1,06     |
| <b>Si K</b>          | 9,30          | 0,80        | 1,92     | 1,65     | 1,59     | 1,38     | 1,32     | 2,29     |
| <b>Cl K</b>          | 20,54         | 0,59        | 0,73     | 6,13     |          |          |          | 0,71     |
| <b>K K</b>           | 0,93          |             |          |          |          |          |          |          |
| <b>Ca K</b>          | 1,16          |             | 1,92     | 0,56     | 0,71     |          |          | 1,45     |
| <b>Cr K</b>          | 3,03          | 12,79       | 9,91     | 7,61     | 11,32    | 10,08    | 11,32    | 10,39    |
| <b>Fe K</b>          | 8,97          | 51,78       | 32,03    | 26,28    | 39,17    | 34,98    | 37,46    | 38,42    |
| <b>Ni K</b>          | 1,90          | 5,76        | 4,19     | 3,01     | 4,51     | 4,05     | 4,57     | 4,41     |
| <b>Mo L</b>          | 1,24          | 0,75        |          |          | 0,66     |          |          |          |

#### 4.1.2.5. Floresans Mikroskobu ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleme

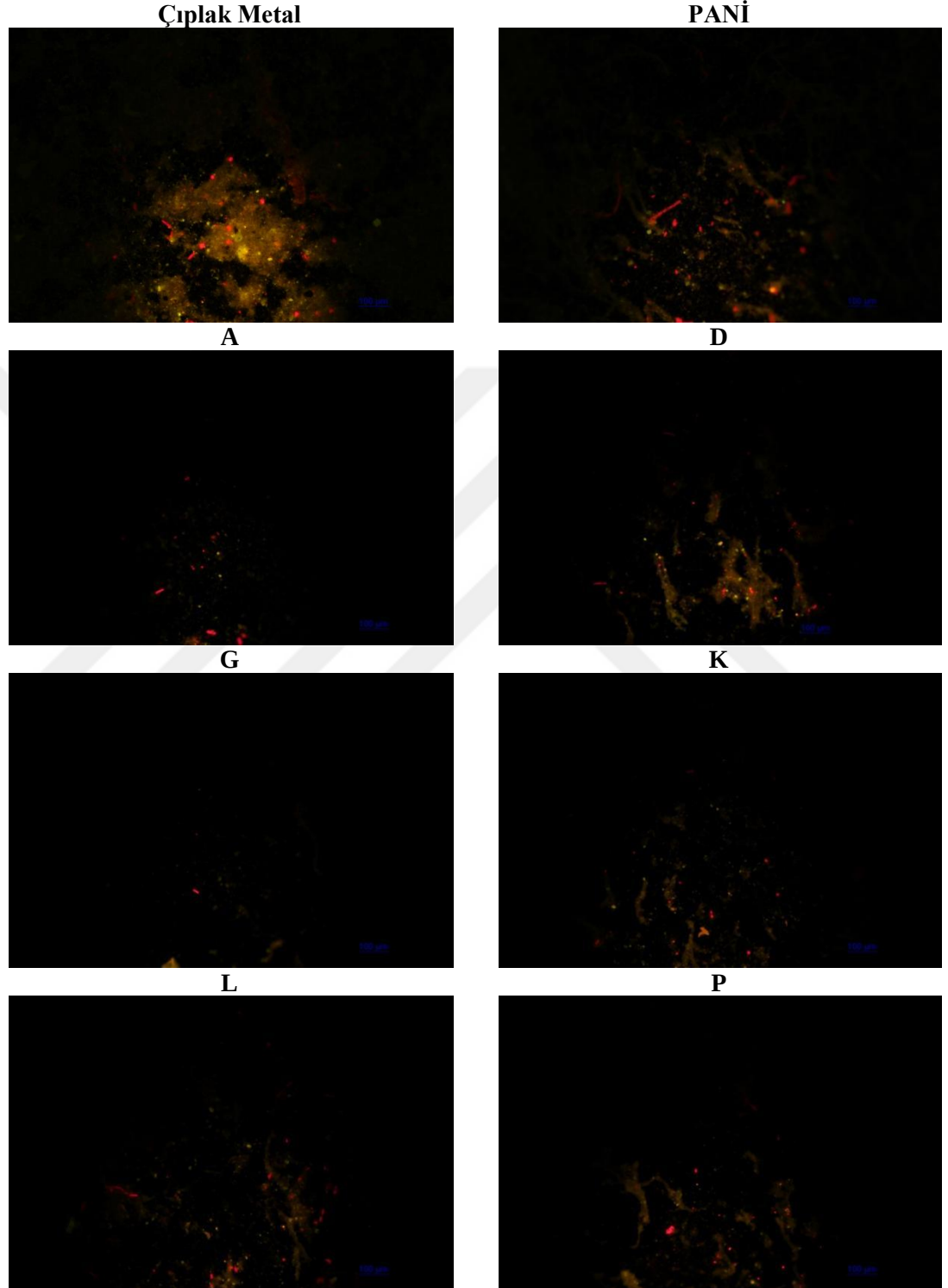
Amonyum okzalit ortamında, paslanmaz çelik kuponlar üzerine anilin kullanılarak ayrı ayrı hapsedilen  $\alpha$ -amilaz, DNAz, glukoz oksidaz,  $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimlerini içeren kuponlara ait, denizde inkübasyon sonrası floresans görüntüleri Şekil 4.30'da verilmiştir. Fotoğraflarda görüldüğü üzere enzim immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponlarda çıplak kupona göre belirgin şekilde daha az biyofilm görülmektedir.



Şekil 4.30. Çıplak metal ve amonyum okzalit ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri

Şekil 4.31.'de amonyum okzalit ortamında immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran PANİ film kaplı kuponlara ait, 12 gün denizde bekledikten sonra elde edilen floresans görüntüleri bulunmaktadır. Enzim immobilize edilmiş olan

kuponlarda, sadece PANİ film kaplı kupona ve çıplak metal kupona kıyasla biyofilm oluşumunun çok daha az olduğu görülmektedir.

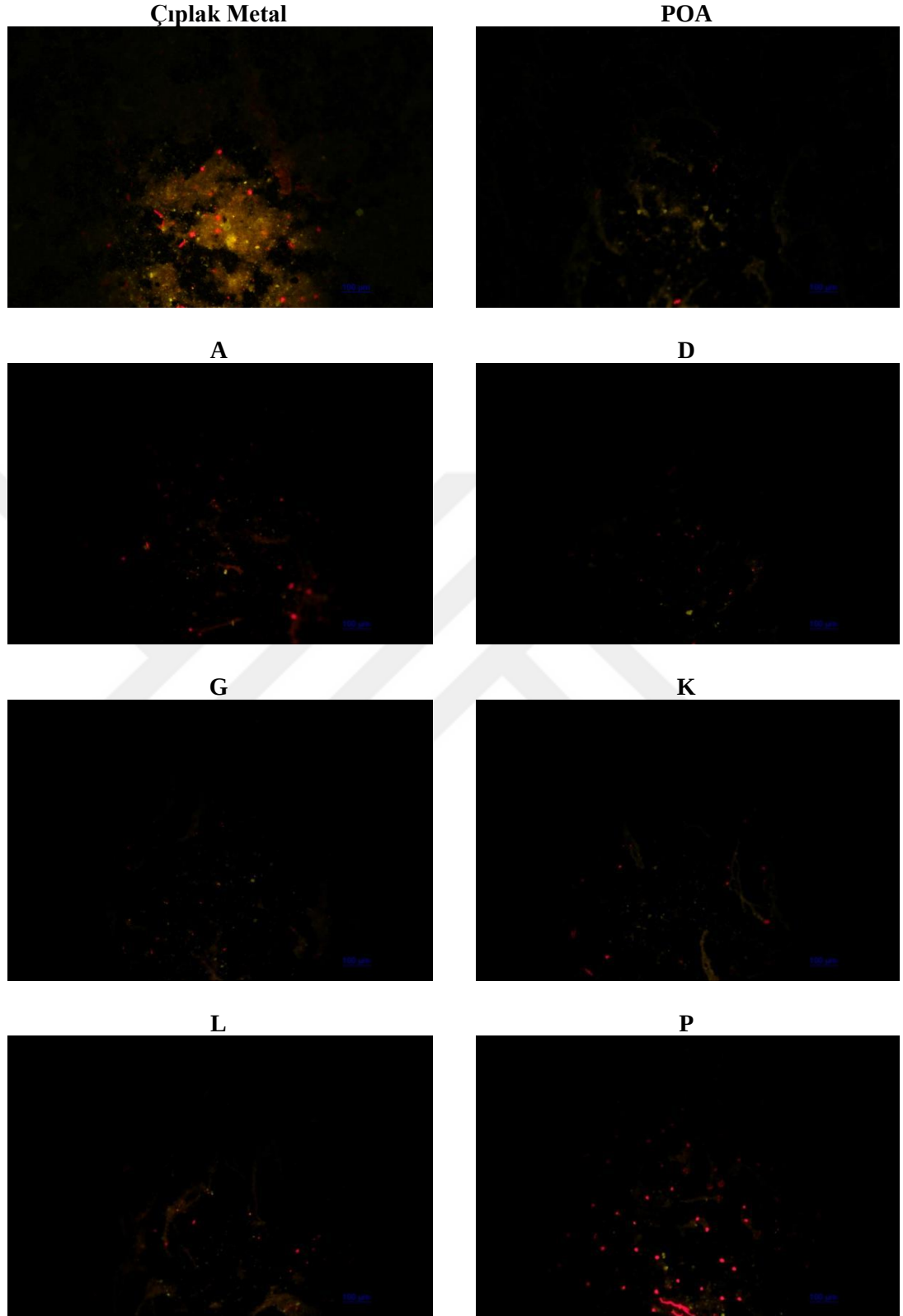


Şekil 4.31. Çıplak metal ve sodyum salisilat ortamında anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri

Özellikle  $\alpha$ -amilaz ve glukoz oksidaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponlarda bu fark belirgin şekilde görülmektedir.

Amonyum okzalat ortamında, POA film tabakanın içerisine enzim hapsedilmiş olan kuponlara ait deniz sonrası görüntüler Şekil 4.32.'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde enzim immobilizasyonlarının antibiyofilm etkinliği görülmektedir. Lipaz ve  $\alpha$ -kimotripsin immobilize kuponlarda biyo film oluşumunun daha az olduğu çok belirgin şekilde kendini göstermektedir.



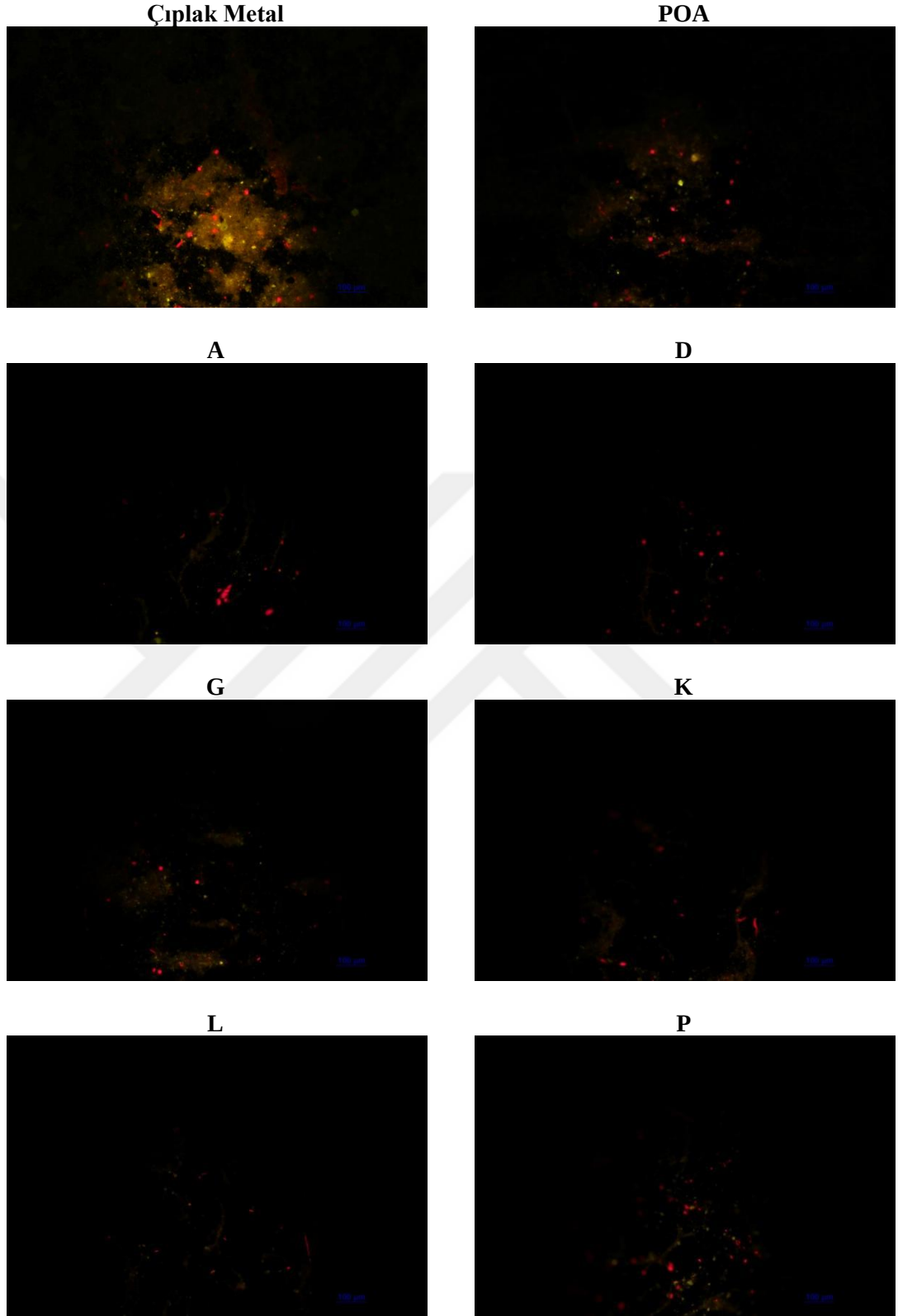


Şekil 4.32. Çıplak metal ve amonyum okzalat ortamında *o*-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri

Şekil 4.33'de sodyum salisilat ortamında sentezi gerçekleştirilen POA filmin

içerisine enzim immobilize edilmiş kuponlara ait deniz sonrası floresans görüntüleri bulunmaktadır. Floresans mikroskop görüntüleri incelendiğinde enzim immobilize edilmiş POA film kaplı kuponların yüzeyinde, enzimsiz POA film ve çıplak metal kuponlara kıyasla daha az biyofilm oluştuğu açık şekilde görülmektedir. Enzim immobilize edilmiş kuponlar arasında yapılacak bir kıyaslamada DNAz,  $\alpha$ -kimotripsin ve lipaz bulunan POA polimer film kaplı kuponların diğer enzim immobilize kuponlara oranla bir miktar daha fazla antibiyofilm etkinliği gözlenmiştir.

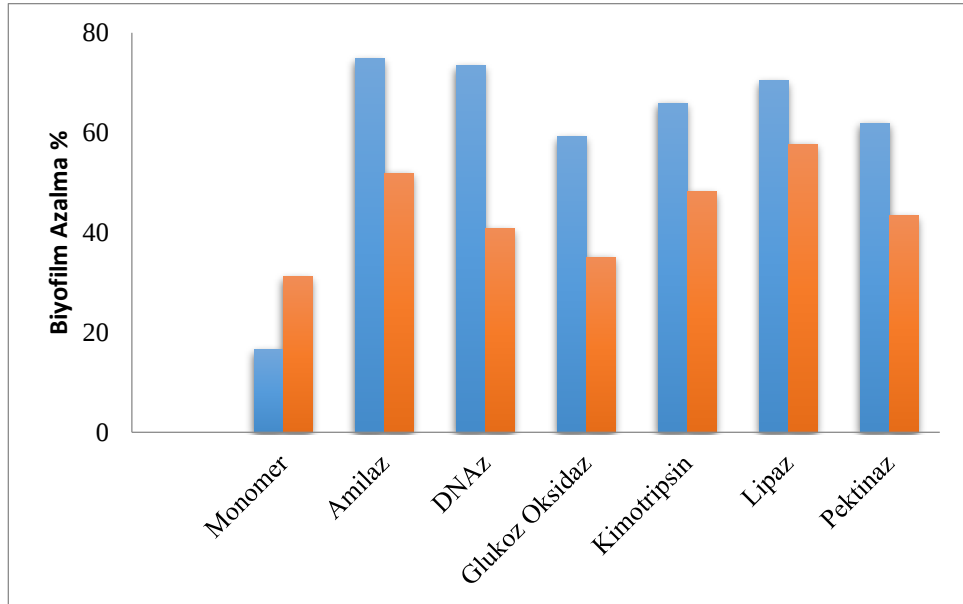




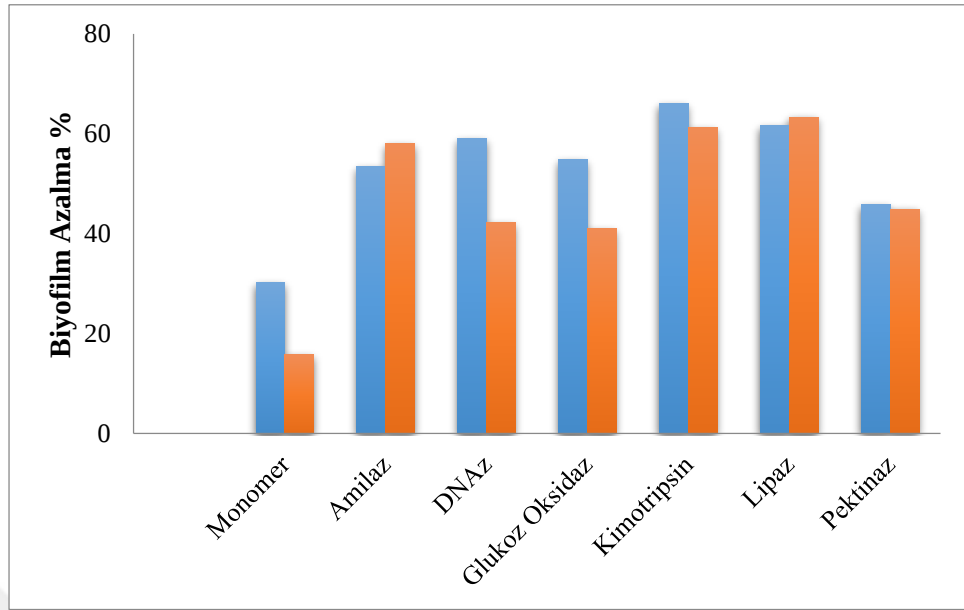
Şekil 4.33. Çıplak metal ve sodyum salisilat ortamında *o*-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri

#### 4.1.2.6. Enzim İmmobilize Kuponların Antibiyofilm Etkilerinin Kristal Viyole Boyama ile Bağlı Olarak Belirlenmesi

Şekil 4.34.'de amonyum okzalit ile sodyum salisilat ortamlarında anilin monomerinin elektropolimerizasyonu sırasında filme hapsedilen enzimlerin bulunduğu kaplamalara ait, çıplak metale göre göstermiş oldukları antibiyofilm etkinliklerinin yüzde olarak ifadeleri bulunmaktadır. Grafik incelendiğinde, sodyum salisilat ortamında gerçekleştirilen immobilizasyonlarda amonyum okzalata göre daha yüksek antibiyofilm etkinliği belirgin bir şekilde görülmektedir. Sodyum salisilat ortamında gerçekleştirilen enzim immobilizasyonları, çıplak metale göre;  $\alpha$ -amilaz % 74,86; DNAz % 73,38; lipaz % 70,44;  $\alpha$ -kimotripsin % 65,88; pektinaz % 61,92 ve glukoz oksidazın % 59,23 oranında antibiyofilm etkisi göstermiştir. Aynı şekilde amonyum okzalit ortamında gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarının çıplak metale göre göstermiş oldukları antibiyofilm etkinlikleri lipaz % 57,69;  $\alpha$ -amilaz % 51,95;  $\alpha$ -kimotripsin % 48,16; pektinaz % 43,32; DNAz % 40,86 ve glukoz oksidaz % 35,04 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, sodyum salisilat ortamında polimerizasyonu gerçekleştirilen PANİ, çıplak metale göre % 16,56 oranında antibiyofilm etkinliği gösterirken, bu değer amonyum okzalit ortamında sentezlenmiş PANİ için % 31,22 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.34. Farklı elektrolit ortamlarda anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran filmlerin çıplak kupona göre bağlı antibiyofilm etkinlikleri, sodyum salisilat (■) ve amonyum okzalit (■)



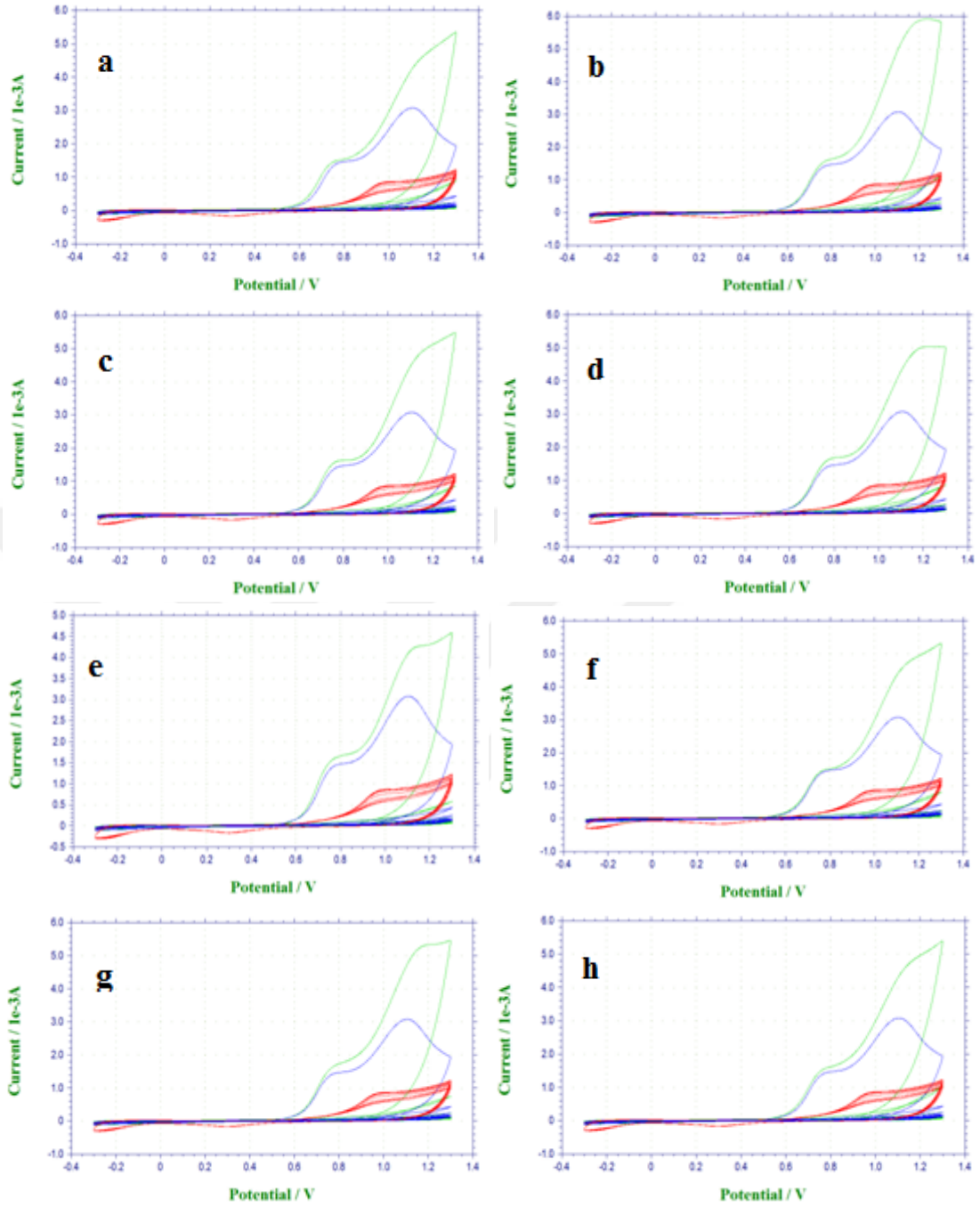
Şekil 4.35. Farklı elektrolit ortamlarda *o*- anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran filmlerin bağıl antibiyofilm etkinlikleri, sodyum salisilat (■) ve amonyum okzalat (■)

Şekil 4.35.'de verilen grafikte, sodyum salisilat ve amonyum okzalat ortamlarında elektropolimerizasyonu gerçekleştirilen *o*-anisidin monomerinin içerisine hapsedilen enzimlere ait, çıplak metal kuponuna bağlı olarak gösterdikleri antibiyofilm etkinlikleri görülmektedir. Grafik incelendiğinde, sodyum salisilat ortamında gerçekleştirilen enzim immobilizasyonlarına ait antibiyofilm özelliklerinin, amonyum okzalat verilerine kıyasla bir miktar daha yüksek olduğu görülmektedir. Sodyum salisilat ortamında POA ile immobilizasyonu gerçekleştirilen  $\alpha$ -kimotripsin % 66,13; lipaz % 61,6; DNAz % 59,07; glukoz oksidaz % 54,9;  $\alpha$ -amilaz % 53,49 ve pektinaz % 45,83 oranında çıplak metale göre antibiyofilm özellik gösterirken bu değerler amonyum okzalat ortamı için lipaz % 63,37;  $\alpha$ -kimotripsin % 61,26;  $\alpha$ -amilaz % 58,12; pektinaz % 44,93; DNAz % 42,18 ve glukoz oksidaz % 40,96 şeklindedir. Bu çalışmada çıplak metale göre, sodyum salisilat ortamında sentezi gerçekleştirilmiş olan POA film kaplamanın göstermiş olduğu antibiyofilm etkinliği % 30,26 oranında iken, amonyum okzalat ortamında yürütülen POA filmin göstermiş olduğu etkinlik % 15,82 olarak bulunmuştur.

### **4.1.3. PANİ ve POA Filmlerine Enzim Koimmobilizasyonu ve Karakterizasyonu**

#### **4.1.3.1. Elektropolimerizasyon ile Enzim Koimmobilizasyonu**

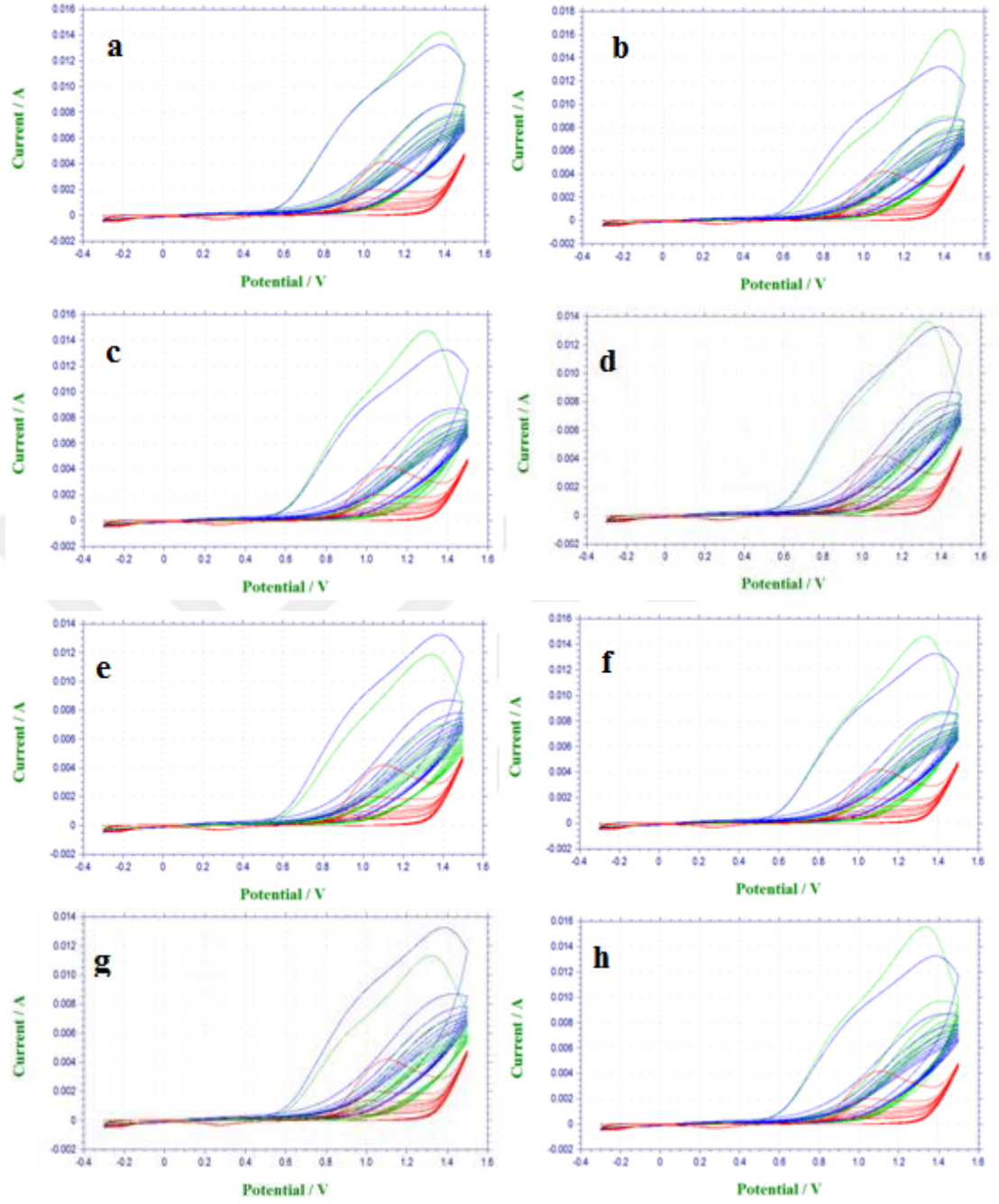
PANİ ve POA sentez ortamlarına çalışılan enzimlerin ikili kombinasyonları eklenerek enzimlerin polimer filmlere ko-immobilize olmaları sağlanmıştır. Sodyum salisilat elektroliti varlığında sentezlenen polimer filmlere tekli immobilize edilen enzimlerin antibiyofilm etkinlikleri daha yüksek olduğundan çalışmanın bu aşaması sadece sodyum salisilat elektroliti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.36'da, sodyum salisilat ortamında anilin monomeri ile gerçekleştirilen koimmobilizasyonlara ait CV sentez eğrileri görülmektedir. Enzim+ monomer içeren elektrolit ortamlarında gerçekleştirilen elektropolimerizasyonlarda sentez eğrilerinin birinci monomer oksidasyon akım değerlerinin, enzimsiz monomer ve elektrolit ortamlarına göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum enzim karışımlarının elektrolit ortamının iletkenliğini artırdığı ve elektropolimerizasyon hızına olumlu katkı yaptığını göstermektedir. Aynı zamanda bu davranış sentezlenen polimer yapısında enzim varlığını da ifade etmektedir. Diğer taraftan Şekil 4.36'da sodyum salisilat ortamında anilin monomeri için en yüksek monomer oksidasyon akım değerlerine  $\alpha$ -amilaz + glukoz oksidaz enzim karışım varlığında ulaşılmıştır.



Şekil 4.36. Anilin monomeri ile enzimlerin koimmobilizasyonlarına ait CV eğrileri (a)  $\alpha$ -amilaz ve deoksiribonükleaz (b)  $\alpha$ -amilaz ve glukoz oksidaz (c)  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -kimotripsin (d)  $\alpha$ -amilaz ve lipaz (e) deoksiribonükleaz ve  $\alpha$ -kimotripsin (f) deoksiribonükleaz ve lipaz (g)  $\alpha$ -kimotripsin ve lipaz (h)  $\alpha$ -amilaz, deoksiribonükleaz,  $\alpha$ -kimotripsin ve lipaz (Kırmızı: elektrolit, Mavi: elektrolit + monomer, Yeşil: elektrolit + monomer + enzimler)

Şekil 4.37'de *o*-anisidin monomeri ile sodyum salisilat ortamında gerçekleştirilen enzim koimmobilizasyonlarına ait sentez eğrileri verilmiştir. Grafiklerde kupon üzerinde

sadece elektrolit, elektrolit+monomer ve elektrolit+monomer+enzimlerin varlığında elde edilen film gelişimlerine ait eğriler görülmektedir. Şekil 4.37'de o-anisidin monomeri+sodyum salisilat ortamına koimmobilizasyon için eklenen deoksiribonükleaz+ $\alpha$ -kimotripsin ve  $\alpha$ -kimotripsin+lipaz ikili enzim karışımları hariç diğer ikili enzim karışımlarında monomer oksidasyon akım değerlerinin enzimsiz ve elektrolit ortamlarına göre daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Diğer taraftan her enzimli ortam için bu o-anisidin monomeri için gözlenen akım değerlerinin, anilin monomerininkine göre iki katından fazla yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında sodyum salisilat ortamında anilin monomerinde olduğu gibi o-anisidin monomeri için de en yüksek monomer oksidasyon akım değerlerine  $\alpha$ -amilaz+glukoz oksidaz enzim karışım varlığında ulaşılmıştır.

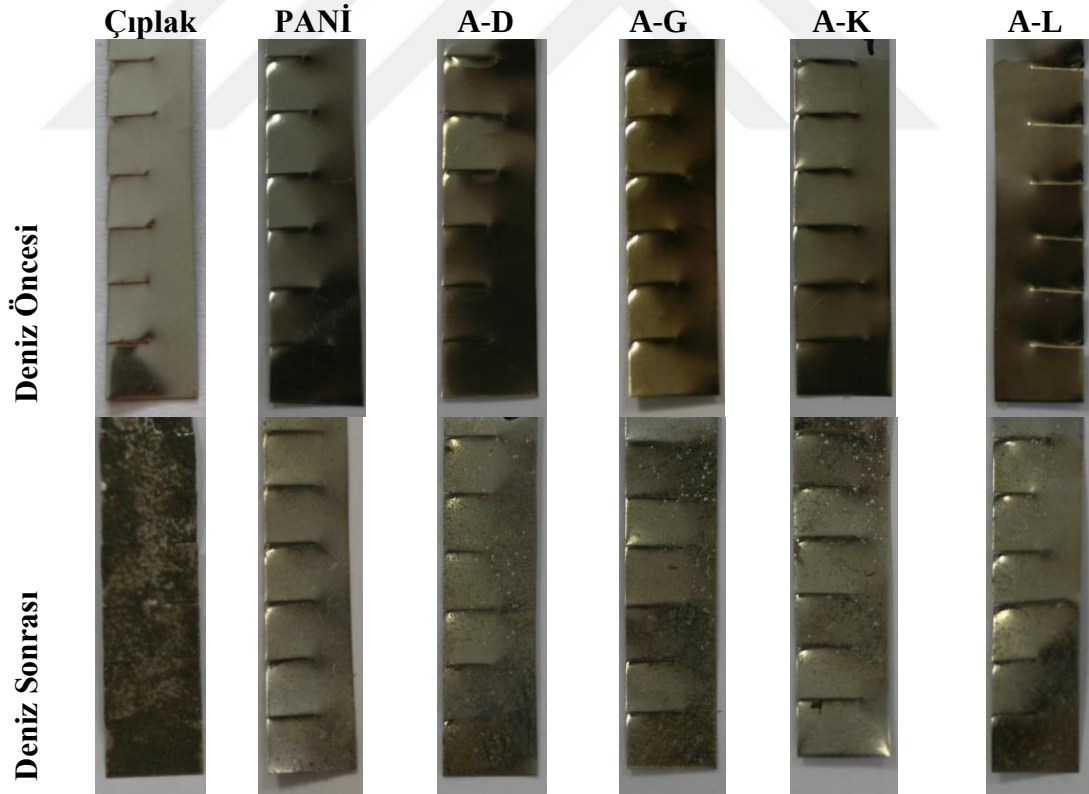


Şekil 4.37. *o*-Anisidin monomeri ile enzimlerin koimmobilizasyonlarına ait CV eğrileri (a)  $\alpha$ -amilaz ve deoksiribonükleaz (b)  $\alpha$ -amilaz ve glukoz oksidaz (c)  $\alpha$ -amilaz ve  $\alpha$ -kimotripsin (d)  $\alpha$ -amilaz ve lipaz (e) deoksiribonükleaz ve  $\alpha$ -kimotripsin (f) deoksiribonükleaz ve lipaz (g) ile  $\alpha$ -kimotripsin ve lipaz (h)  $\alpha$ -amilaz, deoksiribonükleaz,  $\alpha$ -kimotripsin ve lipaz (Kırmızı: elektrolit, Mavi: elektrolit + monomer, Yeşil: elektrolit + monomer + enzimler)

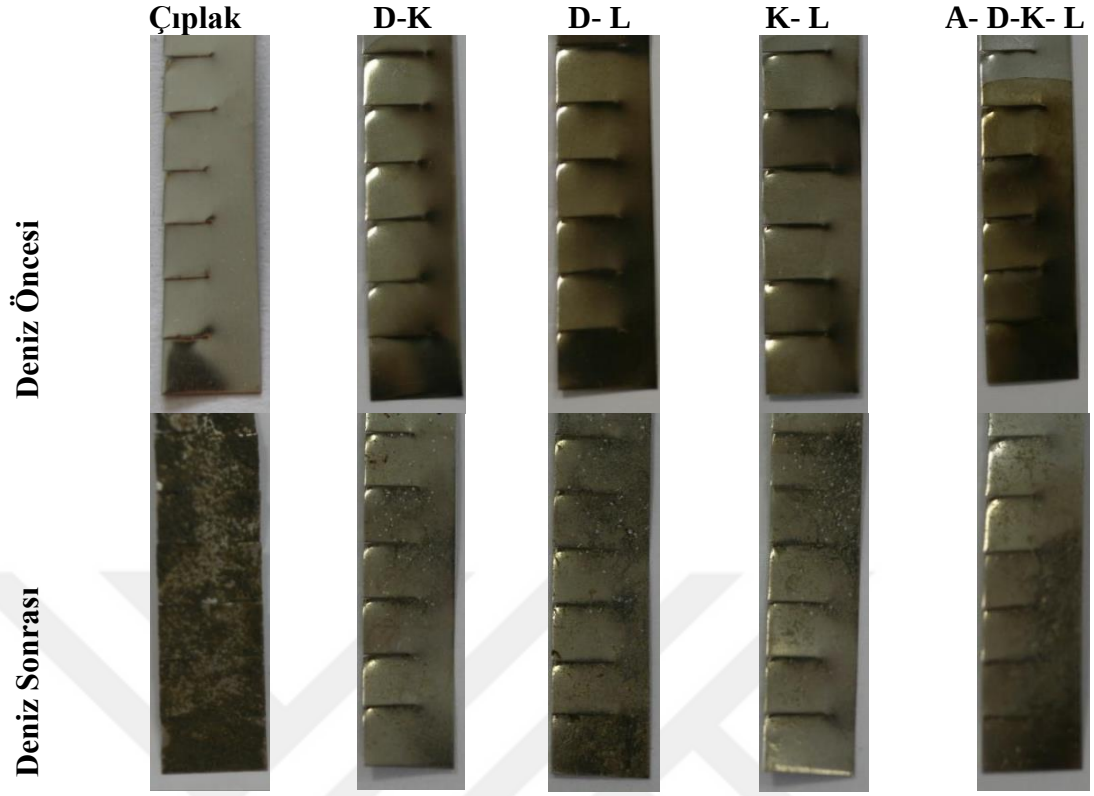
#### 4.1.3.2. Enzim Koimmobilizasyonu Gerçekleştirilmiş Kuponların Yüzey Fotoğraf Görüntüleri

Çıplak SS304 kuponu ve farklı kombinasyonlarda koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş polimer film kaplı SS304 kuponlarının yüzey fotoğrafları, deniz öncesi ve denizde inkübasyon sonrası fotoğraf makinesiyle çekilmiştir. Kuponların, deniz öncesi ve denizde inkübasyon sonrası fotoğrafları karşılaştırılarak oluşan biyofilm miktarları kalitatif olarak incelenmiştir.

Deniz sonrası çekilen fotoğraflar arasında (Şekil 4.38. ve Şekil 4.39.), sodyum salisilat ortamında PANİ ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş olan enzimleri (A:  $\alpha$ -amilaz, D: DNAz, G: GOD, K:  $\alpha$ -kimotripsin, L: lipaz ) barındıran kuponlar ile çıplak metal kuponu karşılaştırıldığında, koimmobilize enzimleri barındıran kuponlarda, çıplak metale göre belirgin şekilde daha az miktarda biyofilm oluşumunun olduğu görülmektedir.

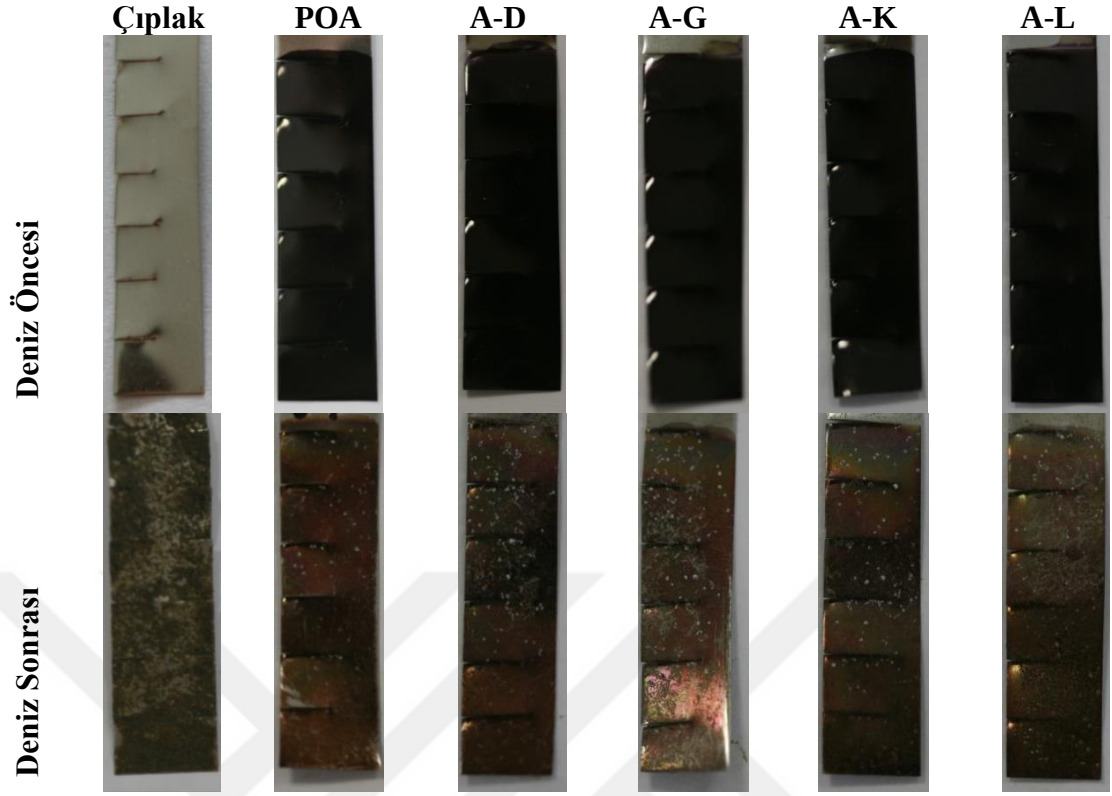


Şekil 4.38. Çıplak metal ve anilin monomeri varlığında amilaz ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş çeşitli enzimleri bulunduran kuponların görüntüleri

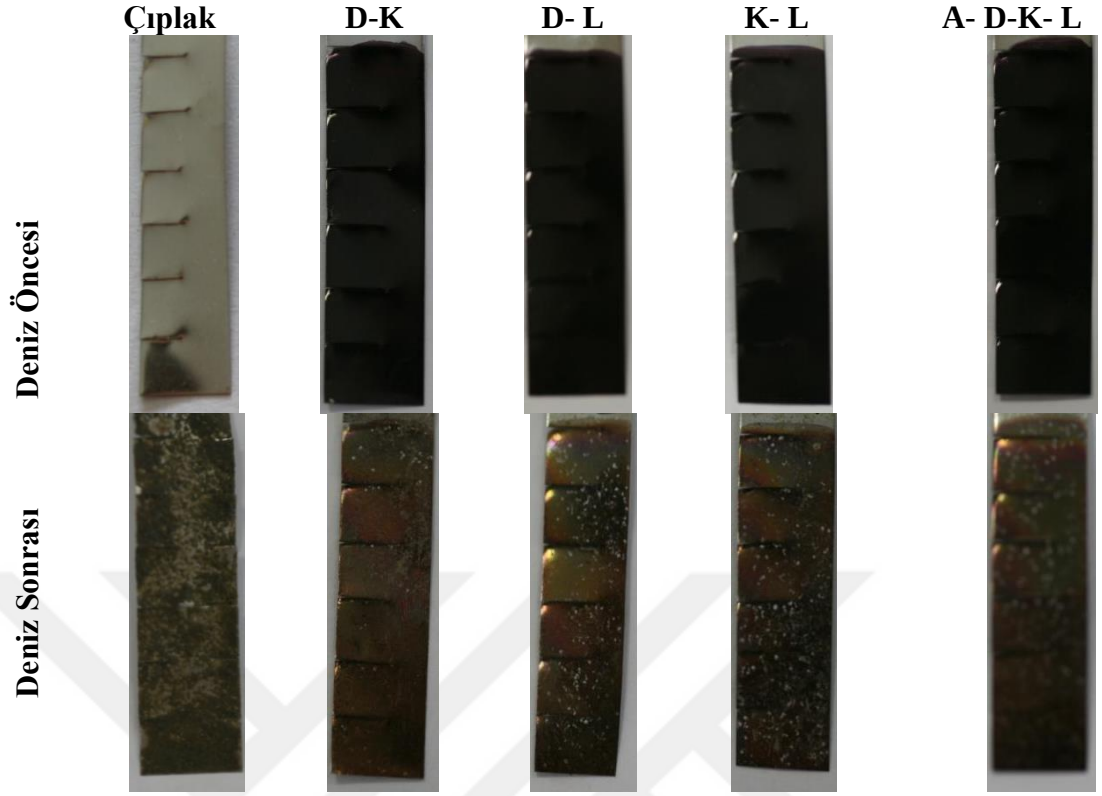


Şekil 4.39. Çıplak metal ve anilin monomeri ile enzim koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş çeşitli kuponların görüntüleri

Sodyum salisilat ortamında POA ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş olan enzimleri barındıran kuponlar ile çıplak metal kuponunun deniz sonrası çekilen fotoğrafları (Şekil 4.40. ve Şekil 4.41.) karşılaştırıldığında, koimmobilize enzimleri barındıran kuponlarda, biyofilm oluşumunun çıplak metale göre daha az olduğu görülmektedir.



Şekil 4.40. Çıplak metal ve o-anisidin monomeri varlığında  $\alpha$ -amilaz ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş çeşitli enzimleri bulunduran kuponların görüntüleri

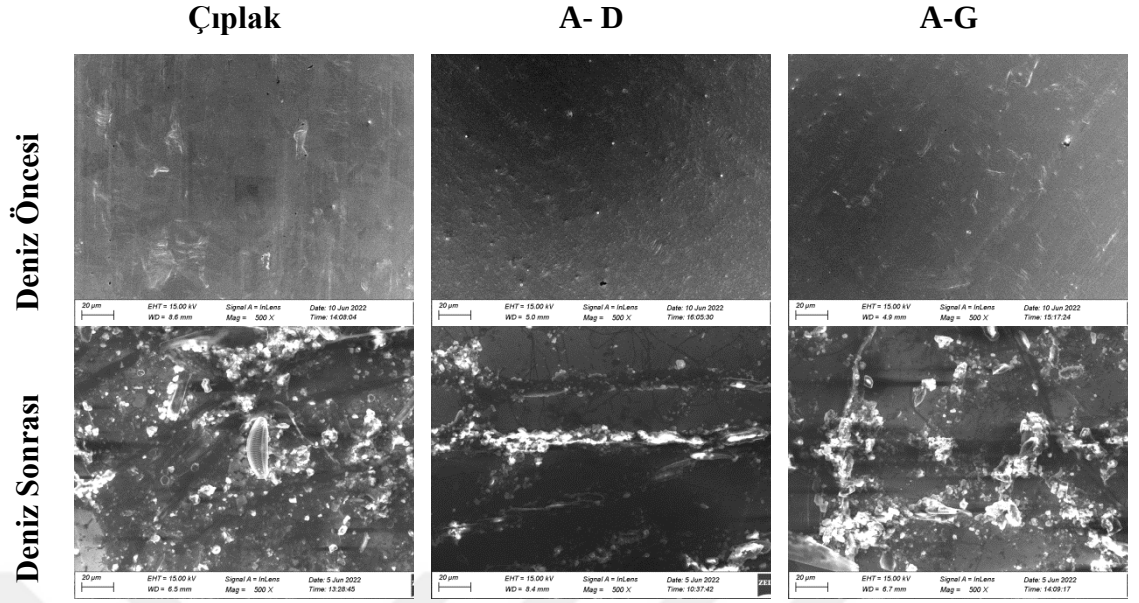


Şekil 4.41. Çıplak metal ve o-anisidin monomeri ile enzim koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş çeşitli kuponların görüntüleri

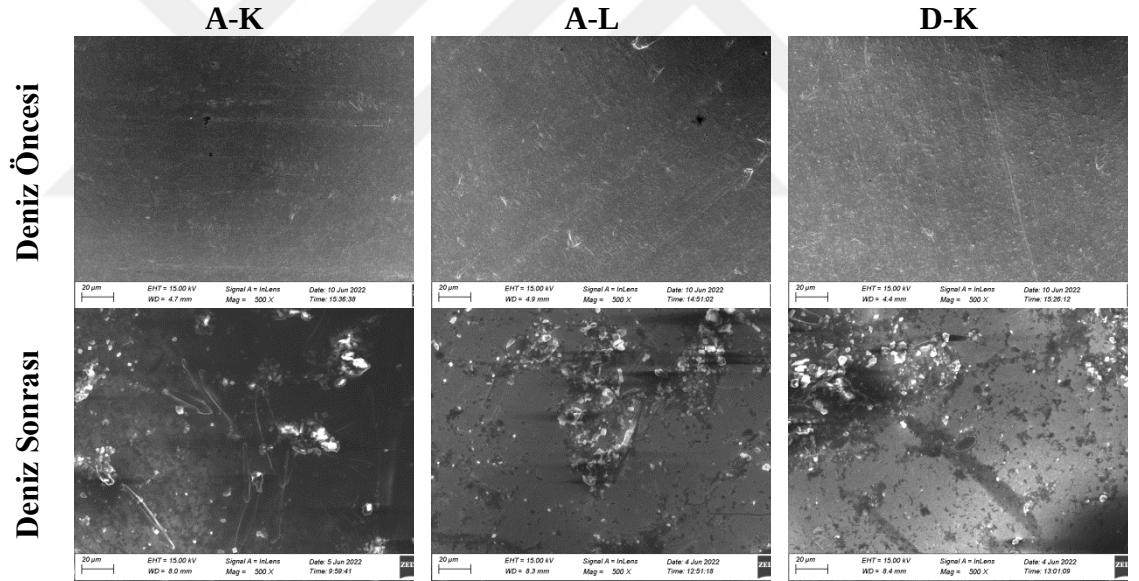
#### 4.1.3.3. SEM ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleri

Sodyum salisilat ortamında PANİ ve POA filmlerine, farklı kombinasyonlarda ikili ve dörtlü olarak,  $\alpha$ -amilaz, DNAz,  $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve glukoz oksidaz koimmobilizasyonu gerçekleştirilen enzimlere ait kuponlar ile çıplak metal kupona ait deniz öncesi ve deniz sonrası SEM görüntüleri karşılaştırılmıştır. Örnekler analiz gönderilmeden önce azot gazından geçirilmiştir.

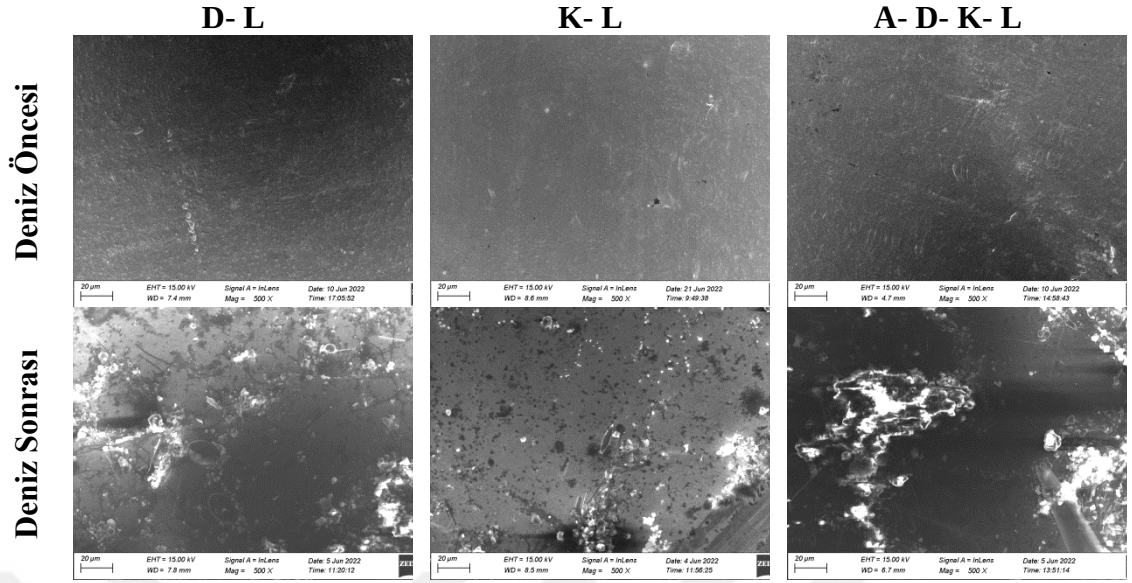
Sodyum salisilat ortamında sentezlenen PANİ ve bu ortamda enzim koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş kuponlara ait deniz öncesi ve deniz sonrası SEM görüntüleri Şekil 4.42., Şekil 4.43. ve Şekil 4.44.'de verilmiştir.



Şekil 4.42. Çıplak metal ve PANİ film içinde ko-immobilize  $\alpha$ -amilaz-DNAz ve  $\alpha$ -amilaz-glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri



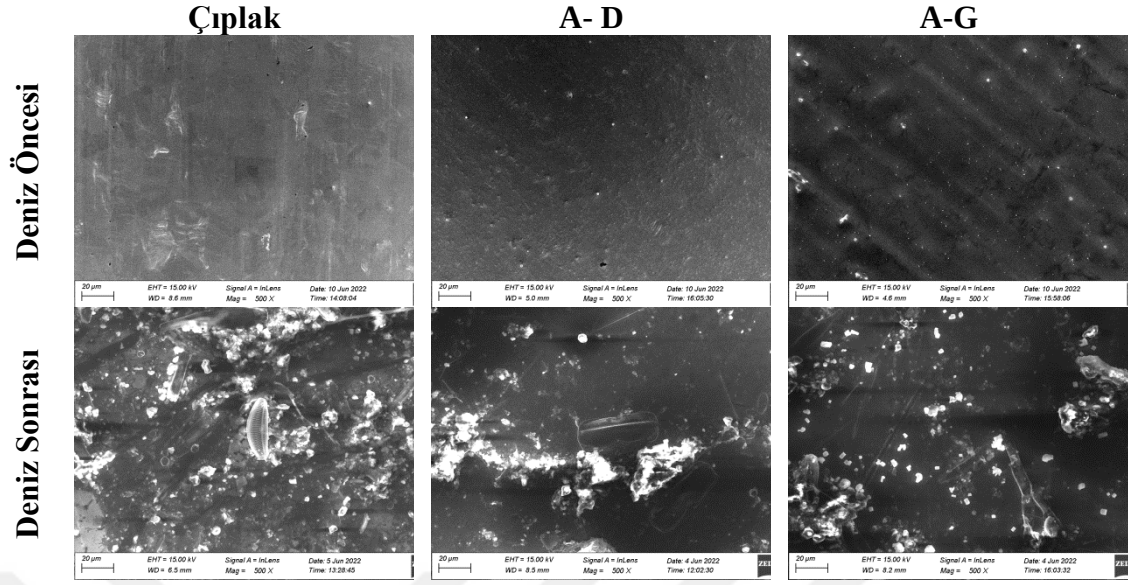
Şekil 4.43. PANİ film içinde ko-immobilize  $\alpha$ -amilaz-  $\alpha$ -kimotripsin,  $\alpha$ -amilaz-lipaz ve DNAaz-  $\alpha$ -kimotripsin enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri



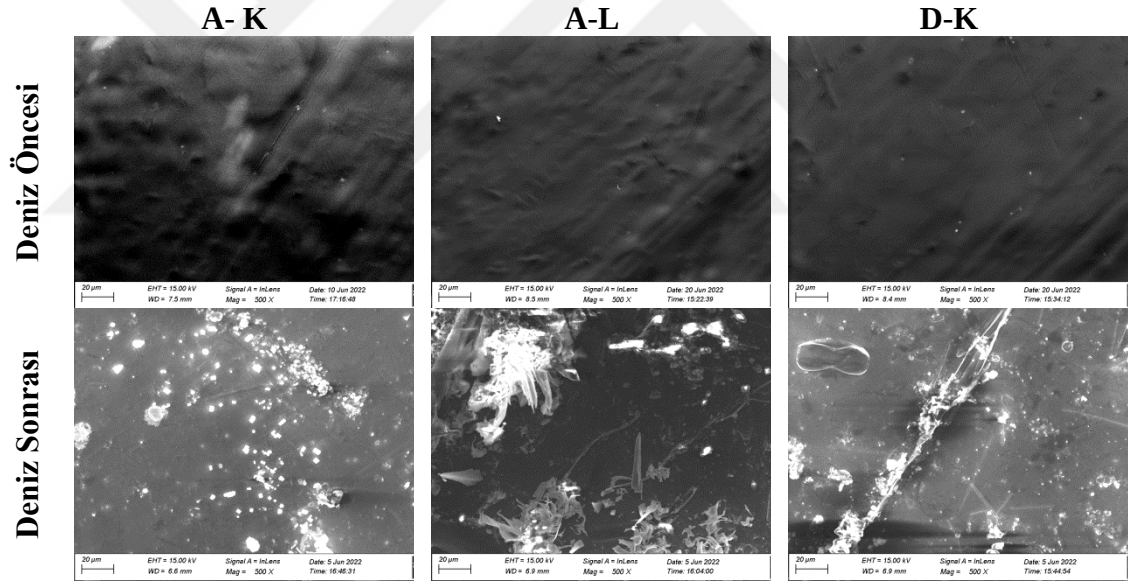
Şekil 4.44. PANİ film içinde ko-immobilize DNAz- Lipaz,  $\alpha$ -kimotripsin-lipaz ve  $\alpha$ -amilaz-DNAz- $\alpha$ -kimotripsin-lipaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri

Şekil 4.42., Şekil 4.43. ve Şekil 4.44 incelendiğinde, PANİ ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş olan,  $\alpha$ -amilaz ile  $\alpha$ -kimotripsin ve DNAz ile  $\alpha$ -kimotripsin koimmobilizasyonunun çıplak metal kupona kıyasla en yüksek antibiyofilm etki gösterdiği görülmüştür. Bununla birlikte  $\alpha$ -amilaz ile glukoz oksidaz koimmobilizasyonu dışında tüm koimmobilizasyonlarda antibiyofilm etkisi görülebilmektedir.

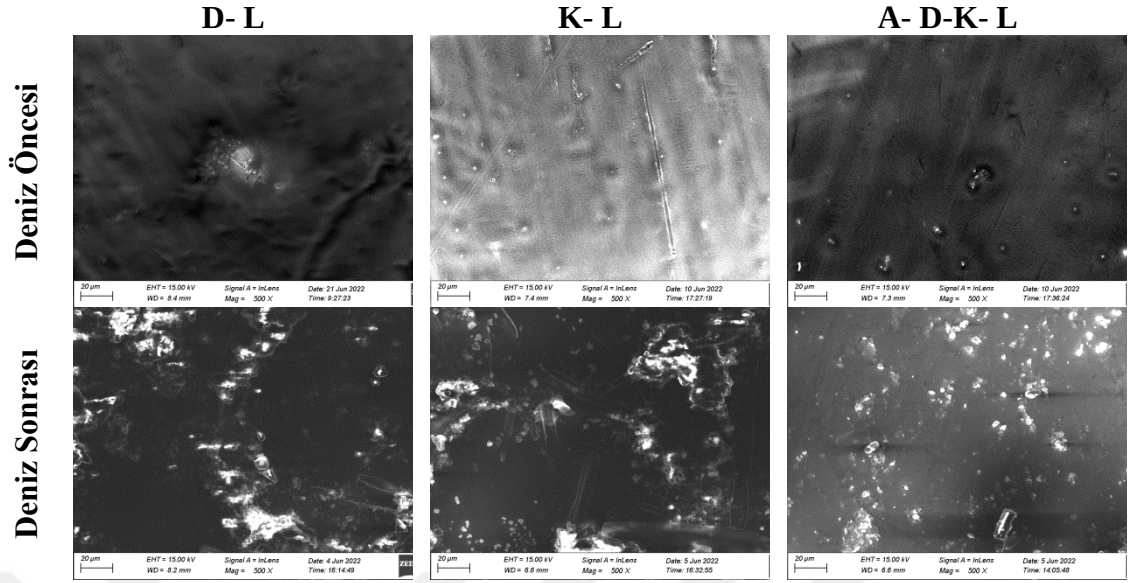
Şekil 4.45., Şekil 4.46. ve Şekil 4.47.'de sodyum salisilat ortamında POA ile enzim koimmobilizasyonları gerçekleştirilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde  $\alpha$ -amilaz ile lipaz koimmobilizasyonu dışındaki kupon görüntülerinde çıplak metal kupona kıyasla daha az miktarda birikim görülmektedir.



Şekil 4.45. Çıplak metal ve POA film içinde ko-immobilize  $\alpha$ -amilaz-DNAaz ve  $\alpha$ -amilaz-Glukoz oksidaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri



Şekil 4.46. POA film içinde ko-immobilize  $\alpha$ -amilaz- $\alpha$ -kimotripsin,  $\alpha$ -amilaz-Lipaz ve DNAz-  $\alpha$ -kimotripsin enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri



Şekil 4.47. POA film içinde ko-immobilize DNAz-Lipaz,  $\alpha$ -kimotripsin-Lipaz ve  $\alpha$ -amilaz-DNAz- $\alpha$ -kimotripsin-Lipaz enzimlerini bulunduran kuponlara ait SEM görüntüleri

#### 4.1.3.4. EDX Analizleri

PANİ film içerisine koimmobilizasyonu gerçekleştirilen kuponlara ait EDX analiz sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Deniz sonrası EDX verilerine bakıldığında öncesine göre, tüm kuponlarda oksijen miktarının arttığı; krom, demir ve nikel miktarlarının ise azaldığı görülmektedir. Kuponların yüzeysel element içeriğini yansıtan bu EDX sonuçlarına göre, kuponların yüzeyinde biriken biyofilm miktarına bağlı olarak oksijen miktarı artarken, paslanmaz çelik elementel içeriğinde var olan krom, demir ve nikel miktarları da yüzeyin kapanmasından dolayı azalmıştır. Deniz ortamında beklemeyle birlikte kuponların üzerinde; sodyum, magnezyum, alüminyum, klor, potasyum, kalsiyum, kükürt ve molibden birikimi gözlenmektedir.

Çizelge 4.7. Anilin ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri (A:  $\alpha$ -amilaz, D: DNAz, GOD: Glukoz oksidaz, K:  $\alpha$ -kimotripsin, L: lipaz )

| Deniz öncesi  |        |       |       |       |       |       |       |       |       |         |
|---------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| Eleman t      | Çıplak | PANİ  | A-D   | A-G   | A-K   | A-L   | D-K   | D-L   | K-L   | A-D-K-L |
| C K           | 3,41   | 5,07  | 6,87  | 7,33  | 5,95  | 6,30  | 6,72  | 6,70  | 6,26  | 8,41    |
| N K           |        | 0,33  | 0,33  | 0,45  | 0,47  | 0,46  | 0,50  | 0,58  | 0,40  | 0,58    |
| O K           | 0,75   | 0,96  | 1,36  | 1,11  | 0,85  | 0,98  | 0,97  | 1,19  | 1,20  | 0,88    |
| Si K          | 0,99   | 1,02  | 0,84  | 0,89  | 0,89  | 0,91  | 0,83  | 1,04  | 0,96  | 0,78    |
| Cr K          | 17,20  | 17,03 | 17,26 | 17,09 | 16,76 | 16,88 | 16,67 | 16,61 | 17,28 | 17,18   |
| Fe K          | 68,81  | 67,50 | 65,58 | 65,16 | 66,99 | 66,40 | 66,34 | 65,07 | 66,21 | 64,82   |
| Ni K          | 8,84   | 8,09  | 7,77  | 7,96  | 8,09  | 8,07  | 7,96  | 8,81  | 7,69  | 7,34    |
| Deniz Sonrası |        |       |       |       |       |       |       |       |       |         |
| C K           | 0,02   | 4,41  | 9,81  | 0,01  | 14,91 | 2,49  | 9,90  | 6,87  | 10,53 | 8,97    |
| N K           |        | 0,63  | 0,80  |       | 0,98  | 0,89  | 0,56  | 0,33  | 0,87  |         |
| O K           | 28,44  | 1,79  | 5,59  | 12,50 | 11,04 | 12,58 | 6,07  | 2,02  | 8,25  | 5,09    |
| Na K          | 20,76  | 0,63  | 0,59  | 1,92  | 2,23  | 13,70 | 0,39  | 1,21  | 0,37  | 0,70    |
| Mg K          | 2,31   | 0,65  | 1,17  | 2,06  | 1,01  | 1,33  | 0,70  | 0,41  | 1,44  | 0,78    |
| Al K          | 1,39   | 0,65  | 0,93  | 1,66  | 1,16  | 1,71  | 0,68  |       | 0,94  | 1,10    |
| Si K          | 9,30   | 0,95  | 1,66  | 3,94  | 4,49  | 4,05  | 2,45  | 0,97  | 2,73  | 1,88    |
| Cl K          | 20,54  | 0,29  | 0,79  | 0,99  | 2,22  | 8,90  | 0,56  | 0,87  | 0,76  | 0,42    |
| K K           | 0,93   |       |       | 0,99  |       | 0,98  |       |       |       |         |
| Ca K          | 1,16   |       | 0,98  | 2,48  |       | 2,36  |       |       | 0,58  |         |
| Cr K          | 3,03   | 16,30 | 14,81 | 13,54 | 12,00 | 9,37  | 15,05 | 16,01 | 13,68 | 15,20   |
| Fe K          | 8,97   | 65,25 | 55,13 | 51,32 | 44,47 | 35,45 | 56,27 | 64,11 | 53,22 | 58,52   |
| Ni K          | 1,90   | 7,87  | 7,04  | 5,90  | 5,48  | 4,80  | 6,54  | 7,20  | 6,08  | 7,33    |
| Mo L          | 1,24   |       |       |       |       | 1,38  | 0,83  |       |       |         |
| S K           |        | 0,58  | 0,70  | 2,69  |       |       |       |       | 0,57  |         |

Verilen Çizelge 4.9'da POA film içerisine koimmobilize formda hapsedilen enzim kombinasyonlarını barındıran kuponlara ait deniz öncesi ve deniz sonrası EDX verileri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Tüm kuponlarda azot miktarının azaldığı buna karşın silisyum, krom, demir ve nikel oranlarının arttığı görülmektedir. Kuponların yüzeyinde azot miktarının azalması, protein kaynaklı biyofilm oluşumunun az olduğunu gösterirken,

silisyum, krom, demir ve nikel oranlarının artması ise polimer film gözenek yapısının artması/büyümesine bağlı olarak paslanmaz çelik elementel içerik kaynaklıdır. Tüm kuponların üzerinde denizde beklemeyele birikim yapan elementler ise; sodyum, magnezyum ve klor olarak tespit edilmiştir. Bunların yanında görülen elementler ise; alüminyum, kükürt, fosfor, kalsiyum, potasyum ve molibdendir.

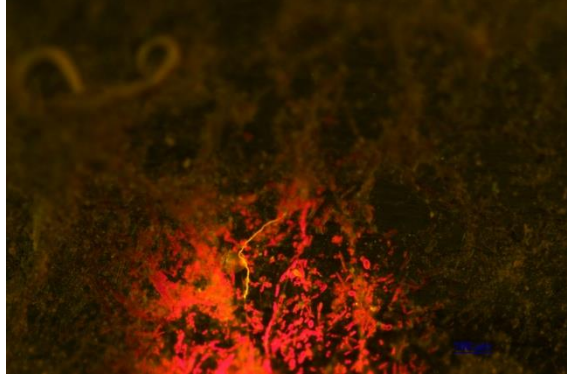
Çizelge 4.8. o-Anisidin ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait EDX analizleri(A:  $\alpha$ -amilaz, D: DNAz, GOD: Glukoz oksidaz, K:  $\alpha$ -kimotripsin, L: lipaz )

| Denizden Önce  |        |       |       |       |       |       |       |       |         |
|----------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| Element        | Çıplak | POA   | A-G   | A-K   | A-L   | D-K   | D-L   | K-L   | A-D-K-L |
| C K            | 3,41   | 44,58 | 51,33 | 47,10 | 46,41 | 43,26 | 43,26 | 45,22 | 49,04   |
| N K            |        | 2,88  | 4,86  | 4,44  | 4,01  | 4,10  | 4,10  | 3,58  | 3,73    |
| O K            | 0,75   | 6,89  | 8,02  | 8,29  | 7,70  | 7,44  | 7,44  | 7,06  | 8,26    |
| Si K           | 0,99   | 0,69  | 0,52  | 0,52  | 0,54  | 0,51  | 0,51  | 0,51  | 0,50    |
| Cr K           | 17,20  | 8,78  | 7,11  | 7,84  | 8,19  | 8,93  | 8,93  | 8,73  | 7,90    |
| Fe K           | 68,81  | 32,53 | 25,12 | 28,26 | 29,89 | 32,03 | 32,03 | 31,21 | 27,52   |
| Ni K           | 8,84   | 3,66  | 3,04  | 3,55  | 3,26  | 3,73  | 3,73  | 3,68  | 3,06    |
| Denizden Sonra |        |       |       |       |       |       |       |       |         |
| C K            | 0,02   | 20,03 | 8,16  | 20,50 | 22,47 | 19,88 | 6,05  | 23,99 | 22,81   |
| N K            |        | 1,61  | 1,41  | 1,38  |       |       | 1,73  | 2,76  |         |
| O K            | 28,44  | 4,34  | 11,11 | 3,36  | 12,20 | 2,69  | 23,91 | 8,39  | 3,13    |
| Na K           | 20,76  | 0,29  | 1,62  | 5,61  | 1,40  | 0,47  | 1,23  | 4,20  | 0,39    |
| Mg K           | 2,31   | 0,75  | 1,30  | 0,54  | 0,80  | 0,62  | 2,39  | 0,81  | 0,60    |
| Al K           | 1,39   | 0,50  | 1,35  | 0,39  | 0,86  |       | 2,13  | 0,57  |         |
| Si K           | 9,30   | 0,80  | 3,44  | 0,55  | 2,79  | 0,90  | 7,16  | 1,32  | 0,82    |
| P K            |        |       |       |       |       |       |       | 0,35  |         |
| S K            |        |       | 0,65  |       |       |       | 0,74  | 0,46  |         |
| Cl K           | 20,54  | 0,59  | 1,16  | 3,43  | 1,24  | 0,40  | 0,83  | 2,94  | 0,66    |
| K K            | 0,93   |       | 0,68  |       |       |       | 0,66  |       |         |
| Ca K           | 1,16   |       | 0,76  |       | 1,07  |       | 5,65  | 0,86  |         |
| Cr K           | 3,03   | 12,79 | 13,17 | 12,32 | 11,25 | 14,06 | 9,36  | 10,51 | 13,75   |
| Fe K           | 8,97   | 51,78 | 49,54 | 46,38 | 41,04 | 53,68 | 34,43 | 37,37 | 51,99   |
| Ni K           | 1,90   | 5,76  | 5,66  | 4,96  | 4,88  | 6,60  | 3,72  | 5,48  | 5,84    |
| Mo L           | 1,24   | 0,75  |       | 0,59  |       | 0,70  |       |       |         |

#### 4.1.3.5. Floresans Mikroskobu ile Elde Edilen Yüzey Görüntüleri

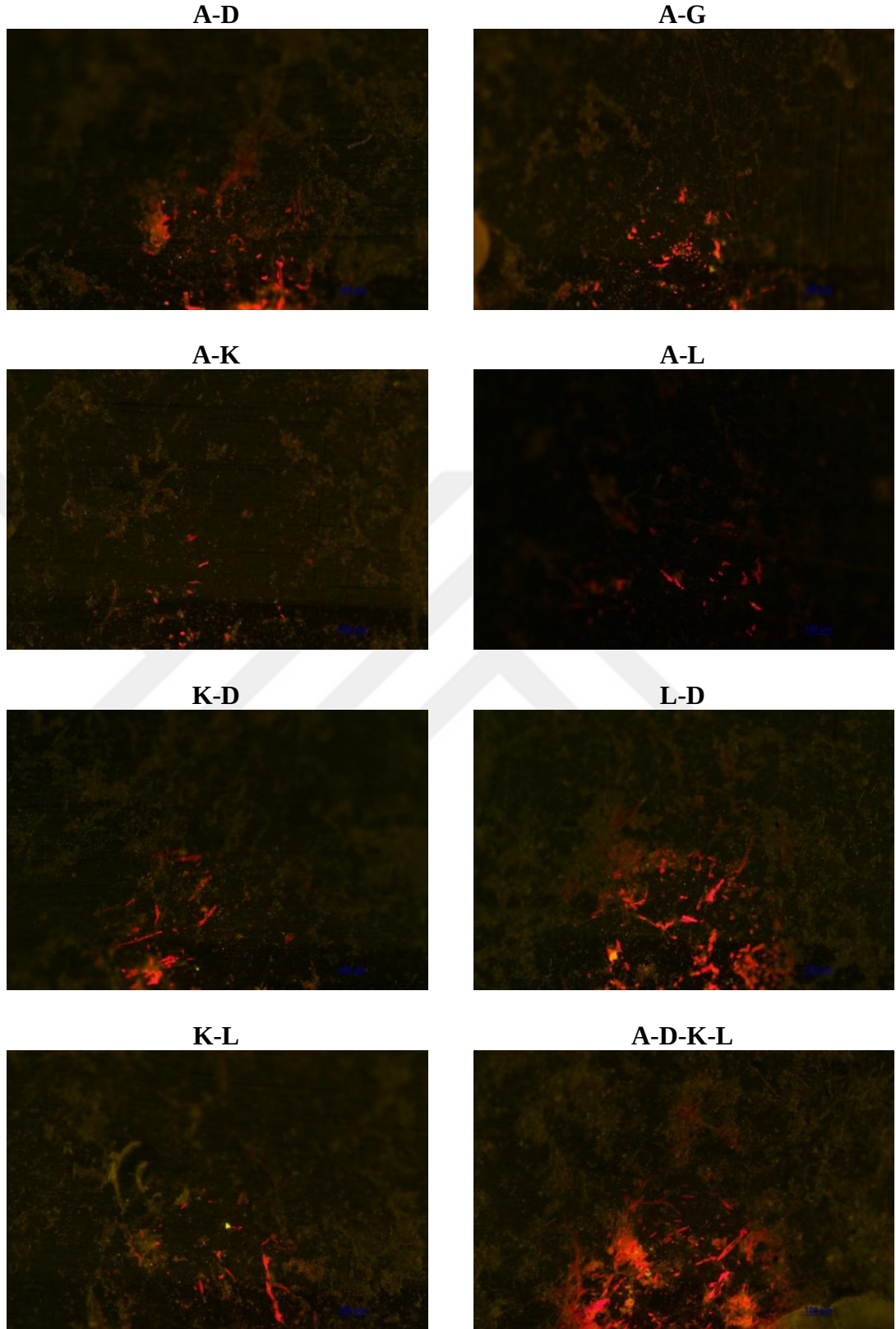
Şekil 4.48.'de 12 gün denizde bekletildikten sonra DAPI ile etkileştirilip floresans görüntüsü alınan çıplak metal kupona ait fotoğraf yer almaktadır. Şekil 4.49.'da sodyum salisilat ortamında sentezi gerçekleştirilen PANİ ile koimmobilizasyonları yapılan

kuponlara ait görüntüler bulunmaktadır. Burada verilen kupon görüntülerinde en az biyofilm oluşumu  $\alpha$ -amilaz ile lipaz koimmobilizasyonuna ait kuponda görülmektedir.

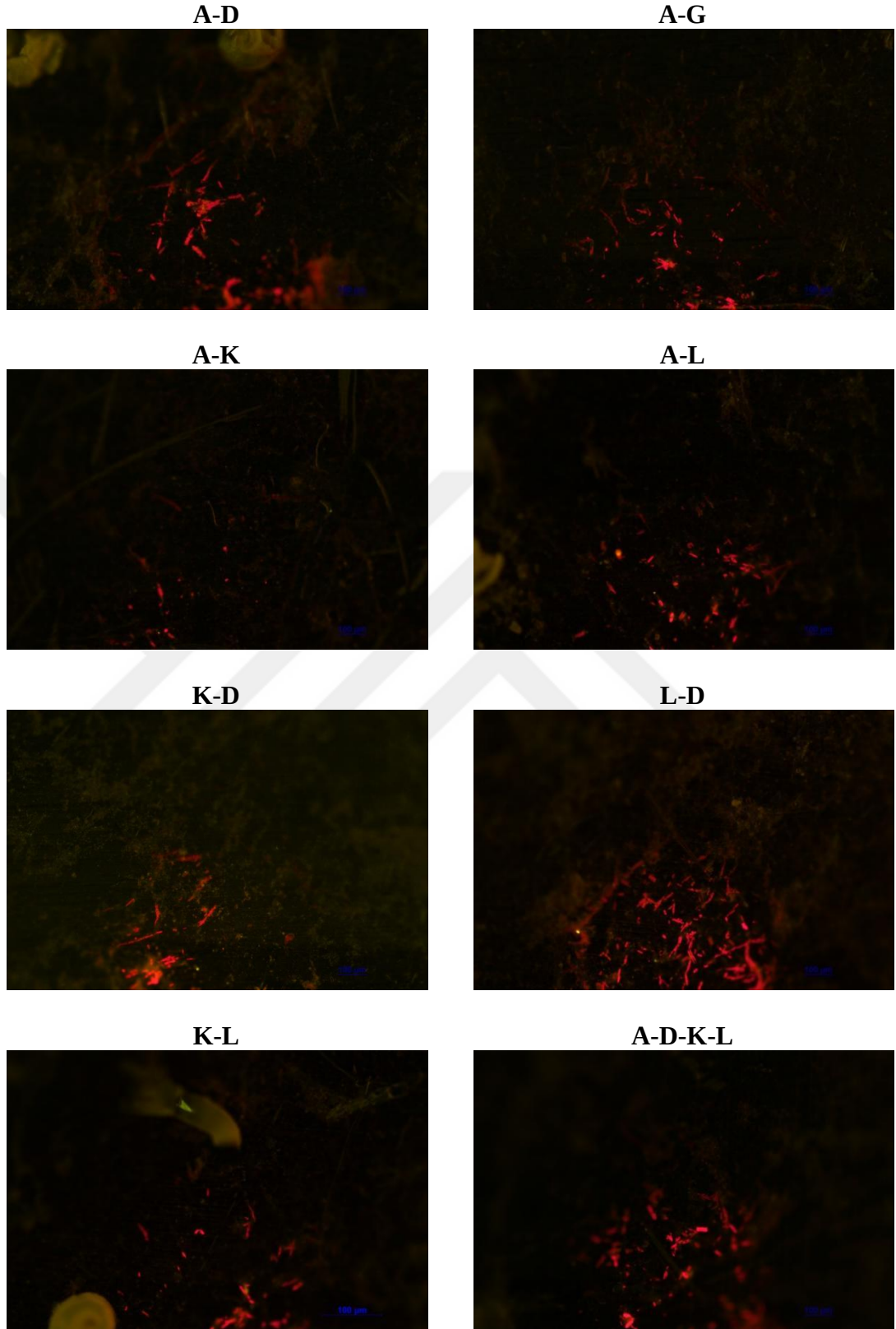


Şekil 4.48. Çıplak metal kupona ait floresans mikroskobu görüntüsü

Bunun yanında  $\alpha$ -amilaz ile  $\alpha$ -kimotripsin koimmobilizasyonu, DNaz ile  $\alpha$ -kimotripsin koimmobilizasyonuna ait kuponlarda da diğer kuponlara oranla daha az biyofilm oluşumu görülmektedir.



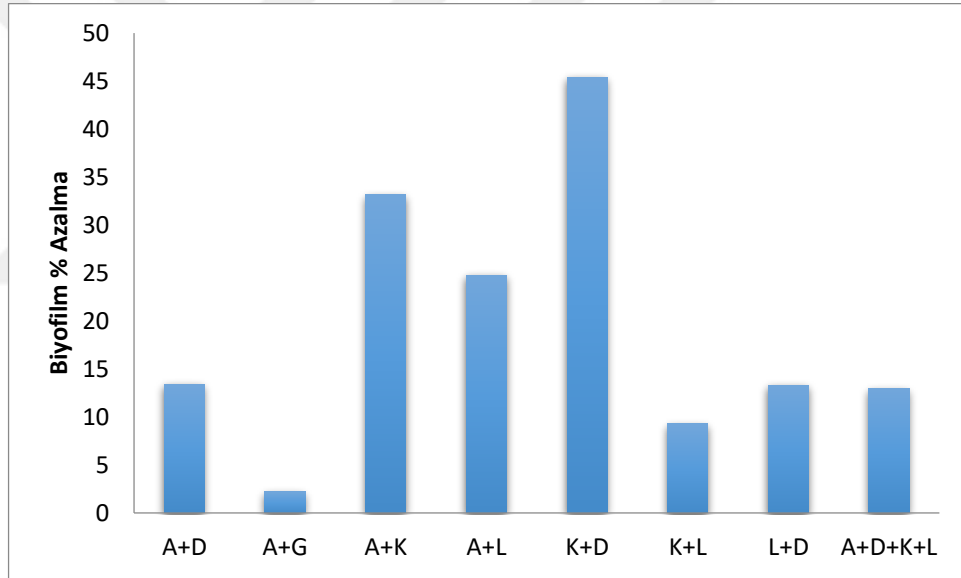
Şekil 4.49. Anilin ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri



Şekil 4.50. *o*-Anisidin ile koimmobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans mikroskobu görüntüleri

Şekil 4.50'de sodyum salisilat ortamında POA sentezi sırasında film içerisine hapsedme yöntemi kullanılarak koimmobilizasyonları gerçekleştirilen enzimleri bulunduran kuponlara ait floresans görüntüler görülmektedir. Görüntüler incelendiğinde POA ile hapsedilen;  $\alpha$ -amilaz ile  $\alpha$ -kimotripsin,  $\alpha$ -amilaz- glukoz oksidaz ve dörtlü kombinasyon olan  $\alpha$ -amilaz, DNAz,  $\alpha$ -Kimotripsin ile lipaz koimmobilizasyonlarının sahip olduğu biyofilm önleyici etkinlikleri açıkça görülebilmekte olup, diğer koimmobilizasyonlara ait görüntüler de çıplak metal kuponu ile kıyaslandığında biyofilm azlığı tespit edilmiştir.

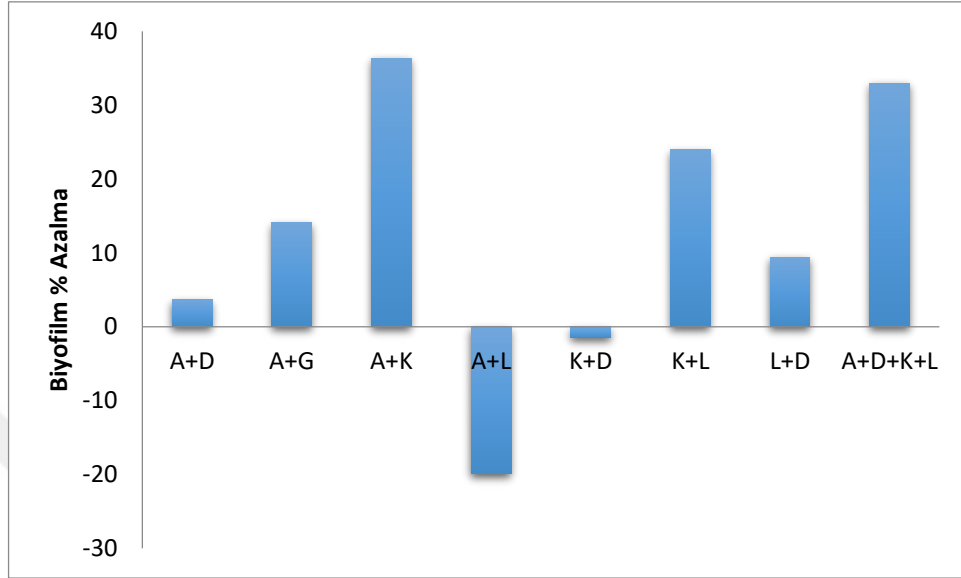
#### 4.1.3.6. Enzim Koimmobilizasyonu Gerçekleştirilmiş Kuponların Antibiyofilm Etkilerinin Kristal Viyole Boyama ile Bağlı Olarak Belirlenmesi



Şekil 4.51. Anilin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran filmlerin bağlı antibiyofilm etkinlikleri

Şekil 4.51.'de sodyum salisilat ortamında anilin monomeri kullanılarak gerçekleştirilen enzim koimmobilizasyonlarını barındıran kuponların, çıplak metal kuponları üzerindeki biyofilm oluşumuna kıyasla gösterdikleri antibiyofilm etkinlikleri yüzde olarak verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi en yüksek antibiyofilm etkinlik DNAz ile  $\alpha$ -kimotripsin enzimlerinin koimmobilizasyonları durumunda elde edilmiştir. Sayısal olarak ifade etmek gerekirse, elde edilen antibiyofilm etkinlik yüzdeleri; DNAz ile  $\alpha$ -kimotripsin % 45,4;  $\alpha$ -amilaz ile  $\alpha$ -kimotripsin % 33,19;  $\alpha$ -amilaz ile lipaz % 24,76;

$\alpha$ -amilaz ile DNAz % 13,39; DNAz ile lipaz % 13,3;  $\alpha$ -amilaz- DNAz- $\alpha$ -kimotripsin ile lipaz % 12,97;  $\alpha$ -kimotripsin ile lipaz % 9,31 ve  $\alpha$ -amilaz ile glukoz oksidaz koimmobilizasyonu için % 2,22 olarak hesaplanmıştır.

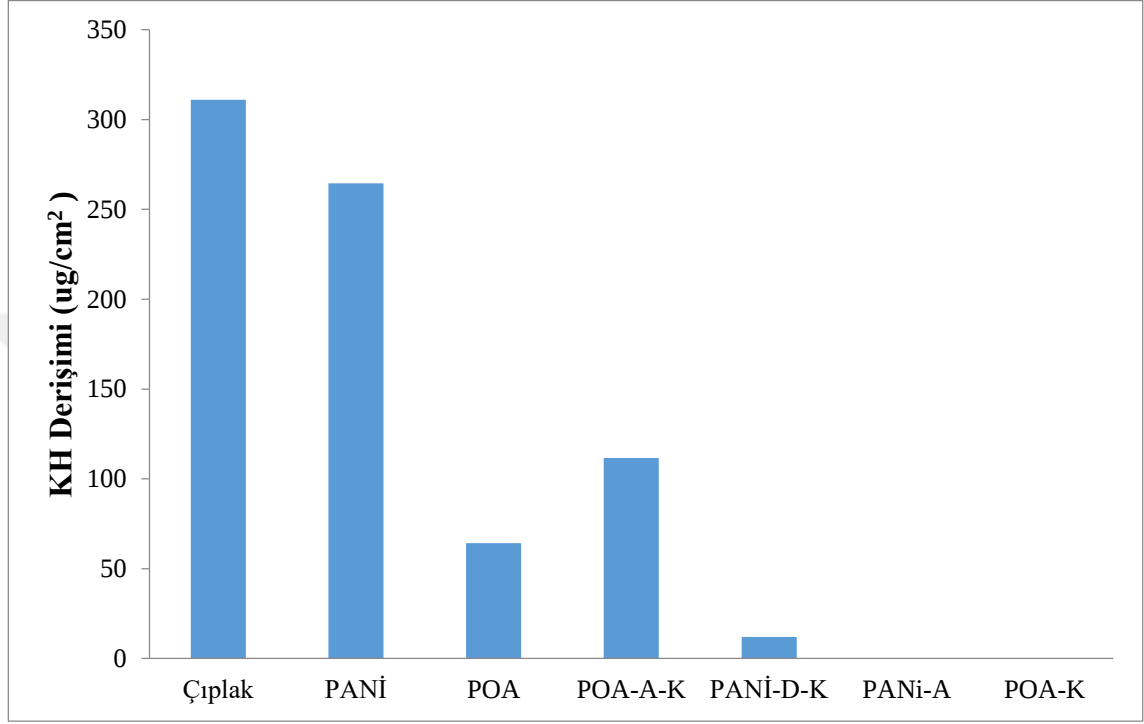


Şekil 4.52. o-anisidin ile immobilizasyonu gerçekleştirilmiş enzimleri bulunduran filmlerin bağıl antibiyofilm etkinlikleri

Şekil 4.52.'de verilen grafikte kuponlar üzerine sodyum salisilat ortamında POA film sentezi ile hapsedilen enzim koimmobilizasyonlarının, çıplak metal kuponunda oluşan biyofilm miktarına kıyasla göstermiş oldukları antibiyofilm özellikleri yüzde ile ifade edilmiştir. Grafik incelendiğinde gerçekleştirilen  $\alpha$ -amilaz ile  $\alpha$ -kimotripsin koimmobilizasyonunun en yüksek antibiyofilm özelliğini gösterdiği görülmektedir. Kristal viyole ile boyama sonucu elde edilen antibiyofilm özelliği yüzdeleri;  $\alpha$ -amilaz ile  $\alpha$ -kimotripsin % 36,38;  $\alpha$ -amilaz- DNAz-  $\alpha$ -kimotripsin ile lipaz % 33,0;  $\alpha$ -kimotripsin ile lipaz % 23,97;  $\alpha$ -amilaz ile glukoz oksidaz % 14,08; DNAz ile lipaz % 9,41;  $\alpha$ -amilaz ile DNAz % 3,67; DNAz ile  $\alpha$ -kimotripsin -% 1,46 ve  $\alpha$ -amilaz ile lipaz -% 19,9 şeklindedir. Görüldüğü gibi DNAz ile  $\alpha$ -kimotripsin ve  $\alpha$ -amilaz ile lipaz koimmobilizasyonlarını barındıran kuponların yüzeyinde, çıplak metale kıyasla daha fazla biyofilm oluşumunun gerçekleştiği görülmektedir.

#### 4.1.4. Farklı Şekillerde Elde Edilmiş Kupon Yüzeylerinin Biyokimyasal ve Mikrobiyolojik Analizi

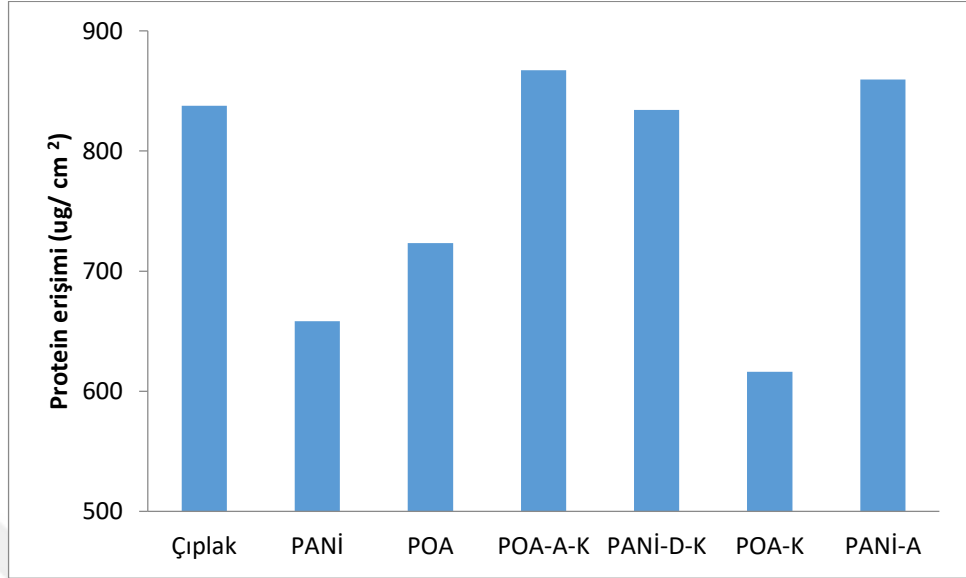
##### 4.1.4.1. Toplam Karbohidrat Tayini



Şekil 4.53. Seçilen kaplamalara ait kuponlarda bulunan karbohidrat konsantrasyonları (µg/ml)

Şekil 4.53'teki grafikte, seyreltme faktörü de dikkate alınarak hesaplanan karbohidrat konsantrasyonları görülmektedir. Gerçekleştirilen fenol- sülfürik asit tayininde; çıplak metal 336 µg/ml, PANİ 285,59 µg/ml, POA filmine hapsedilmiş  $\alpha$ -amilaz ile  $\alpha$ -kimotripsin örneğinde 120,44 µg/ml, POA 69,31 µg/ml, PANİ filmine hapsedilmiş DNaz ile  $\alpha$ -kimotripsin örneğinde 12,99 µg/ml karbohidrat konsantrasyonu belirlenmiştir. PANİ filmine hapsedilmiş  $\alpha$ -amilaz ve POA filmine hapsedilmiş  $\alpha$ -kimotripsin örneklerinde karbohidrat belirlenememiştir.

#### 4.1.4.2. Toplam Protein Tayini



Şekil 4.54. Seçilen kaplamalara ait kuponlarda bulunan protein konsantrasyonları (µg/ml)

Şekil 4.54'de gerçekleştirilmiş olan Bradford protein tayinine ilişkin seyreltme faktörünün dikkate alınmasıyla hesaplanmış olan protein konsantrasyonları bulunmaktadır. Bu tayin sonucuna göre, POA filminde koimmobilize edilmiş olan  $\alpha$ -amilaz ile  $\alpha$ -kimotripsin örneğinde protein konsantrasyonu 867,22 µg/ml, PANİ'de immobilize edilmiş olan  $\alpha$ -amilaz örneğinde 859,63 µg/ml, çıplak metalde 837,59 µg/ml, PANİ filminde hapsedilmiş olan DNAz ile  $\alpha$ -kimotripsin örneğinde 834,26 µg/ml, POA kaplı örnekte 723,33 µg/ml, PANİ kaplı örnekte 658,33 µg/ml ve POA'da immobilize  $\alpha$ -kimotripsin örneğinde 616,11 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

#### 4.1.4.3. Mikrobiyolojik Tanılama

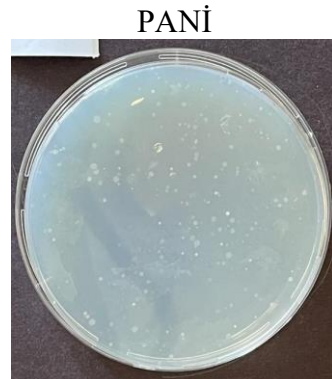
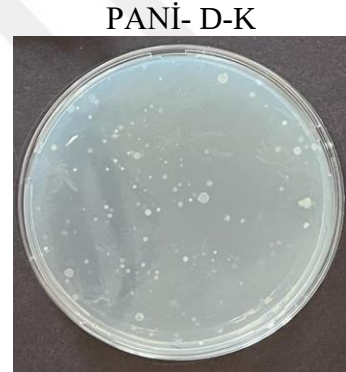
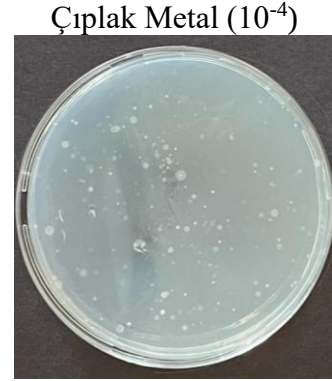
Biyofilm örnekleri ve deniz suyundan ekim yapılan petrilerin 14 gün süreyle 25°C'de inkübasyonu sonrası oluşan koloniler sayılmış ve mililitre başına koloni oluşturan birim hesaplanmıştır (Çizelge 4.10.). İstatistiksel olarak bir anlam ifade etmesi nedeniyle petrilerde sayılacak olan kolonilerin 30-300 arasında olması gerekmektedir. Dolayısıyla kaplama örnekleri için  $10^{-4}$  seyrelme oranlarından ekim yapılan petriler dikkate alınırken deniz suyu için  $10^{-2}$  seyrelme oranında ekim yapılan petriler sayıma

dahil edilmiştir (Şekil 4.55.)

Çizelge 4.9. Seçilen kaplamalara ait biyofilm örneklerinin  $10^{-4}$  seyrelme oranında elde edilen koloni sayıları ve mililitre başına hesaplanan koloni oluşturan birim

| Kupon Adı                                         | Koloni Sayısı ( $10^{-4}$ ) | kob/ml             |
|---------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| POA- $\alpha$ -Kimotripsin                        | 61                          | $6,1 \times 10^5$  |
| PANİ- $\alpha$ -Amilaz                            | 81                          | $8,1 \times 10^5$  |
| POA- $\alpha$ -Amilaz - $\alpha$ -<br>Kimotripsin | 139                         | $13,9 \times 10^5$ |
| PANİ                                              | 242                         | $24,2 \times 10^5$ |
| POA                                               | 112                         | $11,2 \times 10^5$ |
| PANİ- DNaz- $\alpha$ -Kimotripsin                 | 176                         | $17,6 \times 10^5$ |
| Çıplak Metal                                      | 280                         | $28 \times 10^5$   |
| Deniz suyu                                        | $82^* (10^{-2})$            | $8,2 \times 10^3$  |

Şekil 4.57'de koloni sayımları yapılmış olan petrilere ait fotoğraflar yer almaktadır. Bu petrilere farklı olduğu belirlenen toplam 51 koloniden örnek alınarak tekrar yeni petrilere ekimleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.55. Agar ortamında 25°C’de 14 gün geliştirilen biyofilm örnekleri  $10^{-4}$  seyreltme oranına sahip yayma plak görüntüleri ile  $10^{-3}$  seyreltme oranına sahip deniz suyuna ait yayma plak görüntüleri

Petrilere ikinci kez ekimi yapılan izolatlar 2 gün 25°C’de inkübe edildikten sonra mikrobiyolojik tanımlama için MALDİ-TOF MS analizine gönderilmiştir. MALDİ-TOF MS analizine göre bir örneğin yüksek doğrulukta tanımlanabilmesi için elde etmesi gereken minimum skor 2 iken muhtemel bir eşleşme için alınması gereken minimum skor 1,7’ dir (Wieser ve ark., 2012). Buna istinaden 51 örnekten 15 tanesinin 2’nin üzerinde bir skor ile yüksek doğrulukta eşleştiği belirlenmiştir. Bu eşleşmelerden 3 tanesi *Vibrio harvei*, 12 tanesi ise *Vibrio alginolyticus*’u işaret etmektedir. Skor değeri 1,7’nin üzerinde olan ve muhtemel eşleşme gösteren 2 örnek ise, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Vibrio nereis* olarak tanımlanmıştır.

#### 4.2. Tartışma

Çalışmada üç aşamada denemeler gerçekleştirilmiştir. İlk iki aşama sonunda destek elektrolit olarak sodyum salisilatın kullanılması durumunda antifouling etkisinin en yüksek olduğu saptanmıştır. Price ve ark. (2000), salisilatın ökaryotlar üzerinde olduğu kadar, bakteriler üzerinde de antibiyotik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Bunun yanında yapılan çalışmalarla PANİ ve türevlerinin Gram (+), Gram (-) ve fungi üzerinde etkisi olduğu, iyi bir antimikrobiyal özellik taşıdığı belirlenmiştir (Agarwala ve ark., 2014).

İkinci aşamada beş hidrolitik ve bir oksidoredüktaz enzim polimer filmlere hapsedilmiştir. Mikrokoloniler biyofilmlerin temel yapı birimidir. Ancak biyofilmlerin yaklaşık olarak % 10-15’ini hücreler oluştururken, geri kalan % 85-90’ını hücrelerin salgılamış olduğu ekstraselüler polimerik matriks oluşturur. Sıvı ile temasta olan biyofilmin temel bileşeni sudur. Geri kalan maddede ise ağırlıklı olarak ekzopolisakkaritler bulunur (Abd El-Baky, 2011). Biyofilm içerisinde % 40-95 karbohidrat, % 1-60 protein, % 1-40 lipid ve % 1-10 arasında nükleik asit bulunmaktadır (Kaçar, 2009). Antifouling etkiler karşılaştırıldığında; hidrolitik aktiviteye sahip olan  $\alpha$ -amilaz, lipaz,  $\alpha$ -kimotripsin ve DNaz enzimlerinin daha yüksek antifouling etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Denenmiş olan kaplamalar arasında ise en yüksek antifouling etkinin, sodyum salisilat ortamında PANİ film içerisine hapsedilmiş olan  $\alpha$ -amilaz içeren kaplamanın gösterdiği saptanmıştır. Tesfaye ve arkadaşları (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, deniz kaynaklı *Pantoea agglomerans* bakterisinden elde edilen  $\alpha$ -amilazın gıda kaynaklı biyofilm bakterilerine karşı inhibisyon etkinliği

araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar  $\alpha$ -amilazın farklı bakterilere karşı %73- 86 arasında biyofilm inhibisyonu sağladığı görülmüştür. 2021 yılında Lahiri ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ticari amilaz ve *Bacillus subtilis* bakterisinden elde edilen amilaz, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen biyofilmlerin üzerinde antibiyofilm etkinlikleri incelenmiştir. Bu çalışmaya göre, izole edilen  $\alpha$ -amilazın etkinliği %89 - 99 arasında etkinlik gösterirken, ticari enzim %86- 94 arasında biyofilm inhibisyon etkinliği göstermiştir.

Üçüncü aşamada, ikinci aşamada yüksek antifouling etki göstermiş olan hidrolitik enzimlerin polimer filmlere farklı kombinasyonlarda koimmobilizasyonları gerçekleştirilmiştir. Burada en yüksek antibiyofilm özelliği, PANİ film içerisine hapsedilmiş olan  $\alpha$ -amilaz + DNaz ile elde edilen kaplamanın taşıdığı belirlenmiştir. DNaz kaynağı olarak sığır pankreası tercih edilmiştir. Bu kaynaktan elde edilen DNaz I enziminin hücre içerisine giremediği ve sadece ekstrasellüler DNA (eDNA) üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Biyofilm içerisinde bulunan nükleik asit, ağırlıklı olarak eDNA şeklinde bulunmaktadır. Tetz ve Tetz tarafından 2009 yılında gerçekleştirilmiş olan çalışmada, biyofilm oluşumunun sıfıncı anından itibaren DNaz I ile muamele edilen ve edilmeyen denemelerinde, ilerleyen süreçte her iki denemede de 30kb uzunluğunda eDNA'ların bulunduğu buna karşın DNaz ile muamele edilen çalışmada biyofilm ve toplam bakteri biyokütlesinin azaldığı, bakteri canlılığının düştüğü ve antibiyotiklere karşı toleransın azaldığı görülmüştür. Her iki denemede de 30 kb uzunluğunda eDNA'ların bulunması ise ekstrasellüler ortama hücreler tarafından sürekli olarak eDNA sekresyonunun olduğunu düşündürmüştür. eDNA biyofilm oluşumunda, adezyonunda yapısal kararlılığında önemli bir rol oynamaktadır. Bunun yanında bir besin kaynağı ve antimikrobiyal ajanlara karşı bir koruma sağlamaktadır (Vorkapic ve ark., 2016).

Genel olarak tek enzim hapsedilmiş kaplamaların, koimmobilize enzim barındıran kaplamalara göre daha yüksek antifouling etki gösterdiği görülmektedir. Tekli enzim immobilizasyonlarında 50 U/ml enzim ile hazırlanan sentez ortamları, ikili koimmobilizasyon sırasında toplam 50U/ml olarak şekilde her enzim için 25 U/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Ortamda bulunan enzim miktarının azalması, bununla birlikte enzim hapsedme metodunun dezavantajlarından sayılan difüzyon sınırlılıkları dolayısıyla enzim aktivitesinin düşmesi (Çınar, 2009) bu bulguyu desteklemektedir.

SEM hem bir yüzeye yapışmış bakterilerin hem de bu yüzeyin morfolojisi ve bu

ikisi arasındaki ilişkiyi gözlemlemek için bilinen en iyi yöntemlerden biridir. Bunun yanında biyofilmin morfolojisi hakkında da bilgi veren anahtar konumdaki teknikler arasındadır. SEM, 1980'lerden beri biyofilm içerisinde yerleşim gösteren bakterilerin görselleştirilmesinde kullanılmaktadır. Her ne kadar biyofilm hakkında bugün sahip olduğumuz bilgilerin elde edilmesinde büyük bir yeri olsa da SEM'in tüm avantajlarının yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Yukarıda da belirtildiği gibi biyofilm çoğunluğu sudan oluşan cıvık bir matrikstir. Ancak SEM analizi için örnek hazırlanması sırasında dehidrasyon aşaması mevcuttur. Bu nedenle elde edilen SEM görüntülerinde, bir bütün halinde cıvık bir matriks yerine dehidrasyondan kaynaklanan iplikli yapılar görülmektedir (El Abed ve ark.,2012). Bu literatür bilgisi elde etmiş olduğumuz SEM görüntüleri ile örtüşmektedir. SEM görüntülerinde aynı zamanda kristaller de görülmektedir. Li ve ark., 2017 yılında yayınlamış oldukları çalışmada, fouling türlerine değinmişlerdir. Buna göre fouling alt sınıfları; organik, inorganik, kolloidal, biyolojik ve kombinasyon şeklinde sıralanmıştır. Çalışma ortamının deniz olduğu göz önüne alındığında burada biyolojik fouling yanında kimyasal foulingin de görülmesi literatür ile uyusmaktadır.

DAPI, DNA spesifik floresans bir boya olmakla birlikte DNA dışında da bağlanabildiği moleküllerin varlığı ve serbest haldeyken de DNA ile kompleks halde iken yaklaşık aynı floresans cevabı verebildiği için DNA'nın kantitatif tayini için kullanıma uygun değildir. DAPI kullanımında tek parametre, incelenecek materyaldeki DNA miktarı değildir. DNA molekülünde bulunan Adenin (A), Timin (T) miktarı önemlidir. DAPI'nin A ve T'ye bağlanma özgülüğü DAPI'nin aynı zamanda RNA'ya da bağlanmasına neden olmaktadır. Ancak bu kompleks ya hiç floresans özellik göstermemekte ya da çok az göstermektedir. Çalışma sırasında elde etmiş olduğumuz görüntülerde, kırmızı floresans renk de görülmektedir. Bu kırmızı rengin, Kautsky etkisi olarak da bilinen klorofilin otofloresansı olduğu düşünülmektedir. Bu fenomen algler arasında sıradan bir özellik niteliğindedir. Bununla birlikte bakteri ve bitkilerde de görülmektedir. Fotosistem I az miktarda floresans üretirken fotosistem II görünür bir floresansa neden olmaktadır. 440 nm ve 660 nm ışığı absorblayan klorofil kırmızı floresans göstermektedir (Lichtenthaler, 1992).

Denizde inkübasyon sonrası EDX analizleri gerçekleştirilen kuponlar üzerinde, deniz öncesinde üzerlerinde bulunmayan Na, Mg, Cl, K ve Ca elementlerine rastlanmıştır.

Deniz ortamı, tuzlu su çözeltisidir ve genel olarak bakıldığında deniz suyunda çeşitli sodyum, magnezyum, potasyum ve kalsiyum tuzlarının bulunduğu bilinmektedir. Kuponlar üzerinde görülen bu elementlerin, kimyasal fouling sonucu kuponların üzerinde bulunduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.10. 2016 yılına ait Mersin körfez bölgesi iz metal konsantrasyonları (Mersin Büyükşehir Belediyesi, 2016)

| İstasyon adı      | Al (g/kg) | Cr (mg/kg) | Mn (mg/kg) | Fe (g/kg) | Co (mg/kg) | Ni (mg/kg) | Cu (mg/kg) | Zn (mg/kg) | Cd (mg/kg) | Hg (µg/kg) | Pb (mg/kg) |
|-------------------|-----------|------------|------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Mersin Liman önü  | 48,21     | 161,81     | 556,35     | 35,09     | 24,64      | 293,59     | 25,14      | 83,56      | 0,33       | 12,82      | 15,85      |
| Mersin Referans   | 57,44     | 153,45     | 560,48     | 37,56     | 21,52      | 198,69     | 27,56      | 92,79      | 0,26       | 11,98      | 20,01      |
| Mersin Marina önü | 37,86     | 185,34     | 588,94     | 34,19     | 28,80      | 335,55     | 37,59      | 79,82      | 0,22       | 14,32      | 18,22      |

Çizelge 4.11.'deki değerler, kıyıdan 5 km açıkta ve 100 metreye kadar olan derinlikte elde edilmiştir. Kuponlar üzerinde denizde inkübasyon sonrasında görülen alüminyum birikiminin de Çizelge 4.11.'de verilen tabloya dayanarak, deniz kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ağır metallerle ilgili kirlilik seviyesini belirten ülkemize ait bir yönetmelik henüz bulunmamaktadır (Mersin Büyükşehir Belediyesi, 2016).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada kuponlar sığ kıyı sularında inkübe edilmiştir. Kuponlar üzerinde görülen silisyum artışının kum kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır.

İletken polimerlerin metalleri korozyona karşı korudukları uzun süredir bilinen bir durumdur. Bu polimerler katkılандıkları zaman çeliği anodik koruma mekanizmasıyla korozyona karşı korumaktadır. Bunu yüksek koruma kapasiteli metal oksit tabakası oluşturarak ve bu tabakanın zarar görmesi durumunda, tabakayı rejenere ederek gerçekleştirmektedir. Sentezlenen kaplamanın bariyer etkisi çelik yüzeyinin polimer kaplamanın koruyucu oksit tabakaları ile pasivasyonu üzerine olan etkinliği ile açıklanabilir. Ancak Cl<sup>-</sup> ve F<sup>-</sup> gibi halojen iyonlar, metal yüzeyinde bulunan bu koruyucu

oksit tabakasının aşınımını hızlandırmaktadır (Özyılmaz, 2004). Bunu, küçük iyon çapına sahip olmaları sayesinde kaplamanın gözeneklerinden geçerek çeliğin anodik çözünmesini hızlandırarak gerçekleştirirler. Paslanmaz çelik oksitlenmesi, yüzeyinde koruyucu demir, krom ve nikel oksitlerin oluşumu kaynaklı olup, polimer kaplama bariyer davranışın artmasına olumlu katkı sağlamaktadır (Özyılmaz ve ark., 2006). Yüzeyde metal oksitlerin artması, EDX ile tespit edilen Cr, Fe ve Ni değişimlerine neden olmuştur. Bunun yanında Çizelge 4.11.'de de gösterildiği gibi denizde bulunan Cr, Fe ve Ni iyonları da artışa neden olarak gösterilebilir.

Çalışmanın her etabında anilin ve o-anisidin için ayrı ayrı en yüksek antifouling etkiyi gösteren kaplamalar seçilerek, bunların denizde inkübasyon sonrası üzerlerinde oluşan biyofilmlerin karbohidrat ve protein tayinleri gerçekleştirilmiştir. Fenol-sülfürik asit tayininde en yüksek karbohidrat konsantrasyonu çıplak metal üzerinde oluşan biyofilimde görülürken en düşük konsantrasyon PANİ filmine immobilize  $\alpha$ -amilaz ve POA filmine hapsedilmiş  $\alpha$ -kimotripsin kaplamalarında görülmüştür. Çıplak metal ve  $\alpha$ -amilaz enzimlerinin bulunduğu kaplamalardaki sonuç beklentiyi karşılamaktadır. Bradford protein tayini sonucunda en yüksek protein konsantrasyonu POA filmine koimmobilize edilen  $\alpha$ -amilaz- $\alpha$ -kimotripsin kaplamasında görülürken, en düşük protein konsantrasyonu POA filminde hapsedilmiş  $\alpha$ -kimotripsin kaplamasına ait biyofilimde tespit edilmiştir. Biyofilm tabaka % 1-60 arasında protein ihtiva etmektedir (Kaçar, 2009). Bilindiği gibi  $\alpha$ -kimotripsin proteolitik bir enzimdir. Buna istinaden en düşük protein konsantrasyonunun  $\alpha$ -kimotripsin barındıran kaplamalarda görülmesi beklenen bir durumdur.

Mikrobiyal tanımlama için seçilmiş olan kaplamalar ve çıplak metalin denizde inkübasyonu sonrası yüzeyde oluşan biyofilm yapıları izole edilmiştir. Biyofilm izolatları ve farklı oranlarda seyreltilmiş deniz suyu örnekleri petri ortamlarına ekilmiştir. İnkübasyon sonrası koloni sayımları gerçekleştirilmiştir. Buna göre en düşük kob/ml değeri deniz suyunda görülmüştür. Madigan ve ark., 2003 yılındaki çalışmalarında sıvı ortama kıyasla, metal/çözelti arayüzeyinde bulunan besin maddelerinin daha fazla bulunduğunu, buna bağlı olarak yüzeylerinde mikroorganizma sayısının ve aktivitesinin, sıvıya ortamına oranla daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Elde etmiş olduğumuz bulgu; deniz suyunda  $8,2 \times 10^3$  kob/ml iken, çıplak metale ait biyofilm izolatında  $28 \times 10^5$  kob/ml'dir. Bu bulgu literatür ile uyusmaktadır. Gerçekleştirilen kaplamalar arasında en

düşük koloni oluşturan birimler POA filmine immobilize  $\alpha$ -kimotripsin ( $6,1 \times 10^5$ ) ve PANİ filmine hapsedilmiş  $\alpha$ -amilaz ( $8,1 \times 10^5$ ) kaplamalarına ait izolatlarda görülmüştür. Railkin ve ark., 2004 yılında polimer plakalar üzerinde gerçekleştirdikleri bir fouling çalışmasında hücre sayısını  $10^7/\text{cm}^2$  olarak bulmuşlardır. Bu enzimler, biyofilm yapısının temel yapısını oluşturan karbohidrat ve protein moleküllerini hidrolizlemektedir. Buna bağlı olarak, buraya yerleşecek olan mikroorganizmalar için gerekli besin maddelerinin azaldığı ve bakterilerin yerleşemediği düşünülebilir. Zira bakteri sayısındaki artış, biyofilm artmasına ve ihtiyaç duyulan besin maddelerinin artışına yol açar. Besin maddelerinin azalması, kolonileri 3 şekilde etkilemektedir. İlkinde kolonilerde bulunan ve besin maddesinden uzakta kalan hücrelerin, durağan faza geçerek, yaşamlarının devamı için gerekli besin miktarını azaltmalarıdır. İkinci olarak, bu koloniler biyofilm altında kanallar oluşturarak biyofilm yüzey alanını arttırıp besine ulaşmayı kolaylaştırmaktadır. Son olarak ise, biyofilmde bulunan bakterilerin biyofilmi yıkarak burada bulunan besini kullanmasıdır (Pasmore ve ark., 2003).

MALDI-TOF MS ile 51 örneğin analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda 14 izolatın identifikasyonu yapılabilmektedir. Bu izolatların *Vibrio harvei*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Vibrio nereis* olmak üzere dört tür altında toplandığı belirlenmiştir. Biyofouling oluşum sürecinde ilk olarak Brownian hareketler, elektrostatik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimleri gerçekleşir. Ardından polisakkarit, lipid ve protein gibi organik moleküller yüzey tarafından absorplanır. Bu moleküler tabakanın oluşmasıyla 1 günün sonunda birincil kolonizasyon başlar. Yüzeye ilk yerleşen organizmalar fouling bakterileri, diatomlardır. Bunların ardından çok az bir miktar olmakla birlikte heterotrofik flagellatlar gelir. İkincil kolonizasyon yaklaşık 1 hafta sonra başlar. Bu aşamada makroalg sporları, mantarlar, protozoa yerleşimi görülür. 3. haftadan sonra üçüncül kolonizasyon gerçekleşir. Bu aşamada yüzeye omurgasız hayvanların larvaları yüzeye yerleşim gösterir (Callow ve Fletcher, 1994; Hellio ve Yebra 2009). Railkin ve ark., 2004 yılında polimer plakalar üzerinde gerçekleştirdikleri fouling çalışmasında bakteri/diatom/heterotrofik flajellatların oranını 640/4/1 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda kuponlar denizde 12 gün süre ile tutulmuştur. Buna bağlı olarak yüzeyde özellikle bakteri bulunması beklenmektedir. Fouling bakterileri arasında başlıca *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Sarcina*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Caulobacter* cinsleri yer almaktadır (Geldiay

ve Kocataş, 2002). Bu açıdan bakıldığında *Vibrio* türlerinin tanımlanmış olması literatürle uyuşmaktadır. *Vibrionaceae* ailesi deniz ve kıyı sularında yaşayan bakterilerden oluşmaktadır. Gram (-), heterotrofik bakterilerdir. Üzerlerinde bulunan tek veya çoklu flajelleri ile aktif olarak hareket edebilmektedirler. Büyümeleri sodyum iyonları tarafından indüklenmektedir. Hatta çoğu üyesi için zorunludur. *Vibrio harvei* tip I biyolojik ışıma gösteren bir türdür ve lusiferaz enzimini bulundurur (Kaçar,2009).



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mikroorganizmalar, sıvı-katı ve sıvı-hava arayüzlerinin bulunduğu her yere yerleşerek buralara yapışma ve üreme eğilimi göstermektedirler. Bu eğilimleri başlıca tıp alanında kullanılan ameliyat malzemelerinin, protezlerin kontaminasyonundan hastane enfeksiyonlarına (nozokomiyal enfeksiyon), deniz ulaşımında yakıt maliyeti artışlarına, artan bakım sürelerine, biyolojik tür istilalarına, ters ozmoz yöntemiyle su elde edilen tesislerde bakım ve onarım maliyetlerinin artmasına neden olmaktadır.

Bu çalışmamızda deniz suyu ile temas halinde olan yüzeylerde oluşan biyofilm üzerine odaklanılmıştır. Bu amaçla çalışma alanı olarak, biyofilm oluşumunun yoğun olduğu bir durgun su alanı tercih edilmiştir. Balıkçı barınakları deniz olmasına rağmen dalga kıranlarla açık denizden korunan, içerisinde akıntının neredeyse hiç olmadığı durgun sulardır.

Çalışmamızın ilk aşamasında, antimikrobiyal etkileri bilinen anilin ve *o*- anisidin monomerlerinin beş farklı elektrolit ortamında elektropolimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. 0,2M amonyum okzalata, sodyum salisilat, sodyum okzalata, sodyum molibdat ve sodyum *p*-toluen sülfonat içeren ortamlarda SS304 kuponlarının üzerine sentezlenen PANİ ve POA filmleri, Mersin Balıkçı Barınağı'nda 12 gün süre ile denizde 2 metre derinliğinde inkübe edilmiştir. Bu süre zarfında deniz suyu sıcaklığı takip edilmiş ve ortalama sıcaklığın 17,96°C olduğu görülmüştür. İnkübasyon süresi sonunda zaman kaybetmeden kuponların kristal viyole yöntemi kullanılarak biyofilm miktarları, çıplak metal kupona bağlı olarak hesaplanmıştır. Buna göre PANİ filmleri için en yüksek antifouling özellik gösteren filmler, sodyum salisilat (% 50,64) ve amonyum okzalata (% 46,19) ortamlarında sentezlenenler için bulunmuştur. Benzer şekilde POA filmleri için en yüksek antifouling özellik gösteren filmler amonyum okzalata (% 69,88) ve sodyum salisilat (% 68,62) ortamlarında sentezlenenler olmuştur. Spektrofotometrik ölçümlerle birlikte kuponların DAPI ile etkileştirildikten sonra floresans mikroskobu ve SEM ile yüzey analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm sonuçların birbirini desteklediği görüldükten sonra bu bulgular göz önüne alınarak bir sonraki aşamaya amonyum okzalata ve sodyum salisilat ortamları ile devam edilmiştir.

İkinci aşamada, elektrolit olarak amonyum okzalata ve sodyum salisilat ortamları kullanılarak anilin ve *o*-anisidin monomerlerinin elektropolimerizasyonu sırasında  $\alpha$ -

amilaz, DNAz, glukoz oksidaz,  $\alpha$ -kimotripsin, lipaz ve pektinaz enzimleri polimer içerisine hapsedilerek immobilizasyonları gerçekleştirilmiştir. 12 gün boyunca denizde inkübasyonları sırasında deniz suyu sıcaklığı takibi yapılmış ve bu süre zarfındaki ortalama sıcaklık 18,95°C olarak hesaplanmıştır. Inkbasyonları sonucu kristal viyole ile gerçekleştirilen boyama sonucunda elde edilen spektrofotometrik sonuçlara göre genel olarak sodyum salisilat ortamında sentezlenen filmlerin amonyum okzalat ortamında sentezlenenlere göre daha yüksek antifouling etkinlik gösterdikleri grlmştir. Gerçekleştirilen floresans mikroskobu ve SEM analizleri ile desteklenen bulgular sonucunda, bu aşamada immobilize edilen altı enzim arasından dört enzim seçilmiştir. Bunlar  $\alpha$ -amilaz (PANİ % 74,86; POA % 53,49), DNAz (PANİ % 73,38; POA % 59,07),  $\alpha$ -kimotripsin (PANİ % 65,88; POA % 66,13) ve lipaz (PANİ % 70,44; POA % 61,6) enzimleridir.

Çalışmanın nc aşamasında ikinci aşama sonunda seçilmiş olan enzimlerin ikili ve dörtlü koimmobilizasyonları gerçekleştirilmiştir. Burada ortam olarak sodyum salisilat kullanılmıştır. Koimmobilizasyonlar SS 304 kuponlarına PANİ ve POA filmleri içerisine hapsedilerek gerçekleştirilmiştir. 12 gün süresince denizde inkübasyon sırasında, ortalama sıcaklık 17,9°C olarak hesaplanmıştır. Spektrofotometrik lmler sonucunda PANİ filmlerde gerçekleştirilen koimmobilizasyonlar arasından, DNAz ile  $\alpha$ -kimotripsin koimmobilizasyonu % 45,4 ile en yüksek antifouling etkisini gösterirken, POA filmlerde en yüksek etkiyi % 36,38 ile  $\alpha$ -amilaz ile  $\alpha$ -kimotripsin koimmobilizasyonu göstermiştir. Bu sonuç floresans mikroskobu ve SEM analizleri ile desteklenmiştir.

Son aşamada, önceki aşamalarda en yüksek antifouling özellik göstermiş olan sodyum salisilat ortamında PANİ ve POA, PANİ filmlere immobilize  $\alpha$ -amilaz, POA filmlere immobilize  $\alpha$ -kimotripsin, PANİ filmlerde koimmobilize DNAz ile  $\alpha$ -kimotripsin ve POA filmlerde koimmobilize  $\alpha$ -amilaz ile  $\alpha$ -kimotripsin yanında ıplak SS304 kuponu 12 gün denizde bekletildikten sonra biyokimyasal ve MALDİ-TOF MS tayinleri gerçekleştirilmiştir. Fenol sülfürik asit yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen karbohidrat tayininde ıplak SS304 kuponunun tayininde 336  $\mu$ g/ml karbohidrat tayin edilirken, PANİ filmlerde immobilize  $\alpha$ -amilaz ve POA filmlerde immobilize  $\alpha$ -kimotripsin filmlerde karbohidrat tespit edilememiştir. Bradford protein tayininde ıplak SS304 metal kuponunda tayin edilen protein konsantrasyonu 837,59  $\mu$ g/ml iken burada en düşük protein miktarı POA filmlere immobilize bulunan  $\alpha$ -kimotripsin kuponlarında

616,11 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Gerek biyofilm gerekse deniz suyundan alınan örneklerin agar ortamında 14 gün süreyle 25°C'de inkübasyonu sonrası koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. POA filmine immobilize  $\alpha$ -kimotripsine ait petrilerde  $61 \times 10^5$  kob/ml, PANİ filmine immobilize  $\alpha$ -amilaza ait petrilerde  $81 \times 10^5$  kob/ml tayin edilmiştir. Kültürlerin tümünde farklılık gösterdiği belirlenen toplam 51 izolat seçilmiş ve bunların tanımlamaları MALDI-TOF MS analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda izolatların *Vibrio harvei*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Vibrio nereis* olarak tanımlanan dört tür altında toplandığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmanın sonucunda, gerçek deniz ortamında gerçekleştirilen inkübasyonlarda deniz suyu sıcaklığı, hava koşulları, derinlik ve akıntı gibi parametrelerin sonuç üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Elektropolimerizasyon sırasında kullanılan elektrolit ortamının, sentezlenen polimer film türünün antifouling etkinliği üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Tekli immobilize edilen enzimlerin, koimmobilize enzimlere kıyasla daha yüksek antifouling etki gösterdiği görülmüştür.

İleriki çalışmalarda daha etkin antifouling kaplamaları elde etmek amacıyla ticari enzimler yerine deniz mikroorganizmaları kaynaklı enzimler kullanılabilir. Antifouling etkinliği, sadece biyofilm yerine biyofilm ile quorum sensing mekanizması üzerinde de etkili olacak şekilde enzimlerin immobilizasyonu üzerine ilerletilebilir. Deniz mikroorganizmaları kaynaklı enzimler üzerinde mutasyonlar gerçekleştirilerek biyofilm üzerinde daha etkin enzimler elde edilebilir. Gerçek enzimler yerine nanozimlerin immobilizasyonun gerçekleştirildiği kaplamalar oluşturulabilir. Biyofilm üretiminde en etkin olan mikroorganizmalar belirlenerek bunların üretmiş oldukları biyofilmlere özgü karakteristik bileşenler tespit edilerek bunları hedef alan kaplamalar yapılabilir. Bunların yanında antifouling etkinliği yanında antikorozyon etkinliği de gösteren etkili kaplamalar da oluşturulabilir.

## KAYNAKLAR

- Abd El-Baky, R.M., 2011. Application of scanning electron microscopy for the morphological study of biofilm in medical devices. (V. Kazmiruk, Editör). **Scanning Electron Microscopy**. IntechOpen.
- Agarwala, M., Barman, T., Gogoi, D., Choudhury, B., Pal, A.R., Yadav, R.N.S., 2014. Highly effective antibiofilm coating of silver-polymer nanocomposite on polymeric medical devices deposited by one step plasma process. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 102 (6): 1223- 1235.
- Almeida, E., Diamantino, T.C., and De Sousa, O., 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, 59: 2–20.
- Appel, W., 1986. Chymotrypsin: Molecular and Catalytic Properties. **Clinical Biochemistry**, 19: 317- 322.
- Aykın, E., Omuzbüken, B. and Kaçar, A., 2018, Antibiofilm potential of enzymes as ecofriendly antifouling additives. **Fresenius Environmental Bulletin**, 27 (6): 4093- 4103.
- Aykın, E., Omuzbüken, B. and Kaçar, A., 2019. Microfouling bacteria and the use of enzymes in eco-friendly antifouling technology. **Journal of Coatings Technology and Research**, 16(3):847-856.
- Balasubramanian, V., Rajaram, R., Palanichamy, S., Subramanian, G., Mathivanan, K. and Pugazhendhi, A., 2018. Lanosterol expressed bio-fouling inhibition on Gluf of Mannar coast, India. **Progress in Organic Coatings**, 115: 100- 106.
- Baldissera, A. F., Miranda, K. L., Bressy, C., Martin, C., Margaillan, A. and Ferreira, C. A., 2015. Using conducting polymers as active agents for marine antifouling paints. **Materials Research**, 18 (6): 1129-1139.
- Banerjee, I., Pangule, R. C. and Kane R.S., 2011. Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria and marine organisms. **Advanced materials**, 23 (6): 690- 718.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Chemistry**, 72: 248-254.
- Callow, M. E. and Fletcher, R. L., 1994. The influence of low surface energy materials on bioadhesion: a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 34: 333–348.
- Cao, P., He, X., Xiao, J., Yuan, C. and Bai, X., 2018. Covalent bonding of AgNPs to 304 stainless steel by reduction in situ for antifouling applications. **Applied Surface Science**, 425: 201-209.
- Cao, P., Liu, D., Liu, Y., Wang, H., Zhang, C., Yuan, C. and Liu, X., 2021. Marine antifouling behavior of the surfaces modified by dopamine and antibacterial peptide. **Journal of Oceanology and Limnology**, 1-15.
- Chambers, L. D., Stokes, K. R., Walsh, F. C. and Wood, R. J. K., 2006. Modern approaches to marine antifouling coatings. **Surface and Coatings Technology**, 201: 3642–3652.
- Çınar, M., 2009. Enzyme immobilization on titania-silica-gold thin films for biosensor applications and photocatalytic enzyme removal for surface patterning, Yüksek Lisans Tezi, **Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28 (3): 350- 356.
- Eğer, G., 2019. Poli(piról-ko-o-anisidin)/kitosan kompozitinin kimyasal sentezi ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, **Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Hatay.
- El Abed, S., Ibensouda, S. K., Latrache, H. and Hamadi, F., 2012. **Scanning electron microscopy (SEM) and environmental SEM: suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation**. (V. Kazmiruk, Editör). Scanning Electron Microscopy. IntechOpen. 717-730.
- Eyring, V., Köhler, H.W., Van Aardenne, J. and Laver A., 2005. Emissions from international shipping: the last 50 years. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, 110: 171-182.
- Feng, Y., Chen, S. and Cheng, F., 2018. Stearic acid modified zinc nano-coatings with superhydrophobicity and enhanced antifouling performance. **Surface and Coatings Technology**, 340: 55-65.
- Geldiay, R. ve Kocataş, A., 2002. **Deniz biyolojisine giriş**. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, Bornova.
- Giraud, T., 2008. Biological globalisation: bioinvasions and their impacts on nature, the economy and public health. **Environmental Sciences**, 5: 214-216..
- Hellio, C., and Yebra D.M., 2009. **Advances in marine antifouling coatings and technologies**, Woodhead Publishing Limited and CRC Press, Cambridge.
- İbrahim, Y., Wadi, V.S., Ouda, M., Naddeo, V. and Banat, F., 2022. Highly selective heavy metal ions membranes combining sulfonated polyethersulfone and self-assembled manganese oxide nanosheets on positively functionalized graphene oxide nanosheets. **Chemical Engineering Journal**, 428: 131267.
- Kapuscinski, J., 1995. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. **Biotechnic & Histochemistry**, 70 (5): 220-233.
- Kaçar, A., 2009. Antifouling boyaların denizdeki bakteriyel biyofilm gelişimi üzerine etkisi, Doktora tezi, **Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, İzmir.
- Karlsen, E.A., Stensen, W., Juskewitz, E., Svenson, J., Berglin, M. and Svendsen, J. S. M., 2021. Anti-colonization effect of Au surfaces with self-assembled molecular monolayers functionalized with antimicrobial peptides on *S. epidermidis*. **Antibiotics**, 10 (12): 1516.
- Keilin, D. and Hartree, 1948. The use of glucose oxidase (notatin) for the determination of glucose in biological material and for the study of glucose- producing systems by manometric methods. **The Biochemical Journal**, 42 (2): 230-238.
- Kochert, G., 1978. Carbohydrate determination by phenol-sulfuric acid. **Handbook of Physiological Methods**, 1: 171-173.
- Kristensen, J.B., Olsen, S.M., Laursen, B.S., Kragh, K.M., Poulsen, C.H., Besenbacher, F. and Meyer, R.L., 2010. Enzymatic generation of hydrogen peroxide shows promising antifouling effect. Biofouling: **The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, 26 (2): 141-153.
- Lahiri, D., Nag, M., Sarkar, T., Dutta, B. and Ray, R.R., 2021. Antibiofilm activity of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* and prediction of the optimized conditions for biofilm removal by response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 193 (6): 1863- 1872.

- Li, L., Liu, X. and Li, H., 2017. A review of forward osmosis membrane fouling: types, reseach methods and future prospects. **Environmental Technology Reviews**, 6 (1): 26-46.
- Lichtenthaler, H. K., 1992. The Kautsky effect: 60 years of chlorophyll fluorescence induction kinetics. **Photosynthetica**, 27 (1-2): 45-55.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J., 2003. **Brock Biology of Microorganisms**, 10. baskı. Pearson Education, New Jersey.
- Majik, M. S., Rodrigues, C., Mascarenhas, S. and D'Souza, L., 2014. Design and synthesis of marine natural product- based 1H-indole- 2,3- dione scaffold as a new antifouling/ antibacterial agent against fouling bacteria. **Bioorganic Chemistry**, 54: 89- 95.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. and Lee, Y. C., 2004. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, 339: 69-72.
- Mersin Büyükşehir Belediyesi, 2016. Mersin Körfezi oşinografik/kirlilik izleme raporu.
- Olsen, S.M., Kristensen, J.B., Laursen, B.S., Pedersen, L.T, Dam-Johansen, K. and Kiil, S., 2010. Antifouling effect of hydrogen peroxide release from enzymatic marine coating: exposure testing under equatorial and Mediterranean conditions. **Progress in Organic Coatings**, 68:248-257.
- Ommen, P., Zobek, N. and Meyer, R.L., 2017. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **Journal of Microbiological Methods**, 141: 87-89.
- Omuzbüken, B., 2016. Denizel biyofilm bakterilerinin biyositlere ve ağır metallere karşı toleranslarının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, **Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, İzmir.
- Özyılmaz, A.T., 2004. Elektrokimyasal olarak oluşturulacak polianilin (PANI) kaplamanın demirli malzemelerin korozyon davranışları üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi, **Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi**, Adana.
- Özyılmaz, A.T., Erbil, M. and Yazıcı, B., 2006. The corrosion behaviours of polyaniline coated stainless steel in acidic solutions. **Thin Solid Films**, 496: 431-437.
- Özyılmaz, G., 2005. Glukoz oksidaz ve katalazın ayrı ayrı ve birlikte immobilizasyonu ve karakterizasyonu, Doktora Tezi, **Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi**, Adana.
- Pasmore, M. and Costerton, J. W., 2003. Biofilms, bacterial signaling and their ties to marine biology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 30: 407-413.
- Price, C. T. D., Lee I. R. and Gustafson, J. E., 2000. The effects of salicylate on bacteria. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 32 (10): 1029-1043.
- Quan, X., Wang, J., Souleyman, T., Cai, W. and Zhao, S., 2018. Antibakterial and antifouling performance of bisphenol- A/ poly (ethylene glycol) binary epoxy coatings containing bromine- benzyl- disubstituted polyaniline. **Progress in Organic Coatings**, 124: 61-70.
- Railkin, A. I., 2004. **Marine biofouling colonization processes and defenses**. CRC Pres Inc, New York.

- Rajakumara, E., Acharya, P., Ahmad, S., Sankaranaryanan, R. and Rao, N.M., 2008. Structural basis for the remarkable stability of *Bacillus subtilis* lipase (Lip A) at low pH. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1784: 302- 311.
- Rane, R. A., Karpoomath, R., Naphade, S. S., Bangalore, P., Shaikh, M. and Hampannavar, G., 2015. Novel synthetic organic compounds inspired from antifeedant marine alkaloids as potent bacterial biofilm inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, 61: 66-73.
- Rostam, A. B., Peyravi, M., Ghorbani, M. and Jahanshahi, M., 2018. Antibacterial surface modified of novel nanocomposite sulfonated polyethersulfone/ polyrhodanine membrane. **Applied Surface Science**, 427 (A): 17-28.
- Sankar, G. G., Santhya, S., Murthy, P. S., Das, A., Pandiyan, R., Venugopalan, V. P. and Doble, M., 2015. Polydimethyl siloxane nanocomposites: their antifouling efficacy in vitro and in marine conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 104: 307- 314.
- Sha, J., Yu, J., Chen, R., Liu, Q., Liu, J., Zhu, J., Liu, P., Li, R. and Wang, J., 2022. Eco-friendly self-polishing antifouling coating via eugenol ester hydrolysis. **Progress in Organic Coatings**, 172 (1):107077
- Shultz, M.P., 2007. Effect of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. **Biofouling**, 23: 331-341.
- Soares, M.M.C.N., Silva, R. and Gomes, E., 1999. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. **Revista de Microbiologia**, 30:299-303.
- Taş, A.S., 2007. Çeşitli koşullarda iletken polipirrol kaplanan çeliklerin korozyon özelliklerinin elektrokimyasal polarizasyon ve iletkenlik ölçümleri ile belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi, FBE**. Ankara.
- Tesfaye, A., Goel, C., Shakir, C., Sabu, K.R., Idhayadhulla A., Manilal, A., Woldemariam, M., Vijayan N. and Shah, S., 2022. Antibiofilm potential of alpha-amylase from a marine bacterium *Pantoea agglomerans*. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, 2022
- Tetz, V. V. and Tetz, G. V., 2009. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. *DNA and Cell Biology*, 29 (8): 399-405.
- Tiwari, S.P., Srivastava, R., Singh, C.S., Shukla, K., Singh, R.K., Singh, P., Singh, R., Singh N.L., Sharma, R., 2015. Amylases: an overview with special reference to alpha amylase. **Journal of Global Biosciences**, 4(Special Issue 1): 1886-1901.
- United Nations Review of maritime transport, 2019.
- Vorkapic, D., Pressler, K. and Schild, S., 2016. Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. **Current Genetics**, 62: 71-79.
- Wang, X. H., Li, J., Zhang J. Y., Sun, Z. C., Yu, L., Jing, X. B., 1999. Polyaniline as marine antifouling and corrosion-prevention agent. **Synthetic Metals**, 102 (1-2): 1377-1380.
- Waware, U.S., Arukula, R., Hamouda, A.M.S. and Kasak, P., 2020. Electrochemical and X-ray photo electron spectroscopic investigations of conductive polymers. **Ionics**, 26(2):831-838.
- Wieser, A., Schneider, L. and Jung, J., 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics- identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied Microbiology and Biotechnology**, 93: 965-974.

- Wu, C., Schwibbert, K., Achazi, K., Landsberger, P., Gorbushina, A. and Haag, R., 2016. Active antibacterial and antifouling surface coating via a facile one-step enzymatic cross-linking. **Biomacromolecules**, 18 (1): 210-216.
- Yao, C., Xu, Shizhen., Jiang, X., Chen, J. and Yuan, X., 2020. A simple way to achieve self-cleaning surfaces with unique antifouling property. **Journal of Chemistry**, 2020: 1-13.
- Yasmin, J.N., 2015. Çinko kaplanmış karbon çeliğinin korozyon direncinin iki farklı ortamda sentezlenen polipirol ve poli (N-metilpirol) ile geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, **Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Hatay.
- Yang, W., 2011. Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. **Quarterly Reviews of Biophysics**, 1:1-93.
- Yebra, D.M., Kill, S. and Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology, past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, 50: 75- 104.
- Yebra, D.M., Kill, S., Weinbell, C. E. and Dam-Johansen, K., 2006. Presence and effects of marine microbial biofilms on biocide-based antifouling paints. **Biofouling**, 22(1): 33-41.
- Yener, F., 2007. Pektinaz enziminin farklı iki destek üzerine immobilizasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, **Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana
- Zanaroli, G., Negroni, A., Calisti, C., Ruzzi, M. and Fava, F., 2011. Selection of commercial hydrolytic enzymes with potential antifouling activity in marine environments. **Enzyme and Microbial Technology**, 49: 574- 579.
- Zannoni, A., Spinaci, M., Bernardini, C., Bacci, M.L., Seren, E., Mattioli, M. and Forni, M., 2006. DNase I activity in pig MII oocytes: implications in transgenesis. **Reproduction**, 131 (3): 461-468.

## EKLER

### Ek 1.

#### Result Overview

| Analyte Name                  | Analyte ID | Organism (best match)                | Score Value |
|-------------------------------|------------|--------------------------------------|-------------|
| <a href="#">B6</a><br>(-)(C)  | D1         | not reliable identification          | 1.355       |
| <a href="#">B7</a><br>(-)(C)  | D2         | not reliable identification          | 1.248       |
| <a href="#">B8</a><br>(-)(C)  | D3         | not reliable identification          | 1.355       |
| <a href="#">B9</a><br>(+)(A)  | D5         | <a href="#">Vibrio harveyi</a>       | 2.152       |
| <a href="#">B10</a><br>(+)(A) | D6         | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a> | 2.21        |
| <a href="#">B11</a><br>(-)(C) | D7         | not reliable identification          | 1.372       |
| <a href="#">B12</a><br>(-)(C) | D8         | not reliable identification          | 1.391       |
| <a href="#">C1</a><br>(-)(C)  | D9         | not reliable identification          | 1.271       |
| <a href="#">C2</a><br>(-)(C)  | D10        | not reliable identification          | 1.485       |
| <a href="#">C3</a><br>(+)(A)  | D11        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a> | 2.028       |
| <a href="#">C4</a><br>(-)(C)  | D13        | not reliable identification          | 1.362       |
| <a href="#">C5</a><br>(-)(C)  | D15        | not reliable identification          | 1.315       |
| <a href="#">C6</a><br>(-)(C)  | 1-1        | not reliable identification          | 1.245       |
| <a href="#">C7</a><br>(-)(C)  | 1-2        | not reliable identification          | 1.279       |
| <a href="#">C8</a><br>(-)(C)  | 1-4        | not reliable identification          | 1.263       |
| <a href="#">C9</a><br>(-)(C)  | 1-5        | not reliable identification          | 1.498       |
| <a href="#">C10</a><br>(+)(A) | 1-6        | <a href="#">Vibrio harveyi</a>       | 2.202       |
| <a href="#">C11</a><br>(-)(C) | 1-7        | not reliable identification          | 1.259       |
| <a href="#">C12</a><br>(+)(A) | 1-8        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a> | 2.257       |
| <a href="#">D1</a><br>(-)(C)  | 1-9        | not reliable identification          | 1.348       |
| <a href="#">D2</a><br>(-)(C)  | 2-1        | not reliable identification          | 1.372       |
| <a href="#">D3</a><br>(+)(A)  | 2-2        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a> | 2.131       |
| <a href="#">D4</a><br>(-)(C)  | 2-3        | not reliable identification          | 1.266       |
| <a href="#">D5</a><br>(-)(C)  | 2-4        | not reliable identification          | 1.277       |
| <a href="#">D6</a><br>(-)(C)  | 2-5        | not reliable identification          | 1.295       |
| <a href="#">D7</a><br>(-)(C)  | 2-7        | not reliable identification          | 1.24        |
| <a href="#">D8</a><br>(-)(C)  | 2-8        | not reliable identification          | 1.332       |
| <a href="#">D9</a><br>(-)(C)  | 3-1        | not reliable identification          | 1.675       |

Şekil 0.1. MALDI-TOF MS mikrobiyolojik tanımlara sonucu

# Result Overview

| Analyte Name                    | Analyte ID | Organism (best match)                   | Score Value |
|---------------------------------|------------|-----------------------------------------|-------------|
| <a href="#">D10</a><br>(++) (A) | 3-2        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a>    | 2.114       |
| <a href="#">D11</a><br>(-) (C)  | 3-3        | not reliable identification             | 1.583       |
| <a href="#">D12</a><br>(-) (C)  | 3-4        | not reliable identification             | 1.284       |
| <a href="#">E1</a><br>(++) (A)  | 4-1        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a>    | 2.172       |
| <a href="#">E2</a><br>(++) (A)  | 4-2        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a>    | 2.368       |
| <a href="#">E3</a><br>(-) (C)   | 4-3        | not reliable identification             | 1.286       |
| <a href="#">E4</a><br>(-) (C)   | 4-6        | not reliable identification             | 1.266       |
| <a href="#">E5</a><br>(++) (A)  | 5-1        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a>    | 2.071       |
| <a href="#">E6</a><br>(-) (C)   | 5-2        | not reliable identification             | 1.371       |
| <a href="#">E7</a><br>(-) (C)   | 5-3        | not reliable identification             | 1.524       |
| <a href="#">E8</a><br>(++) (A)  | 5-4        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a>    | 2.141       |
| <a href="#">E9</a><br>(+) (B)   | 5-5        | <i>Vibrio nereis</i>                    | 1.722       |
| <a href="#">E10</a><br>(++) (A) | 6-1        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a>    | 2.07        |
| <a href="#">E11</a><br>(++) (A) | 6-2        | <a href="#">Vibrio harveyi</a>          | 2.089       |
| <a href="#">E12</a><br>(-) (C)  | 6-3        | not reliable identification             | 1.466       |
| <a href="#">F1</a><br>(-) (C)   | 6-4        | not reliable identification             | 1.402       |
| <a href="#">F2</a><br>(-) (C)   | 6-5        | not reliable identification             | 1.218       |
| <a href="#">F3</a><br>(++) (A)  | 6-6        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a>    | 2.213       |
| <a href="#">F4</a><br>(-) (C)   | 7-1        | not reliable identification             | 1.192       |
| <a href="#">F5</a><br>(++) (A)  | 7-2        | <a href="#">Vibrio alginolyticus</a>    | 2.281       |
| <a href="#">F6</a><br>(+) (B)   | 7-3        | <a href="#">Vibrio parahaemolyticus</a> | 1.781       |
| <a href="#">F7</a><br>(-) (C)   | 7-5        | not reliable identification             | 1.381       |
| <a href="#">F8</a><br>(-) (C)   | 7-6        | not reliable identification             | 1.313       |

Şekil 0.1.(Devam) MALDI-TOF MS mikrobiyolojik tanımlara sonucu