

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI ORANLARLA HAZIRLANAN
GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AGNP) VE
POLİVİNİLKLOİR (PVC)KOMPOZİTLERİN
ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

NESLİHAN ZORBA ARAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017

**FARKLI ORANLARLA HAZIRLANAN
GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLL (AGNP) VE
POLİVİNİLKLOİR (PVC)KOMPOZİTLERİN
ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

**COMPARİSON OF ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM
PROPERTIES OF SILVER NANOPARTICLE (AGNP) AND
POLYVINYLCHLORIDE (PVC) COMPOSITES PREPARED
WITH DIFFERENT RATIOS**

NESLİHAN ZORBA ARAS

Başkent Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim ve Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOMEDİKAL Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2017

“FARKLI ORANLARLA HAZIRLANANGÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AGNP) VE POLİVİNİLKLOİR (PVC) KOMPOZİTLERİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI”başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından, 25/01/2017 tarihinde **BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Doç. Dr. Lokman UZUN

Üye (Danışman)

Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK

Üye

Doç. Dr. Ebru EVREN

ONAY

/ 02 / 2017

Prof. Dr. Emin AKATA
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 07 / 02 / 2017

Öğrencinin Adı, Soyadı : Neslihan ZORBA ARAS
Öğrencinin Numarası : 21210089
Anabilim Dalı : Biyomedikal Mühendisliği
Programı : Tezli Yüksek Lisans
Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK
Tez Başlığı : Farklı Oranlarla Hazırlanan Gümüş Nanopartikül (AgNp) ve Polivinilklorür (PVC) Kompozitlerin Antibakteriyel ve Antibiyofilm Özelliklerinin Karşılaştırılması.

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 46 sayfalık kısmına ilişkin, 07 / 02 / 2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 12'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

Onay

07 / 02 / 2017

Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK'a

Çalışmaya başladığımız günden itibaren bana yol gösteren, deneyimlerini benimle paylaşan, hem bilimsel hem de manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ' ye

Tezin laboratuvar çalışmalarında çalışma ortamını benimle paylaşan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, yardımını esirgemeyen Gülşah ÇALIK KOÇ' a

Yardıma ihtiyacım olduğu her anda desteğini benden esirgemeyen Sevgili EŞİME

Ve,

Bu noktalara gelmemde en büyük pay sahibi olan, yaşamımın her döneminde hiç bir zaman desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan değerli AİLEME.

En içten duygularımla Teşekkür Ederim.

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA14/28) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

ÖZ

FARKLI ORANLARLA HAZIRLANAN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AGNP) VE POLİVİNİLKLORÜR(PVC) KOMPOZİTLERİNİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Neslihan ZORBA ARAS

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Girişimsel işlemlerde kullanılacak biyomalzemelerin ya da implantların doğal doku ile fiziksel ve biyolojik açıdan uyumlu olması ve vücutta immün cevap uyandırmaması gerekmektedir. Metalik nanopartiküller çoklu toksik etki ile antibakteriyel etki gösterebilmektedir. Antibakteriyel özellikleri en fazla bildirilen metalik nanopartikül gümüş nanopartiküllerdir. Gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel etkileri hücre tipi ve Gram boyanma özellikleri ile değişiklik gösterebilmektedir. PVC, işleme kolaylığı, farklı maddelerle uyumluluk ve çok yönlülük açısından farklı endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılır. Tıbbi ve biyomedikal alanda, birçok biyomalzemeyi üretmede yaygın şekilde kullanılır. Antibakteriyel PVC biyomalzemelerinin üretilmesi sağlık uygulamaları için önemlidir. Bu çalışma ilede belirli ağırlık oranları ile elde edilecek gümüş nanopartikül (AgNp) ve polivinil klorür (PVC) kompozitlerinin, vücut sistemlerinde (solunum, sindirim gibi) kullanılan PVC biyomalzemelerde ve tıbbi cihazlarda kontaminasyona neden olabilecek ve hastane enfeksiyonları için önemli enfeksiyöz suşlara karşı antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Nanoteknoloji alanında yapılması planlanan ileriki çalışmalar için zemin oluşturacağı kanaatindeyiz.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: polivinil klörür, gümüş nanopartikül, antibakteriyel özellik, antibiyofilm, disk difüzyonu, polimer gümüş nanopartikül kompozitleri

Danışman: Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK, Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü.

Eş Danışman: Doç. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ, Başkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü.

ABSTARCT

COMPARISON OF ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM PROPERTIES OF SILVER NANOPARTICLE (AGNP) AND POLYVINYLCHLORIDE (PVC) COMPOSITES PREPARED WITH DIFFERENT RATIOS

Neslihan ZORBA ARAS

Başkent University Institute of Science

Department of Biomedical Engineering

Biomaterials or implants to be used in interventional procedures must be physically and biologically compatible with the natural tissue and should not induce an immunological response in the body. Metallic nanoparticles can exhibit antibacterial effects with multiple toxic effects. The most reported antibacterial properties are metallic nanoparticles of silver nanoparticles. The antibacterial effect of silver nanoparticles cell type may vary with the type and Gram pozitive/ negative properties. PVC is widely used in different industrial applications in terms of ease of processing, compatibility with different materials and versatility. In medical and biomedical fields, PVC widely used in many biomaterials. The production of antibacterial PVC biomaterials is undoubtedly important for health applications. This study also compared the antibacterial and antibiotic activity of silver nanoparticles (AgNP) and polyvinyl chloride (PVC) composites with certain weight ratios against infectious strains important for may cause contamination in PVC biomaterials used in body systems (respiratory, digestive, etc.) and medical devices and hospital infections. We believe that nanotechnology will provide the basis for further studies planned to be done

KEYWORDS: polyvinyl chloride, silver nanoparticle, antibacterial character, antibiofilm, disc diffusion, polymer silver nanoparticle composites

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK, Başkent University, Department of Biomedical Engineering.

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ, Başkent University, Department of Molecular Biology and Genetics.

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	I
ABSTARCT	II
İÇİNDEKİLER LİSTESİ	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
ŞEKİLLER LİSTESİ (Devam Ediyor)	VI
ÇİZELGELER LİSTESİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1 Çalışmanın Amacı	2
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Nanoteknolojinin Tanımı ve Tarihçesi.....	4
2.1.1 Nanoteknolojinin Sağlık alanında kullanımı.....	6
2.2 Nanopartiküller	7
2.2.1 Metalik Nanopartiküller	7
2.2.1 Gümüş Nanopartiküller	8
2.3 Polimerler ve kompozitler	8
2.4 Biyomalzemeler ve Biyolojik aktivite	11
2.5 Biyofilm Tanımı ve Yapısı	14
2.5.1 Biyofilm Oluşum Basamakları	15
2.5.1.1 Dönüşümlü tutunma	16
2.5.1.2 Dönüşümsüz tutunma	16
2.5.1.3 Koloni gelişimi	17
2.5.1.4 Olgun biyofilm gelişimi	17
2.5.1.5 Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması	17
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1 Materyal ve Kimyasallar	18
3.2 Kullanılan Cihazlar.....	18
3.3 Kontrol ve Kompozit materyallerin Hazırlanması	18
3.3.1 Kontrol PVC filmi.....	19
3.3.2 %1, %2, %5 (wt/wt) AgNp- PVC Kompozitlerin hazırlanması:	19
3.4 Besiyerlerin hazırlanması	21

3.4.1	Tryptic Soy sıvı besiyeri (TSB).....	21
3.4.2	Mueller Hinton sıvı besiyeri (MHB).....	22
3.4.3	Mueller Hinton katı besiyeri (MHA)	22
3.5	Bakteri Kùltürlerinin Hazırlanması	23
3.6	Disk Difüzyon Metodu.....	24
3.7	Yüzeyde Bakteri Çoğalmalarının Karşılaştırılması.....	25
3.8	Biyofilm Oluşumunun Engellenmesi	29
3.9	İstatiksel analiz	32
4.	SONUÇLAR.....	33
4.1	Agar Disk Difüzyon Metodu	33
4.2	Yüzeyde Bakteri Çoğalmalarının Karşılaştırılması.....	37
4.3	Biyofilm Oluşumunun Engellenmesi	41
5.	TARTIŞMA	43
6.	KAYNAKLAR	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	Nanoteknolojinin İçerdiği Bilim Dalları.....4
Şekil 0.2	Taramalı Tünelleme Mikroskobu ile Oluşturulan IBM logosu.....5
Şekil 2.3	Biyofilm Oluşum Basamakları.....16
Şekil 0.1	Gümüş Nanopartikül ve PVC Granülleri.....18
Şekil 3.2	Hazırlanan PVC Kontrolü.....19
Şekil 3.3	Hazırlanan %1, %2, %5 (wt/ wt) AgNp-PVC Kompozitleri.....20
Şekil 3.4	Hazırlanan Kompozitlerin disk haline getirilmesi.....21
Şekil 3.5	Disklerin UV ışık altında sterilizasyonu.....21
Şekil 3.6	Mueller Hinton Katı Besiyerini (MHB) hazırlama.....23
Şekil 3.7	Disk difüzyona hazırlanan besiyerleri.....24
Şekil 3.8	0.5 McFarland standardına göre ayarlanan bakteri kültürleri.....25
Şekil 3.9	Bakteri çoğalmalarının karşılaştırılması için 96 kuyucuklu plaka ekim deseni.....25
Şekil 3.10	10 µl hacimde bakteri ekimi yapılan diskler.....26
Şekil 3.11	%1' lik Tween 80' de yıkanan diskler.....27
Şekil 3.12	%1' lik Tween 80' de yıkanan diskler ve inkübasyon için hazırlanan MHB.....27
Şekil 3.13	6 saat inkübasyon sonunda bakteri MHB içerisindeki kültürler.....27
Şekil 3.14	24 saatlik inkübasyona bırakılan 96 kuyucuklu plaka deseni.....28
Şekil 3.15	24 saat inkübasyon sonrasında MHB içerisindeki kültürler.....28
Şekil 3.16	Biyofilm oluşumu için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka deseni.....29
Şekil 3.17	İnkübasyon sonunda biyofilm oluşumu gerçekleşen düz tabanlı 96 kuyucuklu plaka.....30
Şekil 3.18	a. Bakteri fiksasyonu gerçekleşen kompozit diskler

ŞEKİLLER LİSTESİ (Devam Ediyor)

	b. Disklerin kristal viyole (%0.05) ile boyanması	
	c, d. Hücre kontrolünün ve disklerin üzerindeki boyanın etanolde çözünmesi.....	31
Şekil 4. 1	<i>P. aeorginosa</i> inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu.....	33
Şekil 4. 2	<i>K.pneumoniae</i> inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu.....	33
Şekil 4. 3	<i>E. coli</i> inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu.....	34
Şekil 4. 4	<i>E. faecalis</i> inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu.....	34
Şekil 4. 5	<i>S. aureus</i> inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu.....	35
Şekil 4.6	<i>L. monocytogenes</i> inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu.....	35
Şekil 4. 7	<i>S. pyogenes</i> inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu.....	36

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge	3.1 Test Mikroorganizmaları, Suşları ve Gram boyanma özellikleri.....	23
Çizelge	4. 1 Diskler üzerinde kolonize olan gram (-) bakterilerin 6 saatlik büyümlerin karşılaştırılması.....	37
Çizelge	4.2 Diskler üzerinde kolonize olan gram (-) bakterilerin 24 saatlik büyümlerin karşılaştırılması.....	38
Çizelge	4.3 Diskler üzerinde kolonize olan gram (+) bakterilerin 6 saatlik büyümlerin karşılaştırılması.....	39
Çizelge	4.4 Diskler üzerinde kolonize olan gram (+) bakterilerin 24 saatlik büyümlerin karşılaştırılması.....	40
Çizelge	4.5 Gram (-) bakterilerinin biyofilm sonuçları.....	41
Çizelge	4.6 Gram (+) bakterilerinin biyofilm sonuçları.....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AgNp	Gümüş nanopartikül
PVC	Polivinilklorür
THF	Tetrahidrofuran
EPS	Ekzopolimer
CuNp	Bakır nanopartikül
PE	Polietilen
PS	Polisülfon
PES	Polietersülfon
CA	Selüloz asetat
TSB	Triptik Soy sıvı besiyeri (Tryptic soy broth)
MHB	Müller Hinton sıvı besiyeri (Müeller Hinton broth)
MHA	Müller Hinton katı besiyeri (Müeller Hinton agar)
wt	Ağırlık (Weight)
CC	Hücre kontrolü (Cell Control)
C	Karbon
H	Hidrojen
DNA	Deoksiribonükleik asit
SD	Standart Sapma
SEM	Standart Hata
ANOVA	Varyans Analizi
PBS	Phosphate-buffered saline
Np	Nanopartikül
dk	Dakika
SZ	Silverzeolite

1. GİRİŞ

Antibakteriyel özellikler ve biyouyumluluk biyomalzemeler için önemlidir. Özellikle girişimsel işlemlerde kullanılacak biyomalzemelerin ya da implantların doğal doku ile fiziksel ve biyolojik açıdan uyumlu olması ve vücutta immün cevap uyandırmaması gerekmektedir. Biyobozunur polimerler yüksek biyouyumluluklarından dolayı biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılır. Ek olarak dokular ile temas içerisinde olan biyomalzemelerin bakteri tutulumu ve kolonizasyonu açısından uygun olmayan yüzeysel temas noktaları içermesi tercih edilmektedir. Bunun yanı sıra bu yüzeylerin antibakteriyel aktiviteye sahip yüzeyler olması ya da antibakteriyel yüzey modifikasyonları son yıllarda önem kazanmıştır. Biyobozunur polimerler kaynağına göre doğal ya da sentetik olarak ikiye ayrılır. Sentetik biyobozunur polimerler kimyasal olarak kolay modifiye edilerek farklı özellikler ile işlevselleştirilebilir [15]. Sentetik polimerler mekanik özellikleri, yenilenebilirliği, biyodegradasyon ve nispeten düşük maliyetli olması nedeniyle tercih edilmektedir [16].

Çeşitli biyoteknolojik ve tıbbi uygulamalarda metalik nanopartiküllerin (Np) kullanımı günümüzde pek çok araştırmaya konu olmaktadır. Farklı sentetik polimerler ile geliştirilen metalik nanokompozitler farklı biyolojik özelliklerinin yanı sıra tasarım esnekliği ve düşük maliyet açısından avantaj sağlamaktadır. Polimer nanokompozitler, polimer matrisi içinde dağılmış nanopartiküller, polimer ile kaplanmış metalik nanopartiküller ya da polimer yüzeyler üzerine metalik nanopartikül entegrasyonları olarak oluşturulabilmektedir [17]. Polimer metal nanokompozitlerinin farklı biyolojik özelliklerine bağlı olarak çok farklı kullanım alanları olmakla birlikte antibakteriyel aktivite özellikleri ve bakteriyel yüzey tutulumunun azaltılması önemli araştırma alanlarındandır.

Metalik nanopartiküller çoklu toksik etki ile antibakteriyel etki gösterebilmektedir. Antibakteriyel özellikleri en çok rapor edilen metalik nanopartikül gümüş nanopartiküllerdir (AgNp). Antik çağdan bu yana gümüş (Ag) tuzlarının antibakteriyel etkileri fark edilmiştir. Ag ve kompozitleri ortodonti, kataterler ve yanık yaraları dâhil olmak üzere çeşitli uygulamalarda bakteri çoğalmasını kontrol

etmek için kullanılmaktadır. Malzemelerin parçacık boyutunun düşürülmesi, etkinliklerinin geliştirilerek biyouyumluluklarının artırılması için etkin ve güvenilir bir araçtır [18].

Gümüş nanopartikülün neden olduğu antibakteriyel etki için performansı için boyut, şekil, yüzey özelliği ve birikme derecesi gibi parametreler kontrol altında tutulmalıdır. Bu nedenle, polimer AgNp kompozitleri sentezlenmektedir. Polimerik malzemeler şekilsel yapısı ile gümüş nanopartiküllere esneklik kazandırırken aynı zamanda çeşitli yöntemlerle hareketsizleştirilebilir. Polimer bileşenleri nanopartiküllerin yüzeyde veya bir çözelti içinde birikmesini önlerken, gümüş iyonu salınımını da kontrol edebilmektedir.

Erimiş polimerlere gümüşün katılması, antibakteriyel polimer kompozitler elde etmek için kullanılan geleneksel yaklaşımlardandır. Aktif metallerin polimer matrikslerine dahil edilmesi antibakteriyel özelliklere sahip polimerlerin geliştirilmesinde etkili bir metodu temsil etmektedir. PVC, işleme kolaylığı, farklı maddelerle uyumluluk ve çok yönlülük açısından farklı endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılır. PVC malzemeler biyomedikal alanda geniş bir yer kaplar. Tıbbi ve biyomedikal alanda, steril tek kullanımlık biyomalzemeler, tıbbi cihazlar, parenteral beslenme torbaları, enteral beslenme tüpleri, solunum tüpleri gibi birçok biyomalzemeyi üretmede yaygın şekilde kullanılır [62]. Yapılan çalışmalarda PVC yüzeyinde bakteri kolonizasyonunu artırıcı bir etkisi olduğu bildirilmiştir [63].

Biyofilmler hücre dışı matriks içinde sıvı bir yüzeye tutunan mikroorganizma topluluğundan oluşmaktadır. Polisakkarit, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) ve sudan oluşan hücre dışı matriks biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar. Matriksin en önemli fonksiyonlarından birisi UV radyasyon, farklı pH koşulları, ozmotik basınç, su kaybı, antibiyotik gibi birçok faktöre karşı bakteriyi korumaktır. Bakterinin yüzeye ya da dokuya yerleşmesi, tutunması ve kolonizasyonu için biyofilm oluşumu önemlidir. Bu nedenle, yüzeylerin ya da serbest parçacıkların antibiyofilm etkileri biyomateryeller açısından önemli parametrelerdendir.

1.1 Çalışmanın Amacı

Son yıllarda antibakteriyel özelliklere sahip biyomalzemelerin araştırılması ve geliştirilmesi hem akademi hem de endüstriyel alanda gelişim göstermektedir.

PVC biyomalzemeler biyomedikal alanda geniş bir yer kaplar. Yapılan çalışmalarda PVC yüzeyinde bakteri kolonizasyonu artırıcı bir etkisi olduğu bildirilmiştir. PVC'lerin tıbbi kullanımı ile ilgili bilimsel literatürde az sayıda bilgi mevcuttur. Bundan kaynaklı antibakteriyel PVC biyomalzemelerinin üretilmesinin tıbbi uygulamalar için önemli bir yeri olması düşünülmekte ve antibakteriyel ajanlar içeren PVC kompozitlerinkonu olduğu çalışmalar her geçen gün artmaktadır.

Gümüş nanopartiküllerin antik çağdan bu yana antibakteriyel etkileri fark edilmiş ve kataterler, yanık yaraları gibi tıbbi alanda birçok uygulamada ve çalışmada bakteri büyümesini kontrol etmek için kullanılmıştır.

Bu bağlamda, çalışmamızda, belirli ve farklı ağırlık oranları ile hazırlanan AgNp PVC kompozitlerinin, biyomedikal alanda vücut sistemlerinde (solunum, sindirim gibi) kullanılan PVC biyomalzemelerde ve tıbbi cihazlarda kontaminasyona neden olabilecek ve hastane enfeksiyonları için önemli enfeksiyöz suşlara karşı antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır.

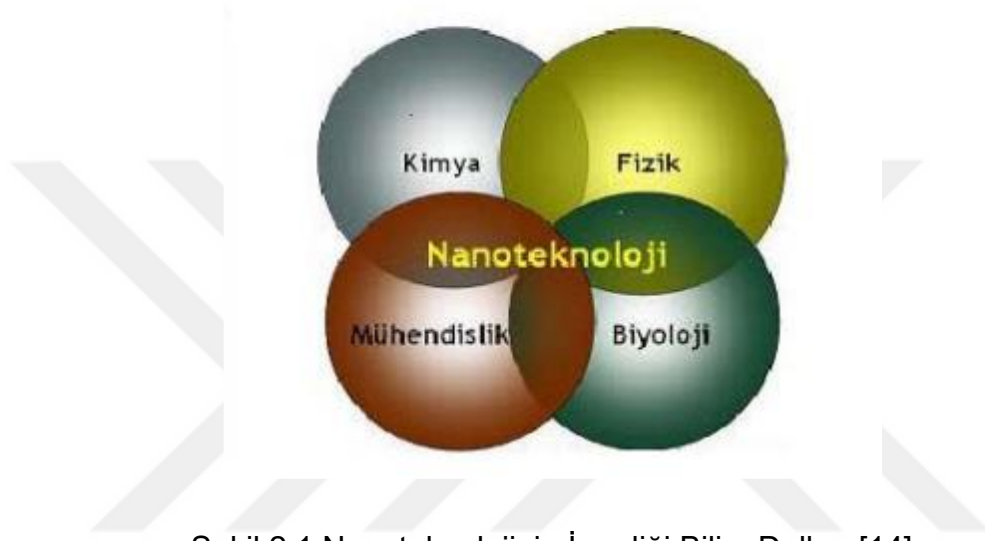
Tez çalışması 2 ana bölümden oluşmaktadır; Materyallerin hazırlanması ve antibakteriyel, antibiyofilm aktivitelerinin karşılaştırılması.

- i. Materyal hazırlanması
 - a. Kontrol ve kompozit materyallerinin hazırlanması
 - b. Besiyerlerinin hazırlanması
 - c. Bakteri Kültürlerinin hazırlanması ve ekilmesi
- ii. Antibakteriyel ve Antibiyofilm aktivitelerin karşılaştırılması
 - a. Disk difüzyon metodu
 - b. Yüzeyde bakteri çoğalmalarının belirlenmesi
 - c. Biyofilm oluşumunun belirlenmesi
 - d. İstatistiksel analiz

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoteknolojinin Tanımı ve Tarihçesi

Nanoteknoloji, maddenin atomik-moleküler boyutta mühendisliğin yapılarak yepyeni özelliklerinin ortaya çıkarılması; nanometre ölçeğindeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrolü ve üretimi amacıyla, fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesidir [1].



Şekil 2.1 Nanoteknolojinin İçerdiği Bilim Dalları [14]

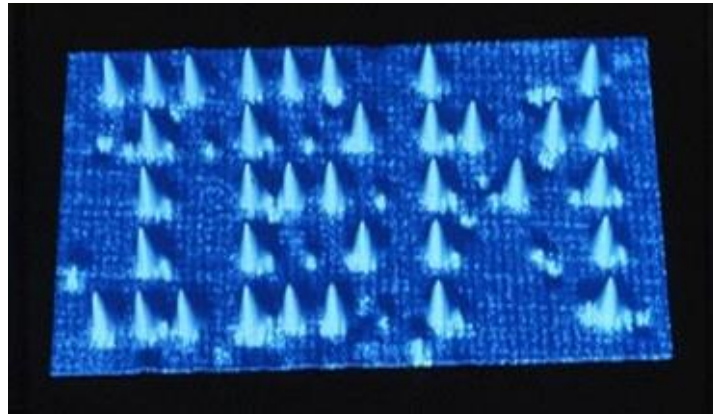
Nanoteknoloji tanımı “Ulusal Nanoteknoloji Adımı (NNI)” tarafından şu şekilde tanımlanmıştır: Nanoteknoloji, 0,1–100 nanometre aralığındaki boyutlarda maddenin incelenmesi ve işlenmesidir. Nano-boyut bilimi, mühendisliği ve teknolojiyi kapsayan nanoteknoloji, maddenin bu boyut ölçeğinde görüntüleme tekniğini, ölçümünü ve modellemesini içermektedir. Nano-boyut bilimi malzemelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, atomların ve moleküllerin ya da kütsel haldeki malzemenin özelliklerinden temel alarak geliştirilmektedir. Nanoteknoloji alanında araştırma geliştirme (AR-GE), bu yeni özelliklere sahip olan gelişmiş malzemeler, aygıtlar ve sistemlerin anlaşılması ve üretilmesine yönelmiştir [2]. Nanoteknoloji, atomik ve moleküler düzeyde düzenlemeye imkân vermekte ve farklı üretim yolları geliştirilebilmesine olanak sağlamaktadır [3].

Nano malzemelerin üretim yollarını genel olarak iki başlık altında toplamak mümkündür.

a. Yukarıdan Aşağıya Yaklaşımı (Top down): En küçük yapıları dahi nanometrik boyutlara getirmeyi sağlar ve var olan makro düzeydeki yapıdan, çok farklı özelliklere sahip nano yapılar geliştirilir.

b. Aşağıdan Yukarı Yaklaşımı (Bottom up): Tek tek atomları, molekülleri ya da molekül kümelerinden yeni nano yapılar eldesini sağlar. Bu organizasyonel yönüyle moleküler biyolojiye benzemektedir [4].

Nanobilim kavramı ilk kez 1959 yılında Nobel Fizik Ödülü sahibi Richard Feynman tarafından bilim felsefesiyle ilgili bir sohbeti sırasında gündeme getirilmiştir. “Aşağıda yeterince boş yer var” başlıklı tarihsel konuşmasında “Vurgulamak istediğim şey, bir şeyleri küçük ölçekte manipüle etmek ve kontrol etmektir” demiştir. Nanoteknoloji terimi ise ilk kez 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından ‘On The Basic Concept of Nanotechnology’ (Nanoteknolojinin Esas Fikri) adlı bir makalede ortaya atılmıştır. Taniguchi’nin tanımlamasına göre nanoteknoloji, mevcut teknolojilerin küçültülmesine ve ileri düzeyde duyarlıklarına dayalı olarak hızla ortaya çıkan teknolojilerdir [5]. Drexler 1986 yılında “Moleküler İmalata Yönelik Protein Tasarımı” konulu makalesinde moleküler yapıdaki nanoteknolojinin olanaklarını tartışmaya açmıştır. Sonraki bir çalışmasında kendi kendini derleyebilen bir yapı kurgulamıştır. Bu yapı aşağıdan yukarı üretim yaklaşımının ilk örneğidir ve bu açıdan ayrı bir öneme sahiptir [6], [7]. 1981 yılında “Taramalı Tünelleme Mikroskobu” icat edilmiştir. Bu nanoteknolojide dönüm noktası olmuştur. 1989’da IBM’in bünyesinde yer alan bilim adamları taramalı tünelleme mikroskobunu kullanarak atomların bir metal yüzey üzerinde nasıl taşınacağı ve konumlandırılacağını keşfederek IBM’in logosunu oluşturmuşlardır (Şekil 2. 2) [8].



Şekil 2.2 Taramalı tünelleme mikroskobu ile oluşturulan IBM logosu

1986'da da "Atomik Kuvvet Mikroskobu" icat edilmiştir. 1991 yılında fullerenlerden silindirik karbon tüpler üretilmiştir. Bu tüpler, hem elektronik hem de malzeme mühendisliği alanlarında geniş uygulama alanı bulması açısından önemlidir [3]. 1997'de ilk kez DNA molekülünü kullanarak nanomekanik aygıt yapılmış ve aynı yıl içinde Rice Üniversitesinde Nanoteknoloji laboratuvarı kurulmuştur. W. De Grado 1998 yılında ekibiyle beraber suni protein yapmayı başarmıştır. 2005 yılında hareket ettirilebilen dört tekerlekli nano araba modeli yapılmıştır. Bu gelişme Feynman'ın fikrinin ne kadar ilerletilebileceğini kanıtlamıştır [9], [10].

2.1.1 Nanoteknolojinin Sağlık alanında kullanımı

Tıp ve sağlık bilimlerinde bir başka deyimle biyomedikal uygulamalarda nanoteknolojik yaklaşımlar, günümüze kadar çözüm bulunamamış pek çok hastalığın teşhis ve tedavisine önemli katkılar sağlamakta ve sağlamaya devam edeceği düşünülmektedir [3]. Nanoteknoloji, tıbbi görüntüleme, farmakoloji, mikrobiyoloji, dokuların yenilenmesi, bazı kronik hastalıkların tedavisi, aşı ve genetik alanında uygulamaya girmiştir. Nanoteknolojik ürünler; test ve tanı işlemlerinin hızla gerçekleştirilmesi, patojenlerin belirlenmesi ve enfeksiyon gelişimini önlemede olanak sağlamıştır. Nanoteknolojik ürünler yararlarının yanında; sistemik, genetik ve sitotoksik riskleri de beraberinde getirebilmektedir [1].

Nanoteknoloji, bilim ve mühendisliğin bir arada kullanılarak yeni ürünlerin keşfini tetikleyen bir bilim dalıdır. Nanoteknolojinin önemi, atomlar ve moleküller seviyesinde çalışarak, tamamen yeni özelliklere (fiziksel, kimyasal, biyolojik) sahip yapılar/ürünler üretilmesine olanak sağlamasıdır ve üretim maliyeti daha uygun olmasına karşın üretilen ürünlerin finansal açıdan getirisi ve yapılan yatırım oldukça yüksektir [11]. Nanoteknolojik ürünler daha sağlam, daha uzun ömürlü, daha kaliteli daha hafif ve üretim maliyeti daha ucuz olduğu için birçok alanda bu ürünleri geliştirme eğilimi mevcuttur.

Nanoteknolojideki gelişmelerin insan ve ekosistem içinde büyük yararları olduğu kadar önemli zararları olabileceği konusu da gündeme gelmiştir [12]. Nano ürünler boyutlarından ötürü benzersiz etkileşimlere neden olabilirler, molekül özellikleri

nedeniyle solunum sistemi, kan, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve cilt üzerindeki muhtemel toksik etkileri de arařtırmalara konu olmuştur [13].

2.2 Nanopartiküller

Nanopartiküller nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır [19]. Nanopartikül terimi, herhangi bir uzaysal boyutta 0,1 ile 100 nm arasında uzunluğa sahip ve oldukça geniş yüzey alanlarına sahip nanoparçacıkları tanımlamaktadır. Nanopartiküller karakteristik fiziksel, kimyasal, elektriksel, manyetik, termal, optik ve biyolojik özelliklere sahiptirler [20]. Nanopartiküller farklı özelliklerine göre basit olarak řu şekilde sınıflandırılabilir; 1. Karbon bazlı nanopartiküller 2. Metal bazlı nanopartiküller 3. Yarı iletken bazlı nanopartiküller [21]

Nanopartiküller bütün bu farklı özellikleri sayesinde hastalıkların tanısı ve tedavisi açısından ilgi odağı haline gelmiştirler [22]. Madde boyutlarının nano boyutlara gelmesiyle; yüzey alanlarının, yüzey enerjilerinin artması ve maddelerde olabilecek kusurlu yapıların azalması sağlanmaktadır [23].

Nanopartiküller insan hücrelerinden küçüktür ama enzim ve reseptör gibi biyolojik moleküllerle aynı büyüklükte dirler. Bu nedenle aynı boyda oldukları peptidler, antikorlar veya nükleik asitlerle konjuge edilerek problemler şeklinde kullanılarak patolojik bölgeler ile ilgili olan hücresel hareketleri ve moleküler değişiklikleri izleyebiliriz [24].

Nanopartiküllerin birçok bakteri türü için antibakteriyel özellik sergilediği bilinmekte. Antibiyotiklere karşı dirençli olan bakteri suşları üzerinde etkili olan nanopartiküller ile yapılan çalışmalar hızla devam etmektedir.

Metal nanopartiküllerin çeşitli biyoteknolojik ve tıbbi uygulamalardaki antibakteriyel etkileri günümüzde pek çok araştırmaya konu olmuştur.

2.2.1 Metalik Nanopartiküller

Metal nanopartiküllerin geniş yüzey alanları, düşük maliyetli olmaları ve moleküler açıdan kararlı olmaları metal nanopartiküllerin en önemli avantajlarıdır. Metal nanopartiküllerin toksik etki göstermemeleri, metal nanopartikül kullanımı için önemli bir tercih nedenidir [25]. Havada veya sıvı içerisinde bulunan oksijenin bir

kısmı metalik iyonun katalizörlüğü ile aktif oksijene dönüşür, böylece organik maddeyi antibakteriyel etki oluşturmak üzere eritir [61]. Örneğin, bir çalışmada *Escherichia coli* hücrelerinde NP uygulamasına bağlı olarak reaktif oksijen türlerinde artış, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA degradasyonu saptanmıştır [54].

2.2.1.1 Gümüş nanopartiküller

Gümüş nanopartiküller optik, elektrik, termal ve antibakteriyel özelliklere sahiptirler. Bu nedenle en yaygın olarak kullanılan nanomateryallerdendir.

Nano-gümüş, proteinlerle tepkimeye girer. Bakteriler ve mantarlarla temas halinde oldukları zaman bakteri ve mantarların hücresel beslenmesini ve büyümesini engeller [61].

AgNP'lerin negatif yüklü bakteri duvarına bağlanması ile lokal hücre duvarına bağlı sitotoksik sinyal tetiklenmekte beraberinde hücresel zar bütünlüğü bozulabilmektedir [38]. Gram negatif *E. coli* ile yapılan bir çalışmada aynı yüzey alanına sahip AgNP'lerin şekil bağımlı olarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir [44]. Benzer bir çalışmada, küresel ve hegzagonal AgNP'lerin bakteri yüzeyine adsorbe olması ve hücre yüzey depresyonu elektron mikroskobu ile gösterilmiştir [51], [52]. Kim ve arkadaşları (2006) AgNP'lerin maya, *E. coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. AgNP sentezlenmiş ve farklı konsantrasyonlarda antibakteriyel ve antifungal özellikleri incelenmiştir. Parçacıklar ile maya ve *E. coli* hücrelerine karşı etkili inhibisyon elde edilmiş; ancak *S. aureus*'un diğerlerine göre daha az etkilendiği saptanmıştır. AgNP'lerin antimikrobiyal etkileri hücre tipi ve Gram boyanma özellikleri ile değişiklik gösterebilmektedir [18].

2.3 Polimerler ve kompozitler

Polimerler, aynı veya farklı organik moleküllerin kimyasal bağlarla oluşturduğu hidrokarbonlardır. Karbon (C) ve hidrojen (H) atom yapısında uzun zincirli veya dallanmış bileşikler, yapılarında metal ve alkali metalleri de içerebilirler. Polimerler; kimyasal yapılarına, zincir yapılarına, sentez yöntemlerine, morfolojilerine ve ısıya/çözücülere gösterdikleri davranışlarına göre sınıflandırılabilir.

Polimerlerin biyomalzeme olarak ortaya çıkışı ise, II. Dünya Savaşında vücuduna uçağın tentesinde bulunan plastik (polimetilmetakrilat) saplanan bir pilotun bu parçalardan dolayı herhangi bir kronik reaksiyon yaşamamasıyla olmuştur. Bu olaydan sonra polimetilmetakrilat kornea tedavilerinde ve kafatası kemikleri hasarlarında yaygınca kullanılmaya başlanmıştır [59]. Sağlık alanında sıklıkla ve ilk olarak kullanılan polimerik biyomalzeme ameliyat iplikleridir. Yaklaşık 4000 sene önce ameliyat ipliği olarak keten kullanılmaktaydı. Naylon, polyester ve poliolefinler gibi sentetik fiberlerin 1950'lerde geliştirilmesiyle sentetik fiberler doğal fiberlerin yerini almaya başlamıştır. Polimerlerin sağlık alanında kullanımı zamanla daha çok önem kazanmıştır.

Biyobozunur polimerler yüksek biyouyumluluklarından dolayı biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılır. Biyobozunur polimerler kaynağına göre doğal ya da sentetik olarak ikiye ayrılır. Sentetik biyobozunur polimerler kimyasal olarak kolay modifiye edilerek farklı özellikler ile işlevleştirilebilirler. Sentetik polimerler mekanik özellikleri, yenilenebilirliği, biyodegradasyon ve nispeten düşük maliyetli olması nedeniyle tercih edilmektedir. Sentetik biyobozunur polimerler kontrollü şartlarda üretilir ve genel olarak biyolojik ortamlardaki davranışları önceden tahmin edilebilir [15], [16].

Biyobozunur polimer ile üretimi yapılan malzemenin;

- Vücutta toksik etki yaratmamalı,
- Kabul edilebilir bir kullanım süresine sahip olmalı,
- Uygulama alanı ile uyum sağlamalı,
- Uygungeçirgenlikte olmalı,
- Uygulama alanına göre istenilen şekli alabilmelidir.

Polimerlerin sahip olduğu özellikleri iyileştirmek veya polimerlere yeni özellikler katmak amacıyla çeşitli kompozitler oluşturulmaktadır. Kompozitler, iki veya daha fazla farklı maddenin karıştırılması veya belli bir düzende birleştirilmesi ile hazırlanır.

Biyomedikal çalışmalardaki yapılar biyouyumlu, biyobozunur ve hedef uygulama için uygun fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip olmalıdır. Bu bağlamda polimer ve nonapartiküllerin sahip oldukları fonksiyonel özelliklerin birleşimiyle; hafif,

biyoyumlu, maliyeti düşük vb. özelliklere sahip kompozit malzeme üretimi birçok çalışmaya konu olmuştur. Polimer nanokompozitler; polimer matrisi içinde dağılmış nanopartiküller, polimer ile kaplanmış metalik nanopartiküller ya da polimer yüzeyler üzerine metalik nanopartikül entegrasyonları olarak oluşturulabilmektedir [17].

Nanokompozitlerin hazırlanması için farklı özellikte polimerler kullanılabilmektedir. Yüksel ve arkadaşları da 3 farklı polimer matriksin (polysulfone (PS), polyethersulfon (PES) ve selüloz asetat (CA) üzerine gümüş nanopartikül yerleşimi ile oluşan kompozitin özelliklerini yüzey morfolojisi, su geçirgenliği ve antibakteriyel parametreler açısından karşılaştırmıştır (2014). Farklı boyutlardaki AgNP'ler (0,03; 0,06; 0,09 AgNP/PS-PES-CA) ile elde edilen kompozitlerin yüzey morfolojilerinde pürüzlükleri kullanılan bazal membranlar ile birlikte değerlendirildiğinde, yüzey kaplı PS ve PES membranlar bazal membranına göre daha pürüzsüzleşmiştir. Ancak, 0,03 AgNP/CA bazal membrana göre daha pürüzsüz bir hal almışsa da diğerleri boyutlarda ki AgNP' ler ile elde edilen yüzeylerin pürüzlülüğü artmıştır. Bu durum nanopartiküllerin alt katmana geçmesi ya da iki tabaka arasında kalması ile ilişkilendirilmiştir. AgNP CA membranının altında kaldığı için hidrofiliği çok etkilememiştir. Su geçirgenliği, modifiye CA ve PES membranlarda azalırken, PS membranda artmıştır. Antibakteriyel özellikler karşılaştırıldığında en iyi antibakteriyel etki AgNP kaplı PS membran ile elde edilmiştir [53]. Polimer tipine bağlı materyal özelliklerinin yanı sıra polimer metal NP oranlarının da antibakteriyel etkileri değiştirdiği belirlenmiştir.

Biyoteknolojik ve tıbbi uygulamalarda polimer metalik nanopartikül kompoziti pek çok araştırmaya konu olmuştur. Polimer metal nanokompozitlerinin farklı biyolojik özelliklerine bağlı olarak çok farklı kullanım alanları olmakla birlikte antibakteriyel aktivite özellikleri ve bakteriyel yüzey tutulumunun azaltılması önemli araştırma alanlarındanıdır. Ayrıca biyolojik özelliklerinin yanı sıra tasarım esnekliği ve düşük maliyet açısından avantaj sağlamaktadır. Gümüş nanopartikülün neden olduğu antibakteriyel etki performansı için boyut, şekil, yüzey özelliği ve birikme derecesi kontrol altında tutulmalıdır. Polimerik malzemeler şekilsel yapısı ile gümüş nanopartiküllere esneklik kazandırırken aynı zamanda çeşitli yöntemlerle hareketsizleştirilebilir. Polimer bileşenleri nanopartiküllerin yüzeyde veya bir çözelti

içinde birikmesini önleyebilir. Ayrıca, gümüş iyonu salınımını kontrol edebilmektedir.

Kumar ve Münstedt (2005) polyamide/Ag kompozitinin gümüş iyon serbestliğine bakarak antibakteriyel özelliğini araştırmışlardır. Kompozit 14 gün süreyle sulu bir ortamda bırakılmış ve su geçirgenliğiyle, gümüş iyon salınımı incelenmiştir. 6.günden sonra gümüş iyon salınımının arttığı, gümüş tozunun yüksek konsantrasyonuna sahip ürünlerin daha fazla bırakma hızına sahip olduğu ve 4 ila 6 güne kadar olan su geçirgenliğinin az olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada kompozitin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı çok iyi antibakteriyel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [57].

Guo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2013), polimer- AgNp kompozit kaplamasının antibakteriyel özellikleri incelenmiştir. Daha küçük boyuttaki AgNp yapılardan iyon salınımının daha kolay olduğu ve daha yüksek bir yüzey-hacim oranına sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, daha küçük boyuttaki gümüş nanopartikülün hücre içine alınmasındaki artışa bağlı daha güçlü bir oksidatif strese neden olacağı belirtilmiştir [49].

2.4 Biyomalzemeler ve Biyolojik aktivite

Biyomalzemeler, insan vücudundaki hasarlı veya eksik dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan; kan, mukoza gibi vücut sıvılarıyla sürekli veya aralıklarla temas eden doğal ya da sentetik yöntemlerle elde edilen malzemelerdir. Biyomalzemelerin farklı koşullara dayanıklı olması, vücutta istenmeyen tepkiler(enflamasyon, pıhtı oluşumu vb) oluşturmaması ve antibakteriyel özellikte olması önemlidir.

Geçmişten günümüze kadar gerek tahta, kauçuk gibi organik malzemelerin, gerekse altın, cam gibi inorganik malzemelerin biyomalzeme olarak kullanımı denenmiştir. Ancak vücudun bu malzemelere verdiği cevaplar son derece farklıydı. Belirli koşullar altında, bazı malzemeler vücut tarafından kabul görürken, koşullar değiştiğinde vücut tarafından kabul görmemiştir [59], [60].

Biyomalzemelerin vücutta oluşturabileceği inflamasyonun önlenmesi için, biyomalzeme üzerinde veya ortamındaki mikroorganizmaların büyümesini

sınırlamak veya inhibe etmek için var olan yöntemlerle birlikte malzemelerde önem kazanmaktadır. Bu anlamda, bileşimlerine antibakteriyel ajanlar içeren kompozit materyallerin kullanımı, mikroorganizmaların büyümesinin kontrolünü mükemmel bir alternatif olarak ve dolayısıyla hastalık bulaşmasının önlenmesini sağlar. Hastane enfeksiyonlarının önlenmesi ve yüzeylerde mikroorganizma büyümesini inhibe etmek için çeşitli araştırmalar mevcuttur.

Modifiye polimer-metal nanopartikül kompozitlerinin antibakteriyel özelliklerini açıklayan iki mekanizma önerilmiştir. Birinci mekanizma, metal nanopartiküllerden iyonlarının salınmasıyla bakterileri inhibe ettiği; ikinci mekanizma ise süspansiyon haline getirilmiş nanopartiküllerin bakterilerin hayatta kalmasını ve üremesini önlediğini önermektedir. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada (Tamayo ve ark, 2014), farklı ağırlıklardaki (1-2-5 wt%) polietilen (PE) AgNP ve bakır nanopartikül (CuNP) kompozitlerinin antibakteriyel özellikleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada gram pozitif bir bakteri olan ve bulaşma ana yolu kontamine gıda tüketiminden kaynaklı olmasına karşın cihazların kontaminasyonu ile ilişkili hastane raporlarında mevcut olan *Listeria monocytogenes* suşu kullanılmıştır. Farklı büyüklüklerdeki oransal olarak farklı (2-5 wt%) PE-AgNP kompozitlerin iyon salınımının 90 günün sonunda yakın değerlerde olduğu, ancak 2wt%'lik PE-CuNP de bir salınım olmadığı belirlenmiştir. Nanokompozitler bakteri ile 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda ağırlık bakımından büyük olan nanokompozitte büyümenin azaldığı gözlemlenmiştir. Bakırın 5wt%'lik kompozitte iyon salınımı daha fazla olduğu için gümüş nanopartikülle karşılaştırıldığında antibakteriyel özelliği artmıştır [56].

Zapata ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu bir çalışmada ise *in situ* polimerizasyon ile sentezlenen PE- AgNP kompozitinin içine eklenen gümüş nanopartikül miktarına (1-2-5 wt%) ve temas süresine bağlı olarak *E. coli* 'ye karşı antibakteriyel etkinin arttığı gözlenmiştir. Nanokompozit içindeki 5 wt% AgNP lerin yüksek gümüş iyon salınımı ile 24 saatlik temas sonunda, bazal PE ile karşılaştırıldığında bakterilere karşı mükemmel bir etkinlik (%99 inhibisyon) gösterdiği saptanmıştır [55].

Paula ve arkadaşları poly(styrene-acrylic acid) polimeri ile gümüş nanopartikül kompozitinin sentezini ve antibakteriyel özelliklerini disk difüzyon yöntemiyle rapor

etmiştir (2009). Sentezlenen kompozitin mikroorganizma inhibisyonuna neden olduğu ve antiseptik özellikte olduğu bildirilmiştir [50].

PVC içerikli medikal malzemeler biyomedikal alanda 40 yıla varan bir geçmişi vardır ve bu alanda geniş bir yer kaplar. PVC, işleme kolaylığı, farklı maddelerle uyumluluk ve çok yönlülük açısından uygulamalarda yaygın olarak kullanılır. PVC'nin biyomalzeme içeriği olarak tercih edilmesinin diğer nedenleride maliyet avantajı vemedikal alanda kullanılan tüm sterilizasyon yöntemleri ile steril edilebilir olmasıdır. Vücut sistemlerine yardımcı tek kullanımlık olarak kullanılan biyomalzemeler, parenteral beslenme torbaları, enteral beslenme tüpleri, kataterler, ekstrakorporeal oksijenezasyon dolaşım setleri, solunum maskeleri, endotrakeal tüpler gibi birçok üründe bulunabilir. PVC'lerin avantajlarının yanı sıra içerdiği veya esnekliğin sağlanması için eklenen maddelerden kaynaklı birçok toksik etkisi ve enflamasyon etkisi mevcuttur.

PVC'den yapılan biyomalzemelerin yumuşaklığının ve esnekliğinin kazanması için ftalat olarak bilinen kimyasal maddeler kullanılır. PVC biyomalzemedede kullanılan ve %20-40 oranında kullanım oranı olan Di-2-etiheksil ftalat (DEHP), ftalat türlerindendir. DEHP, enteral beslenme tüpleri, kataterler, ekstrakorporeal oksijenezasyon dolaşım setleri, solunum maskeleri, endotrakeal tüpleri ve eldivenler gibi çeşitli medikal malzemedede bulunabilir. Ve son derece toksik etkisi olan bir maddedir. Yağda çözünmesi yüksek olan bu madde kolaylıkla lipid içeren vücut sıvılarına ve organellere geçebilir ve buralarda büyük hasarlara neden olabilir [65].

PVC biyomalzemelerinin neden olduğu enflamasyonun süresinin, şiddetinin veya ilaç salınımının etkisi, biyomalzeme büyüklüğüne, şekline ve kimyasal-fiziksel özelliğinin yanı sıra in vitro/in vivo olmasına bağlı olarak değişmektedir. PVC biyomalzemelerin neden olabileceği etkileri en aza indirmek ve biyoyumluluğu artırmak için yeni materyallerin araştırılıp, geliştirilmesi yönündeki çalışmalar hızla artmıştır [64]. PVC'nin özellikle antibakteriyel etkilerini artırmak için çeşitli çalışmalar mevcuttur. Zampino ve ark. (2011) tarafından farklı oranlarda ki (%10, %20) PVC-Silverzeolite (SZ) kompozitinin antibakteriyel etkisi *E.coli* ve *Staphylococcus epidermidis* üzerinde test edilmiş. Deney düzenekleri sıvı ve katı besiyeri (TSB, TSA) ve steril idrardır. %20 oranında SZ ile hazırlanan kompozitin

antibakteriyel etksinin %10 oranında SZ ile hazırlanan kompozite göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir [62].

PVC biyomalzemelerin antibakteriyel özelliğini artırmak için yapılan bir başka çalışmada hastane enfeksiyonu için büyük bi öneme sahip *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde test edilmiştir. Tıbbi cihazlar için kullanılacak PVC yüzeyinin oksijen plazma işlemi ile hidrofilik bir yüzey haline getirilmesi ve *P. Aeruginosa*'nın yüzey kolonizasyonunu %70 oranında azalttığı bildirilmiştir. Bu düşünün kolonizasyonu önlemek için yeterli olmadığı savunulmuştur [63].

2.5 Biyofilm Tanımı ve Yapısı

Biyofilmler, bir yüzeye tutunarak polimerik yapıda hücre dışı matriks içinde yaşayan mikroorganizma topluluğundan oluşmaktadır [26]. Bu hücre dışı matriks, bakteri hücreleri tarafından üretilen ve “hücre dışı polimerik yapı”, “ekzopolisakarit” ya da “ekzopolimer (EPS)” adı verilen polisakkarit bazlı bir ağ yapısıdır [27]. Bir başka deyişle biyofilm, bakterinin birbirine ya da bir yüzeye yapışarak organik bir polimer matriks içine gömülmesidir [28]. Biyofilmler, bakterileri kimyasal (nem, ısı ve pH vb), çevre koşulları gibi fiziksel değişimlerden oluşabilecek zararlardan korur, besinlerin depolanmasını ve atıkların uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Bakterilerin ekzopolimer matriks içinde ve kümeler halinde bulunmaları fagosite edilmelerini zorlaştırır ve hümmoral bağışıklık sistemi bileşenlerinin ulaşımını engellemiş olur [29]. Bakterilerin yüzeylere bağlanmaları ve biyofilm oluşumu; bakteri türü, bakteri sayısı, bakteri hücre duvarının yapısı (gram pozitif ya da gram negatif oluşu), bağlandığı yüzeyin özellikleri, ortamdaki besin maddeleri içeriğı, miktarı ve ortamın kimyasal özellikleri (pH, ısı, nem) gibi birçok faktörden etkilenebilir [30], [31].

Kives ve ark.'nın *Pseudomonas fluorescens* B52 suşu ile yapmış oldukları çalışmada, biyofilm matriksindeki EPS üretimi paslanmaz çelik ve cam malzeme yüzeyinde incelenmiş ve EPS içindeki bileşik miktarlarının cam malzemeye kıyasla paslanmaz çelik yüzeyde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Biyofilm matriksinin yapısında bulunan enzimlerin yüzeye tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmekte olduğunu göstermiştir [34].

Biyofilmler tek bir organizma türünü de, birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Birden fazla türden oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur ve türlere ait mikrokoloniler su kanalları ile birbirlerinden ayrılırlar. Bu su kanalları gözenekli bir yapıdadır ve mikrokolonilerin altında ve arasında bulunur. Besin maddelerinin ve oksijenin taşınması pasif difüzyon ile sağlanır [36].

Biyofilm matriksinin içinde %97 su, %1-2 EPS, %1-2 glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipid, fosfolipitler bulunmaktadır. Bu oranlar bakteri çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamına ve genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir [34]. Bakterinin yüzeye sıkıca tutunmasından sonra tutunduğu yüzeyde çoğalır ve mikrokolonisini oluşturur. Mikrokolonilerde büyüyerek biyofilm tabakasını oluşturur. Biyofilm matriksindeki EPS üretimi, organizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunmasını sağlar [37].

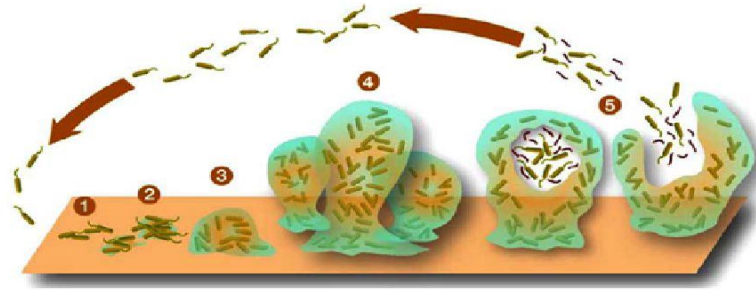
En kolay ve en yaygın şekilde biyofilm oluşturan bakteriler; *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* *Staphylococcus* ve *Bacillus* türleridir [32]. Enfeksiyon gelişimi ve biyofilm oluşumu arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Bu mikroorganizmalar özellikle kalp iç zarı iltihabı, periodontit, kistik fibrioz gibi hastalıklara neden olur [33].

2.5.1 Biyofilm Oluşum Basamakları

En basit biyofilm tabakası bile karmaşık bir yapıya sahiptir. Biyofilm gelişimi su kanallarından besin ve oksijen aktarımı sağlandıkça devam eder. Ancak, ortamdaki besin maddeleri tükenince yüzey bağlantıları zayıflar ve bakteri hücreleri planktonik evrelerine geri dönerler [37].

Biyofilm oluşumu beş basamakta incelenebilir. İlk olarak bakteri hücresi yüzeye etkileşerek yüzeye dönüşümlü olarak tutunurlar. Yüzeye dönüşümlü tutunan hücreler gerekli besin madde araştırması yaparak; kısa mesafeli etkileşimler ve bağlar yardımıyla flagella ve pili gibi yapılar ile yüzeye dönüşümsüz olarak tutunurlar. Yüzeye dönüşümsüz olarak tutunan bakteriler gelişerek koloni oluşturur. Zamanla mikrokoloniler büyür ve olgun biyofilm oluşumu sağlanır. Son olarak, bakteri veya bakteri kümeleri olgun biyofilmden ayrılarak ortama yayılır. Şekil 2.3'de biyofilm oluşum aşamaları gösterilmiştir.

Biyofilmin Oluşum Basamakları:



Şekil 2.3 Biyofilm Oluşum Basamakları

2.5.1.1 Dönüşümlü tutunma

Dönüşümlü tutunma aşamasında, bakteri hücresi yüzeyin yakınındadır, amahenüz yüzeyle tam olarak temas etmemiştir ve bakteri hücresi ile yüzey arasında uzun mesafeli zayıf etkileşimler meydana gelir. Bu etkileşimler sıklıkla hidrofobik etkileşimler ya da Van der Waals bağlarıdır. Ek olarak, bakteri ve katı yüzeyler negatif yüklü olduğu için itici güç olan elektrostatik etkileşimlerde dönüşümlü tutunmayı sağlar. Yüzeyle ilk temasın gerçekleşmesinde hidrofobik etkileşimlerin katkısı büyüktür. Bu aşamada basit yıkama işlemleri ile bakteri hücreleri yüzeyden kolayca uzaklaştırılabilirler [39], [28], [36].

2.5.1.2 Dönüşümsüz tutunma

Dönüşümsüz tutunma aşamasında, bakteri ve yüzey arasında kısa mesafeli etkileşimler ile yüzeye tutunma gerçekleşir. Bu aşamada yeterli besin maddesinin ortamda bulunması önemli bir faktördür. Bakteri hücreleri flagella ve pili gibi yapılar ile yüzeylere dönüşümsüz olarak tutunurlar. Yüzeye tutunan bakteri hücreleri, membrana bağlı proteinlerden EPS üretir. [28]Bu aşamadan sonra biyofilm hücrelerini yüzeyden uzaklaştırabilmek için güçlü mekanik kuvvet, enzimatik degradasyon, dezenfektan, deterjan, sanitizeler ve/veya yüksek ısı uygulamaları gereklidir [37].

Gerke ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada (1998) *Staphylococcus epidermidis* bakterisinin EPS üreterek yüzeye tutunduğunu ve gelişen mikrokolonilerden olgun biyofilm oluşumunun gerçekleştiği saptanmıştır [37], [48].

2.5.1.3 Koloni gelişimi

Biyofilm oluşumunun 3. aşaması yüzey kolonizasyonudur. Bakterilerin kolonizasyonu hücrelerin sinyal molekülleriyle etkileşip bir araya gelmesiyle gerçekleşir [28]. Mikrokoloni gelişimi bakteri hücrelerinin yüzeyde birikmesi, gelişmesi ve EPS üretimi sonucunda gerçekleşir [37], [42]. EPS bakteri ve alt katmanı arasında bağ oluşumuna katkıda bulunur, koloniyi her türlü çevresel etmene karşı stabil hale getirir [37], [43].

2.5.1.4 Olgun Biyofilm Oluşması

Bu aşamada mikrokoloniler besin maddelerinin etkisiyle büyürler ve kompleks yapılar veya kulelere dönüşürler. Hücrelerin bu yapıya ulaşılabilmesi için yaklaşık 10 gün ya da daha uzun bir süre gerekmektedir [37], [45].

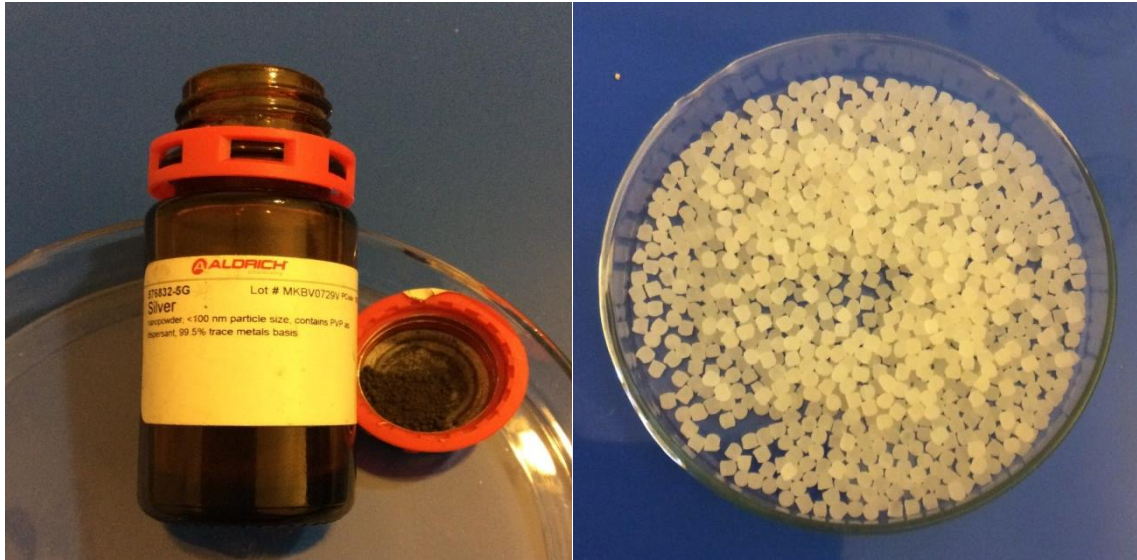
2.5.1.5 Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması

Biyofilm gelişiminin bu aşamasında bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu kopma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi EPS ya da yüzey bağlayan proteinlerin açığa çıkması ve ortamdaki besin maddelerinin tükenmesi ile gerçekleşebilir [28], [47].

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal ve Kimyasallar

Çalışmanın aşamalarında kullanılan materyaller; Gümüş nanopartikül (Sigma-Aldrich, ABD), PVC granülleridir (ticari olarak temin edildi) (Şekil3.1).



Şekil 3.1 Gümüş Nanopartikül ve PVC Granülleri

Kullanılan kimyasallar; THF (Tetrahidrofuran, 72.11 g/mol) (Merck, Almanya), TSB (Merck, Almanya), MHB (Merck, Almanya), Agar (Merck, Almanya), NaCl (Merck, Almanya), Tween 80 (Merck, Almanya), PBS (Merck, Almanya), Metanol (Merck, Almanya), Kristal Viyole (Merck, Almanya), Etanol (Merck, Almanya).

3.2 Kullanılan Cihazlar

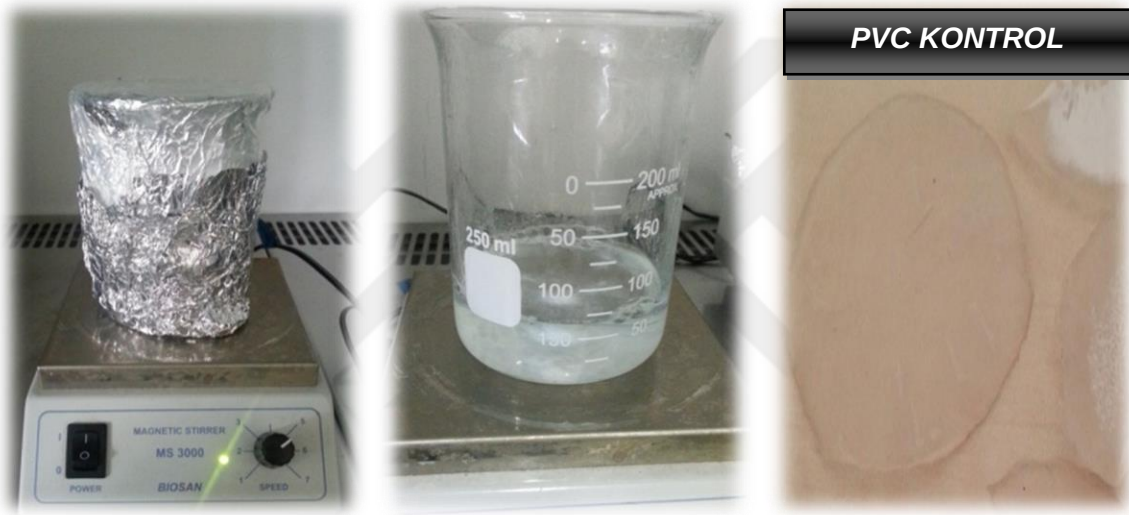
Çalışmanın aşamalarında kullanılan cihazlar; Hassas terazi (Sartorius, Almanya), Manyetik karıştırıcı (Biosan, Letonya), Biyolojik güvenlik kabini (Biosan, Letonya), Distile su cihazı (Millipore, Fransa), Vorteks (DragonLab, Çin), Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya), Otoklav (Hitachi, Japonya), Etüv (Nüve, Türkiye).

3.3 Kontrol ve Kompozit materyallerin Hazırlanması

Çalışmamızda farklı oranlarda (1-2-5 wt%) PVC - AgNp kompozitleri ve saf PVC kontrol filmi hazırlanmıştır.

3.3.1 Kontrol PVC filmi

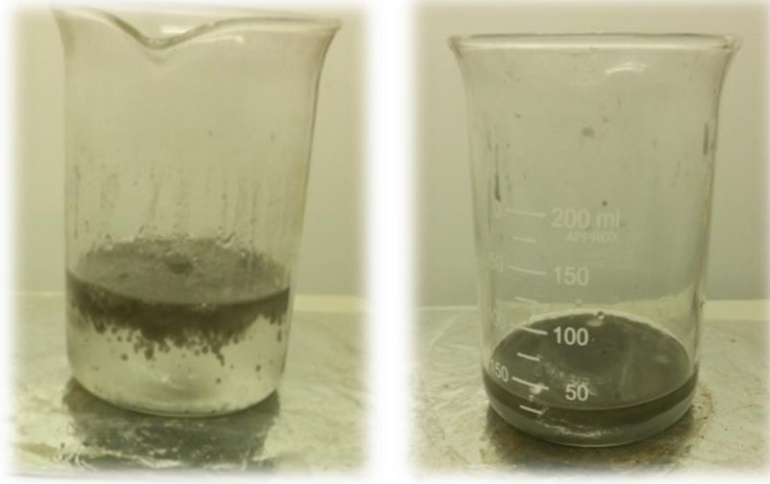
75ml THF içerisinde 3gr PVC (~ %4) granülü 1 saat karanlık ortamda manyetik karıştırıcıda balık ile karıştırılarak çözünmesi sağlandı. PVC granüller tamamen eridikten sonra üzerine 50ml distile su ilave edildi ve karıştırıcıda 1 saat daha inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon sonucu oluşan yapının dibe çökmesi sağlandı ve beher içindeki fazla çözelti alındı. Kalan sıvının buharlaşması için 2 saat 50°C'da ısıtıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonucunda, yaklaşık 1–2mm kalınlığında ince bir film elde edildi. Elde edilen bu film, kontrol PVC filmi olarak kullanıldı (Şekil 3.2).



Şekil3.2 Hazırlanan Kontrol PVC filmi

3.3.2 %1, %2, %5 (wt/wt) AgNp-PVC Kompozitlerin hazırlanması:

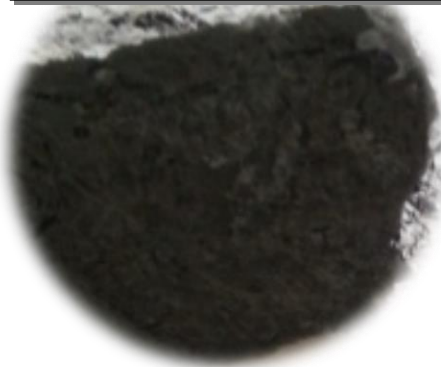
75ml THF içerisinde 3gr PVC (~ %4) 1 saat karanlık ortamda manyetik karıştırıcıda balık ile karıştırılarak erimesi sağlandı. PVC granüller tamamen eridikten sonra %1'lik kompozit için 0,03gr AgNp, %2'lik kompozit için 0,06gr AgNp, %5'lik kompozit için 0,15gr AgNp eklendi. AgNp'lerin homojen olarak dağılımı için karıştırıcıda 1 saat daha karıştırıldı ve 1 saat sonunda üzerine 50 ml distile su ilave edildi. 2 saat 50°C ısıtıcıda bekletilerek oluşan yapının dibe çökmesi sağlandı. 2 saat sonunda beherdeki fazla çözelti ayrıldı. Kalan filmin tamamen buharlaşması için 1 gece oda ısısında inkübasyona bırakıldı ve yaklaşık 1-2 mm kalınlığında AgNp-PVC kompozit filmleri elde edildi (Şekil 3.3).



%1 AgNp - PVC



%2 AgNp - PVC

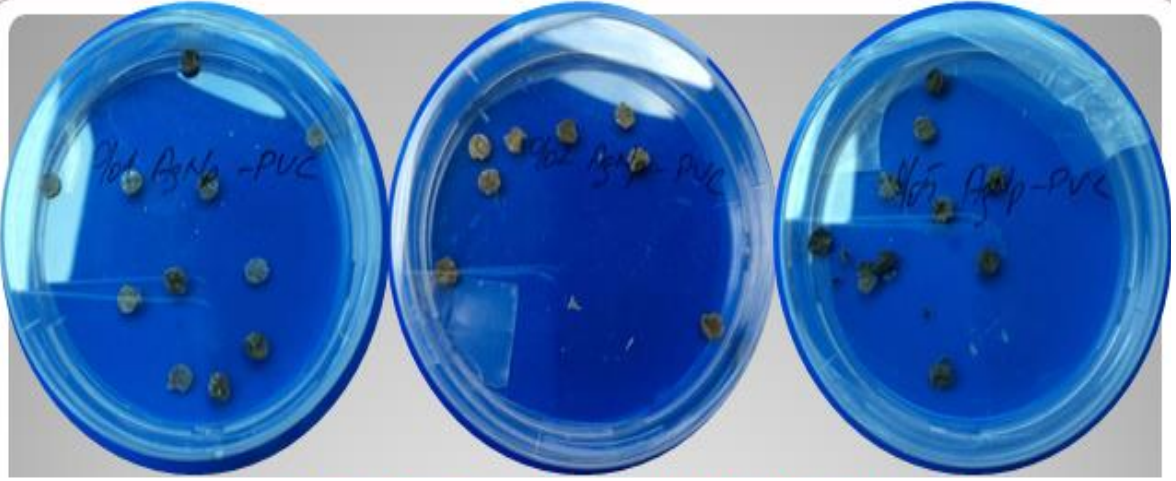


%5 AgNp - PVC

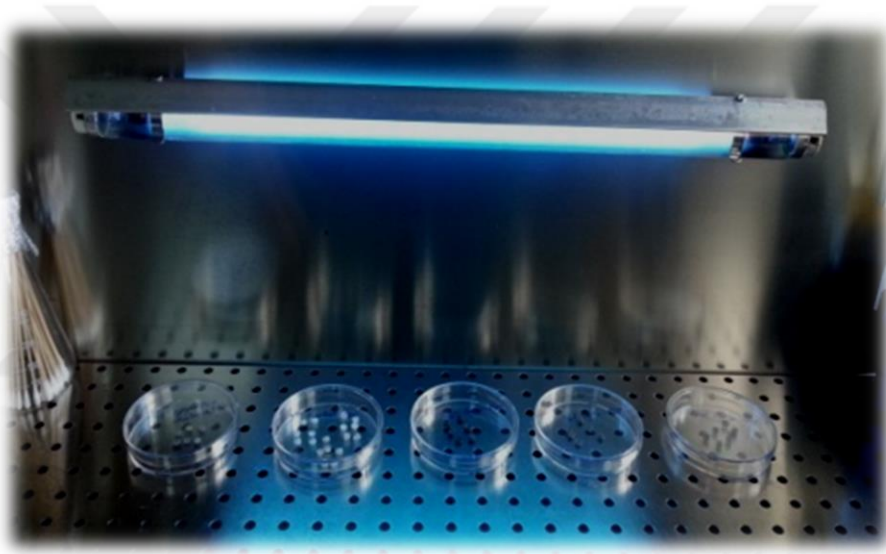


Şekil3.3 Hazırlanan %1, 2,5 (wt/ wt) AgNp-PVC Kompozitleri

Hazırlanan PVC kontrol filmleri ve (1-2-5 %) PVC- AgNp kompozit filmler yaklaşık 6 mm çapında, 1-2 mm kalınlığında diskler haline getirildi. Diskler 20-25 dk UV lamba altında kabin içerisinde steril edildi ve sonraki çalışmalar için muhafaza edildi(Şekil 3. 4) (Şekil 3. 5).



Şekil 3.4 Hazırlanan Kompozitlerin disk haline getirilmesi



Şekil 3.5 Disklerin UV ışık altında sterilizasyonu

3.4 Besiyerlerin hazırlanması

3.4.1 Triptik Soy sıvı besiyeri (TSB)

Besiyeri hazırlamak için 30 gr toz Triptik Soy besiyeri üzerine distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Vida kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi içerisindeki sıvı besiyeri 121°C, 1atm basınç altında 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyerlerinin kapakları sıkıca kapatıldı ve kullanılabileceği kadar +4°C'da buzdolabında muhafaza edildi.

Besiyer kontrolü için steril cam deney tüpüne 5ml alınan TSB ağzı kapalı bir şekilde 37°C'da 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyerinde herhangi bir üreme gözlemlenmedi.

3.4.2 Mueller Hinton Sıvı Besiyeri (MHB)

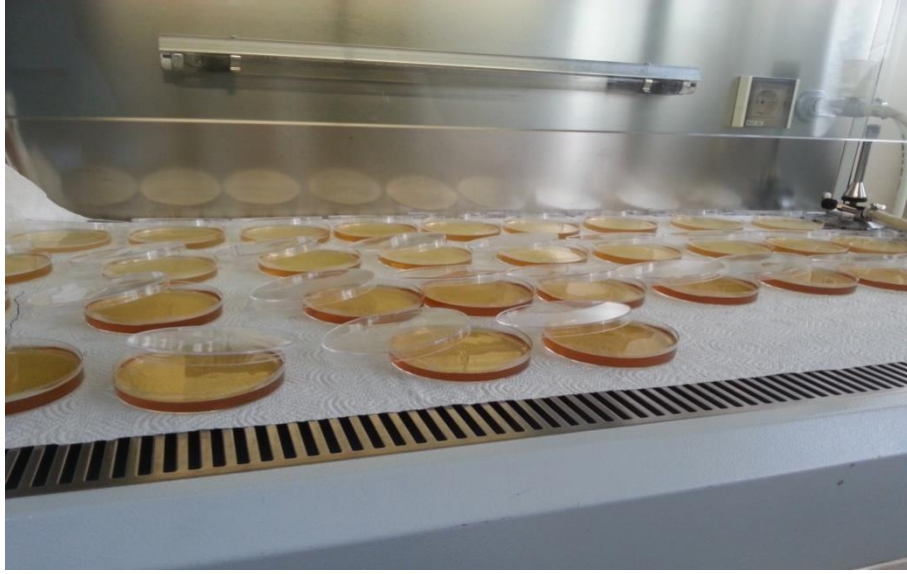
MHB hazırlamak için 21 gr toz Mueller Hinton besiyeri üzerine distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Vida kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi içerisindeki sıvı besiyeri 121°C 1atm basınç altında 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyerlerinin kapakları sıkıca kapatıldı ve kullanılana kadar +4°C'da buzdolabında muhafaza edildi.

Besiyer kontrolü için steril cam deney tüpüne 5ml alınan MHB ağzı kapalı bir şekilde 37°C'da 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyerinde herhangi bir üreme gözlemlenmedi.

3.4.3 Mueller Hinton Katı Besiyeri (MHA)

Disk difüzyon için kullanılacak besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılan MHA hazırlamak için 21 gr toz Mueller Hinton besiyeri üzerine distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlandı. Vida kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi içerisindeki sıvı besiyeri çözeltisi içerisine 15 gr agar (toz) eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra 121°C'da, 1atm basınç altında 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıkarılan sıvı besiyeri 50°C'a kadar soğutuldu. Steril şartlarda 90x15 ml steril petri kaplarına 4mm (~20ml) kalınlığında dökülerek katılaşması beklendi. Katılaştıran besiyerleri kullanılana kadar +4°C'da buzdolabında muhafaza edildi. (Şekil 3. 6)

Hazırlanan MHA petrilerinden iki adet 37°C'da 24 saat inkübasyona bırakıldı ve İnkübasyon sonunda besiyerinde herhangi bir üreme gözlemlenmedi.



Şekil 3.6 Mueller Hinton Katı Besiyerini hazırlama

3.5 Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Çizelge 3.1’de çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları, suşları ve Gram boyanma özellikleri verilmektedir.

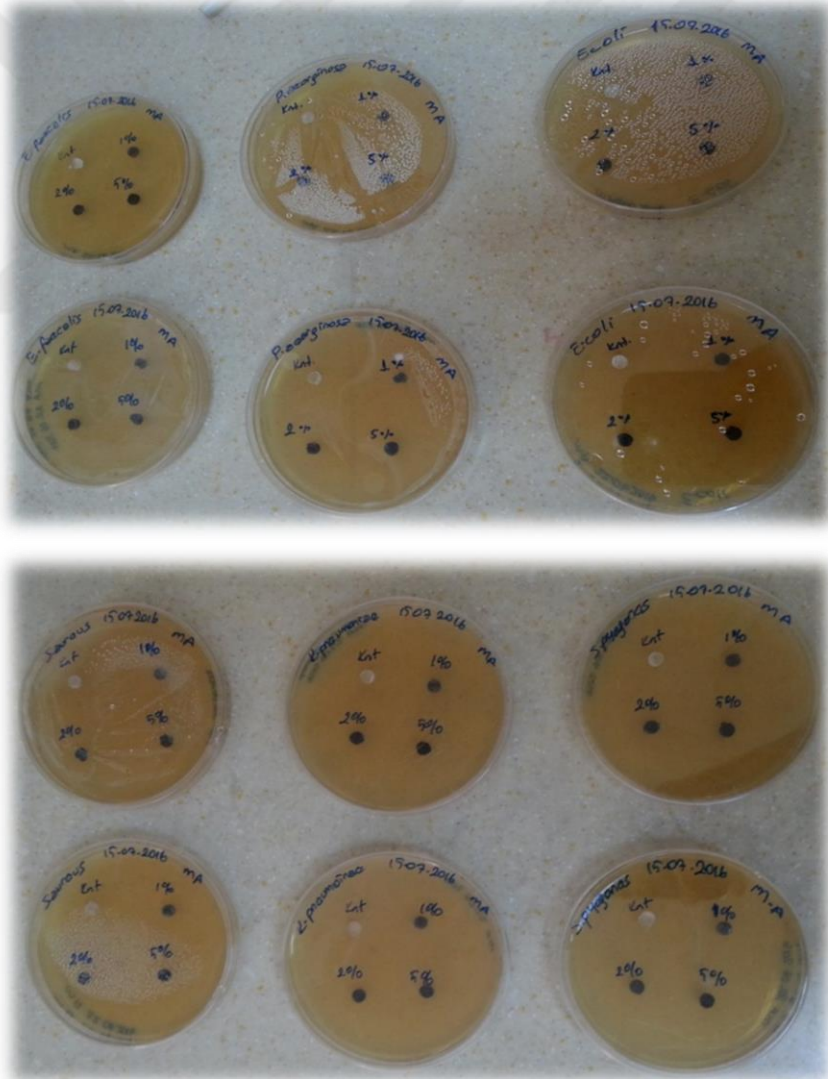
Çizelge 3.1 Test Mikroorganizmaları, Suşları ve Gram boyanma özellikleri

Test Mikroorganizmaları	Suş	Gram Özelliği
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram (-)
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Gram (+)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	Gram (+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33591	Gram (+)
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	Gram (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram (-)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Klinik izolat	Gram (-)

Mikroorganizmalar katı besiyerlerinden alınarak 5ml'lik sıvı besiyerine ekildive yaklaşık 18 saat $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'da üremesi/ çoğalması sağlandı.

3.6 Disk Difüzyon Metodu

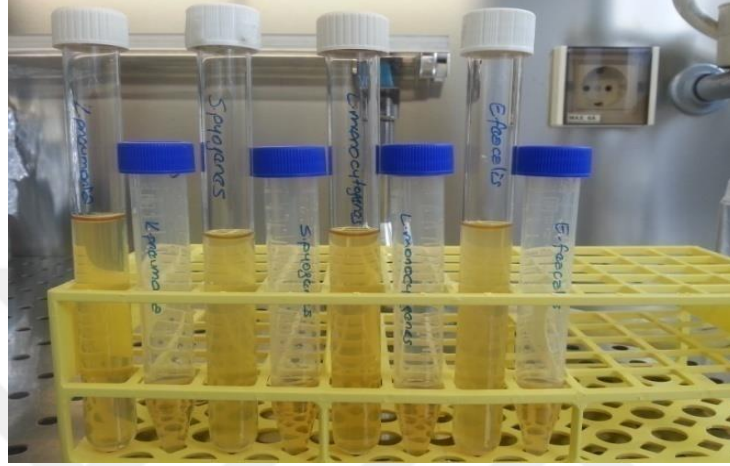
TSB sıvı besiyerinde büyütülen aktif bakteri kültürleri %0,85'lik NaCl ile 0,5McFarland standardına göre ayarlandı ve 1/20 oranında seyreltildi 100µl inokülasyon hacmi ile katı besiyerine (MHA) cam yayma çubuğu yardımıyla yayılarak ekildi. Steril edilen diskler bakteri inoküle edilen besiyerlerine eşit aralıklarla yerleştirildi ve 37°C 'da 24saat ve 72 saat inkübasyonun ardından disklerin çevresinde oluşan inhibasyon zonu incelendi (Şekil3.7). Deneyler iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.



Şekil 3.7 Disk difüzyona hazırlanan besiyerleri

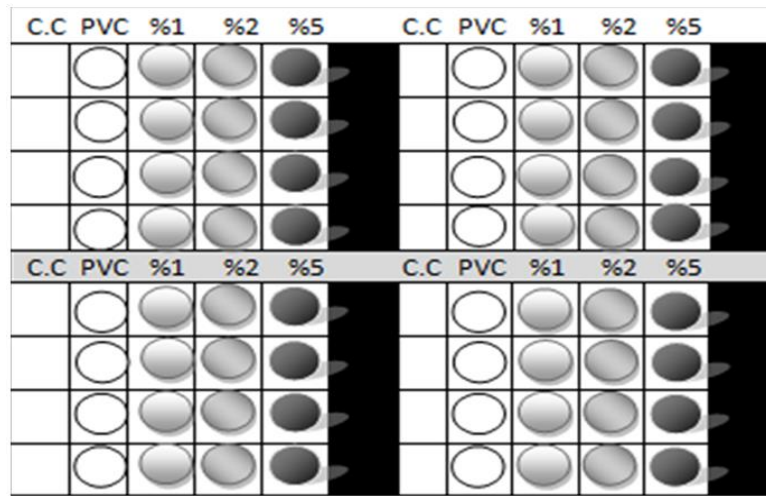
3.7 Yüzeyde Bakteri Çoğalmalarının Karşılaştırılması

Yüzeyde bakteri çoğalmasının karşılaştırılması Tamayo ve ark. (2014) tarafından tanımlanan yöntemle göre modifiye edilerek uygulandı. TSB sıvı besiyerinde büyütülen aktif bakteri kültürleri %0,85'lik NaCl ile 0.5 McFarland standardına göre ayarlandı ve 1/100 oranında seyreltildi (10^6 CFU/ml).



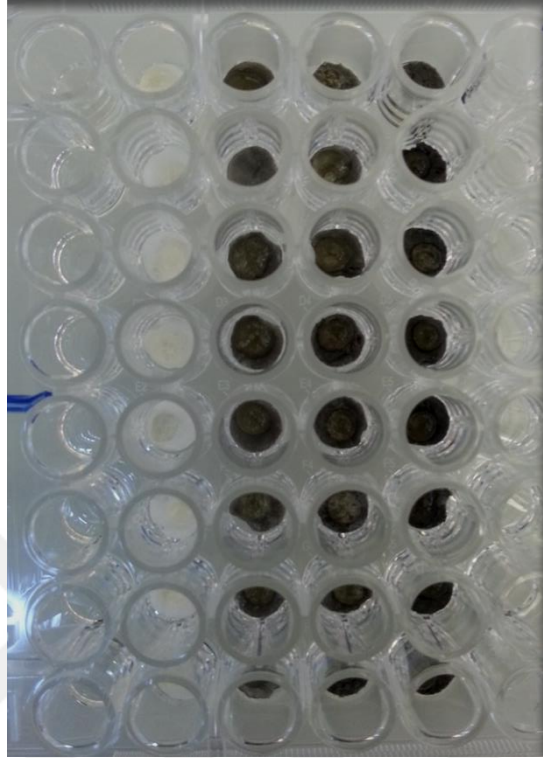
Şekil 3.8 0.5 McFarland standardına göre ayarlanan bakteri kültürleri

96 kuyucuklu, taban yüzeyi hücre kültürü için modifiye düz tabanlı plakalar 4 ayrı bakteri ekimine uygun olacak şekilde deneysel desen oluşturuldu. Steril edilen kontrol PVC ve kompozit diskler 4 tekrarlı olarak sırasıyla hücre kontrolü (CC), kontrol PVC, %1, %2, %5 oranında AgNp-PVC kompozitleri için ayrılan kuyucuklara yerleştirildi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Bakteri çoğalmalarının karşılaştırılması için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka ekim deseni

Seyreltilen bakteri kültürleri 10 µl hacimde disklerin üzerine ekildi. Hücre kontrolü için (CC) boş kuyucuğa 10 µl hacimde bakteri kültürü ekimi yapıldı (ekil 3.10)



Şekil 3.10 10 µl hacimde bakteri ekimi yapılan diskler

37°C'da 6 saatlik ve 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. 6 saatlik inkübasyon sonucunda %0.85 NaCl ile %1'lik Tween 80 hazırlandı ve 2 tekrarlı olarak diskler 2 ml'lik %1'lik Tween 80 içersinde yıkandı. 4ml MHB içerisine yıkama yapılan solüsyondan 5 µl hacimde ekim yapıldı ve 37°C'da 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkbasyonun ardından, 1ml'lik plastik küvetler ile MHB blank küvete karşı 600nm'de spektrofotometrik lmyapıldı.



Şekil 3.11 %1'lik Tween 80 ile yıkanan diskler

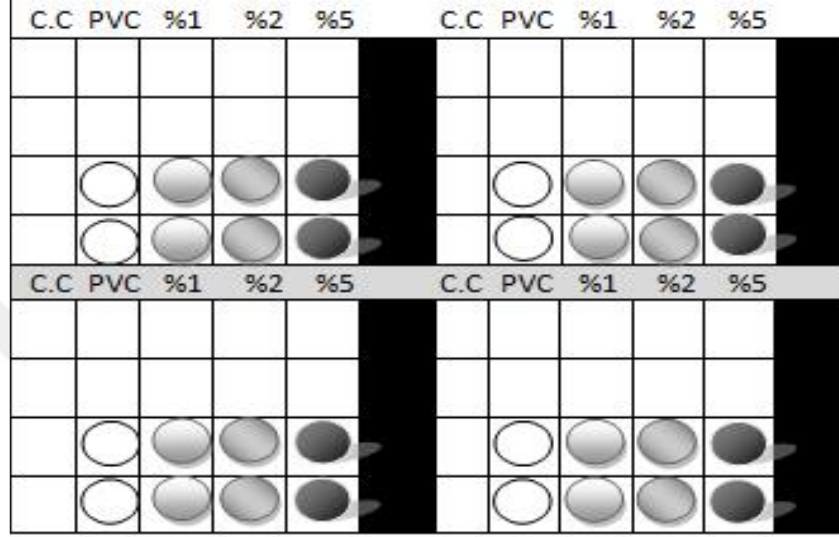


3.12 %1lik Tween 80 ile yıkanan diskler ve inkübasyon için hazırlanan MHB



Şekil 3.136 saat inkübasyon sonrasında MHB içerisindeki kültürler

24 saatlik inkübasyona bırakılan kalan 2 disk içinde aynı prosedür uygulandı. 24 saatlik inkübasyonun sonucunda %0,85 NaCl ile hazırlanan %1'lik Tween 80 ile yıkandı ve 4 ml MHB içerisinde yıkama yapılan solüsyondan 5 µl hacimde ekim yapıldı ve 37°C'da 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, 1ml'lik plastik küvetler ile MHB blank küvete karşı 600 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.



Şekil 3.14 24 saatlik inkübasyona bırakılan 96 kuyucuklu plaka deseni



Şekil 3.15 24 saat inkübasyon sonrasında MHB içerisindeki kültürler

Deneyler, çift tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

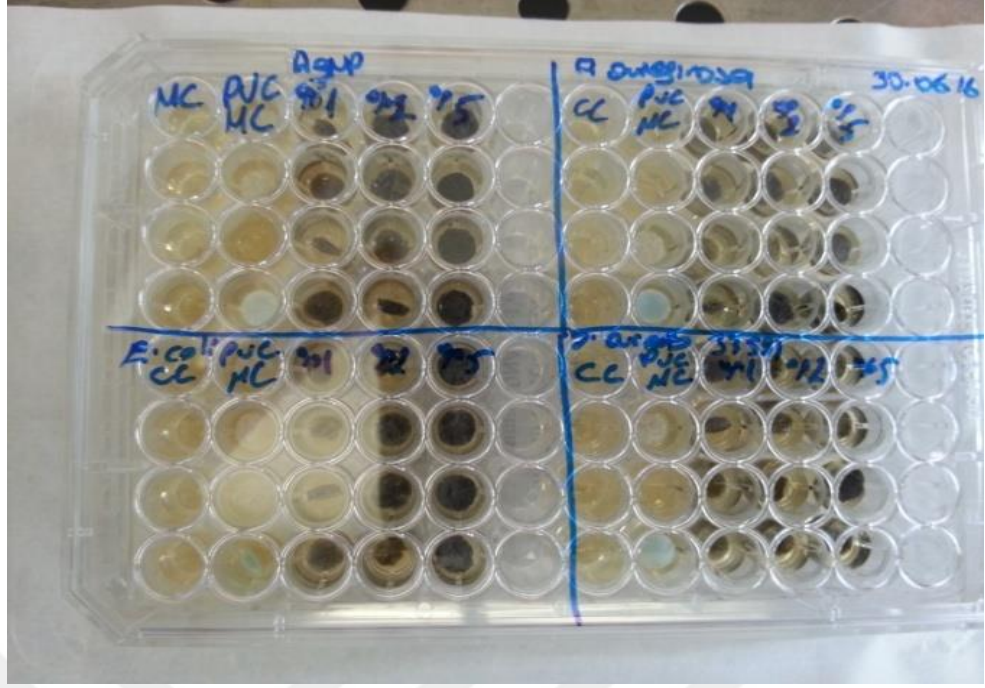
3.8 Biyofilm Oluşumunun Engellenmesi

Biyofilm oluşumu Christensen ve ark. (1995) tarafından tanımlanan yöntemle göre modifiye edilerek uygulandı. Suşlar TSB içerisinde 37°C'da 24 saat inkübe edildi. 96 kuyucuklu taban yüzeyi hücre kültürü için modifiye düz tabanlı plakalar 4 ayrı bakteri için ekim düzenine uygun olarak bölündü. Steril kontrol PVC ve kompozit diskler 4 tekrarlı olarak sırasıyla CC, kontrol PVC, %1, %2, %5 oranında AgNp-PVC kompozitleri için ayrılan kuyucuklara yerleştirildi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C.C	PVC	%1	%2	%5		C.C	PVC	%1	%2	%5	
A												
B												
C												
D												
	C.C	PVC	%1	%2	%5		C.C	PVC	%1	%2	%5	
E												
F												
G												
H												

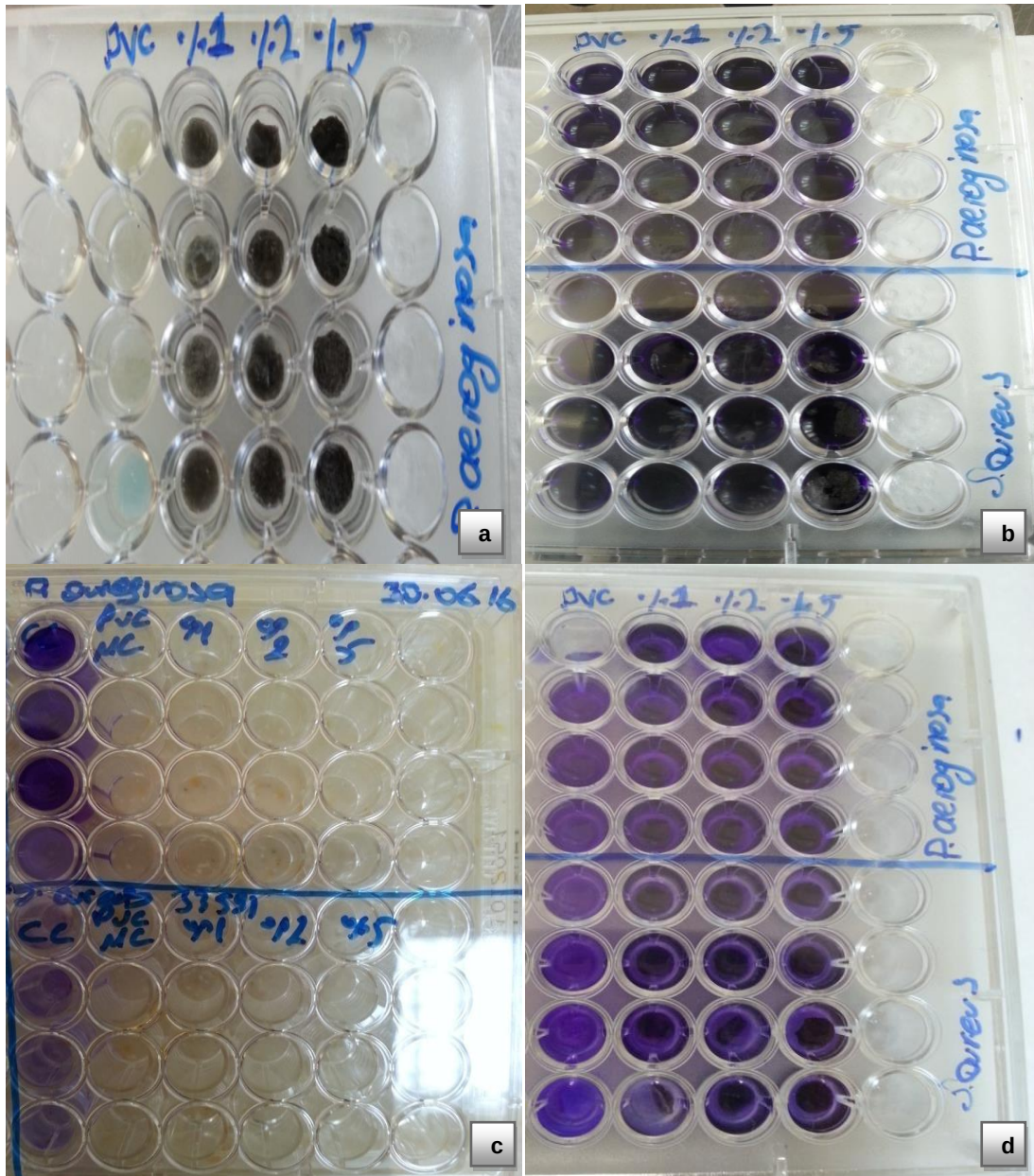
Şekil 3.16 Biyofilm oluşumu için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka deseni

TSB sıvı besiyerinde 37°C'da 18 saat büyütülen aktif bakteri kültürleri %0,85'lik NaCl ile 0.5McFarland standardına göre ayarlandı. Bakteri kültürleri 1/20 oranında seyreltildi ve kontrol PVC disklerin, %1, %2, %5' lik sterilAgNp disklerin yerleştirildiği kuyucuklara 200 µl hacimde ekildi. Hücre kontrolüne (CC); 100µl TSB ve 100µl seyreltilen kültürden ekildi. Plakalar, 37°C'da 24 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.17 İnkübasyon sonunda biyofilm oluşumu gerçekleşen 96 kuyucuklu plaka

İnkübasyonun ardından kuyucuklar boşaltıldı ve PBS (phosphate buffered saline) ile yıkandı. Bakteriler 15dk metanolle fikse edildi ve diskler üzerindeki biyofilm oluşumunu değerlendirmek için bakteri fiksasyonu sağlanan diskler farklı bir 96 kuyucuklu plakaya alındı. Kuyucuklardaki disklerin üzerine 100µl kristal viyole solüsyonu (%0.05 wt/v etanol içerisinde) eklendi ve 15dk boyandı. İnkübasyonun ardından boya atılarak 3 kere PBS ile yıkandı. Son olarak, kuyucuklara 200µl etanol eklendi ve 30 dk etanolde bekletilerek disklerin üzerindeki boyanın çözünmesi sağlandı. Etanolde çözünen boya, 1ml'lik plastik küvetlerde su ile seyreltildi ve optik yoğunluğu 570 nm'de etanol/su blank solüsyonuna karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü. Çalışma çift tekrarlı olarak yapıldı.



3.9 İstatiksel analiz

İstatiksel analizler, SPSS 17,0 yazılımı kullanılarak yapıldı (SPSS Inc, USA). Tüm verilerin standart sapmaları (SD) ve ortalamanın standart hatası (SEM) hesaplandı. Tüm deneylerden elde edilen veriler ortalama $\pm$ SEM kullanılarak ifade edilmiştir.

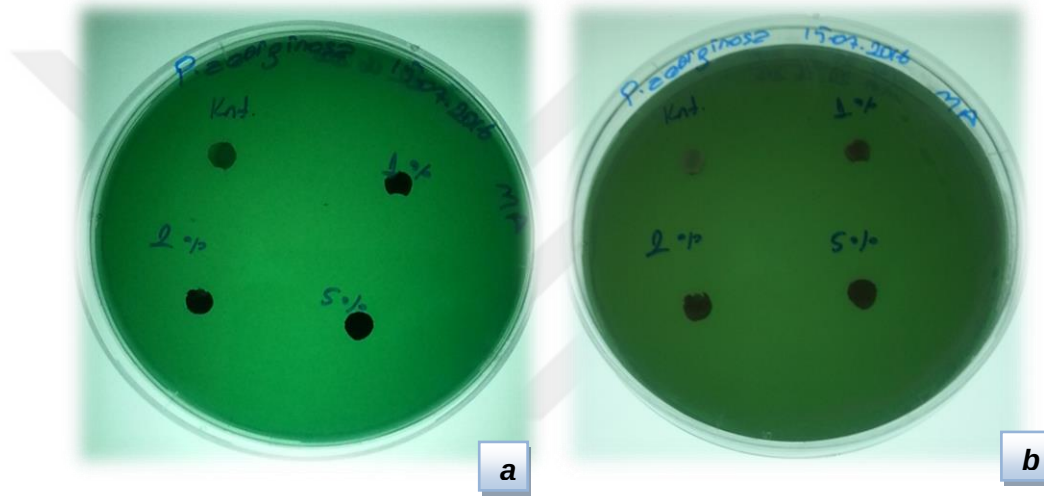
Farklı oranlardaki kompozitlerin kontrol grupları ile olan ve kendi aralarındaki ortalama farkları 0,05 anlamlılık düzeyinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. Ortalama farkları anlamlı ve anlamsız olan grupların belirlenmesi için post hoc tukey analizleri gerçekleştirildi.



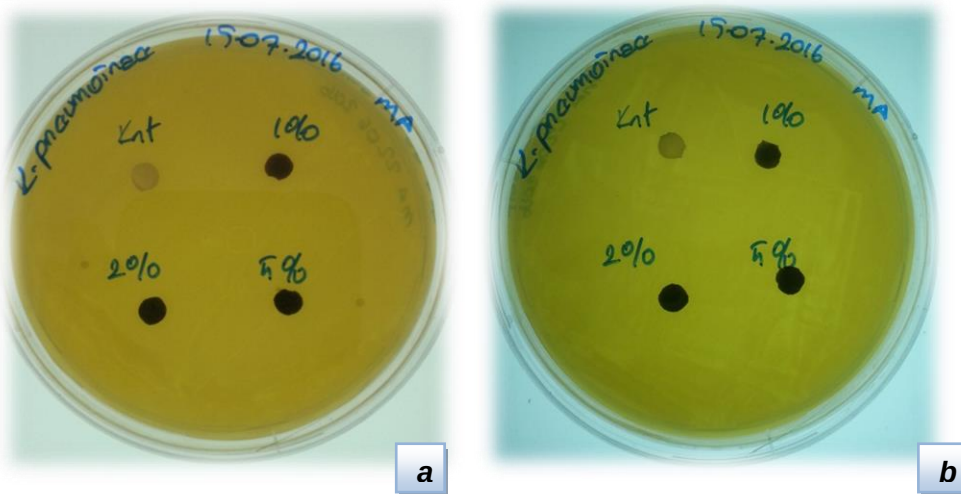
4. SONUÇLAR

4.1 Agar Disk Difüzyon Metodu

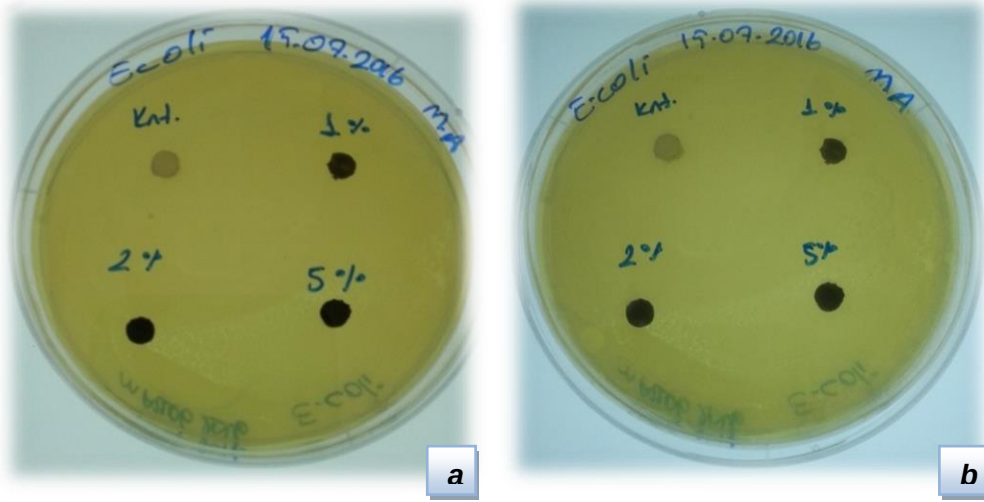
Bu metodun uygulanmasının amacı; inoküle edilen besiyerine yerleştirilen disklerin iyon salınımına bağlı olarak disk çevresinde oluşabilecek inhibisyon zonunu incelemektir. 37°C'da 24 saatlik ve 72 saatlik inkübasyonun ardından disklerin çevresinde inhibisyon zonu olmadığı gözlemlendi. Bu nedenle, kompozit disklerden besiyerine 24 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda antibakteriyel etkiye neden olabilecek iyon salınımı gerçekleşmediği düşünülmektedir.



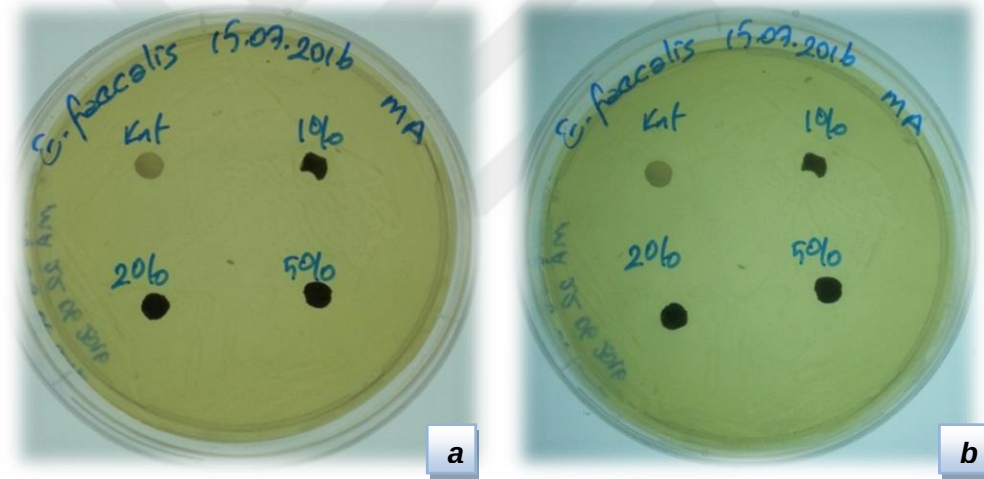
Şekil 4.1 *P. aeruginosa* inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu



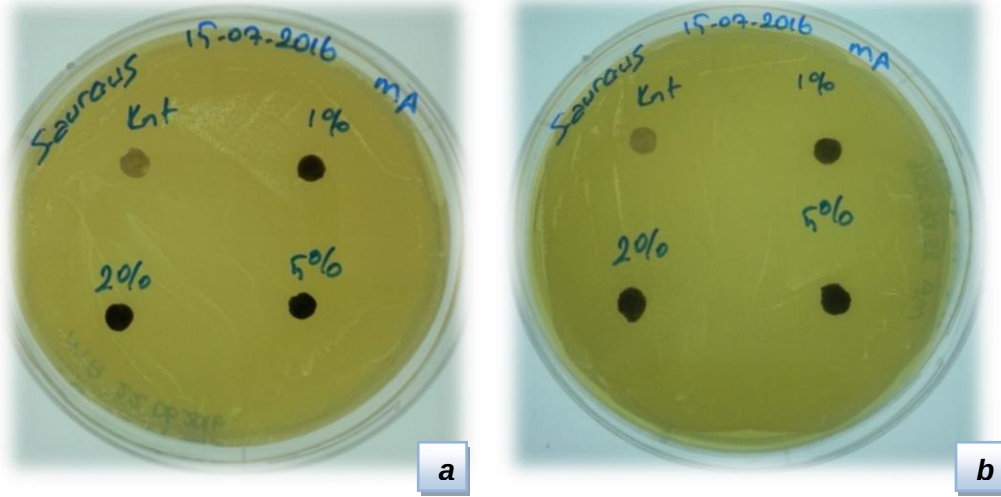
Şekil 4.2 *K. pneumoniae* inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu



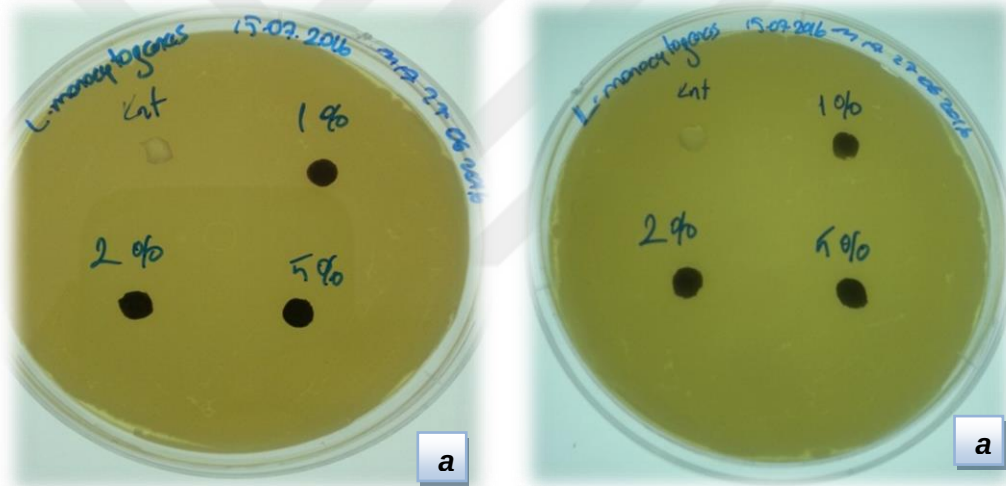
Şekil 4.3 *E. coli* inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu



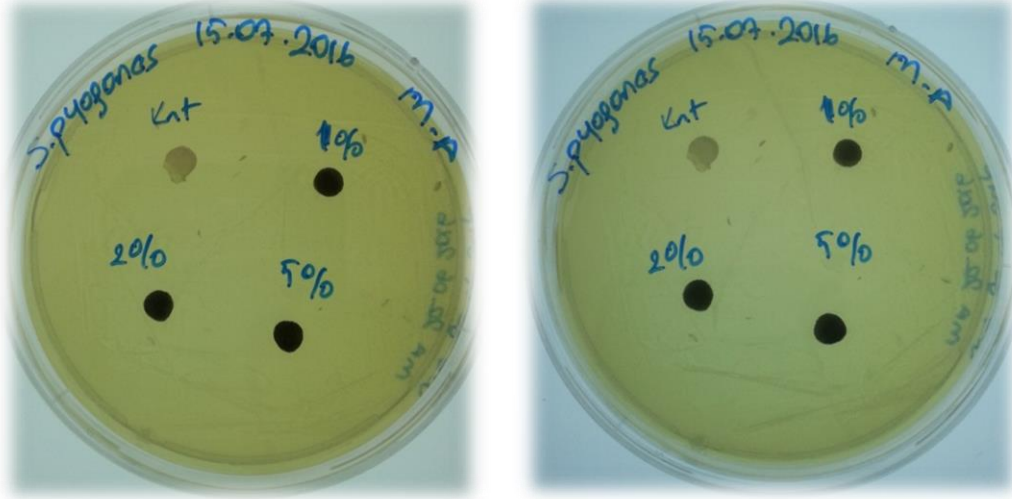
Şekil 4.4 *E. faecalis* inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu



Şekil 4.5 *S. aureus* inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu



Şekil 4.6 *L. monocytogenes* inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu



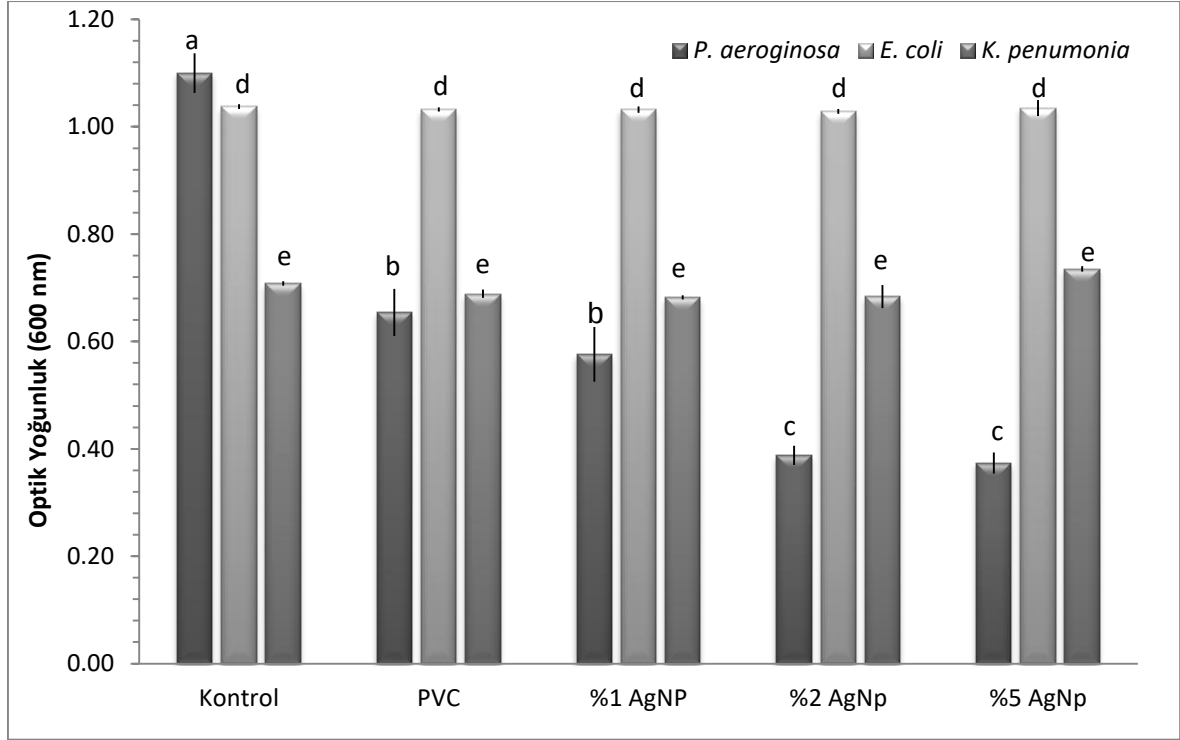
Şekil 4.7 *S. pyogenes* inoküle edilen besiyerlerinde 24 (a) ve 72 (b) saatlik disk difüzyon sonucu

E. coli, *S. aureus* ve *E. faecalis* bakterilerinin inoküle edildiği katı besiyerlerinde (MHA), pozitif referans standardı olarak amfisilin (10mgr/disk) kullanıldı. Besiyerleri 24 saat 37°C'da inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü. İnhibisyon zon çapları; *E. coli* için $18,3 \pm 0,3$ mm, *S. aureus* için $15,5 \pm 1,0$ mm, *E. faecalis* için $28,0 \pm 1,0$ mm olarak ölçüldü.

Disk difüzyon testleri ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ortama iyon salınımının çok az olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, hazırlanan biyomateryallerin yüzeyinde bakteri çoğalmasının incelenmesine yönelik deney düzeneği tasarlanmıştır.

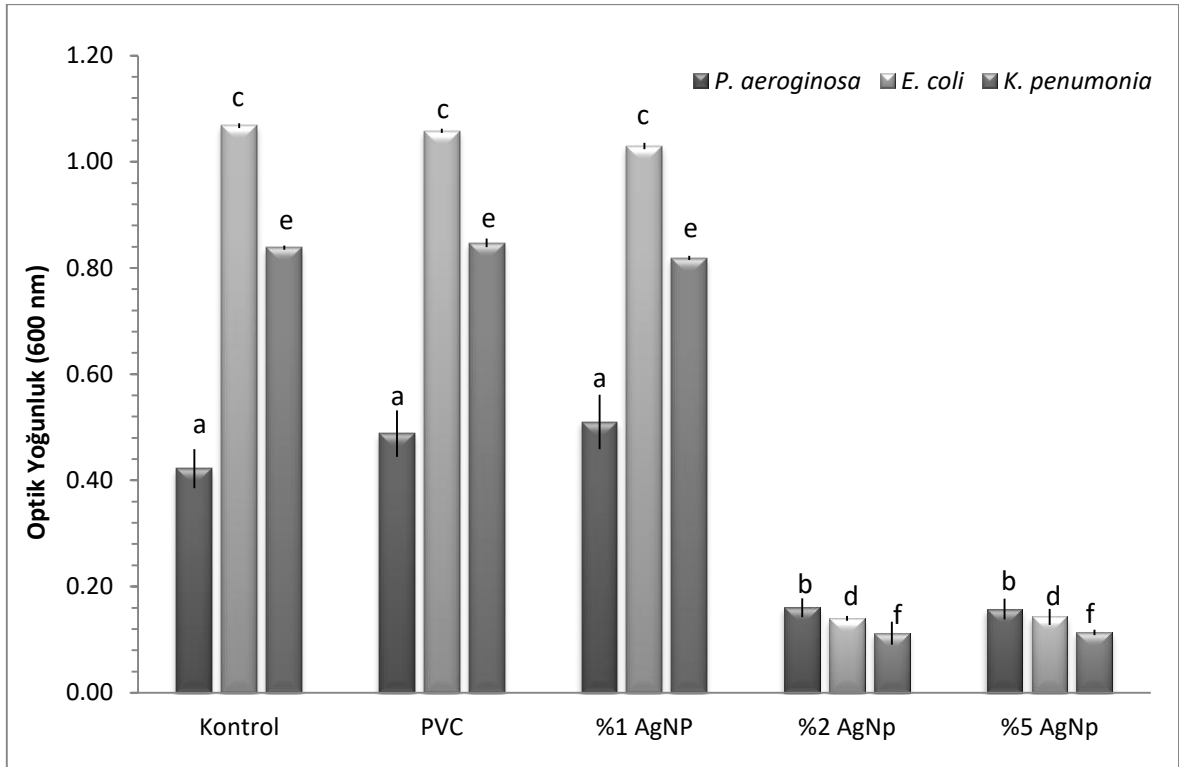
4.2 Yüzeyde Bakteri Çoğalmalarının Karşılaştırılması

Çalışmamızda, kontrol ve kompozit disklerin yüzeylerine inoküle edilen bakterilerin 6 ve 24 saatlik inkübasyon sonunda, materyal yüzeyinde çoğalmaları ve çoğalmanın inhibisyonu incelenmiştir.



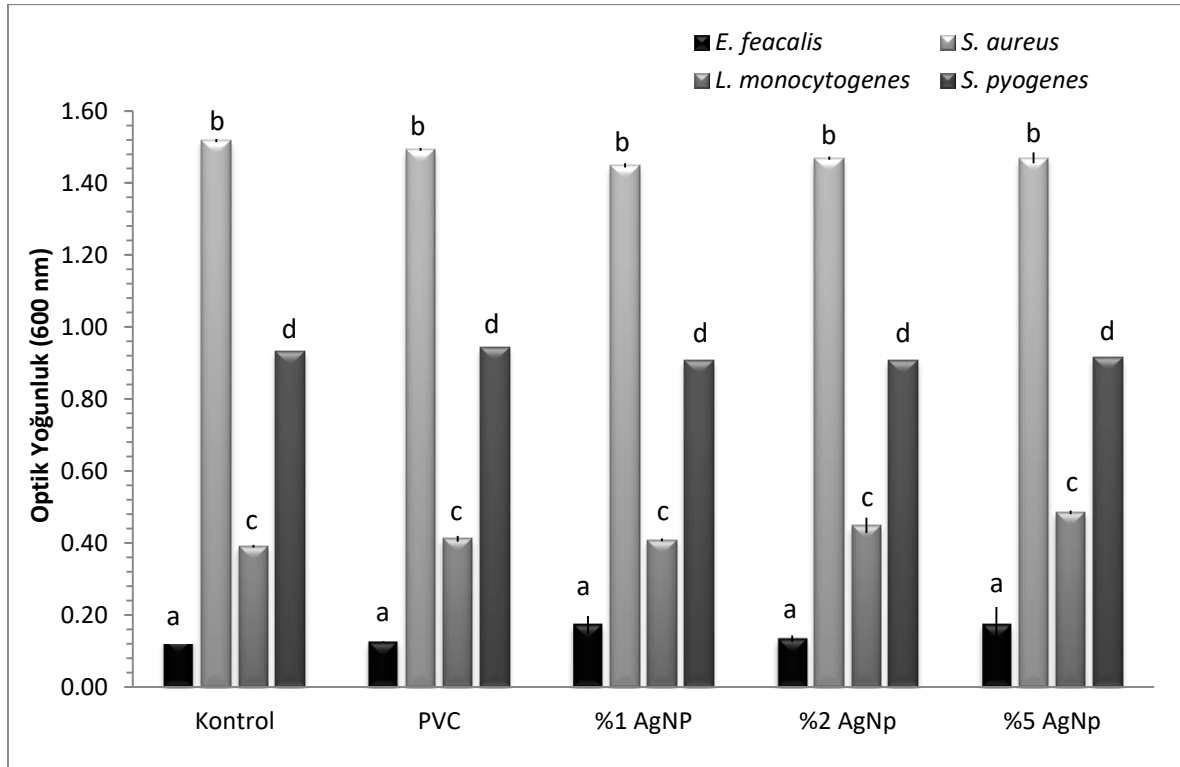
Çizelge 4.1 Disklerin üzerinde kolonize olan gram (-) bakterilerinin 6 saatlik çoğalmalarının karşılaştırılması

Gram (-) bakterilerin 6 saatlik inkübasyon sonunda optik yoğunlukları karşılaştırıldığında (Çizelge 4.1), %2 ve %5 oranında AgNP ile hazırlanan kompozitlerin üzerinde *P. aeruginosa* çoğalmasının PVC kontrolüne ve hücre kontrolüne göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$). %1 oranında hazırlanan kompozitin üzerindeki çoğalmanın hücre kontrolüne göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0,05$), ancak, farklı kompozitler üzerindeki çoğalmalarda fark olmadığı belirlenmiştir. *E. coli* ve *K. pneumoniae* ile elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, hazırlanan disk yüzeylerindeki çoğalmalarda 6 saat sonunda anlamlı değişiklik olmamıştır.



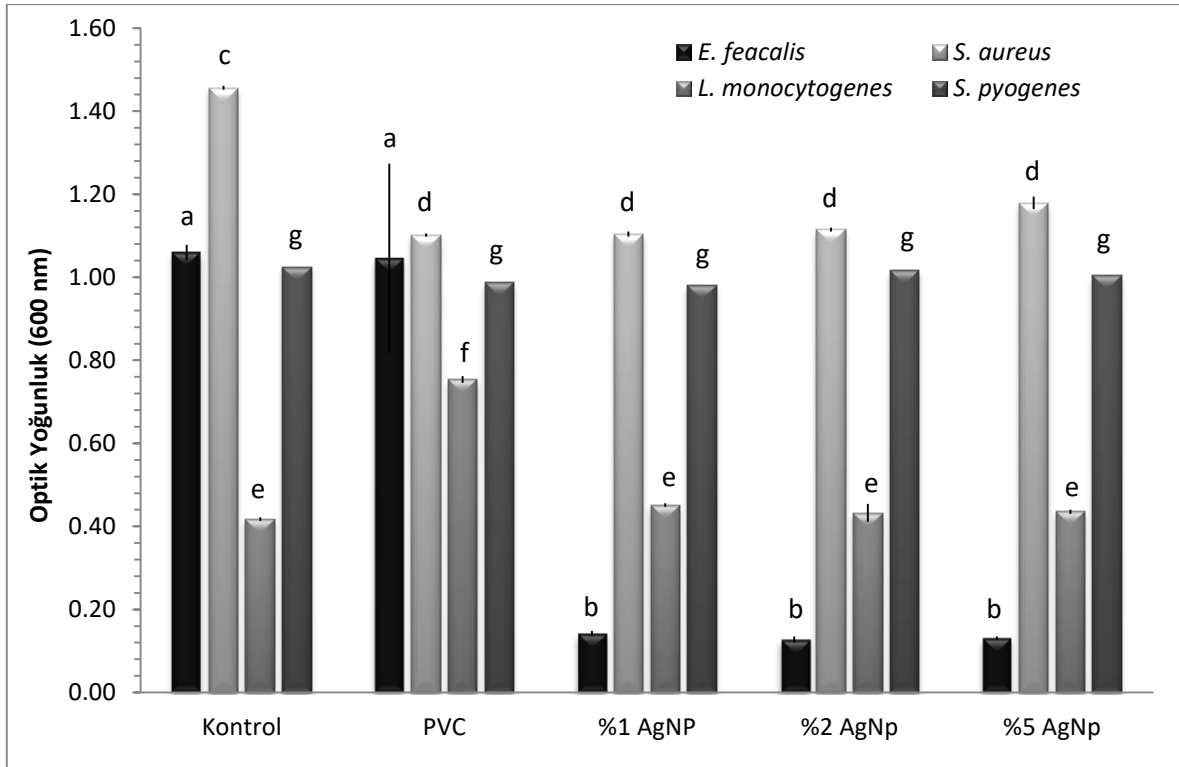
Çizelge 4.2 Disklerin üzerinde kolonize olan gram (-) bakterilerin 24 saatlik büyümelerin karşılaştırılması

Gram (-) bakterilerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda optik yoğunlukları karşılaştırıldığında (Çizelge 4. 2), %2 ve %5 oranında AgNp ile hazırlanan kompozitlerin üzerinde, üç suşun çoğalmasının PVC kontrolüne ve hücre kontrolüne göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). %1 oranında AgNp ile hazırlanan kompozitin üzerindeki çoğalmalarda PVC kontrolüne ve hücre kontrolüne göre değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Kompozitlerin kendi aralarındaki karşılaştırmalarında, %2 ve %5 oranında AgNp ile hazırlanan kompozitler üzerindeki suşların çoğalmasının %1 oranında AgNp ile hazırlanan kompozite göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$).



Çizelge 4.3 Disklerin üzerinde kolonize olan gram (+) bakterilerin 6 saatlik büyümelerin karşılaştırılması

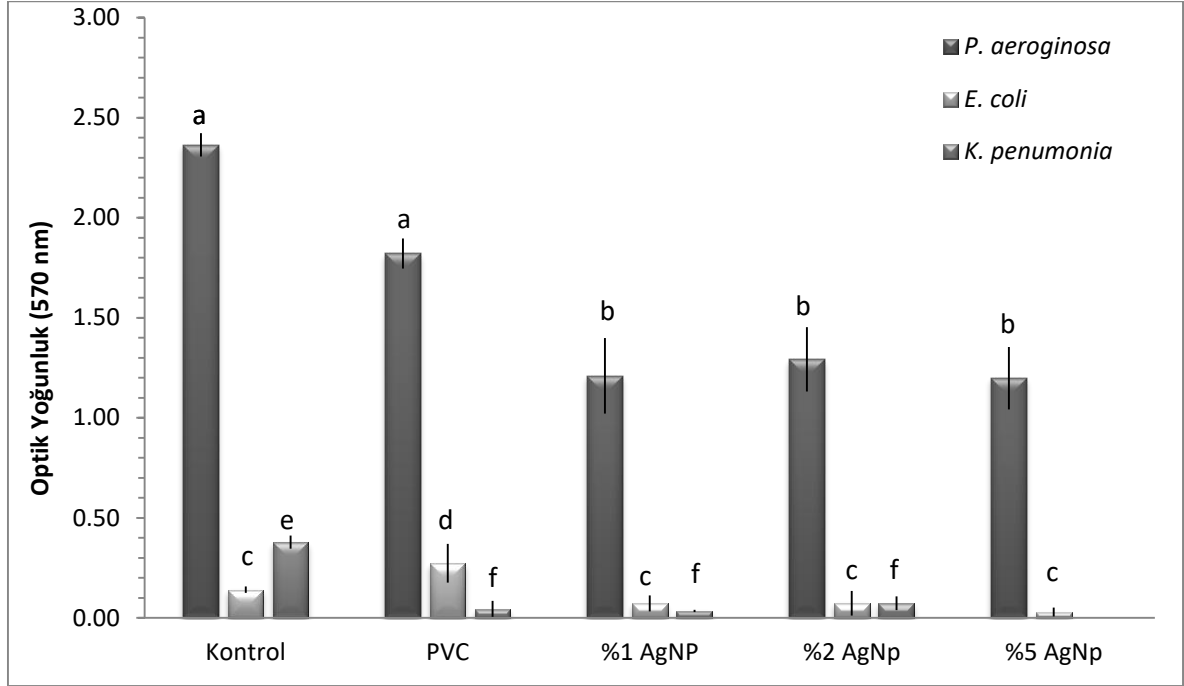
Gram (+) bakterilerin 6 saatlik inkübasyonu sonunda optik yoğunlukları karşılaştırıldığında (Çizelge 4.3), dört bakteri için %1,%2 ve %5 oranında AgNP ile hazırlanan kompozitler üzerindeki kolonizasyonda değişiklik olmamıştır.



Çizelge 4.4 Disklerin üzerinde kolonize olan gram (+) bakterilerin 24 saatlik büyümelerin karşılaştırılması

Gram (+) bakterilerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda optik yoğunlukları karşılaştırıldığında (Çizelge 4.4), %1, %2 ve %5 oranında AgNP ile hazırlanan kompozitlerin üzerinde *E. faecalis* çoğalmasının PVC kontrolüne ve hücre kontrolüne göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). AgNP ile hazırlanan farklı oranlardaki kompozitlerin üzerindeki *S. aureus* çoğalmasında hücre kontrolüne göre anlamlı bir azalma varken ($p<0,05$), PVC kontrole göre bir değişiklik olmamıştır. *L. monocytogenes* çoğalmasının, PVC kontrolüne göre anlamlı olarak azalırken ($p<0,05$), hücre kontrolüne göre değişmediği belirlenmiştir. %1, %2 ve %5 oranında AgNP ile hazırlanan kompozitlerin üzerinde *S. pyogenes* çoğalmasında değişiklik olmadığını tespit ettik. AgNP ile hazırlanan kompozitlerin yüzeyindeki çoğalmalar karşılaştırıldığında, artan gümüş konsantrasyonunun dört bakterinin yüzey üzerindeki çoğalmasına etkisi olmadığı belirlenmemiştir ($p<0,05$).

4.3 Biyofilm Oluşumunun Engellenmesi

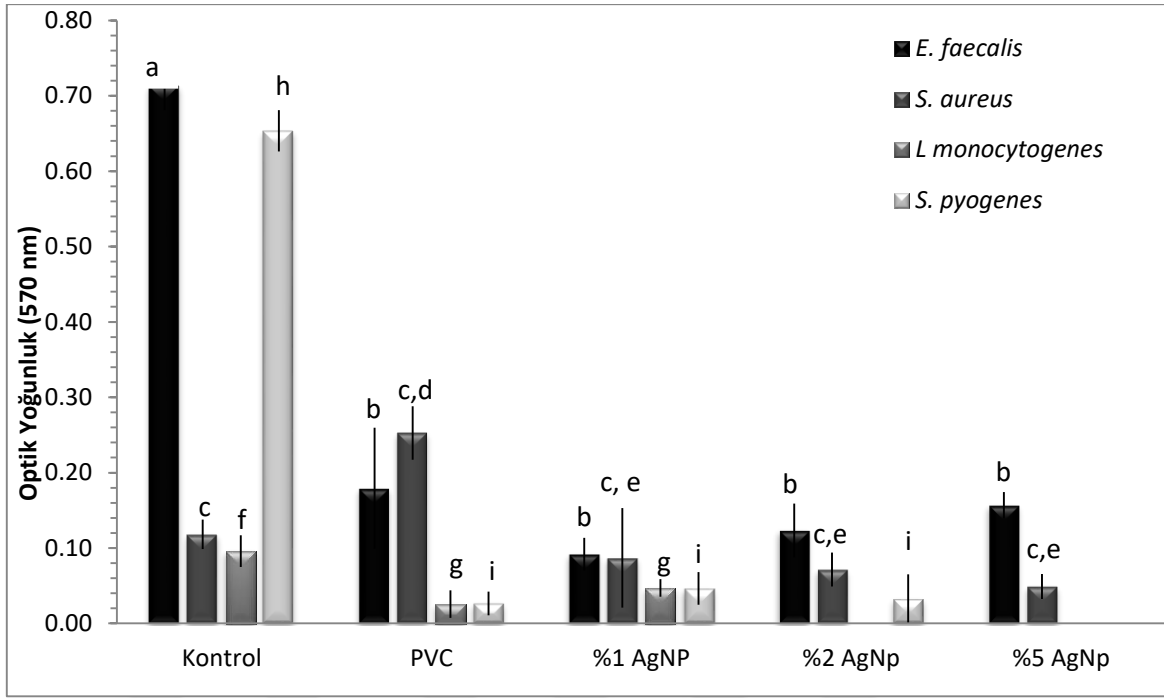


Çizelge 4.5 Gram (-) bakterilerin biyofilm sonuçları

Gram (-) bakterilerin kompozit materyallerin üzerindeki biyofilm oluşum sonuçları değerlendirildiğimizde (Çizelge 4.5); farklı oranlarda AgNP ile hazırlanan kompozitlerin (%1, %2, %5) üzerindeki *P. aeruginosa* biyofilm oluşumunun PVC ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0,05$), kendi aralarında ise anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Farklı oranlarda AgNP ile hazırlanan kompozitlerin (%1, %2, %5) üzerindeki *E. coli* biyofilm oluşumunun PVC kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,05$).

%5 oranında AgNP ile hazırlanan kompozit üzerindeki *K. pneumoniae* biyofilm oluşumunun tamamen engellendiği belirlenmiştir. %1 ve %2 oranında AgNP ile hazırlanan kompozitlerin üzerindeki biyofilm oluşumu ise hücre kontrolüne göre anlamlı olarak azalırken ($p < 0,05$) PVC kontrol ile karşılaştırıldığında değişim olmadığı tespit edilmiştir.



Çizelge 4.6 Gram (+) bakterilerin biyofilm sonuçları

Gram (+) bakterilerin kompozit materyallerin üzerindeki biyofilm oluşumlarını değerlendirdiğimizde (Çizelge 4.6); AgNp ile hazırlanan kompozitlerin üzerindeki *E. faecalis* biyofilm oluşumu hücre kontrolü ile karşılaştırıldığında tüm kompozit materyallerde azalmıştır ($p<0,05$). PVC kontrolle karşılaştırıldığında ise değişim saptanmamıştır. Kompozit materyaller üzerindeki *S. aureus* biyofilm oluşumu hücre kontrolüne göre azalmıştır ($p<0,05$).

L. monocytogenes biyofilm oluşumunun %2 ve %5 oranında AgNp ile hazırlanan kompozitlerde tamamıyla engellendiği belirlenmiştir. %1 oranında AgNp ile hazırlanan kompozitte ise, hücre kontrolüne göre azalmanın anlamlı olduğu, PVC kontrole göre anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

S. pyogenes biyofilm oluşumunun %5 oranında AgNp ile hazırlanan kompozitin üzerinde tamamıyla engellendiği tespit edilmiştir. %1 ve %2 oranında AgNp ile hazırlanan kompozit üzerindeki biyofilm oluşumunun hücre kontrolüne göre anlamlı olarak azalmış, ancak, PVC kontrole göre değişmediği bulunmuştur ($p<0,05$).

5. TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan PVC kontrolü ve farklı oranlardaki kompozitler Biyomedikal Mühendisliği Bölümü araştırma laboratuvarında hazırlandı. Materyallerin sterilizasyonu, besiyeri ve kültür hazırlama işlemleri ile antibakteriyel, antibiyofilm ve yüzeylerdeki bakteri çoğalma analizleri Transplantasyon ve Gen bilimleri Enstitüsü laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma aşamaları çevresel faktörleri sabit tutmak ve kontaminasyonu engellemek amacıyla güvenlik kabini içerisinde kişisel koruyucu ekipmanlar kullanılarak gerçekleştirildi.

PVC'nin yüzey kolonizasyonunu artırdığı literatürdeki çalışmalarda mevcuttur [63]. PVC biyomalzemelerin biyoyumluluğunu artırmak ve tıbbi cihazlar kaynaklı enfeksiyonu engellemek için. Antibakteriyel PVC biyomalzemelerin üretimi ve uygulamaları her geçen gün artmaktadır. Çalışmamızda belirli ağırlık oranlarıyla (%1, %2, %5) hazırlanan AgNp-PVC kompozitlerinin, vücut sistemlerinde (solunum, sindirim gibi) kullanılan PVC biyomalzemelerde ve tıbbi cihazlarda kontaminasyona neden olabilecek ve hastane enfeksiyonları için önemli enfeksiyöz suşlara karşı antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

PVC biyomalzemelerle yapılan antibakteriyel çalışmalarda, farklı oranlarda hazırlanan (%10, %20) Silverzeolite (SZ)-PVC kompozitinin antibakteriyel etkisi *E.coli* ve *Staphylococcus epidermidis* üzerinde test edilmiş ve %20 oranında SZ ile hazırlanan kompozitin antibakteriyel etkisinin %10 oranında SZ ile hazırlanan kompozite göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da farklı oranlarda hazırlanan AgNp-PVC kompozitinin antibakteriyel ve antibiyofilm özellikleri, özellikle %2 ve %5 oranında AgNP içeren kompozitlerde daha etkili olmuştur. Başka bir çalışmada tıbbi cihazlar için kullanılacak PVC yüzeyinin oksijen plazma işlemi ile hidrofilik bir yüzey haline getirilmiş ve *P. Aeruginosa*'nın yüzeydeki kolonizasyonu %70 oranında azalmış olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda da *P. aeruginosa* ile yaptığımız yüzey kolonizasyonu ve biyofilm deneylerinde etkili bir inhibisyon tespit ettik. Bu bağlamda; PVC'lerin tıbbi kullanımı ile ilgili bilimsel literatürde az sayıda bilgi mevcut olmasına karşın çalışmamızın literatürdeki bu sonuçlarla eş değer olduğunu belirlemiş olduk.

Çalışmamızda disk difüzyon deneylerinde pozitif kontrollerimizde inhibisyon zonu oluşmuşken, AgNp ile hazırlanan kompozit diskler etrafında inhibisyon zonu oluşmamıştır. Bu sonuçlar bize kompozitlerden iyon salınımının olmadığını düşündürmüştür. Bu nedenle, hazırlanan kontrol PVC ve kompozit disk yüzeylerindeki bakteri çoğalmalarının incelenmesine yönelik bir yaklaşım ile çalışmalarımız devam etmiştir.

Literatür araştırması sonucunda gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel etkilerinin hücre tipi, türü ve Gram pozitif/negatif özellikleri ile değişiklik gösterebildiği anlaşılmıştır. Kim ve arkadaşları (2006) AgNP'lerin maya, *E. colive S.aureus*'a karşı antifungal ve antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Bu çalışmada, parçacıklar ile maya ve *E. coli* hücrelerine karşı etikli inhibisyon elde edilmiş; ancak *S.aureus*'un diğerlerine göre daha az etkilendiği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda, materyal yüzeylerindeki bakteri çoğalmaları karşılaştırıldığında gram negatif bakterilerin farklı oranlarda AgNP ile hazırlanan AgNP-PVC kompozitlerin üzerinde gram pozitif bakterilere göre daha az kolonize olduğu belirlenmiştir.

Gram (-) bir bakteri türü olan *P.aeruginosa* dışında diğer bakteri inhibisyonlarında AgNp ile hazırlanan kompozitlerin üzerinde 6 saatlik inkübasyon sonunda anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında ise AgNp'ün yoğun olduğu %2 ve %5 oranlarına sahip kompozitlerde gram (-) suşların çoğalmasının her iki kompozitte de anlamlı olarak azalma mevcuttur. Gram (+) bakterilerde ise AgNp ile hazırlanan tüm kompozitlerin üzerinde *E. faecalis* çoğalmasının anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. *E. faecalis* dışındaki suşlarda anlamlı bir değişiklik yoktur. Ayrıca *L. monocytogenes*'in AgNp ile hazırlanan kompozitlerin üzerinde ki 24 saatlik inkübasyonu sonunda, PVC kontrolünde *L. monocytogenes* kolonizasyonunun gerçekleşmiş olduğu, bu kolonizasyona nispeten kompozitler üzerindeki kolonizasyonunda anlamlı bir azalma olduğu belirlendi.

Çalışmadaki amaç, hazırlanan kontrol materyalinin ve kompozitlerin üzerinde biyofilm oluşumlarının karşılaştırmalı incelenmesiydi. Bu nedenle, çalışmada PVC kontrol ve kompozit diskler bakteriler ile 24 saatlik inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda bakteri fiksasyonu gerçekleştirildi. Bakteri fiksasyonu gerçekleştirilen diskler farklı bir plakaya alındı ve kristal viyole boyaması

gerçekleştirildi. Boyama sonrası optik yoğunlukları spektrofotometrede (570nm) ölçüldü. Biyofilm oluşumu, gram negatif ve gram pozitif suşların kendi aralarında karşılaştırıldı.

Biyofilm oluşum sonuçlarına göre çalışmamızda; kompozitlerin tüm gümüş konsantrasyonlarındagram (-) bakterilerin biyofilm oluşumunu kontrollere göre engellediği belirlenmiştir. Özellikle, %5 oranındaki kompozitin *K. pneumoniae* biyofilm oluşumunda %99 inhibisyona neden olduğu saptandı. Tüm gümüş konsantrasyonları ile hazırlanankompozitlerin Gram (+) bakterilerilerin biyofilm inhibisyonunda kontrollere göre etkin olduğu bulgular arasındadır. Bu sonuçlar arasında, en etkin inhibisyonun *S.pyogenes* ve *L. monocytogenes* biyofilm oluşumunda gerçekleştiği belirlendi. *S. pyogenes* biyofilm oluşumu %5 oranında gümüş ile hazırlanan kompozit yüzeyinde %99 engellendi. Aynı inhibisyon yüzdesi, *L. monocytogenes* ile %2 ve %5 oranında gümüş ile hazırlanan kompozitlerle elde edildi.

Biyofilm ve büyüme sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, her iki parametre açısından da AgNp-PVC kompozitlerinin gram (-) bakterilerde inhibisyona neden olduğu saptandı. Ancak, kompozitlerin gram (+) bakterilerin büyümelerini engellemesine karşın farklı oranlarda ki kompozitlerin üzerindeki biyofilm oluşumunun inhibe olduğu belirlendi.

Gümüş nanopartikül boyutunun küçük olduğu çalışmalarda iyon salınımının daha kolay olduğu ve bu nedenle, antibakteriyel etkinin daha güçlü olacağı tartışılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız np boyutu (<100 nm) büyük boylarda olmasına karşın suşların AgNp ile hazırlan kompozit yüzeylerindeki tutunumunu ve biyofilm oluşumunu engellediği belirlendi.

Literatür taramasında PVC ve AgNp kompozit çalışmalarına rastlanmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasının nanoteknoloji alanında yapılması planlanan ileriki çalışmalar için zemin oluşturacağı ve ayrıca, incelenen bakteri türleri, sayısı ve enfeksiyonları açısından (hastane, üst solunum, sindirim vb gibi) ileriki medikal cihazlara yönelik çalışmalara büyük katkıda bulunacağı kanaatindeyiz.

Çalışmamızda, kompozit filmler istenilen pürüzsüzlükte olmamıştır. Pürüzlü yüzeylerin bakteri tutunmasını ve biyofilm oluşumunu desteklediği

düşünülmektedir. Bu nedenle, yüzeylerdeki pürüzlülük dikkate alındığında tutunumun, kolonizasyonun ve biyofilm oluşumunun engellenmediği gruplarda ileride daha olumlu sonuçlar elde edilebileceği kanısındayız. İleriki çalışmalarda, mekanik presler kullanılarak daha pürüzsüzve homojen yüzeyler elde etmeyi planlıyoruz.



6. KAYNAKLAR

- [1] Zehra G.M. Leyla Ö, Nanoteknolojinin sağlık alanında kullanımı ve hemşirenin sorumlulukları. Anadolu hemşirelik ve sağlık bilimleri dergisi;18:3, 2015.
- [2] Sharifzadeh, M. Nanotechnology Sector Report, Cronus Capital Markets, 1st Quarter, 2006.
- [3] Luther, D.W. International Strategy and Foresight Report on Nanoscience and Nanotechnology, 2006.
- [4] Ramsden, J. Essentials of Nanotechnology, Ventus Publishing Aps, 2009.
- [5] Taniguchi, N. On the basic concept of nanotechnology. in Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, Japan Society of Precision Engineering, 1974.
- [6] K. Eric Drexler, "Molecular Engineering: An Approach to the Development of General Capabilities for Molecular Manipulation", Proceedings of the National Academy for Molecular Manipulation, 78(9): 5275-78, 1981.
- [7] Regan, Lynne, ve William F. DeGrado. "Characterization of a helical protein designed from first principles." Science, (241): 976-78, 1988.
- [8] "IBM" atoms.
http://www.03.ibm.com/ibm/history/exhibits/vintage/vintage_4506VV1003.htm
1.22Aralık 2015, 1990.
- [9] Erkoç, Ş. Nanobilim ve Nanoteknoloji, ODTÜ Yayıncılık, 2007.
- [10] Milburn, C. "Just for Fun: The Playful Image of Nanotechnology", NanoEthics, 5(2): 223-232, 2011.
- [11] Roco, M.C. "International Strategy for Nanotechnology Research", Journal of Nanoparticle Research, 3(5-6): 353-360, 2001.
- [12] Seaton A, Donaldson K. Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. Lancet; 365: 923-4, 2005.
- [13] Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. Br J Pharmacol; 150: 552-8, 2007.
- [14] <http://www.istekpatent.com/haberler.php?ID=25&lang=tr>, 2011.
- [15] Huayu Tian, Zhaohui Tang, Xiuli Zhuang, Xuesi Chen, Xiabin Jing, Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application, Progress in Polymer Science 37:237-280, 2012.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- [16] Jean-Marie Raquez, Youssef Habibi, Marius Murariu, Philippe Dubois, Polylactide (PLA)-based nanocomposites, *Progress in Polymer Science* 38: 1504-1542, 2013.
- [17] Panagiotis Dallas, Virender K. Sharma, Radek Zboril, Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, application and perspectives, *Advances in Colloid and Interface Science* 166: 119-135, 2011.
- [18] Jun Sung Kim, Eunye Kuk, Kyeong Nam Yu, Jong-Ho Kim, Sung Jin Park, Hu Jang Lee, Hyun Kim, Young Kyung Park, Yong Ho Park, Cheol-Yong Hwang, Yong-Kwon Kim, Yoon-Sik Lee, Dae Hong Jeong, Myung-Haing Cho, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3: 95– 101, 2007.
- [19] Rao, C.N.R., Müller, A., Cheetham, A.K. *The Chemistry of Nanomaterials Synthesis, Properties and Applications in 2 Volumes Volume 1*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 761 p., Weinheim, 2004.
- [20] Marie-Christine Daniel and Didier Astruc, Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chem. Rev.* 2004, 104, 293–346, 2004.
- [21] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4: 26-49, 2008.
- [22] Suri, S.S., Fenniri, H., Singh, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J. Occup. Med. Toxicol.*, 2, 16, 2007.
- [23] Narayanan, K.B., Sakthivel, N. Biological Synthesis of Metal Nanoparticles By Microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156, 1-13, 2010.
- [24] Cuenca, A.G., Jiang H., Hochwald S.N., Delano M., Cance W.G., Grobmyer S.R. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer.*, 107, 459-466, 2006.
- [25] Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R., Minaian, S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomed: Nanotechnol. Biol. Med.*, 3, 2, 168-171, 2007.
- [26] Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Donato A, Parrilli M. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydr Res*, 341: 2456 – 2461, 2006.
- [27] Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM. A feeling for the microorganism: structure on a small scale. *Biofilms*, 2006.
- [28] Poulsen LV. Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. Wiss. u. Techn.*, 32 (6): 321-326, 1999.
- [29] Çiftçi Z. Kronik tonsillitte biofilmin rolü, T.C. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2005.
- [30] Arnold JW, Silvers S, Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation, *Poul Sci*, 79: 1215-1221, 2000.
- [31] Lindsay D, Brözel VS, Mostert JF, Von Holy A. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate *J Appl Microbiol* 92: 352 – 361, 2002.
- [32] Ölmez, Z. Süt sanayisinde biyofilm Oluşturan mikroorganizmalar ve biyofilm oluşumunun önlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2009.
- [33] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms : Survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiol*, 15 (2): 167-193, 2002.
- [34] Allison DG. The biyofilm matrix. *Biofouling*, 19 (2): 139-150, 2003.
- [35] Kives J, Orgaz B, SanJos'e C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids Surfaces B*, 52: 123–127, 2006
- [36] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 49: 711-745, 1995.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- [37] Özer K. Ecem A. Biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilmlerin gıda güvenliğine etkisi. Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi / Journal of Food and Feed Science - Technology 14:42-51, 2014
- [38] Su HL, Chou CC, Hung DJ, Lin SH, Pao IC, Lin JH, Huang FL, Dong RX, Lin JJ, The disruption of bacterial membrane integrity through ROS generation induced by nanohybrids of silver and clay. Biomaterials 30:5979–5987, 2009
- [39] Lindsay D, Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. J Hosp Infect, 1-13, 2006.
- [40] Augustin, M., Ali-Vehmas, T., & Atroshi, F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences: a Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques, 7(1), 55-64, 2004.
- [41] Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30(6), 327-356, 2003.
- [42] Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities, 2003.
- [43] Donlan, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases, 8(9), 881-890, 2002.
- [44] Pal S, Tak YK, Song JM, Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 73:1712–1720, 2007.
- [45] Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. Annual Review of Microbiology, 56, 187-209, 2002.
- [46] Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. Bacteriology, 184(4), 1140-1154, 2002.
- [47] O'Toole, G. A., & Kaplan, H. B. Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology, 49-79, 2000.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- [48] Gerke, C., Kraft, A., Süßmuth, R., Schweitzer, O., & Götz, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18586-18593, 1998.
- [49] Liya Guo, Weiyong Yuan, Zhisong Lu, Chang Ming Li, Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial application, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 439: 69-83, 2013.
- [50] Marcos Marques da Silva Paula, César Vitorio Franco, Mario César Baldin, Larissa Rodrigues, Tatiana Barichello, Geovana Dagostim Savi, Luiz Felipe Bellato, Márcio Antônio Fiori, Luciano da Silva, Synthesis, characterization and antibacterial activity studies of poly-{styrene-acrylic acid} with silver nanoparticles, *Materials Science and Engineering C* 29: 647-650, 2009.
- [51] Choi O, Deng KK, Kim NJ, Ross L Jr, Surampalli RY, Hu Z, The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res* 42:3066–3074, 2008.
- [52] Li WR, Xie XB, Shi QS, Zeng HY, OU-Yang YS, Chen YB, Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1115-1122, 2010.
- [53] Merve Sile-Yüksel, Bahar Tas, Derya Y.Köseoğlu-İmer, İsmail Koyuncu, Effect os silver nanoparticle(AgNp) location in nanocomposite membrane matrix fabricated with different polyme type on antibacterial mechanism, *Desalination* 347: 120-130, 2014.
- [54] Soo-Hwan K, Lee HS, Ryu DS, Choi SJ, Lee DS, Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39(1): 77–85, 2011.
- [55] Paula A. Zapata, Laura Tamayo, Maritza Paez, Enrique Cerda, Ignacio Azocar, Franco M. Rabagliati, Nanocomposites based on polyethylene and nanosilver particles produced by metallocenic “in situ” polymerization: synthesis, characterization, and antimicrobial behavior, *European Polymer Journal* 47: 1541-1549, 2011.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- [56] L.A. Tamayo, P.A.Zapata, N.D.Vejar, M.I.Azócar, M.A.Gulppi, X.Zhouc, G.E. Thompsonc, F.M. Rabagliati, M.A. Páez, Release of silver and copper nanoparticles from polyethylene nanocomposites and their penetration into *Listeria monocytogenes*, *Materials Science and Engineering C* 40: 24-31, 2014
- [57] Radhesh Kumar, Helmut Münstedt, Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites, *Biomaterials* 26: 2081-2088, 2005.
- [58] Kevser Ö. Sitrik asit esaslı biyobozunur polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu, Yalova Üniversitesi/ Fen bilimleri Enstitüsü, Yalova, 2013.
- [59] Mehmet Y. Süperkritik akışkan ortamında kopolimerizasyon, Ankara Üniversitesi/ Fen bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2009.
- [60] J. Mayer, E. Karamuk, T. Akaike, E. Wintermantel "Matrices for tissue engineering-scaffold structure for a bioartificial liver support system" *Journal of Controlled Release* 64, 81-90, 2000.
- [61] Prof. Dr. Fevzi Köksal, Doç. Dr. Rahmi Köseoğlu, Nanobilim ve Nanoteknoloji, Nobel Yayıncılık, 2014.
- [62] Daniela Zampino, Tiziana Ferreri, Concetto Puglisi Monique Mancuso, Renata Zacccone, Roberto Scaffaro, Danila Bennardo. PVC silver zeolite composites with antimicrobial properties; *J Mater Sci* 46: 6734– 6743, 2011
- [63] Triandafillu K, Balazs DJ, Aronsson BO, et al. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to untreated and oxygen-plasma treated poly (vinyl chloride) (PVC) from endotracheal intubation devices. *Biomaterials*; 24: 1507-18, 2003
- [64] Yıldız Özalp, Nurtan Özdemir, Biyomateryaller ve Biyouyumluluk, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmöstik Teknoloji Anabilim Dalı
- [65] Sevcan Atay, Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEPH) in medical devices, *The journal of Pediatric Research*; 1(3):113-7, 2014